

ESCUELA UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ.

POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA.

GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y AGROAMBIENTAL



EFFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS CON *azotobacter chroococcum* SOBRE EL DESARROLLO Y PRODUCCIÓN DE LECHUGAS Y ESCAROLAS EN CULTIVO ECOLÓGICO Y TRADICIONAL.

TRABAJO FIN DE GRADO

Septiembre-2015

Autor: Víctor Ato Sánchez

Tutores: María Asunción Amorós Marco

María Soledad Almansa Pascual de Riquelme

Efectos de los tratamientos con *Azotobacter chroococcum* sobre el desarrollo y producción de lechugas y escarolas en cultivo ecológico y tradicional

Effects of treatment with *Azotobacter chroococcum* on the development and production of lettuce and endive in organic farming and traditional

RESUMEN

En este trabajo se ha caracterizado la cepa 4103 de *Azotobacter chroococcum*, presentando una capacidad de síntesis de compuestos auxínicos media-alta, una capacidad de síntesis de compuestos tipo giberelinas muy alta y una capacidad negativa de solubilización de fosfatos insolubles. Posteriormente se han tratado semillas de lechuga y escarola con dos concentraciones de esta bacteria, 10^6 y 10^7 UFC/ml de medio de cultivo. Estos tratamientos provocaron un incremento en el porcentaje de germinación sólo en escarolas. Las plántulas tratadas produjeron un incremento del peso fresco total, que fue proporcional al incremento del peso y longitud de la parte aérea. El tratamiento bacteriano no modificó el contenido en clorofilas de las plántulas tratadas en ningún caso. Después las plántulas tratadas se plantaron en suelos ecológicos y no ecológicos. Las lechugas y escarolas tratadas no han presentado diferencias significativas en cuanto a la producción y peso fresco, a excepción de las escarolas cultivadas en suelos ecológicos y a la menor concentración de *A. chroococcum* tratadas. Sin embargo, todos los tratamientos han incrementado el contenido proteico de todas las lechugas y escarolas. El porcentaje de humedad ha disminuido en todas las plantas tratadas.

ABSTRACT

In this work the characterization of strain 4103 of *Azotobacter chroococcum* was evaluated. This bacterium presents a medium-high synthesis of auxinic compounds, a high synthesis of compounds gibberellins and a negative capacity of solubilisation of insoluble phosphates. Subsequently lettuce and endive seeds have been treated with two concentrations of this bacterium: 10^6 and 10^7 CFU / ml of culture medium. These treatments caused an increase in the percentage of germination only in endive. The treated seedlings produced an increase in the total fresh weight that was proportional to the increase in weight and length of the aerial part. The bacterial treatment did not change the chlorophyll content of seedlings treated under any circumstances. The treated seedlings were planted in organic and non-organic soils. Lettuce and endive treated have not shown significant differences in the production and fresh weight, except endives grown in organic soils and lowest concentration of *A. chroococcum*. However, all treatments have increased the protein content of all lettuce and endive. The moisture content decreased in all treated plants.

Palabras clave: diazótrofo, *Azotobacter chroococcum*, auxinas, giberelinas, lechuga, escarola, proteínas, clorofilas

Keywords: diazotroph, *Azotobacter chroococcum*, auxins, gibberellins, lettuce, endive, proteins, chlorophylls

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar las gracias a todas las personas que han formado parte de este proyecto:

A Manuel Valero Roche por todo su esfuerzo, entusiasmo y tiempo dedicado en las tareas de microbiología, que sin él no hubiéramos podido realizar.

A María Soledad Pascual de Riquelme por formar parte de este trabajo, por ayudarnos en todo momento con los análisis y determinaciones, por gastar tu tiempo que no tenías, por entenderme en mis momentos malos, con mis agobios y mis historias. Mil gracias.

A Adrián Grau Sánchez por estar al cuidado del cultivo y estar siempre en plena disposición para ayudarnos.

A Santiago García Martínez por ayudarnos en todo lo que se le proponía, con las tareas del semillero, trasplante,... Muchísimas gracias Santi

A mi hermana Marisa por ayudarme en uno de los días más duros, cargando con las cajas de lechugas para arriba y para abajo, en el laboratorio, en la limpieza y en todo lo que hubiera surgido, estoy seguro.

Y como no, a María Asunción Amorós Marco, por dar el cien por cien en todo momento, por aguantarme día sí y día también, por tu profesionalidad a la hora de hacer las cosas, de intentar hacerlo siempre lo mejor posible, siempre encontrando soluciones a todo, por hacer parte del trabajo que yo tenía que haber hecho, eres una excelentísima persona y excelentísima profesional. Muchísimas gracias por haber empleado todo este tiempo, que ha sido mucho en este trabajo. Este trabajo hubiera sido imposible realizarlo sin ti.

Gracias por haber estado siempre ahí, Te agradezco de corazón toda la dedicación y el empeño que le has puesto a este trabajo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. EL CULTIVO DE LA LECHUGA.....	1
1.1.1. ORIGEN.....	1
1.1.2. TAXONOMÍA Y MORFOLOGÍA.....	1
1.1.3. VARIEDADES MÁS CULTIVADAS.....	2
1.1.4. VALOR NUTRICIONAL.....	7
1.1.5. REQUERIMIENTOS EDAFOCLIMÁTICOS.....	7
1.1.5.1. TEMPERATURA.....	7
1.1.5.2. SUELO.....	8
1.1.5.3. HUMEDAD RELATIVA.....	8
1.1.5.4. pH.....	9
1.1.5.5. SALINIDAD.....	9
1.1.6. PARTICULARIDADES DEL CULTIVO.....	5
1.1.6.1. RIEGO.....	9
1.1.6.2. ABONADO.....	10
1.1.7. MALAS HIERBAS, PLAGAS, ENFERMEDADES Y FISIOPATÍAS.....	11
1.1.7.1. MALAS HIERBAS.....	11
1.1.7.2. PLAGAS.....	11
1.1.7.3. ENFERMEDADES.....	14
1.1.7.4. FISIOPATÍAS.....	17
1.1.8. ALMACENAMIENTO.....	23
1.1.9. GENÉTICA.....	24
1.2. EL CULTIVO DE LA ESCAROLA.....	13
1.2.1. ORIGEN.....	24
1.2.2. TAXONOMÍA Y MORFOLOGÍA.....	25
1.2.3. VARIEDADES MÁS CULTIVADAS.....	25
1.2.4. REQUERIMIENTOS EDAFOCLIMÁTICOS.....	27
1.2.4.1. TEMPERATURA.....	28
1.2.4.2. HUMEDAD.....	28
1.2.4.3. SUELO.....	28
1.2.5. PARTICULARIDADES DEL CULTIVO.....	28
1.2.5.1. RIEGO.....	29
1.2.5.2. ABONADO.....	29
1.2.5.3. BLANQUEO.....	30

1.2.6. PLAGAS, ENFERMEDADES Y FISIOPATÍAS.....	31
1.2.6.1. PLAGAS.....	31
1.2.6.2. ENFERMEDADES.....	31
1.2.6.3. FISIOPATÍAS.....	32
1.2.7. GENÉTICA.....	33
1.3. IMPORTANCIA ECONÓMICA.....	33
1.3.1. IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LA LECHUGA A NIVEL NACIONAL.....	33
1.3.2. IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LA ESCAROLA A NIVEL NACIONAL.....	38
1.4. AZOTOBACTERIAS.....	42
1.4.1. INTRODUCCIÓN.....	42
1.4.2. ORGANISMOS FIJADORES DE NITRÓGENO.....	45
1.4.3. EL NITRÓGENO Y SU FIJACIÓN.....	45
1.4.4. FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO. LA NITROGENASA.....	46
1.4.5. EFECTO DEL AZOTOBACTER SOBRE EL RENDIMIENTO DE LAS PLANTAS.....	48
1.4.5.1. PRODUCCIÓN DE FITOHORMONAS Y EFECTO ESTIMULANTE.....	49
1.4.6. PERSPECTIVAS DEL USO DEL AZOTOBACTER EN LA AGRICULTURA.....	51
2. OBJETIVOS.....	53
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
3.1. MATERIAL VEGETAL.....	55
3.2. AZOTOBACTER CHROOCOCCUM.....	55
3.3. DISEÑO DEL EXPERIMENTO.....	55
3.3.1. RECUPERACIÓN DEL CULTIVO LIOFILIZADO.....	56
3.3.2. DISEÑO DEL EXPERIMENTO EN SEMILLERO.....	57
3.3.3. ENSAYOS DE LECHUGA Y ESCAROLA EN NO ECOLÓGICO.....	59
3.3.3.1. MARCO DE PLANTACIÓN.....	59
3.3.3.2. RIEGO Y FERTIRRIGACIÓN.....	60
3.3.3.3. TRATAMIENTOS FITOSANITARIOS.....	61
3.3.4. ENSAYOS DE LECHUGA Y ESCAROLA EN ECOLÓGICO.....	62
3.3.4.1. MARCO DE PLANTACIÓN.....	62
3.3.4.2. RIEGO Y FERTIRRIGACIÓN.....	63
3.3.4.3. TRATAMIENTOS FITOSANITARIOS.....	63
3.4. PLAN DE TRABAJO.....	64
3.5. CULTIVO DE AZOTOBACTER.....	67
3.5.1. INVESTIGACIÓN Y RECUENTO.....	67

3.5.2. DETERMINACIÓN DE AIA.....	67
3.5.3. DETERMINACIONES DE GIBERELINAS.....	69
3.5.4 DETERMINACIONES DE LA SOLUBILIZACIÓN DE PO_4^-	69
3.6. DETERMINACIONES DE LAS PLÁNTULAS DE LECHUGAS Y ESCAROLAS.....	61
3.6.1. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE GERMINACIÓN.....	72
3.6.2. DETERMINACIONES DE PESO.....	73
3.6.3. DETERMINACIONES DE LONGITUD.....	73
3.6.4. DETERMINACIONES DEL CONTENIDO EN CLOROFILAS.....	74
3.7 DETERMINACIONES ANALÍTICAS DE PARÁMETROS FÍSICOS DE LAS LECHUGAS Y ESCAROLAS.....	75
3.7.1. DETERMINACIONES DE PESO.....	75
3.7.2. DETERMINACIONES DE LONGITUD Y DIÁMETRO.....	73
.....3.7.3. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.....	76
3.7.4 DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD.....	78
3.8. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....	78
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	79
4.1. PRODUCCIÓN DE AIA DEL AZOTOBACTER.....	79
4.1.1. INVESTIGACIÓN Y RECUENTO DE AZOTOBACTERCHROOCOCCUM.....	79
4.2. CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE FITOHORMONAS.....	84
4.2.1. CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE AIA	84
4.2.2. CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO GIBERÉLICO	86
4.2.3. CAPACIDAD DE SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS INSOLUBLES.....	87
4.3. EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LAS PLÁNTULAS EN SEMILLERO.....	88
4.3.1. PORCENTAJE DE GERMINACIÓN.....	88
4.3.2. NÚMERO DE HOJAS.....	89
4.3.3. PESO TOTAL.....	90
4.3.4. PESO PARTE AÉREA.....	91
4.3.5. PESO PARTE RADICULAR.....	92
4.3.6. LONGITUD PARTE AÉREA	94
4.3.7. LONGITUD PARTE RADICULAR	94
4.3.8. CLOROFILA a	95
4.3.9. CLOROFILA b	92
4.3.10. CLOROFILAS TOTALES	97
4.4. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LOS PARÁMETROS FÍSICOS DE LA PLANTA.....	90

4.4.1. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LA PRODUCCIÓN TOTAL.....	94
4.4.2. PESO	101
4.4.3. LONGITUD....	103
4.4.4. PROTEÍNAS TOTALES	105
4.4.5. PORCENTAJE DE HUMEDAD.....	107

5.CONCLUSIONES.....	109
----------------------------	------------

6.BIBLIOGRAFÍA.....	111
----------------------------	------------





INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL CULTIVO DE LA LECHUGA

1.1.1. ORIGEN

El origen de la lechuga no parece estar muy claro. Aunque algunos autores afirman que procede de la India, hoy día los botánicos no se ponen de acuerdo, por existir un seguro antecesor de la lechuga, *Lactuca scariola* L., que se encuentra en estado silvestre en la mayor parte de las zonas templadas, siendo las variedades cultivadas actualmente una hibridación entre especies distintas.

El cultivo de la lechuga se remonta a una antigüedad de 2.500 años, siendo conocida por griegos y romanos. Las primeras lechugas de las que se tiene referencia son las de hoja suelta, aunque las acogolladas eran conocidas en Europa en el siglo XVI (Mallar, 1978).

1.1.2. TAXONOMÍA Y MORFOLOGÍA

La clasificación taxonómica de la lechuga se encuentra en la tabla I.

Tabla I: Clasificación taxonómica

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Asterales
Familia:	Asteraceae
Subfamilia:	Cichorioideae
Tribu:	Lactuceae
Género:	<i>Lactuca</i>
Especie:	<i>Lactuca sativa</i> L.

La lechuga es una planta anual y autógama,. Sus características morfológicas son las siguientes:

RAIZ

La raíz, que no llega nunca a sobrepasar los 25 cm de profundidad, es pivotante, corta y con ramificaciones.

HOJAS

Las hojas están colocadas en roseta, desplegadas al principio; en unos casos siguen así durante todo su desarrollo (variedades romanas), y en otros se acogollan más tarde. El borde de los limbos puede ser liso, ondulado o aserrado.

TALLO

Es cilíndrico y ramificado.

INFLORESCENCIA

Son capítulos florales amarillos dispuestos en racimos o corimbos.

SEMILLAS

Están provistas de un vilano plumoso

1.1.3. VARIEDADES MÁS CULTIVADAS

La lechuga *Romana* (fotografía 1) queda englobada dentro de la variedad botánica *L. sativa var. Longifolia Lam.*, son lechugas que no forman un verdadero cogollo. La hoja es de forma aovada u oblonga, con bordes enteros y nervio central muy ancho (Maroto, 1995). Las variedades más conocidas dentro del tipo *Romana* son (Maroto et al., 2000):



Fotografía 1: Lechuga romana

VALLADOLID

Se adapta bien para recolecciones en el periodo invernal por su buena resistencia a las bajas temperaturas, dando piezas de 1 kg de peso medio, compactas y que arpeollan muy bien. Generalmente las variedades son de color verde oscuro, ligeramente abullonadas, de hojas brillantes, borde entero, el cogollo cierra bien. Existen variedades de color claro.

INVERNA

Las piezas son más voluminosas, de color verde claro, de hoja ancha, fina y borde ligeramente dentado, algo abullonadas, generalmente de peor compacidad que las tipo Valladolid y aunque arpeollan bien en su fecha de cultivo, lo suelen hacer peor que las variedades del tipo anterior, Las variedades existentes se adaptan a recolecciones otoñales, primaverales y algunas selecciones en período estival, debido a su resistencia al espigado y al «Tipburn». Cultivadas para recolectar en invierno, alargan excesivamente el ciclo y arpeollan muy mal.

PARRISH ISLAND O COS

Dentro de este grupo se encuentran variedades de color verde intenso, con hoja muy abullonada, de borde entero, textura coriácea, crujiente, hoja gruesa, hojas externas planas no recurvadas hacia abajo, muy buen arpeollado, de tamaño inferior a los tipos anteriores y con selecciones que pueden funcionar bien para recolecciones otoñales y primaverales. En 1998 aparecieron las variedades *Donatus* y *Remus* que son resistentes a 16 razas de *Bremia lactucae*.

ROMANA DEL PRAT, LARGA VERDE CLAROS

Son lechugas de hoja más estrecha, fina, color verde intenso, con borde liso, abullonado pequeño, de buen tamaño, que arpeollan muy mal y generalmente requieren de atado. Este tipo es apreciado por los consumidores debido a su buen sabor y textura. Existen algunas variedades que se puede englobar dentro de este tipo y que no requiere de atado, como es *Francesca Oreja de mulo*. Es una lechuga que sus hojas presentan coloraciones rojizas.

Otra de las variedades es la cervantes RZ que es la que utilizamos para nuestro experimento:

CERVANTES RZ

De color claro y vigor medio-alto, muy buena formación del corazón y muy buena base (fotografía 2), buen comportamiento frente al Tip Burn, al espiralizado (twisting) y emisión de dobles cabezas y de subida a flor muy lenta. Variedad válida para pieza entera y embolsado de corazones, recomendada para recolecciones de primavera, verano y otoño según zonas.



Fotografía 2: Cultivo de lechuga romana variedad Cervantes RZ

MINIRROMANA

Parecida a la anterior pero de calibre uniforme y más reducido, de unos 18-20 cm de altura y un peso de 250-450 g. Puede considerarse de tamaño ideal para una ensalada familiar. Su aspecto es muy atractivo cuando se presenta enfundada en plástico (over-wrap). La variedad más cultivada de esta modalidad es *Lincol* (Fotografía 3).



Fotografía 3: Variedad
miniromana

LITTLE GEM O COGOLLITOS

Son lechugas que tienen también la hoja alargada y forman un cogollo compacto de 10-15 cm de longitud y 8-10 cm de diámetro (fotografía 4). Se han hecho muy populares tanto en el mercado nacional como para exportación. De la variedad *Little gem* hay varias selecciones y cruzamientos. Actualmente se pueden cultivar, aparte de la mencionada, otras variedades como *Ferro*, *Bambi*, *Cherry*, *Baby Star* ó *Craquante*.



Fotografía 4: Little gem

ICEBERG

Tiene su origen en Norte América, donde recibió el nombre debido a que los envíos de lechuga desde California hacia el Este se hacían con el producto recubierto de hielo troceado (fotografía 5). Es el grupo de variedades que ha experimentado mayor crecimiento ya que constituye la base de la exportación de lechuga.



Fotografía 5: Plantación de lechugas iceberg

Se producen principalmente en Murcia (Campo de Cartagena, Valle del Guadalentín y Aguilas) y Alicante, recolectándose ininterrumpidamente desde octubre hasta mayo, escalonando debidamente las plantaciones con distintas variedades. La producción para recolección en verano se realiza en zonas a mayor altitud, con veranos más frescos.

Es de hoja redonda y crujiente que forma un cogollo compacto. Dentro del tipo Iceberg, el grupo derivado de la variedad Salinas es el más difundido y sobre el que se basa, en gran parte, la mejora genética pues es el que forma cogollos más perfectos y tiene mejor sabor. Se van haciendo variedades más resistentes al espigado que pueden cultivarse a principio (*Duchesse*) o final de campaña (*Bix*) o más vigorosas, aptas para el invierno (*El Toro*). Para las épocas favorables son, incuestionablemente, el grupo de variedades preferido.

TROCADERO

Es, como la icerberg, acogollada, pero de hoja suave, no crujiente (fotografía 6). La variedad tradicional, *Trocadero*, ha dado el nombre al grupo. Se cultiva casi exclusivamente para los mercados del norte de España. Muchas de las variedades tienen resistencia a varias (12-16) razas de mildiu de la lechuga (*Daguan*, *Ventura*, *Renco*, *Milly*, *Nadine*). *Audran* es bastante resistente a espigado; esta variedad junto con *Divine* y *Nadine* se han comportado bien en recolecciones de finales de mayo. Las variedades *Comina*, *Alhambra*, *Caterina* y otras tienen ya incorporada la resistencia a pulgón.



Fotografía 6: Lechuga tipo trocadero

OTROS TIPOS DE LECHUGA

Batavia, de hoja redondeada y crujiente (fotografía 7), al cual pertenecen las variedades tradicionales *Maravilla de Verano*, de coloración algo rojiza y *Dorada de Primavera*.



Fotografía 7: Lechuga batavia

Más recientemente se han introducido variedades de lechuga de hojas dispersas, que no forman cogollo, de colores atractivos, rojo, verde claro, dorado.

De hojas roja y textura suave (fotografía 8) es el tipo llamado *Lollo rosso*, que tiene la hoja con el borde rizado. Algunas selecciones de este grupo son *Lotto*, *Valeria*, *Malibú* y *Secam*.



Fotografía 8: Lollo rosso

1.1.4. VALOR NUTRICIONAL

La lechuga es una hortaliza pobre en calorías, aunque las hojas exteriores son más ricas en vitamina C que las interiores. Valor nutricional de la lechuga por 100 g (tabla II):

Tabla II: Valor nutricional de la lechuga

Nutriente	Cantidad	Nutriente	Cantidad
Acido fitico	0 g.	Fosfocolina	9,90 mg.
Grasas saturadas	0,12 g.	Grasas monoinsaturadas	0,01 g.
Adenina	0 mg.	Grasas poliinsaturadas	0,37 g.
Agua	95,10 g.	Guanina	0 mg.
Alcohol	0 g.	Licopeno	0 ug.
Cafeína	0 mg.	Grasa	0,60 g.
Calorías	19,60 kcal.	Luteína	1130 ug.
Carbohidratos	1,40 g.	Proteínas	1,37 g.
Colesterol	0 mg.	Purinas	13 mg.
Fibra insoluble	1,29 g.	Quercetina	3 mg.
Fibra soluble	0,21 g.	Teobromina	0 mg.
Fibra	1,50 g.	Zeaxantina	0 ug.

1.1.5. REQUERIMIENTOS EDAFOCLIMÁTICOS

1.1.5.1. TEMPERATURA

La temperatura óptima de germinación oscila entre 15-20°C. Durante la fase de crecimiento del cultivo se requieren temperaturas entre 14-18°C por el día y 5-8°C por la noche, pues la lechuga exige que haya diferencia de temperaturas entre el día y la noche.

Durante el acogollado se requieren temperaturas en torno a los 12°C por el día y 3-5°C por la noche. Este cultivo soporta peor las temperaturas elevadas que las bajas, ya que como temperatura máxima puede soportar hasta los 30°C y como mínima hasta -6°C (Casanova, 1996).

1.1.5.2. HUMEDAD RELATIVA

El sistema radicular de la lechuga es muy reducido en comparación con la parte aérea, por lo que es muy sensible a la falta de humedad y soporta mal un periodo de sequía, aunque éste sea muy breve.

La humedad relativa conveniente para la lechuga es del 60 al 80%, aunque en determinados momentos agradece menos del 60%. Los problemas que presenta este cultivo en invernadero es que se incrementa la humedad ambiental, por lo que se recomienda su cultivo al aire libre, cuando las condiciones climatológicas lo permitan (Infoagro, 2015).

1.1.5.3. SUELO

Para cultivos de primavera, se recomiendan los suelos arenosos, pues se calientan más rápidamente y permiten cosechas más tempranas.

En la fotografía 9 se observa un cultivo con diferentes tipos de lechugas.

En cultivos de otoño, se recomiendan los suelos francos, ya que se enfrían más despacio que los suelos arenosos (Maroto, 2002).

En cultivos de verano, es preferible los suelos ricos en materia orgánica, pues hay un mejor aprovechamiento de los recursos hídricos y el crecimiento de las plantas es más rápido (Infoagro, 2015).



Fotografía 9: Cultivo de diferentes tipos de lechugas

1.1.5.4. pH

Su límite óptimo de pH se cifra entre 6,8 y 7,4 (Anstett, 1967), aunque a veces se llega a señalar que si bien el intervalo óptimo de pH está entre 6,5-7,0 puede vegetar sin problemas (con un manejo agronómico adecuado) con valores entre 5-8,5 (Davis et al., 1997).

1.1.5.5. SALINIDAD

Normalmente se admite que la producción de lechugas no se ve afectada con valores de la CE del extracto de saturación inferior a 1,3 mmhos/cm. Según la FAO, el riego con aguas de 1,4 dS/m puede reducir la cosecha en un 10%, en un 25% con aguas de 2,9 dS/m, y hasta en un 50%, con aguas de riego de 3,1 dS/m. En términos generales la lechuga es más sensible a la salinidad de suelos y aguas en los estadios más jóvenes. No resiste la acidez y se adapta bien a terrenos ligeramente alcalinos (Davis et al., 1997).

1.1.6. PARTICULARIDADES DEL CULTIVO

1.1.6.1. RIEGO

Los mejores sistemas de riego que actualmente se están utilizando para el cultivo de la lechuga son el riego por goteo, cuando se cultiva en invernadero y las cintas de exudación cuando el cultivo se realiza al aire libre (fotografía 10), como es el caso del sudeste de España



Fotografía 10: Riego con cintas de exudación

Para lograr un buen aprovechamiento del agua de riego, la dosis se debe ajustar a las necesidades del cultivo, de forma que sean mínimas las pérdidas por percolación, evaporación, o escorrentía, debiendo evitarse los estados extremos de humedad (déficit o encharcamiento) que puedan resultar perjudiciales para las plantas (Maroto et al., 2000).

1.1.6.2. ABONADO

El 60-65% de todos los nutrientes son absorbidos en el período de formación del cogollo y éstos se deben de suspender al menos una semana antes de la recolección.

El aporte de estiércol en el cultivo de lechuga se realiza a razón de 3 kg/m², cuando se trata de un cultivo principal desarrollado de forma independiente de otros. No obstante, cuando se cultiva en invernadero, puede no ser necesaria la estercoladura, si ya se aportó estiércol en los cultivos anteriores.

La lechuga es una planta exigente en abonado potásico, debiendo cuidar los aportes de este elemento, especialmente en épocas de bajas temperaturas; y al consumir más potasio va a absorber más magnesio, por lo que habrá que tenerlo en cuenta a la hora de equilibrar esta carencia.

Sin embargo, hay que evitar los excesos de abonado, especialmente el nitrogenado, con objeto de prevenir posibles fitotoxicidades por exceso de sales y conseguir una buena calidad de hoja y una adecuada formación de los cogollos. También se trata de un cultivo bastante exigente en molibdeno durante las primeras fases de desarrollo, por lo que resulta conveniente la aplicación de este elemento vía foliar, tanto de forma preventiva como para la corrección de posibles carencias.

El abonado de fondo puede realizarse a base de complejo (N-P-K) 8-15-15, a razón de 50 g/m². Posteriormente, en sistema de riego tradicional por gravedad, un abonado de cobertera orientativo consistiría en el aporte de unos 10 g/m² de nitrato amónico. En suelos de carácter ácido, el nitrato amónico puede ser sustituido por nitrato de cal a razón de unos 30 g/m², aportados en cada riego, sin superar el total de 50 g/m². También son comunes las aplicaciones de nitrógeno vía foliar, en forma de urea, cuando los riegos son interrumpidos y las necesidades de nitrógeno elevadas (Infoagro, 2015).

En fertirrigación, la programación puede realizarse de la siguiente forma:

-En caso necesario, aportar unos 25 g/m² de abono complejo (N-P-K) 8-15-15, como abonado de fondo.

-Tras la plantación, regar diariamente durante 4-5 días sin aporte de abono, para facilitar el enraizamiento de las plantas.

-Durante el primer mes, regar tres veces por semana, aportando las siguientes cantidades de abono en cada riego:

0,30 g/m² de nitrógeno (N).

0,10 g/m² de anhídrido fosfórico (P₂O₅).

0,20 g/m² de óxido de potasio (K₂O).

-Al mes siguiente, regar tres veces por semana, aplicando en cada riego:

0,50 g/m² de nitrógeno (N).

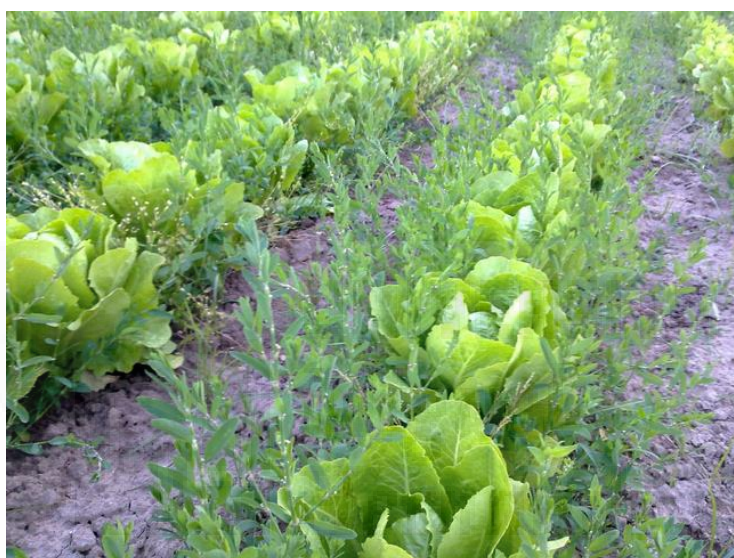
0,10 g/m² de anhídrido fosfórico (P₂O₅).

0,10 g/m² de óxido de potasio (K₂O).

1.1.7. MALAS HIERBAS, PLAGAS, ENFERMEDADES Y FISIOPATÍAS

1.1.7.1. MALAS HIERBAS.

Siempre que las malas hierbas estén presentes será necesaria su eliminación, pues este cultivo no admite competencia con ellas (fotografía 11). Este control debe realizarse de manera integrada, procurando minimizar el impacto ambiental de las operaciones de escarda. Se debe tener en cuenta en el periodo próximo a la recolección, las malas hierbas pueden sofocar a la lechuga, creando un ambiente propicio al desarrollo de enfermedades que invalida el cultivo. Además las virosis se pueden ver favorecidas por la presencia de algunas malas hierbas.



Fotografía 11: Cultivo de lechugas con malas hierbas

1.1.7.2. PLAGAS

TRIPS (*Frankiniella occidentalis*)

Se trata de una de las plagas que causa mayor daño al cultivo de la lechuga (fotografía 12), pues es transmisora del virus del bronceado del tomate (TSWV). La importancia de estos daños directos (ocasionados por las picaduras y las hendiduras de puestas) depende del nivel poblacional del insecto (aumentando desde mediada la primavera hasta bien entrado el otoño) (Maroto, 2000).



Fotografía 12: Planta de lechuga afectada por trips

MINADORES (*Liriomyza trifolii* y *Liriomyza huidobrensis*)

Forman galerías en las hojas y si el ataque de la plaga es muy fuerte la planta queda debilitada (Fotografía 13).



Fotografía 13: Hoja de lechuga afectada por minadores

Los tratamientos comenzarán cuando se observen los primeros síntomas, procurando mojar bien toda la superficie de la planta (Maroto, 2000).

MOSCA BLANCA (*Trialeurodes vaporariorum*)

Produce una melaza que deteriora las hojas, dando lugar a un debilitamiento general de la planta (Fotografía 14).



Fotografía 14: Planta infectada con mosca blanca

Los tratamientos químicos comenzarán una vez que la población de mosca blanca vaya incrementándose (Maroto, 2000).

PULGONES (*Myzus persicae*, *Macrosiphum solani* y *Narsonovia ribisnigri*)

Se trata de una plaga sistemática en el cultivo de la lechuga, siendo su incidencia variable según las condiciones climáticas (Fotografía 15).



Fotografía 15: Hojas de lechuga con plaga de pulgones

El ataque de los pulgones suele ocurrir cuando el cultivo está próximo a la recolección. Aunque si la planta es joven, y el ataque es considerable, puede arrasar el cultivo, además de ser entrada de alguna virosis que haga inviable el cultivo (Maroto, 2000).

1.1.7.3. ENFERMEDADES

ANTRACNOSIS (*Marssonina panattoniana*)

Los daños se inician con lesiones de tamaño de punta de alfiler, éstas aumentan de tamaño hasta formar manchas angulosas-circulares, de color rojo oscuro, que llegan a tener un diámetro de hasta 4 cm (Fotografía 16).



Fotografía 16: Lechuga afectada por antracnosis

BOTRITIS (*Botrytis cinerea*)

Los síntomas comienzan en las hojas más viejas con unas manchas de aspecto húmedo que se tornan amarillas, y seguidamente se cubren de moho gris que genera enorme cantidad de esporas (fotografía 17). Si la humedad relativa aumenta las plantas quedan cubiertas por un micelio blanco; pero si el ambiente está seco se produce una putrefacción de color pardo o negro.



Fotografía 17: Lechuga afectada por *Botritis*

Esta enfermedad se puede controlar a partir de medidas preventivas basadas en la disminución de la profundidad y densidad de plantación, además de reducir los excesos de humedad.

MILDIU VELLOSO (*Bremia lactucae*)

En el haz de las hojas aparecen unas manchas de un centímetro de diámetro, y en el envés aparece un micelio veloso (fotografía 18); las manchas llegan a unirse unas con otras y se tornan de color pardo. Los ataques más importantes de esta plaga se suelen dar en otoño y primavera, que es cuando suelen presentarse periodos de humedad prolongada, además los conidios del hongo son transportados por el viento dando lugar a nuevas infecciones (Maroto et al., 2000).



Fotografía 18: Planta de lechuga infectada con *Mildiu*

ESCLEROTINIA (*Sclerotinia sclerotiorum*)

Se trata de una enfermedad principalmente de suelo, por tanto las tierras nuevas están exentas de este parásito o con infecciones muy leves (Fotografía 19).



Fotografía 19: Planta infectada por *Esclerotinia*

La infección se empieza a desarrollar sobre los tejidos cercanos al suelo, pues la zona del cuello de la planta es donde se inician y permanecen los ataques. Sobre la planta produce un marchitamiento lento en las hojas, iniciándose en las más viejas, y continúa hasta que toda la planta queda afectada. En el tallo aparece un micelio algodonoso que se extiende hacia arriba en el tallo principal (Infoagro, 2015).

VIRUS DEL MOSAICO DE LA LECHUGA (LMV)

Es una de las principales virosis que afectan al cultivo de la lechuga, debido a los importantes daños causados. Se transmite por semilla y pulgones (Fotografía 20).



Fotografía 20: Planta de lechuga afectada por el virus del mosaico

Los síntomas producidos pueden empezar incluso en semillero, presentando moteados y mosaicos verdosos que se van acentuando al crecer las plantas, dando lugar a una clorosis generalizada, en algunas variedades pueden presentar clorosis foliares (Maroto et al., 2000).

VIRUS DEL BRONCEADO DEL TOMATE (TSWV)

Las infecciones causadas por este virus están caracterizadas por manchas foliares, inicialmente cloróticas, y, posteriormente, necróticas e irregulares, a veces tan extensas que afectan a casi toda la planta que, en general, queda enana y se marchita en poco tiempo (fotografía 21). En los campos de lechuga la incidencia de la virosis no supera el 20-50%.



Fotografía 21: Planta afectada por el mosaico del tomate

Se transmite por el trips *Frankliniella occidentalis*. Este se nutre de las hojas, mediante un mecanismo de inyección de saliva en los tejidos vegetales seguida de vaciado por succión del contenido celular predigerido. Además provocan heridas a las plantas con los pinchazos de alimentación (Maroto et al., 2000).

1.1.7.4. FISIOPATÍAS

HELADAS Y BAJAS TEMPERATURAS

En términos generales las lechugas soportan mal, como especie, las heladas (fotografía 22), si bien las denominadas variedades de invierno, sobre todo en el caso de la lechuga, pueden resistir temperaturas de algunos grados bajo cero (así, por ejemplo los tipos de lechuga «Iceberg», Coolguard o Mula, se consideran tolerantes a las bajas temperaturas). Una respuesta típica de las lechugas a las bajas temperaturas, en particular los cultivos de hoja mantecosa tipo Trocadero, es la aparición de zonas rojizas, como consecuencia de la formación de sustancias antociánicas. Como respuesta a las heladas, y en función de la intensidad de las mismas (valor de las temperaturas mínimas y duración de ellas) y del cultivo sobre el que se han producido, se pueden detectar alteraciones diversas, como descamaciones epidérmicas, desecaciones, amarronamientos foliares, y en caso de descensos térmicos muy elevados, hasta el colapso de las plantas (Maroto, 1995; 1997).



Fotografía 22: Lechugas heladas en Orihuela

-GRANIZO

El impacto del granizo es particularmente negativo sobre el cultivo de las lechugas (Fotografía 23), tanto por el daño directo que puede originar, como por el posterior ataque de patógenos secundarios que pueden desarrollarse sobre las heridas de los impactos. Además, y sobre todo en el caso del cultivo de las lechugas *Iceberg*, sobre plantas supervivientes, pueden producirse mermas notables en el calibre de las piezas, deformaciones, etc., que pueden afectar muy negativamente a una comercialización óptima de las lechugas (Maroto et al., 2000).



Fotografía 23: cultivo afectado por una granizada

SUMERSIÓN

Como consecuencia de las fuertes lluvias y el estancamiento de las mismas, el daño que se origina suele conducir hasta el colapso irreversible de las plantas, a pesar de que los sistemas radiculares de las lechugas, entre las hortalizas, son de los más superficiales (40-60 cm), característica que induce a nivel específico una cierta y relativa ventaja en relación con otras especies, a los riesgos por sumersión. En suelos inundados el principal problema que se origina se debe a la restricción de oxígeno existente en la rizosfera, por lo que la respiración se hace muy dificultosa, prevaleciendo los procesos de reducción de sales, como los nitratos, los óxidos de manganeso y de hierro, y los sulfatos a cargo de los microorganismos del terreno. Tras estas reducciones se producen síntomas carenciales en muchos nutrientes (N, K, P, Fe, Ca, Mg, Zn, Cu,...), se acumula etileno, compuestos fenólicos y ácidos grasos volátiles que pueden actuar como depresores del crecimiento e incluso como sustancias tóxicas -así por ejemplo, el etileno induce epinastía foliar-. La respiración anaerobia de las raíces propicia la formación de etanol y metaldehído, que tienen asimismo un carácter tóxico para las plantas. Como consecuencia de la sumersión se inhibe la síntesis y la traslocación de giberelinas y citoquininas hacia las hojas, lo que suele inducir senescencia. La mayor o menor gravedad de la sumersión depende de la intensidad de lluvia caída (lo que en el área mediterránea es bastante habitual durante el otoño, en que son frecuentes las fuertes precipitaciones en un escaso lapso de tiempo), de la textura del suelo, de la pendiente del terreno, y dentro de una determinada especie, incluso existen diferentes susceptibilidades a nivel de cultivos. La aportación de determinados bioestimulantes puede soslayar parcialmente los efectos negativos de la sumersión y en términos generales la adición de nitrógeno nítrico, al aportar oxígeno, puede

asimismo contribuir a esta misma finalidad. En caso de sumersiones parciales, además de los problemas indicados pueden producirse ataques más intensos de enfermedades criptogámicas y bacterianas (Maroto, 1997).

SALINIDAD

En términos globales la lechuga se considera una especie situada en un grupo intermedio con una moderada resistencia a la salinidad, señalándose que la potencialidad productiva del cultivo no se ve alterada hasta conductividades eléctricas (CE) de 1,3 mmhos/cm en el extracto de saturación (e.s.) y la producción puede llegar a ser nula para valores superiores a 9 mmhos/cm del susodicho e.s. (FAO, 1986).

FISIOPATÍAS RELACIONADAS CON DEFECTOS DEL ACOGOLLADO EN LECHUGAS: COGOLLOS PEQUEÑOS, POCO COMPACTOS, ESPIRALADOS, APOSTILLADOS

La capacidad de acogollado de las lechugas es particularmente importante en los cultivos de los grupos Iceberg, Trocadero, Batavia y algunas minilechugas. Quizás es el tipo Iceberg en el que este tema se encuentra más estudiado, existiendo en la capacidad de acogollado una fuerte interacción entre la variedad cultivada (se conocen diversas bases genéticas que inducen un mayor acogollado), y las condiciones climáticas existentes. En términos generales, para los cultivos tipo Iceberg se consigue un buen acogollado para valores de las temperaturas nocturnas, comprendidos entre 3 y 18°C y de las temperaturas diurnas entre 17 y 28°C (Whitaker et al., 1974). Determinados autores consideran más bajos los límites térmicos diurnos, y en cualquier caso, con temperaturas más elevadas la compacidad de los cogollos es menor, colocándose el valor óptimo en torno a los 20°C. La luminosidad, y en particular la duración del fotoperíodo, también puede ejercer un papel importante en el acogollado (Maroto et al., 2000).

SUBIDA A FLOR PREMATURA

La subida a flor prematura (fotografía 24) es una fisiopatía que afecta negativamente al acogollado de la lechuga. Los fotoperíodos largos, junto con la vernalización de las semillas y las elevadas temperaturas, son los principales factores de floración, aunque entre todos ellos, cuando las plantas son adultas, las altas temperaturas parecen ser determinantes en la incidencia de este desorden. De cualquier manera debe reseñarse que el mecanismo de floración en lechugas es bastante complejo, pudiéndose dar casos de especial propensión hacia la floración, tras un verano excesivamente caluroso al llegar las temperaturas más frescas del otoño (Maroto, 1995).



Fotografía 24: Subida a flor prematura en lechugas

«TIPBURN»

Se suele manifestar como una quemadura de las puntas de las hojas más jóvenes y está ocasionado por una deficiente translocación del calcio hacia los órganos en los que aparece (Fotografía 25).



Fotografía 25: Lechuga afectada por tipburn

El calcio se trasloca en las plantas por vía xilemática a través del flujo radicular de agua, y en la distribución de este elemento juegan un importante papel los procesos transpiratorios de las plantas y, por lo tanto, todos aquellos factores que intervienen en los mismos. Las hojas externas poseen un mayor potencial transpiratorio, por lo que durante el día reciben de forma prioritaria el flujo de calcio de la savia ascendente y, en caso de que la evaporación sea muy elevada, a causa de elevadas temperaturas y bajas higrometrías, pueden incluso retirar el calcio de las hojas más jóvenes, por lo que en caso de un crecimiento excesivamente rápido, en que en los tejidos jóvenes existe una amplia demanda de calcio para la formación de membranas, esta fisiopatía suele manifestarse más intensamente. Con una elevada humedad relativa nocturna, la presión radicular induce un flujo de savia ascendente a presión superior a la atmosférica que ocasiona la gutación foliar. Es precisamente mediante este flujo nocturno

de savia ascendente, a través de donde el calcio se trasloca principalmente hacia las hojas más jóvenes. Las temperaturas excesivamente altas, al acelerar la respiración, incrementan el contenido de ácidos orgánicos y otros metabolitos intermedios que quelatan el calcio disponible (Misaghi y Grogan, 1978).

Determinados factores ambientales como temperaturas excesivas, estrés hídrico, salinidad, bajas higrometrías nocturnas, escasos contenidos en calcio del suelo, etc., pueden exacerbar la incidencia de «Tipburn».

Todos aquellos factores de manejo o ambientales que induzcan un crecimiento excesivo, pueden influir positivamente en una mayor acentuación del «Tipburn».

BAJOS NIVELES DE GERMINACIÓN EN LECHUGAS

No constituyen exactamente una fisiopatía y a parte de una excesiva longevidad de las semillas (la duración media de la capacidad germinativa, en buenas condiciones de conservación, es de 3 años), los bajos índices de germinación son en gran medida atribuibles al hecho de que la mayoría de los cultivos de lechuga presentan latencia seminal. Esta latencia puede ser rota o acortada por diversos agentes como luz roja, tratamientos térmicos, oxigenación, imbibición en determinados fitoreguladores (giberelinas, tiourea y citoquininas), inmersión en soluciones osmóticas, etc. La mayor parte de los cultivos de lechuga germinan sin problemas a temperaturas de 15-20°C, mientras que a partir de los 25°C se suelen plantear problemas de termolatencia, que se acentúan a partir de los 30°C, en que los tegumentos de las semillas se muestran impermeables al oxígeno (Maroto, 1995).

VENACIONES ROSADAS («PINKRIB») Y VENACIONES DECOLORADAS («RIB DISCOLORATION») EN LECHUGAS

Alteración caracterizada por la aparición de una coloración difusa en las áreas cercanas a la base de las nerviaciones centrales de las hojas externas de las lechugas (fotografía 26). Generalmente suele presentarse en lechugas maduras y sobremaduras (sobre todo en postrecolección), si bien también puede manifestarse en piezas que todavía no han alcanzado la madurez. En cultivo esta fisiopatía se relaciona con los encharcamientos y la falta de oxigenación a nivel radicular. La conservación de lechugas en atmósferas pobres en oxígeno, pueden exacerbar este desorden, sobre todo a temperaturas relativamente elevadas, si bien incluso con temperaturas bajas, en cultivo bajo las condiciones de campo anteriormente apuntadas, con el paso del tiempo puede aparecer esta fisiopatía (Maroto et al., 2000).



Fotografía 26: Lechuga afectada por la fisiopatía de las venaciones

Las decoloraciones en venación de las hojas de lechugas, suelen ocurrir en la parte más cálida del cultivo, y se manifiestan en la parte interna y basal de las hojas, mediante la aparición de manchas oblongas sobre las nerviaciones de los limbos, que en un principio son amarillentas y posteriormente marrón oscuras, mientras que las áreas intermedias muestran una decoloración más o menos ostensible. Aunque no se conocen exactamente las causas de esta alteración, tal y como se deduce de lo señalado anteriormente, las elevadas temperaturas durante el crecimiento de las plantas, favorecen el desarrollo de esta fisiopatía (Lipton et al., 1972).

MANCHAS ROJIZAS («RUSSET SPOTTING») EN LECHUGAS

Las manchas son de pequeño tamaño, de color marrón rojizo y pueden presentarse tanto en las nerviaciones como en otras partes de las hojas de las lechugas (fotografía 27). Parece ser que la exposición de piezas de lechugas al etileno desprendido por otros productos -tomates, melones, plátanos, etc.-, durante el almacenamiento frigorífico, puede ser una causa importante de este desorden, si bien otros factores que pueden incidir en la aparición de esta alteración pueden ser los cogollos sobremaduros, largos almacenamientos frigoríficos, conservaciones en cámara a temperaturas excesivamente elevadas, daños mecánicos, etc (Davis et al., 1997).



Fotografía 27: Lechuga afectada por el "russet Spotting"

DAÑOS ATRIBUIBLES A UN EXCESO DE DIÓXIDO DE CARBONO («BROWN STAIN») EN LECHUGAS

Suelen producirse durante la conservación frigorífica de las lechugas y entre los más usuales se encuentra la aparición de manchas marrones o «Brown Stain» (manchas ovales de aproximadamente 5 mm de ancho por 9 mm de longitud), rodeadas de un halo más oscuro (fotografía 28), situadas sobre o cerca de la nerviación central, hacia la parte inferior de las hojas, sobre hojas intermedias del cogollo (que ni son las más externas, ni tampoco las más internas); se ha constatado susceptibilidad varietal al «Brown Stain», así como influencia de otros aspectos como el momento de la recolección (las lechugas cosechadas durante la mañana son menos tolerantes a estas fisiopatías que las recolectadas por la tarde). En hojas internas, los daños atribuibles al CO₂ consisten en decoloraciones marginales de color anaranjado-rojizo. En términos generales los cultivos de lechugas romanas suelen ser menos susceptibles a este desorden que los cultivos de tipo *Iceberg* (Maroto et al., 2000).



Fotografía 28: Daños en una planta de lechuga por exceso de CO₂

1.1.8ALMACENAMIENTO

Se requiere una temperatura de 0°C y una humedad relativa mayor del 95% para optimizar la vida de almacenaje de la lechuga. Está muy generalizado el enfriamiento por vacío (*vacuum cooling*) para la lechuga tipo *Iceberg*, sin embargo el enfriamiento por aire forzado también puede ser usado con buenos resultados. El daño por congelamiento puede ocurrir si la lechuga es almacenada a menos de -0.2°C. La apariencia del daño es un oscurecimiento translúcido o un área embebida en agua, la cual se torna legamosa y se deteriora rápidamente o después de descongelarse. Durante el almacenamiento pueden producirse pudriciones blandas bacterianas (*bacterial soft-rots*), causadas por numerosas especies de bacterias, dando lugar a una destrucción legamosa del tejido infectado. Las pudriciones blandas pueden dar pie a infecciones por hongos. La eliminación de las hojas exteriores, enfriamiento rápido y una baja temperatura de almacenamiento reducen el desarrollo de las pudriciones blandas bacterianas. Los hongos pueden producir una desorganización acuosa de la lechuga (ablandamiento acuoso) causado por *Sclerotinia* o por *Botritis cinérea*. Estas se distinguen de

las pudriciones blandas bacterianas por el desarrollo de esporas negras y grises. La eliminación de las hojas y la baja temperatura también pueden reducir la severidad de estas pudriciones.

1.1.9 MEJORA GENÉTICA

Los objetivos de la mejora genética se basan en la obtención de nuevos tipos de lechuga y la reducción del tamaño. Además de la mejora en calidad: basada fundamentalmente en la formación de los cogollos, haciéndolos más compactos. Además de lo anteriormente citado destaca la tolerancia a la subida de la flor y a "Tipburn", incluyendo la producción de semillas libres de virus.

1.2. EL CULTIVO DE LA ESCAROLA

1.2.1. ORIGEN

Su origen cabe situarlo en el Antiguo Continente, posiblemente en la península indostánica, si bien algunos autores consideran que puede ser oriunda del área mediterránea. Es una planta conocida por la antigua civilización egipcia, en la que era utilizada como ensalada y como verdura cocida. Como en el caso de la lechuga, la escarola está citada como planta cultivada en los tratados agrícolas clásicos. Así por ejemplo en el «De rustica» de Columela hay diversas citas a esta planta, como por ejemplo las siguientes: « ... escarola que estímulo sea del gusto embotado..»; « ... el mismo sistema de cultivo -que la lechuga- se sigue también con la escarola, excepto que ella aguanta más el invierno y así se puede sembrar incluso en las regiones frías a principios del otoño ... », etc. (Figura 29). Por su sabor ligeramente amargo, se considera a la escarola como una planta estimuladora del apetito. Actualmente también suele trocearse en las presentaciones de «cuarta gama».



Fotografía 29: Plantación de un cultivo de escarolas

1.2.2. TAXONOMÍA Y MORFOLOGÍA

La escarola es una planta anual o bianual, su clasificación taxonómica se encuentra en la tabla III.

Tabla III: Clasificación taxonómica

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	Asterales
Familia:	Asteraceae
Subfamilia:	Cichorioideae
Tribu:	Cichorieae
Género:	<i>Cichorium L.</i>
Especie:	<i>Cichorium endivia L.</i>

Posee una raíz pivotante, corta y con pequeñas ramificaciones, las hojas están colocadas en roseta, desplegadas al principio. No llegan a formar nunca pella, pero hay variedades en que las hojas nacen muy apretadas y dan lugar a un blanqueamiento natural.

Después de estar madura, es cuando la escarola emite el tallo floral que se ramifica en capítulos de flores de color azulado.

Forman frutos en aquenios, que se confunden con las verdaderas semillas y que son de mayor tamaño que los de las lechugas.

Existen dos grupos varietales en función de la forma de sus hojas:

Cichorium endivia var. *Crispa*: tiene hojas muy divididas y retorcidas, con los bordes dentados.

Cichorium endivia var. *Latifolia*: con hojas anchas, onduladas y los bordes sin apenas dentados (Infoagro, 2015).

1.2.3. VARIEDADES MÁS CULTIVADAS

Hay diferentes tipos de escarola (Infoagro, 2015):

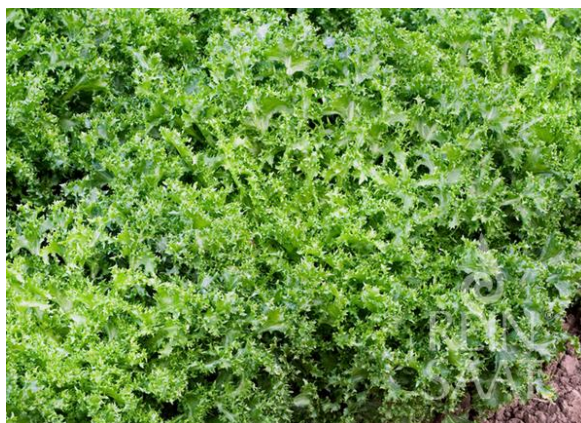
DE HOJA ANCHA Y LISA (*Cichorium endivia* var. *Latifolia*): son de sabor amargo y textura fuerte. Para el blanqueo se emplearán dispositivos que impidan la entrada de luz en las últimas fases de cultivo, aunque pueden autoblanquearse ligeramente en sus hojas internas (Fotografía 30).



Fotografía 30: Escarola gigante hortelana

- GIGANTE HORTELANA tienen las hojas en roseta, que nacen en el centro apretadas unas con otras, formando un corazón compacto a cuyo interior no llega la luz (Fotografía 30).
- AGORA: se cultiva en pleno invierno. Resistente a la “subida de flor”.
- BREVO: Pella de 40-50 cm de diámetro, con hojas onduladas, limbo ancho, color verde oscuro en el exterior y verde claro o amarillo en el centro.
- SALANCA: variedad rústica, voluminosa y homogénea. Resistente a la “subida de flor”.
- STRATEGO: cultivo de invierno-primavera. Pella de gran volumen que blanquea con facilidad. Resistencia a “subida de flor” y necrosis apical.

-DE HOJA ANCHA Y RIZADA (*Cichorium endivia* var. *Crispa*): presentan limbos muy divididos en segmentos estrechos y retorcidos con márgenes muy dentados (Fotografía 31). Para su blanqueo suelen emplearse técnicas como el atado.



Fotografía 31: Escarolas wallone

- WALLONE: vigor medio-alto. Hoja con limbo rizado en los bordes y nervio estrecho. Suele recolectarse en otoño-invierno.
- FRIDA: resistente a la “subida de flor” y necrosis apical.
- PISCILIA: pella voluminosa, blanca con rizamiento fino.
- DE RUFFEC RAZA AMEL: variedad de hoja muy dividida, ondulada y dentada. Pella cerrada y voluminosa. Pencas blancas, anchas y resistentes a "subida de flor".
- OXALIE: variedad rústica. Pella blanca y compacta. Peso aproximado: 0,4-0,6 kg.
- REMIX: hojas finas y rizadas. Resistente al “Tip burn”.
- TOSCA: muy precoz. Resistente a “subida de flor”. Tiene un corazón lleno y buena capacidad de blanqueo (Infoagro, 2006).

VALOR NUTRICIONAL

Al igual que la lechuga es un alimento muy pobre en calorías. En la siguiente tabla se muestra su valor nutricional por 100 gr de escarola (Tabla IV).

Tabla IV. Valor nutricional de la escarola

Nutriente	Cantidad	Nutriente	Cantidad
Acido fólico	0 g.	Fosfocolina	0 mg.
Grasas saturadas	0 g.	Grasas monoinsaturadas	0 g.
Adenina	0 mg.	Grasas poliinsaturadas	0,10 g.
Agua	94,60 g.	Guanina	0 mg.
Alcohol	0 g.	Licopeno	0 ug.
Cafeína	0 mg.	Grasa	0,20 g.
Calorías	17,40 kcal.	Luteína	0 ug.
Carbohidratos	1 g.	Proteínas	1,60 g.
Colesterol	0 mg.	Purinas	0 mg.
Fibra insoluble	0 g.	Quercetina	0 mg.
Fibra soluble	0 g.	Teobromina	0 mg.
Fibra	2,60 g.	Zeaxantina	0 ug.

1.2.4. REQUERIMIENTOS EDAFOCLIMÁTICOS

1.2.4.1. TEMPERATURA

Al igual que las coles, la escarola soporta mejor las temperaturas bajas que las altas. Los intervalos de temperatura estarían entre los 30°C de máxima y los 6°C de mínima, aunque la escarola puede llegar a soportar temperaturas de hasta -6°C. En el cultivo se requiere entre 14-18°C durante el día y 5-8°C por la noche, durante la fase de crecimiento.

En el acogollado se requiere de 10-12°C por el día y 3-5°C por la noche. La temperatura del suelo no debe bajar de 6-8 °C. Las necesidades de temperatura en la germinación son de 22-24°C, durante 2-3 días (Infoagro, 2015).

1.2.4.2. HUMEDAD

Como el sistema radicular de la escarola es muy reducido en comparación con la parte aérea, es por tanto muy sensible a la falta de humedad y soporta mal los períodos de sequía, por breves que sean, pues pueden dar lugar a "tip burn" y favorecer la "subida de flor".

Por tanto la humedad del suelo debe mantenerse siempre cerca del 60% de su capacidad de campo, en los primeros 30 cm de suelo.

La humedad ambiental excesiva favorece la aparición de enfermedades (Infoagro, 2015).

1.2.4.3. SUELO

Los mejores suelos para este cultivo son los de textura franco-arcillosa. Admite algo mejor la acidez que la alcalinidad. El pH óptimo estaría entre 6 y 7. Prefiere la acidez a la alcalinidad.

El suelo por dentro debe permanecer húmedo durante todo el cultivo, aunque la capa superficial aparentemente debe estar seca para evitar podredumbres de cuello (Infoagro, 2006).

1.2.5. PARTICULARIDADES DEL CULTIVO

El ciclo de cultivo de la escarola es un poco más largo que el de la lechuga y está menos definido, ya que el corte puede dilatarse más o menos, en función del peso requerido de la pieza, de las necesidades del mercado e incluso de la organización del trabajo en la explotación.

1.2.5.1. RIEGO

Tras el trasplante, durante la primera semana conviene efectuar riegos por aspersión con sistemas móviles.

Durante las primeras fases vegetativas de las plantas se debe mantener la humedad del suelo para favorecer el arraigue y el desarrollo radicular.

La frecuencia del riego depende del tipo de suelo, de la salinidad del agua y de las condiciones climáticas.

En general se regará cada 1-2 días, excepto en los suelos muy arenosos que se efectuará más de un riego diario.

Los momentos de regar serán a primera hora de la mañana o última de la tarde; si se riega cuando hay temperatura elevada, se pueden producir desequilibrios que dan lugar a amarillamiento de hojas y a paralización de la vegetación (Infoagro, 2015).

1.2.5.2. ABONADO

En el caso de cultivo en invernadero, la estercoladura va a depender del cultivo anterior y posterior a la escarola. Se pueden aportar 3 kg/m² de estiércol muy bien descompuesto cuando el cultivo que le sigue lo requiera, no siendo necesario su aporte si los cultivos anteriores a la escarola ya han sido estercolados.

Un abonado de fondo común consiste en el aporte de 50 g/m² de abono complejo (N-P-K) 8-15-15, aunque en invernadero generalmente este tipo de abonado no es necesario, ya que la escarola suele ser un cultivo secundario de relleno. Se trata de un cultivo exigente en potasio.

En riego por gravedad el abonado de cobertura se aplica en cada riego a razón de aproximadamente 3 g/m² de nitrógeno, sin sobrepasar en ningún caso los 10 g/m². En caso de no ser necesarios los riegos, puede aplicarse abono foliar cuando la planta requiera el aporte de nitrógeno.

En fertirrigación, la programación de los riegos y abonados puede ser la siguiente (Infoagro, 2015):

-Si se realiza abonado de fondo, aportar 25 g/m² de abono complejo (N-P-K) 8-15-15.

-Tras la plantación, regar diariamente durante 4-5 días, sin aporte de abono, hasta que se haya producido un buen enraizamiento.

-Durante el primer mes, regar tres veces por semana, aportando las siguientes cantidades de abono:

- 0,30 g/m² de nitrógeno (N).
- 0,10 g/m² de anhídrido fosfórico (P₂O₅).

- 0,20 g/m² de óxido de potasa (K₂O).

-A continuación, regar tres veces por semana con las siguientes cantidades:

- 0,50 g/m² de nitrógeno (N).
- 0,10 g/m² de anhídrido fosfórico (P₂O₅).
- 0,10 g/m² de óxido de potasa (K₂O).

1.2.5.3. BLANQUEO

En la escarola los objetivos son el blanqueo de las hojas y la reducción de los principios amargos de las mismas (Fotografía 32).

Fotografía 32: Blanqueo de un cultivo de escarolas



El blanqueo de la escarola puede hacerse de varias formas, en función del tipo de escarola:

En el caso de escarolas rizadas de calibre grande, se hace mediante atado con rafia, esparto o cualquier otro material sobre las hojas exteriores.

En escarolas rizadas de calibre pequeño, se realiza mediante el uso de campanas invertidas.

En el caso de escarolas de hoja lisa el blanqueo se realiza mediante el "tipo acogollado" consistente en que cada hoja se dobla hacia el interior, y el conjunto de todas estas hojas apretadas forman un centro de hojas blancas. Si en este tipo se requieren piezas con mayor calidad se podrá usar también campanas invertidas de polietileno blanco que llevan varillas metálicas para anclarlas al suelo.

Puede realizarse el tapado o sombreado de las plantas con láminas plásticas más o menos anchas (Infoagro, 2015).

1.2.6. PLAGAS, ENFERMEDADES Y FISIOPATÍAS

1.2.6.1. PLAGAS

PULGONES (*Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Narsonovia ribisnigri*).

Es una plaga cuya incidencia depende de las condiciones climáticas. El ataque de los pulgones suele tener lugar cuando el cultivo está próximo a la recolección, además esta plaga puede ser entrada de alguna virosis.

Los pulgones comienzan el ataque desde las hojas exteriores, avanzando hasta el interior, excepto *Narsonovia ribisnigri*, cuya colonización comienza en las hojas interiores, multiplicándose progresivamente y trasladándose a las partes exteriores (Maroto, 2000).

ORUGAS (*Spodoptera littoralis*, *Spodoptera exigua*, *Plusia gamma*, *Heliothis*).

Se trata de lepidópteros pertenecientes al género: *Spodoptera*, *Plusia* y *Heliothis*.

Las orugas destruyen el tejido foliar, pudiendo llegar a devorar la totalidad de las hojas (Maroto, 2000).

1.2.6.2. ENFERMEDADES

ANTRACNOSIS (*Marsonina panattoniana*)

Los daños comienzan con lesiones de punta de alfiler, posteriormente estas evolucionan llegando a formar manchas angulosas-circulares de color rojo oscuro, que llegan a tener un diámetro de hasta 4 cm (Infoagro, 2015).

BOTRYTIS (*Botrytis cinerea*)

Los síntomas se manifiestan en las hojas viejas con manchas de aspecto húmedo que se tornan amarillas y posteriormente se cubren de moho gris que genera enorme cantidad de esporas (Infoagro, 2015).

Si la humedad relativa aumenta las plántulas se cubren de un micelio blanco; pero si el ambiente está seco da lugar a una putrefacción de color pardo o negro (Infoagro, 2015).

MILDIU VELLOSO (*Bremia lactucae*)

La infección tendrá lugar cuando la humedad ambiental sea elevada con una temperatura adecuada, siendo la óptima alrededor de 15°C. Por tanto los ataques más importantes se suelen dar en otoño y primavera, además los conidios del hongo son transportados por el viento dando lugar a nuevas infecciones.

Los síntomas de la enfermedad se manifiestan en el haz de las hojas con unas manchas de aproximadamente un centímetro de diámetro, y en el envés aparece un micelio vellosos; las manchas llegan a unirse unas con otras y se tornan de color pardo (Maroto, 2000).

ESCLEROTINIA (*Sclerotinia sclerotiorum*)

Es una enfermedad principalmente de suelo, por tanto las tierras nuevas están exentas de este parásito o con infecciones muy leves.

Comienza a desarrollarse sobre los tejidos cercanos al suelo, pues la zona del cuello de la planta es donde se inician y permanecen los ataques. Sobre la planta produce un marchitamiento lento en las hojas, iniciándose en las más viejas, y continúa hasta que toda la planta quede afectada. En el tallo aparece un micelio algodonoso que se extiende hacia arriba en el tallo principal (Infoagro, 2015).

1.2.6.3. FISIOPATÍAS

«TIPBURN»

Produce los mismos efectos que en el caso de las lechugas, ya explicado.

GRANIZO

El impacto del granizo es particularmente negativo sobre el cultivo de las escarolas, tanto por el daño directo que puede originar, como por el posterior ataque de patógenos secundarios que pueden desarrollarse sobre las heridas de los impactos (Maroto, 2000).

SUMERSIÓN

Produce los mismos efectos que en el caso de las lechugas, ya explicado.

SALINIDAD

En términos globales la escarola se considera una especie situada en un grupo intermedio con una moderada resistencia a la salinidad, señalándose que la potencialidad productiva del cultivo no se ve alterada hasta conductividades eléctricas (CE) de 1,3 mmhos/cm en el extracto de saturación (e.s.) y la producción puede llegar a ser nula para valores superiores a 9 mmhos/cm del susodicho e.s. (FAO, 1986).

HELADAS Y BAJAS TEMPERATURAS

En términos generales las escarolas soportan mal, como especie, las heladas, si bien las denominadas variedades de invierno, pueden resistir temperaturas de algunos grados bajo cero. Como respuesta a las heladas, y en función de la intensidad de las mismas (valor de las temperaturas mínimas y duración de ellas) y del cultivo sobre el que se han producido, se pueden detectar alteraciones diversas, como descamaciones epidérmicas, desecaciones, amarronamientos foliares, y en caso de descensos térmicos muy elevados, hasta el colapso de las plantas (Maroto, 1995).

1.2.7. MEJORA GENÉTICA

En general las líneas de investigación en el cultivo de la escarola van dirigidas a buscar variedades resistentes a subida a flor y a tip-burn; en este sentido se han conseguido importantes avances, pero solo se ha llegado a lograr, en algunas variedades, un cierto grado de tolerancia.

Uno de los principales objetivos en la mejora genética en escarola es la introducción de genes de resistencia a mildiu (*Bremia*), pero resulta bastante complejo, pues solo en Europa se han identificado más de 30 razas distintas de mildiu frente a algunas de las cuales hay algunas variedades que ofrecen una cierta protección. Por tanto queda identificar las razas endémicas de cada zona de cultivo y la elección de las variedades con las resistencias disponibles.

1.3. IMPORTANCIA ECONÓMICA

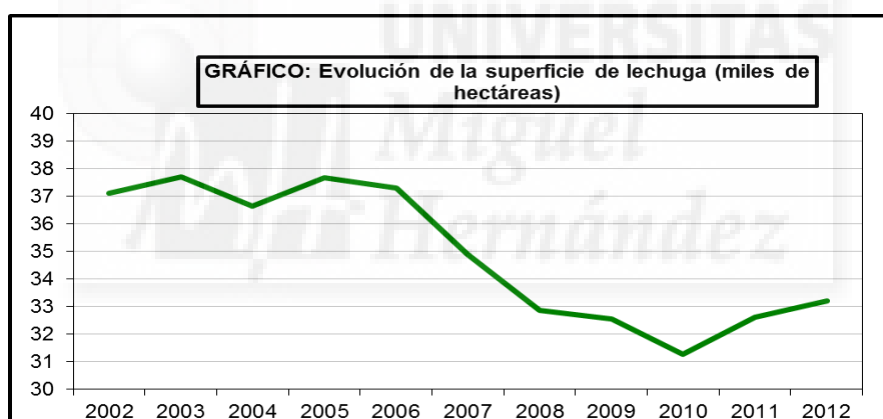
1.3.1. IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LA LECHUGA A NIVEL NACIONAL

El cultivo de la lechuga a nivel nacional supone un peso importante en nuestra economía (tabla V).

La lechuga es una de las principales hortalizas cultivadas en España, aunque tanto la superficie como la producción han ido disminuyendo en los últimos años (tabla V y figuras 1 y 2), desde 2002 hasta 2010. De 2010 a 2012 ha habido un aumento de 1.900 ha, hasta alcanzarse las 33.200 finalmente.

Tabla V: Resumen de importancia económica y comercial

Años	Superficie (miles de hectáreas)	Rendimiento (qm/ha)	Producción (miles de toneladas)	Precio medio percibido por los agricultores (euros/100kg)	Valor (miles de euros)
2002	37,1	279	1.037,1	38,15	395.639
2003	37,7	254	956,8	47,66	456.011
2004	36,6	284	1.041,6	32,15	334.882
2005	37,7	263	991,9	51,12	507.045
2006	37,3	264	985,9	39,40	388.429
2007	34,9	271	947,6	42,16	399.513
2008	32,9	271	889,2	49,00	435.724
2009	32,6	262	853,0	37,69	321.491
2010	31,3	259	809,4	46,84	379.118
2011	32,6	266	868,4	30,00	260.531
2012	33,2	264	876,9	43,90	384.971

**Figura 1:** Evolución de la superficie plantada de lechugas en España

La producción, como podemos observar, sigue la misma línea que la superficie, un descenso muy notable hasta 2010 y un ligero aumento de 2010 a 2012, situándose en una producción final de 876.900 toneladas de lechuga (figura 2).

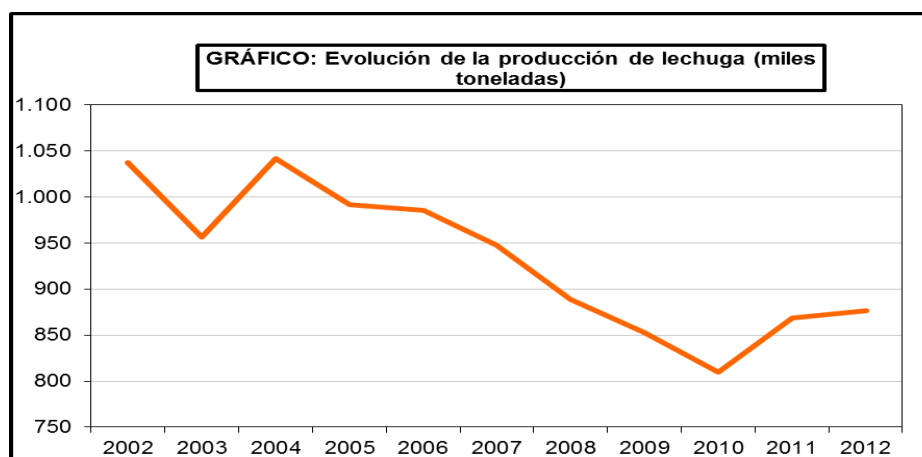


Figura 2: Evolución de la producción de lechugas en España

Por el contrario el valor de la producción por año de las lechugas ha sufrido una serie de altibajos desde 2002 hasta 2012, situándose finalmente con valores muy cercanos a los de 2002 (figura 3).

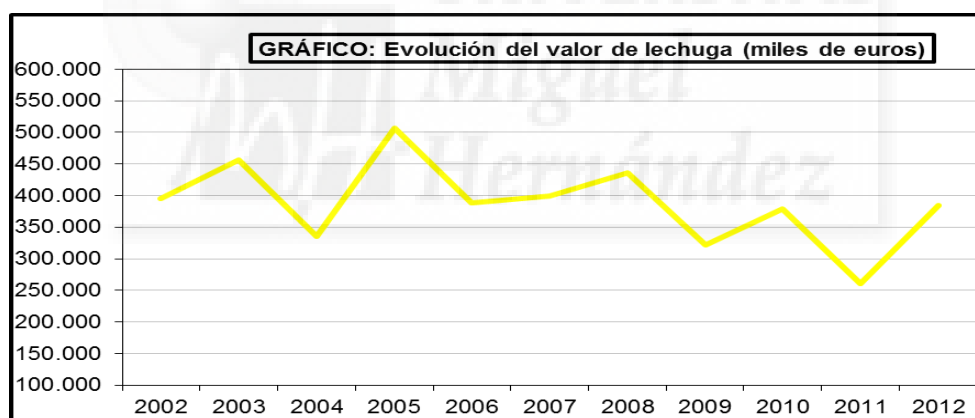


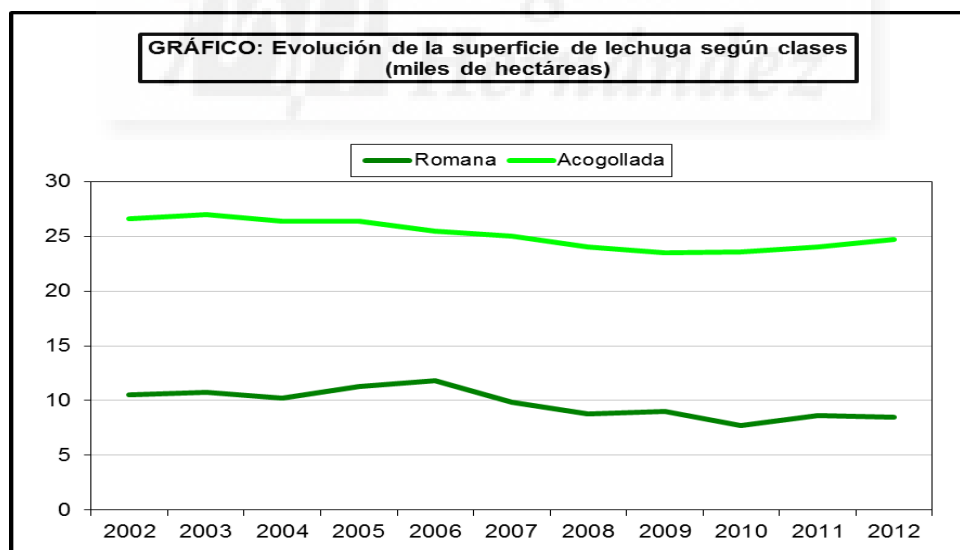
Figura 3: Evolución del valor de la producción por año de la lechuga en España

La variedad más cultivada en España es la acogollada (tipo iceberg) con una producción a final de 2012 de casi 629.000 toneladas y una superficie de plantación de casi 25.000 ha. La lechuga romana se produce en mucha menor cantidad rondando a final de 2012 las 250.000 toneladas y ocupando una superficie de 8.500 ha (Tabla VI).

Tabla VI: Comparación de los datos de producción y superficie de lechuga acogollada y lechuga romana.

Años	Lechuga romana		Lechuga acogollada	
	Superficie (miles de hectáreas)	Producción (miles de toneladas)	Superficie (miles de hectáreas)	Producción (miles de toneladas)
2002	10,5	321,8	26,6	715,3
2003	10,7	313,7	27,0	731,0
2004	10,3	309,0	26,4	732,7
2005	11,3	318,8	26,4	673,1
2006	11,8	341,3	25,5	644,6
2007	9,9	306,0	25,0	641,6
2008	8,8	270,6	24,1	618,7
2009	9,0	267,6	23,5	585,4
2010	7,7	225,8	23,5	583,6
2011	8,6	244,6	24,0	623,9
2012	8,5	248,4	24,7	628,6

En la siguiente figura vemos la evolución de la superficie cultivada y la comparación de las dos clases de lechuga, acogollada y romana (figura 4). Dicha evolución ha sufrido un descenso no muy significativo en los últimos diez años

**Figura 4:** Evolución de la superficie cultivada de lechuga acogollada y lechuga romana

Vemos que la producción también disminuyó en los últimos diez años (figura 5). Se observa en la gráfica que en la lechuga acogollada este descenso es mayor que en la romana, pasando de más de 700.000 toneladas a 600.000, mientras que en lechuga romana pasa de las 300.000 a las 250.000 toneladas.

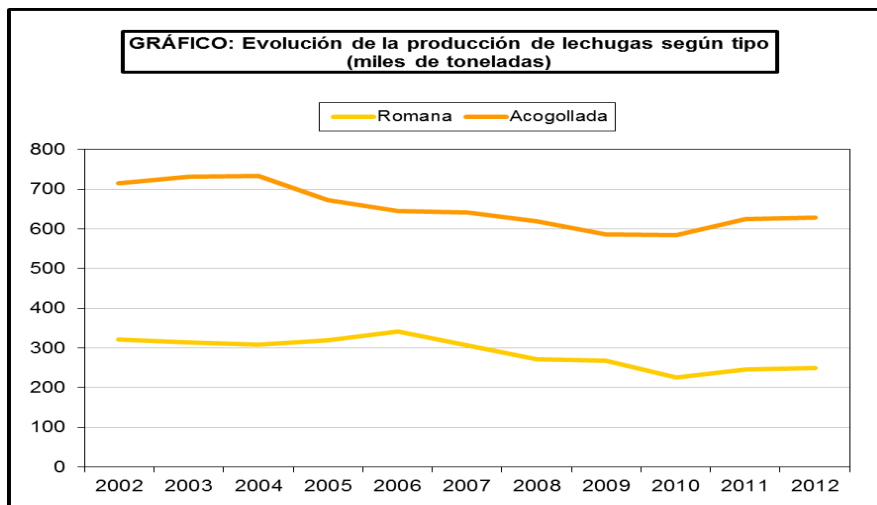


Figura 5: Evolución de la producción obtenida de lechuga acogollada y lechuga romana

Como se observa en la figura 6, la región de Murcia es la segunda comunidad que más superficie plantada tiene de lechuga romana en el país, después de Andalucía.

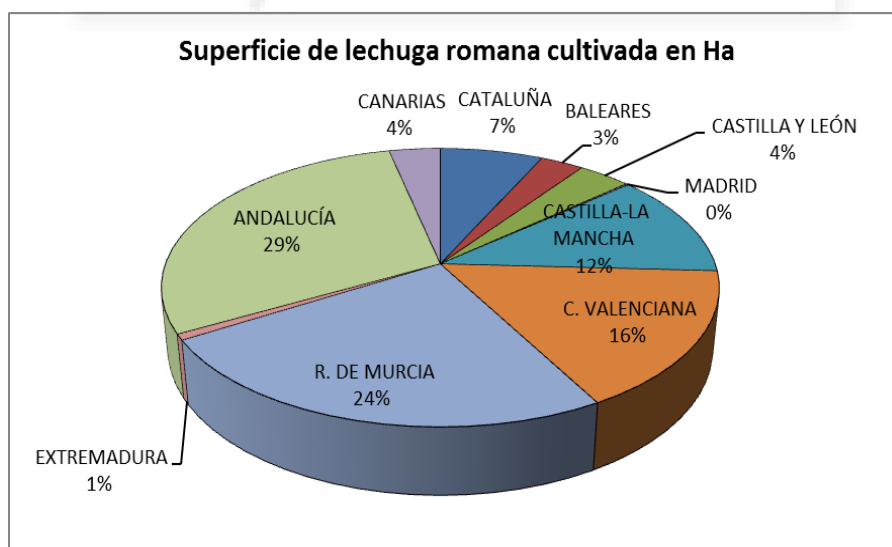


Figura 6: Superficie cultivada de lechuga romana por comunidades autónomas

Donde más lechugas romanas se producen es en Andalucía, y Murcia se encuentra en segundo lugar (figura 7).

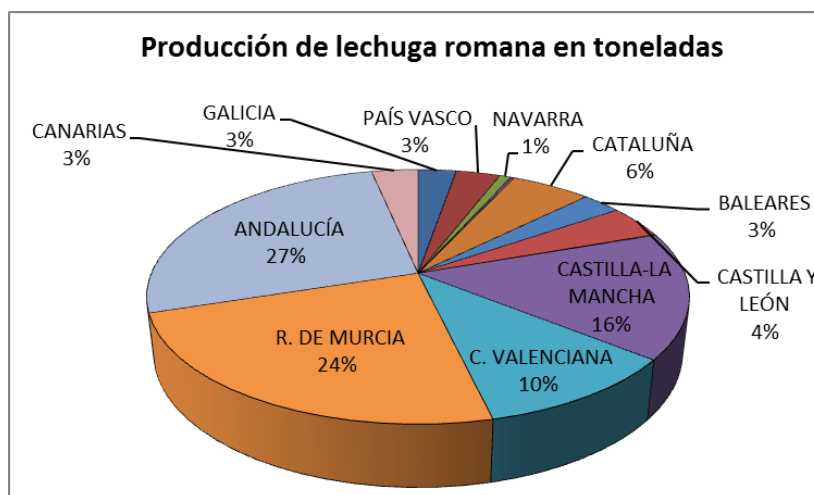


Figura 7: Superficie cultivada de lechuga romana por comunidades autónomas

Sin embargo, Navarra es la Comunidad Autónoma que presenta un mayor rendimiento del cultivo de la lechuga romana, con una producción de 50 t/ha (figura 8).

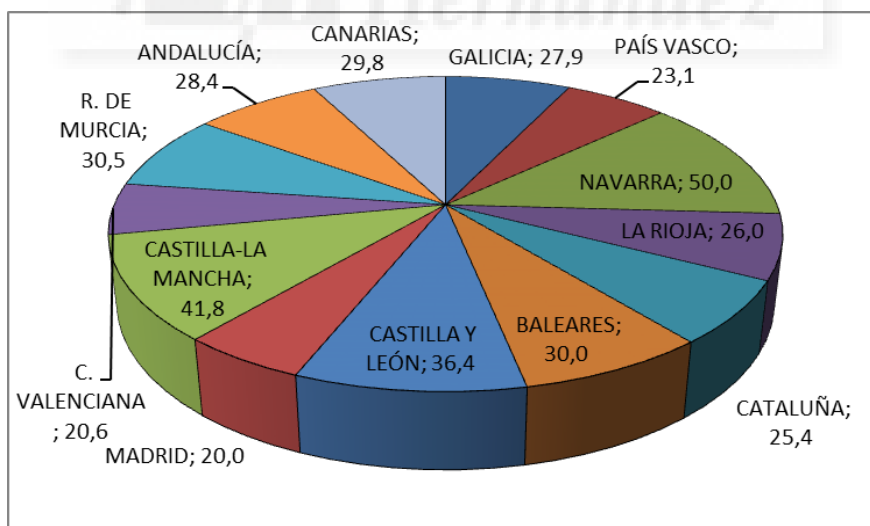


Figura 8: Rendimiento del cultivo de lechuga romana por comunidades autónomas (t/ha)

1.3.2. IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LA ESCAROLA A NIVEL NACIONAL

La superficie y producción de escarola en España es mucho más reducida que la de lechuga. En la tabla VII se muestran los datos de producción, superficie y rendimiento del cultivo de la escarola.

Tabla VII: Datos de superficie, producción y rendimiento del cultivo de escarola en España

Años	Superficie (miles de hectáreas)	Rendimiento (qm/ha)	Producción (miles de toneladas)	Precio medio percibido por los agricultores (euros/100kg)	Valor (miles de euros)
2002	2,8	253	71,1	51,40	36.545
2003	2,8	258	72,2	50,62	36.548
2004	3,0	261	77,1	52,48	40.443
2005	3,0	265	80,1	53,99	43.243
2006	2,9	253	72,2	55,38	39.977
2007	2,5	253	63,7	55,35	35.250
2008	2,4	258	61,9	49,34	30.535
2009	2,5	250	62,3	45,71	28.477
2010	2,4	250	59,8	54,13	32.371
2011	2,5	243	60,7	50,09	30.423
2012	2,4	246	59,0	50,10	29.537

Se observa en la figura 9 que la producción de escarola fue creciendo desde 2002 hasta alcanzar sus máximos a mediados de 2005. Posteriormente en los años siguientes ha habido una disminución bastante significativa hasta mediados de 2007. De 2007 hasta 2012 se ha ido manteniendo casi constante la producción entre 60.000 y 65.000 toneladas.

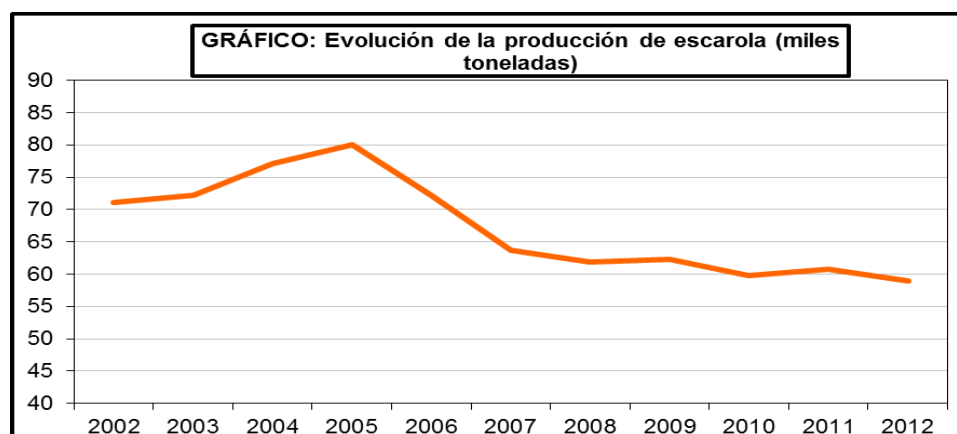


Figura 9: Evolución de la producción obtenida de escarolas en España.

En cuanto a la superficie cultivada, ha habido un ascenso en la superficie plantada desde 2002 hasta 2005, año que se alcanzó el máximo de 3.000 ha. En los últimos años ha ido disminuyendo hasta llegar en 2012 a los mínimos cultivados, de 2.400 ha (figura 10).

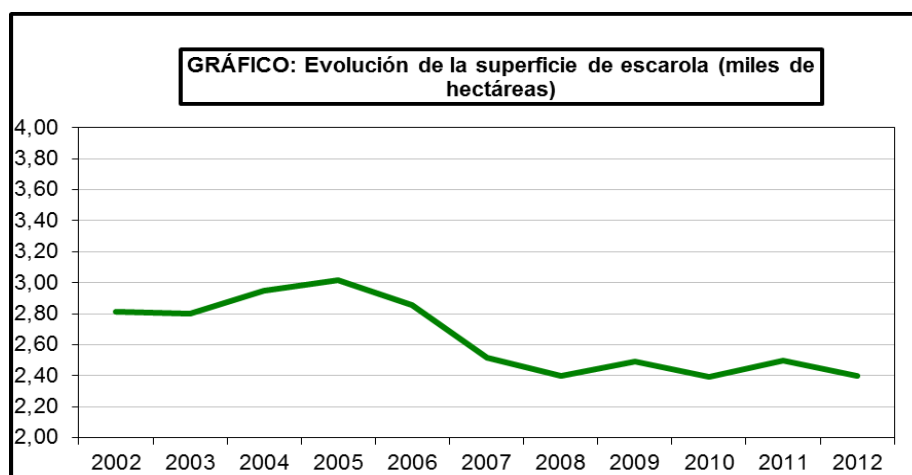


Figura 10: Evolución de la superficie del cultivo de escarola

El valor por año de la producción total de escarola alcanzó sus máximos a mediados de 2005, superando los 40 millones de euros. Sin embargo, a finales de 2012 no superaron los 30 millones de euros (figura 11).

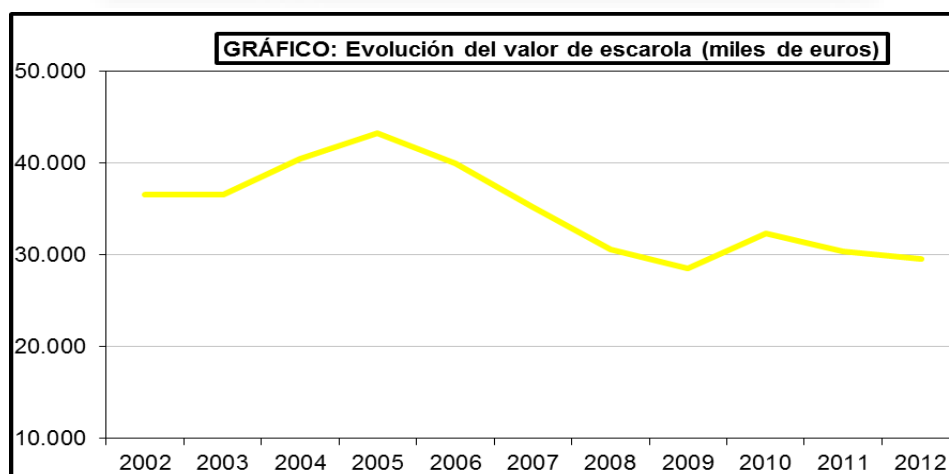


Figura 11: Evolución del valor de la producción de la escarola por año en España

Donde más superficie se ocupa de escarola, por Comunidades Autónomas, es en Cataluña, la Región de Murcia se encuentra en segundo lugar con 495 Ha y la Comunidad Valenciana es la cuarta, con una producción de 328 ha (figura 12).

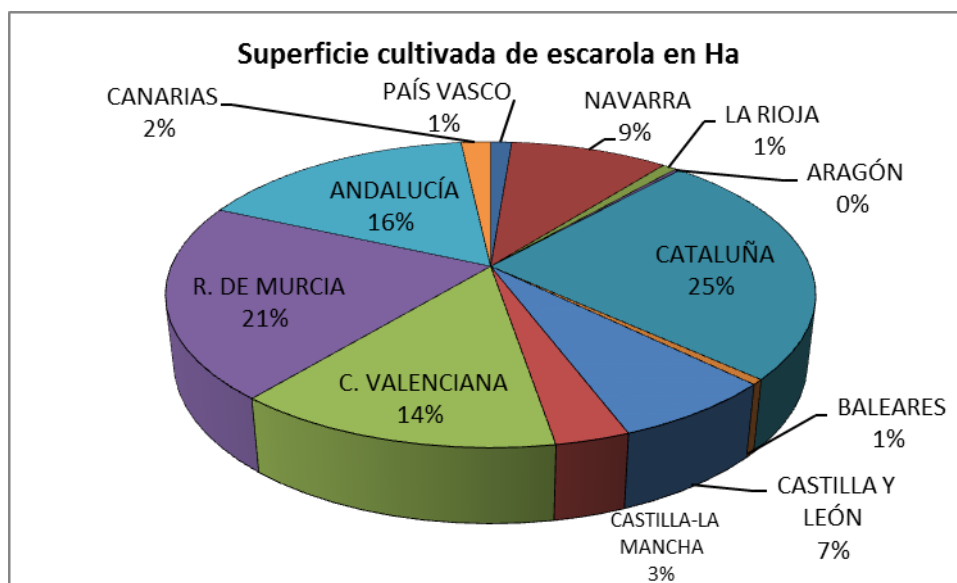


Figura 12: Superficie cultivada de escarola por comunidades autónomas

La Comunidad Autónoma que más escarolas produce es la Región de Murcia, con 12.375 toneladas (figura 13).

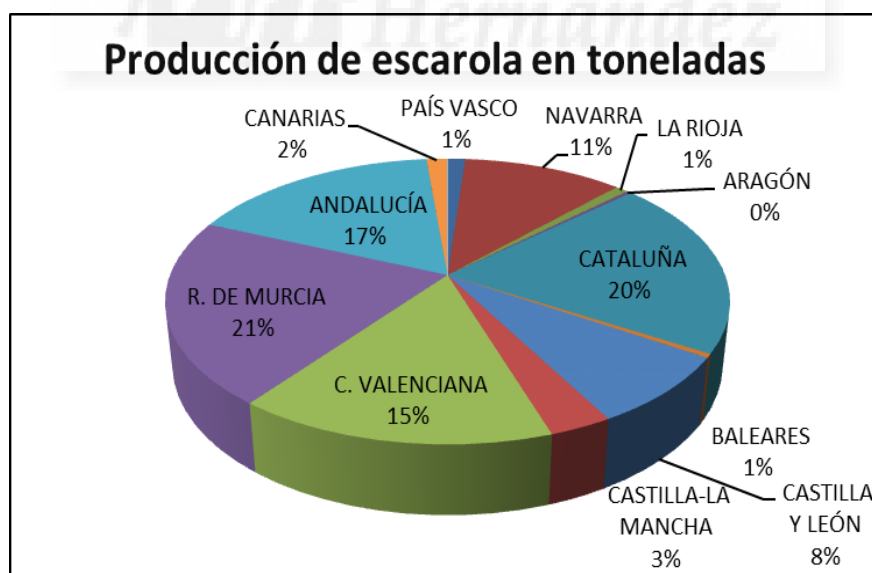


Figura 13: Producción de escarola por comunidades autónomas

Finalmente, el mayor rendimiento lo obtiene Aragón, seguido por Navarra y Castilla y León en tercer lugar (figura 14).

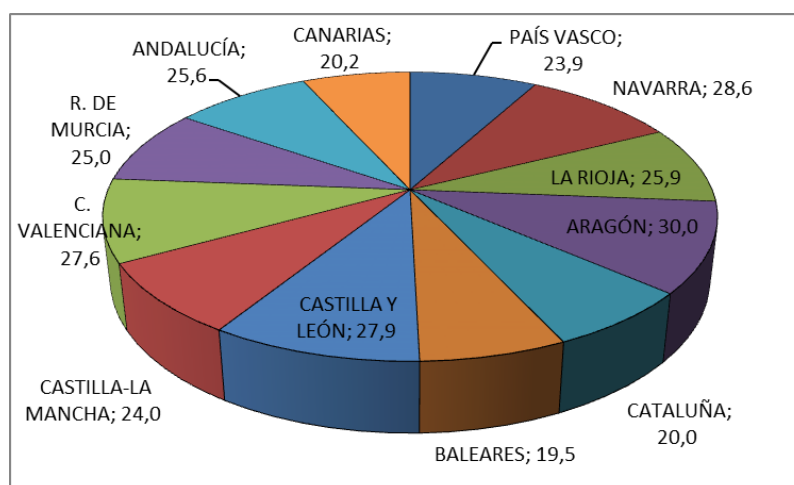


Figura 14: Rendimiento del cultivo de escarolas por comunidades autónomas

1.4. AZOTOBACTERIAS

1.4.1. INTRODUCCIÓN

Azotobacter chroococcum es un microorganismo aerobio, diazotrófico de vida libre, que se caracteriza por una eficiente fijación del nitrógeno atmosférico (N_2) al suelo y por producir sustancias fisiológicamente activas que estimulan el desarrollo y crecimiento de las plantas (Behl et al., 2007; Sarhan et al., 2011; Khan y Pariari, 2012). La clasificación taxonómica de esta bacteria es la que se encuentra en la tabla VIII.

Tabla VIII: Clasificación taxonómica

Dominio:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Gammaproteobacteria
Orden:	Pseudomonadales
Familia:	Pseudomonadaceae
Género:	<i>Azotobacter</i>
Especie:	<i>A. chroococcum</i>

Son bacterias Gram negativas que tienen una pared celular compleja que está formada por una membrana externa y una capa interna de peptidoglicano que contiene ácido murámico y mureína. Se reproducen por fisión binaria, viven en suelos y en aguas frescas, son células ovoides y grandes de 1.5 a 2.0 μm de diámetro. Son pleomórficas, variando su morfología desde bacilos hasta células en forma de cocos. Se les observa como células individuales, como pares o formando agregados irregulares, y algunas veces formando cadenas de tamaño variable. Sufren un proceso de diferenciación para formar quistes resistentes a la desecación.

Los quistes son células metabólicamente inactivas que son considerablemente más resistentes a condiciones adversas que las células vegetativas. En el laboratorio son viables durante más de 10 años cuando se mantienen en suelo seco (Vela, 1974), sugiriendo que la resistencia a la desecación les permite sobrevivir en estas condiciones en la naturaleza.

Se mueven por flagelos peritricos. Son aerobios, pero pueden crecer en concentraciones de oxígeno bajas. Algunas cepas producen pigmentos solubles o insolubles en agua.

Son quimioorganotróficos, utilizan azúcares, alcoholes y sales inorgánicas para crecer. Son fijadores de nitrógeno; en vida libre fijan al menos 10 mg de N_2 por gramo de carbohidrato (glucosa) consumido. Requieren molibdeno para fijar nitrógeno que puede ser parcialmente reemplazado por vanadio. Utilizan nitrato y sales de amonio y ciertos aminoácidos como fuentes de nitrógeno. Son catalasa positivos. El rango de pH en el que crecen en presencia de nitrógeno combinado es 4.8-8.5, aunque el pH óptimo para crecer cuando fijan nitrógeno es 7.0-7.5.

A continuación se muestra en la tabla IX un cuadro resumen con sus características más importantes:

Tabla IX: Resumen de las características *A. chroococcum*

BACTERIA	GRAM NEGATIVA
REPRODUCCION	BINARIA
MORFOLOGÍA	BACILOS-COCOS
FORMA DE RESISTENCIA	QUISTES
RESPIRACIÓN	AEROBIOS FACULTATIVOS
ALIMENTACIÓN	QUIMIORGANOTRÓFICOS
CRECIMIENTO ÓPTIMO	Ph: 7-7,5

El número de bacterias del género *Azotobacter* en los suelos de varias latitudes del mundo es muy variado y se encuentra en el orden de 10^4 células g^{-1} y se desarrolla más

intensivamente en la zona rizosférica de las plantas, que de forma libre en los suelos (Behl *et al.*, 2007). Estos hallazgos sugieren que las secreciones de las raíces de las plantas, pueden suministrar el medio adecuado para la existencia de estos microorganismos en los suelos (Behl *et al.*, 2007).

Khan y Pariari (2012) señalan que el incremento del nitrógeno proveniente de la fijación biológica es la vía más promisoría de suministrar cantidades significativas de este elemento a los sistemas agrícolas, sin contaminar el medio ambiente, mejorando el crecimiento, la productividad y la calidad de los frutos.

Las bacterias del género *Azotobacter* representan uno de los primeros géneros conocidos como fijadores del nitrógeno atmosférico. Fija 10 mg/g de hidrato de carbono consumido, por lo que tienen la capacidad de fijar entre 50 y 80 kg / ha.año (Mahajan *et al.*, 2003; Jarak *et al.*, 2010; Khan y Pariani, 2012).

Azotobacter chroococcum es la especie de mayor prevalencia en los suelos, pero otras especies han sido también aisladas, descritas e identificadas mediante análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado y dentro de ellas se incluyen: *A. agilis*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. insignis*, *A. macrocytogenes* y *A. paspali* (Aquilanti *et al.*, 2004).

Una de las características más importantes del *Azotobacter chroococcum* es su capacidad para utilizar gran variedad de fuentes de nitrógeno, como son el nitrógeno atmosférico, el nitrato, nitrito y amonio. De esta particularidad fisiológica se deriva la necesidad de regular la utilización de las diferentes fuentes nitrogenadas, siempre en función del mayor ahorro para la célula. Puesto que la fijación de nitrógeno es un proceso que se inhibe irreversiblemente por la presencia de oxígeno y *A. chroococcum* es aerobio, estas bacterias han desarrollado mecanismos que permiten proteger a la nitrogenasa del oxígeno.

Cuando las células de *A. chroococcum* disponen simultáneamente de más de una fuente de nitrógeno, se observa una fuerte jerarquización en la utilización de éstas, utilizando el amonio antes que el nitrato, y éste a su vez antes que el nitrito y finalmente el nitrógeno atmosférico. En presencia de amonio, se reprime la síntesis de los sistemas de fijación de nitrógeno y de asimilación de nitrato y nitrito (tabla X).

Tabla X: Jerarquización de los usos de nitrógeno

1	NH_4^+
2	NO_3^{2-}
3	NO_2^-
4	N_2

Cuando el nitrato (o nitrito) está presente en el medio, y en ausencia de amonio, se expresa el sistema responsable de su asimilación, manteniéndose reprimido el sistema de utilización del nitrógeno atmosférico. Por todo ello, sólo en ausencia de una fuente de nitrógeno combinada, se expresa el sistema de fijación de nitrógeno (Eady, 1981; Postgate, 1982; Revilla et al., 1986 Kennedy y Toukdarian, 1987).

1.4.2. ORGANISMOS FIJADORES DE NITRÓGENO

Los grupos de organismos fijadores de nitrógeno más importantes se encuentran en la tabla XI.

Tabla XI: Tipos de organismos fijadores N₂

ORGANISMOS FIJADORES DE NITRÓGENO	ASOCIACIONES SIMBIÓTICAS	LEGUMINOSAS, LÍQUENES
	SIMBIOSIS ASOCIATIVAS	GRAMÍNEAS, BACTERIAS
	BACTERIAS DE VIDA LIBRE	<i>Azotobacter chroococcum</i>

La mayoría de bacterias que fijan nitrógeno no están asociadas con plantas o animales. Ellas viven libres en el suelo y fijan nitrógeno para su propio beneficio y en el momento de su muerte este nitrógeno es aprovechado por las plantas. Las bacterias más ampliamente estudiadas de vida libre son *Azotobacter vinelandii* y *Azotobacter chroococcum* (aerobios estrictos), *Klebsiella pneumoniae* (anaerobio facultativo), *Clostridium pasteurianum* (anaerobio obligado), *Rhodobacter capsulatus* (bacterias fotosintética) y varias especies de *Anabaena*. La FBN que hacen estos organismos llega a ser generalmente disponible para el ecosistema circundante cuando la bacteria muere (Newton y Fisher, 2002).

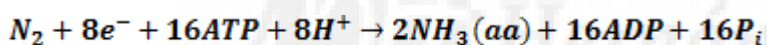
1.4.3. EL NITRÓGENO Y SU FIJACIÓN.

A pesar que el nitrógeno molecular (N₂) se encuentra en la atmósfera en una concentración de casi el 80%, ni plantas ni animales tienen una forma fácil para obtener el nitrógeno suficiente para su crecimiento. Esta situación se hace aún más crítica ya que el N₂ es una molécula muy estable químicamente y de esta forma no está disponible para la mayoría de los organismos vivos. Este debe ser fijado antes que pueda ser asimilado. Las formas más comunes de encontrar el nitrógeno fijado, es en forma de iones amonio y nitrato. La fijación de

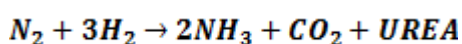
nitrógeno es el proceso mediante el cual se lleva a cabo la reducción de nitrógeno molecular a amonio (Newton y Fisher, 2002).

En la naturaleza existen dos formas de fijar nitrógeno. Un mecanismo es mediante energía lumínica en la cual la enorme cantidad de luz ioniza las moléculas en la atmósfera y las hace aptas para combinarse y formar óxidos de nitrógeno. Estos óxidos de nitrógeno se disuelven en la lluvia y forman nitritos y nitratos, los cuales son llevados a la tierra. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de energía lumínica alrededor del mundo, esta no es una forma efectiva de producir compuestos nitrogenados que puedan ser utilizados por plantas y animales. Esta forma de fijación de nitrógeno atmosférico probablemente contribuye con el 10% del total anual fijado.

La fuente más importante de nitrógeno fijado deriva de la actividad de ciertas bacterias del suelo que absorben el nitrógeno atmosférico y lo convierten en amonio. Algunas de estas bacterias son libres en suelo y se alimentan de materia orgánica muerta. Otras bacterias fijadoras de nitrógeno, son encontradas creciendo en asociación con las raíces de plantas mayores. Las plantas suplen a la bacteria con la energía para crecer, mientras que la bacteria suple a la planta con nitrógeno fijado. Debido a que tanto la planta como la bacteria se benefician a partir de esta relación, esta interacción se denomina simbiosis. Los procesos biológicos contribuyen con alrededor del 65% de la producción total anual de nitrógeno fijado (Newton y Fisher, 2002). La fijación biológica del nitrógeno a través de microorganismos del suelo sigue la siguiente reacción global:



La síntesis comercial de amonio es otra forma diferente de fijar nitrógeno y contribuye aproximadamente con el 25% del total de nitrógeno fijado anualmente. Aquí el N_2 y el hidrógeno (H_2) son combinados a alta presión y temperatura para formar amonio, el método se denomina Haber-Bosch en honor a sus creadores, sin embargo este es un proceso ambiental y energéticamente costoso (Newton y Fisher, 2002), que requiere 500-1000°C, 200-300 atm, H_2 (petróleo, gas natural, metano) y catalizadores. La reacción global es la siguiente:



1.4.4. FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO. LA NITROGENASA

La fijación biológica de nitrógeno o reducción de N_2 a NH_4 , es un proceso que pueden llevar a cabo solo algunos procariontes gracias a que poseen el complejo enzimático conocido como nitrogenasa, la cual está formada por dos proteínas: una proteína que contiene hierro (proteína-Fe) y otra que contiene molibdeno y hierro (proteína Mo-Fe). La nitrogenasa que contiene molibdeno Mo es la más ampliamente distribuida.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno o diazótrofes, ocupan un nicho ecológico indispensable ya que suplen de nitrógeno fijado al ciclo global del nitrógeno. Gracias a este papel, los diazótrofes están presentes virtualmente en todos los ecosistemas, con representantes en ambientes tan variados como la superficie de los océanos (*Tricodesmium*), los nódulos de las raíces de las plantas (*Rhizobium*), y en suelos aeróbicos como es el caso de *Azotobacter*.

En cualquier ecosistema los diazótrofes responden a condiciones variadas del ambiente para regular el muy caro proceso de fijación de nitrógeno. Todos los diazótrofes regulan la nitrogenasa a nivel transcripcional. Algunos también poseen sistemas rápidos de regulación postranscripcional.

La fijación de nitrógeno o reducción de N_2 a NH_4 requiere 8 electrones, por lo tanto se requiere un mínimo de 16 ATP para reducir una molécula de N_2 atmosférico. Además la reducción de N_2 está siempre acoplada a la reducción de H^+ a H_2 . El ATP utilizado en la fijación de nitrógeno lo provee la respiración aeróbica. Por lo tanto la fijación de nitrógeno aeróbica requiere una concentración de O_2 mínima.

La nitrogenasa purificada es inactivada rápida e irreversiblemente por el O_2 (Gallon, 1992.). La proteína-Fe es mucho más sensible que la proteína-MoFe, con una vida media en presencia de aire de 45 segundos y 10 minutos respectivamente (Robson y Postgate, 1980). *Azotobacter* fija nitrógeno en aerobiosis gracias a que posee un sistema bien integrado de protección de su nitrogenasa que comprende: protección conformacional, protección respiratoria, autoprotección y otros cambios morfológicos y fisiológicos que le permiten crecer diazotróficamente en condiciones totalmente aeróbicas (Manchal y Vanderleyden, 2000).

La bacteria *azotobacter chroococcum* posee varios mecanismos de defensa para proteger a la nitrogenasa frente al oxígeno (tabla XII).

Tabla XII: Mecanismos de defensa frente al O_2

Mecanismos de defensa	Protección conformacional
	Protección respiratoria
	Autoprotección

PROTECCIÓN CONFORMACIONAL.

Un aumento pasajero del O_2 provoca un mecanismo de inactivación (switching-off) de la nitrogenasa, que consiste en la formación de un complejo de nitrogenasa inactivado pero protegido, conocido como protección conformacional. Este complejo está formado por la unión no covalente de una proteína que contiene Fe-S (conocida como FeSII o Shetna) a las proteínas Fe y MoFe (Moshiri et al., 1995).

PROTECCIÓN RESPIRATORIA.

Cuando las células se adaptan al ambiente de mayor concentración de O_2 , se expresa la citocromo oxidasa, parcialmente desacoplada con baja afinidad por O_2 , la cual probablemente actúa junto con una NADH deshidrogenasa desacoplada. El flujo de electrones a través de esta cadena desacoplada permite tasas de respiración altas y un rápido consumo del O_2 intracelular sin agotar las reservas de ATP y NADH. La tasa respiratoria en condiciones de fijación de nitrógeno atmosférico es 10 veces más alta que la tasa normal de muchas bacterias. Además de reducir el O_2 la citocromo oxidasa cyt bd, funcionaría como un productor de ATP rápido ya que se necesitan grandes cantidades de ATP para la autoprotección de la nitrogenasa.

AUTOPROTECCIÓN.

Si la concentración de nitrogenasa es lo suficientemente alta en relación a la concentración de O_2 celular, la nitrogenasa reductasa puede reducir O_2 a H_2O_2 y posiblemente a H_2O y por lo tanto reduciría el O_2 en la vecindad de la nitrogenasa. Además el flujo constante de equivalentes reductores a través de la nitrogenasa puede ayudar a mantenerla en un estado reducido (Thorneley y Ashby, 1989).

Este proceso conocido como autoprotección requiere grandes cantidades de equivalentes reductores y ATP.

1.4.5 EFECTO DEL *AZOTOBACTER* SOBRE EL RENDIMIENTO DE LAS PLANTAS

Se conoce el importante papel que desempeña el *Azotobacter* en el crecimiento y desarrollo de las plantas, incluso son capaces de incrementar el rendimiento de los cultivos. Los valores varían de acuerdo con la bacteria y su afinidad por el cultivo, lo que indica especificidad del microorganismo e incluso de las cepas. González (2000) demostró que con la inoculación de la azotobacteria había mucha más tendencia al aumento del rendimiento en tomates que en lechuga. También plantea que en la aplicación del biofertilizante con la dosis completa de fertilizante nitrogenado no hay fijación de nitrógeno, porque las bacterias utilizan el que abundantemente tienen a su alcance y no gastan energía en la fijación (que tiene un alto costo de energía biológica), pero se observa el incremento del rendimiento por la acción de las sustancias activas de la bacteria.

1.4.5.1 PRODUCCIÓN DE FITOHORMONAS Y EFECTO BIOESTIMULANTE

De acuerdo a Milic et al. (2004), las bacterias del género *Azotobacter* son microorganismos asimbióticos, que actúan como biofertilizantes y bioestimulantes del crecimiento vegetal. Estos son capaces de producir en sus exudados metabólicos, sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal tales como: auxinas, citoquininas, giberelinas, vitaminas y sideróforos (Revillas et al., 2000; Tsavkelova et al., 2006; Jarak et al., 2010).

En la tabla XIII se muestran las sustancias de mayor interés que la bacteria le puede aportar a la planta:

Tabla XIII: Sustancias aportadas por *Azotobacter*

SUSTANCIAS PRODUCIDAS POR AZOTOBACTER	AIA
	GA
	CITOQUININAS
	VITAMINAS
	SIDERÓFOROS
	S.FUNGISTÁTICAS
	PROTEINAS

El ácido indolacético (AIA) es la principal auxina de las plantas y es una de las fitohormonas de mayor relevancia dado que regula muchos aspectos del crecimiento y desarrollo vegetal como la división, elongación y diferenciación celular (Zaho, 2010).

Por otro lado, la giberelina es una fitohormona producida en zonas jóvenes, frutos y semillas. Sus principales funciones son la interrupción del período de latencia de las semillas, haciéndolas germinar, la inducción del desarrollo de yemas y frutos y la regulación del crecimiento longitudinal del tallo como así también la elongación de órganos axiales: pecíolos, pedúnculos, etc.

Los sideróforos son sistemas específicos de adquisición de hierro basados en el empleo de sustancias quelantes de bajo peso molecular (Kraepiel et al. 2009). Éstos son secretados al ambiente, capturan los iones férricos y luego el complejo sideróforo-Fe⁺³ es absorbido por las células bacterianas tras un reconocimiento específico llevado a cabo por proteínas de membrana (Hofte y Baker 2007). La adquisición de hierro mediada por sideróforos juega un rol fundamental en la habilidad de los microorganismos para colonizar las raíces e interviene en las interacciones que se establecen entre los microorganismos en la rizósfera. La competencia por hierro a través de la producción de sideróforos es uno de los mecanismos observados en algunas bacterias capaces de controlar patógenos del suelo (Lugtenberg y Kamilova 2009). Además, la producción de sideróforos por bacterias colonizadoras de la raíz puede desencadenar también una mejora del sistema de defensa de la planta de manera sistémica, fenómeno denominado resistencia sistémica inducida (ISR) (Hofte y Baker 2007).

Los sideróforos son producidos por, al menos, tres especies del género *Azotobacter*, *A. chroococcum*, *A. vinelandii* y *A. salinestrus* (Kennedy et al. 2005).

La producción de fitohormonas por *Azotobacter* podría estar implicada en la respuesta observada en los vegetales (Jackson et al. 1964, Azcón y Barea 1975, Nieto y Frankenberger 1990). Por ejemplo, González-López et al. (1986), publicaron que *A. vinelandii* produce auxinas, giberelinas y citoquininas en medio químicamente definido. Azcón y Barea (1975) detectaron auxinas, citoquininas y giberelinas en los sobrenadantes de una cepa de *A. beijerinckii* y otra de *A. chroococcum*. Por su parte, Brown y Burlingham (1968) publicaron la producción de ácido giberélico por una cepa de *A. chroococcum*.

Martínez-Viera et al. (1997), publicaron que *Azotobacter chroococcum* sintetiza, entre otras sustancias, ácido nicotínico (240-600 mg g⁻¹), tiamina (50-100 mg g⁻¹ de sustancia celular seca), ácido pantoténico (más de 500 mg g⁻¹), biotina (6-16 mg g⁻¹), riboflavina (4,5-11 mg g⁻¹) y otras vitaminas.

Por otra parte, Verma et al. (2001) señalan que estos microorganismos son capaces de liberar sustancias fungistáticas que inhiben el crecimiento de hongos fitopatógenos y nematodos del suelo, promoviendo de esta manera el desarrollo de las plantas.

Mezei et al. (1998) han estudiado la presencia de enzimas del metabolismo nitrogenado y proteico en excreciones de la bacteria *Azotobacter*. En tanto, Milic et al. (2004), publicaron el hallazgo de sustancias bioestimulantes y de proteínas, que pueden producir diferentes modificaciones fisiológicas en las plantas, al intervenir en los procesos de fotosíntesis y en la respiración celular.

1.4.6. PERSPECTIVAS DEL USO DEL AZOTOBACTER EN LA AGRICULTURA CONTEMPORÁNEA.

Actualmente, existe un gran interés y conciencia por usar *Azotobacter* como un bioinoculante microbiano y como un componente básico de las estrategias de manejo integrado de nutrientes, para lograr un uso más eficiente de los nutrientes en las plantas, y para enfrentar el elevado coste de los fertilizantes minerales y sus efectos adversos a largo plazo en los ecosistemas agrícolas (Behl et al., 2007; Khan y Pariari, 2012; Tahir y Sarwar, 2013).

Con el empleo de *Azotobacter* se han obtenido resultados muy positivos en diferentes cultivos agrícolas como: tomate, ajo, cebolla y pimiento (Foly et al., 2002; Yaso et al., 2007), entre otros.



OBJETIVO

2. OBJETIVOS

La bacteria diazótropa de crecimiento libre en el suelo *Azotobacter chroococcum* se caracteriza por presentar una alta fijación de N_2 atmosférico, así como por excretar a la rizosfera de las plantas fitohormonas tales como AIA, giberelinas y citoquininas, además de solubilizar fosfatos insolubles. Por esta razón, se han utilizado diversas cepas de esta especie como biofertilizantes para incrementar la producción de cosechas. Sin embargo, no todas las cepas tienen las mismas características en cuanto a la síntesis de fitohormonas, y solubilización de fosfatos. Además, no todas las cepas se adaptan igual a todos los suelos y, tampoco tienen la misma afinidad con las especies vegetales a las que se les va a tratar.

Por todas estas razones los objetivos de este trabajo han sido:

1. Conseguir una cepa a utilizar y caracterizarla en cuanto a las fitohormonas que sintetice y si es capaz de solubilizar fosfatos insolubles.
2. Evaluar si se mantiene la concentración aplicada de bacterias en los suelos objeto de estudio.
3. Comprobar la afinidad de esta cepa con dos especies vegetales, lechugas y escarolas, tanto en semillero como en campo. Para esto se estudiarán diferentes parámetros productivos y de calidad, tales como % de germinación, peso, longitud y contenido en clorofilas de plántulas en semillero y producción, peso fresco, longitud, proteínas y contenido en humedad en plantas en campo.
4. Debido a que es una bacteria diazótropa, se va a inocular en lechugas y escarolas que se van a cultivar en suelos ecológicos (no abonados) y no ecológicos (abonados) para comprobar si la fijación de N_2 producida por las bacterias puede sustituir el abonado nitrogenado.



MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1 MATERIAL VEGETAL.

La variedad de lechuga empleada para el experimento fue lechuga romana variedad cervantes RZ de la casa Kitkzwaan, de color claro y vigor medio-alto. Muy buena formación del corazón y muy buena base. Buen comportamiento frente al Tip Burn, al espiralizado (twisting), emisión de dobles cabezas y de subida a flor muy lenta. Variedad válida para pieza entera y embolsado de corazones. Recomendada para recolecciones de primavera, verano y otoño según zonas.

La escarola empleada fue rizada doble de verano variedad estival de la casa de semillas Fito España. Variedad de hojas erguidas y anchas, finas y crepas, de gran resistencia al calor que blanquean fácilmente. Se siembra de febrero a julio, aconsejando que las primeras siembras sean de asiento y las más tardías en semillero, trasplantándose o aclarando al marco de 40 x25 cm. Para su blanqueo deberán atarse unos 15 días antes de su recolección, que normalmente se produce a los 3 meses de su siembra.

3.2. *Azotobacter chroococcum*.

La cepa utilizada es la CECT 4103, que es la cepa tipo de la Colección Española de Cultivos Tipo de la Universitat de València.

3.3. DISEÑO DEL EXPERIMENTO

El experimento consta de varias etapas. La primera etapa fue la recuperación de las bacterias liofilizadas y su cultivo en el medio apropiado. La segunda etapa consistió en la inoculación de la bacteria en semillero tanto a semillas de escarola como a semillas de lechuga. Finalmente, la tercera etapa fue el trasplante de las plántulas a suelo ecológico y no ecológico hasta la recolección comercial de las lechugas y escarolas.

Una vez obtenidas las plántulas del semillero, comprobamos la altura de la parte aérea, radicular y su peso, también por separado.

Se midieron las clorofilas por espectrofotometría y se midió el porcentaje de germinación de las semillas de escarola.

Una vez finalizado el ciclo de cultivo, recolectamos las plantas y medimos su longitud, peso, diámetro, humedad y proteínas.

3.3.1. RECUPERACIÓN DEL CULTIVO LIOFILIZADO

Para la recuperación del cultivo liofilizado se siguieron minuciosamente las instrucciones editadas por el organismo suministrador. El liofilizado se resuspendió asépticamente en 0.5 mL de medio líquido libre de nitrógeno con ayuda de una pipeta Pasteur estéril. Con unas gotas de la suspensión obtenida se sembraron dos placas de Petri con medio de cultivo sólido libre de nitrógeno (Medio Norris Tabla XIV) y el resto se añadió a un tubo de ensayo con tapón de rosca que contenía 10 mL de medio líquido. Las placas, en posición invertida, junto con el tubo se incubaron a 28 ± 1 °C durante 4 días. Finalmente, con el cultivo obtenido se inocularon 500 mL de medio líquido fresco en un matraz Erlenmeyer que se mantuvo en las mismas condiciones de incubación. La cosecha máxima alcanzada fue de 7.58 ± 0.03 log CFU/mL.

Tabla XIV: Medio de cultivo NORRIS

NORRIS MEDIUM
-K ₂ HPO ₄ 1.00 g
-MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.20 g
-CaCO ₃ 1.00 g
-NaCl 0.20 g
-FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.10 g
-Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O 5.00 mg
-Agar powder (solo para medio sólido) 15.00 g
-Glucosa 10.00 g
-Agua destilada 950 ml

Se preparó suficiente cantidad tanto de medio de cultivo líquido y sólido (Fotografías 33 y 34) para realizar las pertinentes diluciones decimales y para la recuperación del cultivo.



Fotografía 33: Medio Norris líquido.



Fotografía 34: Medio Norris sólido.

3.3.2. DISEÑO DEL EXPERIMENTO EN SEMILLERO

Tanto el ensayo de lechuga como el de escarola se llevaron a cabo en el semillero comercial denominado Serviplant, situado en el término municipal de Dolores (Alicante). Para el experimento en semillero disponíamos de 3 bandejas de 294 alveolos cada una. Los alveolos estaban provistos de una mezcla de turba al 80% y perlita al 20%. El 17 de marzo de 2015, se realizó una aplicación a cada alveolo, cada una a la concentración correspondiente de la bacteria. En la bandeja para la lechuga incorporamos una sola semilla por alveolo, pero para la escarola se sembraron en cada hueco de 4 a 5 semillas. En la fotografía 35 se muestra una de las bandejas utilizadas.



Fotografía 35: Bandeja corcho con 296 alveolos.

Cada bandeja contenía los siguientes tratamientos:

Bandeja 1:

98 lechugas control, con 1 mL de agua destilada.

98 lechugas con 1 ml de *A. chroococcum* 1.10^6 UFC/mL en cada alveolo.

98 lechugas con 1ml de *A. chroococcum* 1.10^7 UFC/mL en cada alveolo.

Bandeja 2:

98 escarolas control, con 1 mL de agua destilada.

98 escarolas con 1 mL de *A. chroococcum* 1.10^6 UFC/ml en cada alveolo.

98 escarolas con 1 mL de *A. chroococcum* 1.10^7 UFC/ml en cada alveolo.

Bandeja 3:

130 lechugas control, con 1 mL de agua destilada.

130 escarolas control, con 1 mL de agua destilada.

En la fotografía 36 se ilustra el momento en el que se efectuaron los tratamientos.



Fotografía 36: Momento de inoculación de la bacteria

Después del tratamiento, las bandejas estuvieron 2 días en una cámara de germinación a 26°C y alta humedad relativa, y posteriormente pasaron al invernadero dónde fueron regadas por aspersión.

Una vez alcanzado el tamaño adecuado, después de 1 mes, el 20 de abril, recogimos las plántulas y las llevamos al laboratorio (fotografías 37 y 38).



Fotografía 37: Escarolas recibidas del semillero con los distintos tratamientos.



Fotografía 38: Lechugas recibidas del semillero con los distintos tratamientos.

3.3.3. ENSAYOS DE LECHUGA Y ESCAROLA EN NO ECOLÓGICO

3.3.3.1. MARCO DE PLANTACIÓN

Las plántulas de lechugas y escarolas se dispusieron en líneas dobles y la separación entre las plántulas dentro de cada línea fue de 40 cm, la separación entre líneas de 50 cm y la separación entre ejes de 100 cm (fotografía 39 y 40).



Fotografía 39: Realizando las labores de trasplante en parcela no ecológica.

El trasplante se realizó mediante un trasplantador manual de hortalizas.



Fotografía 40: Vista de la parcela del cultivo no ecológico.

3.3.3.2. RIEGO Y FERTIRRIGACIÓN.

Una vez trasplantadas las plántulas se dieron riegos de 5 horas los primeros días para que se mantuviera una buena humedad en el suelo para que favoreciera el

arraigue y se produjera un buen desarrollo radicular. Los días siguientes se dieron riegos de hora y media todos los días.

El abono fue disuelto en el agua de riego y se realizó siguiendo las referencias de la tabla XV:

Tabla XV: Fertirrigación de la parcela experimental no ecológica

Semana a partir de la plantación	Nitrato amónico(33,5% N) (Kg/ha)	Ácido fosfórico(54 % P ₂ O ₅) (l/ha)	Nitrato potásico(13-0-46) (Kg/ha)
1a	0	0	0
2a	8	5	13
3a	14	10	22
4a	28	20	44
5a	43	20	65
6a	43	15	65
7a	57	10	87
8a	57	10	87
9a	35	5	52
10a	0	0	0
Total	285	95	435

3.3.3.3. TRATAMIENTOS FITOSANITARIOS

Los tratamientos fitosanitarios se aplicaron según indica la tabla XVI.

Tabla XVI: Tratamientos fitosanitarios

Semana a partir de la plantación	tratamientos fitosanitarios
1a	
2a	
3a	
4a	Imidacloprid 20%, Agral (mojante)
5a	calcio quelatado
6a	Lambda Cihalotrin 2.5% WG, Abamectina, Agral (mojante)
7a	Imidacloprid 20%, Agral (mojante), Spinosad 48 SC
8a	Agral (mojante), Azoxistrobin (ortiva), Pirimicarb 50
9a	
10a	

El imidacloprid se utilizó para combatir la plaga de mosca blanca que disponían las escarolas, y para el pulgón.

Azoxistrobin para oidio, abamectina para liriomyza, spinosad para trips y orugas, pirimicarb también para pulgón y lambda cihalotrín para orugas.

Se dispusieron además cintas ahuyentadoras para pájaros. A partir de la 4ª semana se eliminaron las malas hierbas manualmente una vez cada dos semanas.

Para prevenir el tip burn utilizamos calcio quelatado y lo aplicamos vía foliar pulverizado.

3.3.3. ENSAYOS DE LECHUGA Y ESCAROLA EN ECOLÓGICO

3.3.3.1. MARCO DE PLANTACIÓN

En la parcela de cultivo ecológico el marco de plantación fue igual que el anterior, pero a diferencia de que la separación entre lechugas fue de 30 cm, es decir, se dispusieron en líneas dobles y la separación entre plantas dentro de cada línea fue de 30 cm, la separación entre líneas de 50 cm y la separación entre ejes de 100 cm.



Fotografía 41: Realizando las labores de trasplante en la parcela ecológica

3.3.3.2. RIEGO Y FERTIRRIGACIÓN

El riego fue el mismo que en el suelo no ecológico. En el cultivo ecológico no se realizó ningún abonado.

3.3.3.3. TRATAMIENTOS FITOSANITARIOS

Los tratamientos fitosanitarios se siguieron conforme indica la tabla XVII.

Tabla XVII: Tratamientos fotosanitarios realizados en la parcela experimental ecológica

Semana a partir de la plantación	tratamientos fitosanitarios
1a	
2a	
3a	Aceite de Neem
4a	Bacillus thuringiensis Kurtaki 32 Mill.
5a	Spinosad 48 SC
6a	Aceite de Neem
7a	Calcio quelatado
8a	V55
9a	
10a	

El aceite de Nemm se utilizó para combatir la plaga de mosca blanca, el *Bacillus thuringiensis* para orugas y el V55 para el oidio.

Además Se dispusieron cintas ahuyentadoras para pájaros. A partir de la 4ª semana se eliminaron las malas hierbas manualmente una vez cada dos semanas.



Fotografía 42: Vista de la parcela ecológica ya trasplantada

3.4. PLAN DE TRABAJO

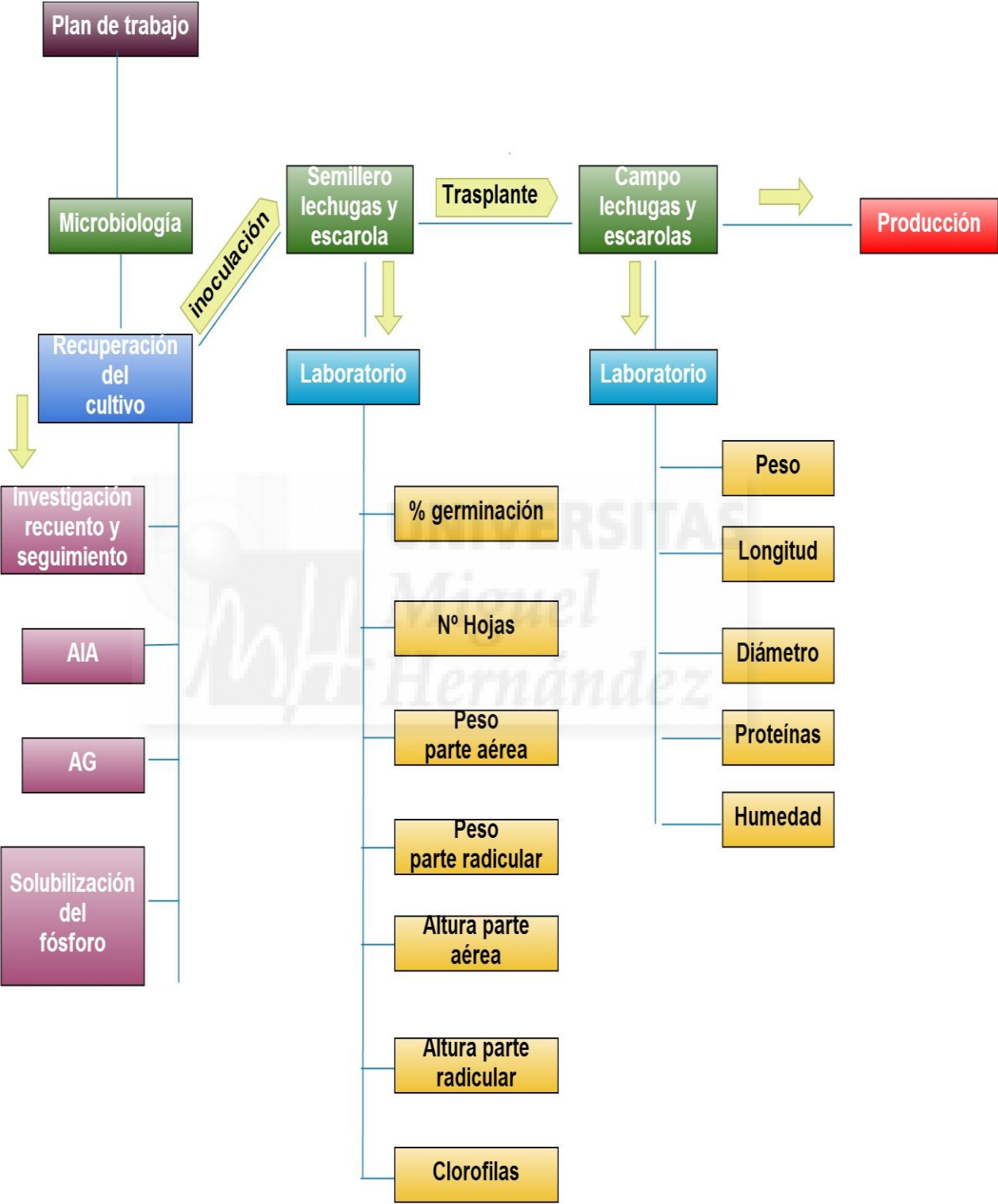
En las cuatro experiencias llevadas a cabo en este trabajo (lechuga y escarola en cultivo ecológico y en tradicional), el plan de trabajo ha sido el siguiente:

- 1) El 26 de febrero de 2015 se realizó el medio de cultivo con la bacteria. Se prepararon dos concentraciones de *A. chroococcum*: 10^6 y 10^7 UFC/mL para realizar los tratamientos.
- 2) El 17 de marzo de 2015 se inocularon las bacterias en semillero. Los tratamientos fueron 3: el control y las dos concentraciones de *A. chroococcum* preparadas, para lechuga y escarola.
- 3) Determinación de la producción de las hormonas ácido indolacético y ácido giberélico, por *A. chroococcum*.
- 4) Al mes de la inoculación, el 20 de abril, se analiza microbiológicamente el cepellón, antes del trasplante, y el suelo, tanto ecológico como no ecológico, para conocer la concentración de *A. chroococcum* que poseen.
- 5) El 21 de abril se realizó el trasplante al campo. Se plantaron 35 plántulas en ecológico y otras 35 en no ecológico, para cada especie y tratamiento. Se utilizaron plántulas no tratadas para completar dos líneas de bordes de las parcelas.
- 6) Se tomaron 15 plántulas de lechuga y de escarola de cada tratamiento que se llevaron a laboratorio para determinar los siguientes parámetros físicos: el porcentaje de germinación, número de hojas, la altura y peso de la parte aérea y radicular de las plántulas.

- 7) Parte de estas muestras se congelaron a -80°C para determinar posteriormente su contenido en clorofilas a, b y totales, determinación que se hizo a 6 submuestras de cada tratamiento y especie.
- 8) Una vez acabado el ciclo de cultivo y recolectadas las hortalizas, el 12 de junio, procedimos determinar el peso total y por tanto la producción de las cosechas de cada tratamiento. y después.
- 9) Posteriormente se llevaron al laboratorio para determinar el peso, y la longitud y diámetro a 6 submuestras de cada tratamiento y especie.
- 10) Parte de las muestras se congelaron para medir posteriormente el contenido de proteínas, que se realizó a 4 submuestras de cada tratamiento y especie.
- 11) Otra parte de las muestras se desecaron para hallar el porcentaje de humedad y su peso seco, que se realizó a 5 submuestras de cada tratamiento y especie.



El plan de trabajo se muestra resumido en el siguiente esquema:



3.5. CULTIVO DE AZOTOBACTER

3.5.1. INVESTIGACIÓN Y RECuento DE *A. chroococcum*

Para hacer el recuento de bacterias y, por tanto, conocer su concentración (tanto en el medio de cultivo como en suelo o en cepellón) se siguió el siguiente protocolo. A partir de las muestras bien homogeneizadas, se prepararon diluciones decimales, resuspendiendo 1g de muestra en 9 mL de suero fisiológico (NaCl al 0.9%) estéril. De la serie de diluciones decimales, y por triplicado, se sembraron por extensión en superficie (0.1 mL) placas de Petri con medio sólido libre de nitrógeno. La incubación de las placas se realizó en posición invertida a 28 ± 1 °C durante 4 días. El número medio de colonias contadas por placa, multiplicado por el factor de dilución de la serie de placas elegidas (con aproximadamente entre 30 y 300 colonias aisladas), da como resultado el recuento total de *Azotobacter* por gramo (o mL en el caso de cultivo puro) de la muestra analizada.

3.5.2. DETERMINACIÓN DE AIA

La determinación de AIA en disoluciones microbiológicas se realizó por espectrofotometría con el método de Salkowski (Salkowski, 1889). Este método se basa en la utilización del reactivo de Salkowski que permite la oxidación de compuestos indólicos por sales férricas (Mayer, 1958). Cuando la respuesta es positiva se obtiene una coloración rosada que va desde el rosa claro a intenso dependiendo de la concentración del ácido indol acético presente.

El reactivo de Salkowski, actualizado por Glickmann y Deesaux (1995), se prepara con 250 mL de agua destilada a la que se le añaden 150 mL de H₂SO₄ concentrado y finalmente 7.5 mL de FeCl₃ 0.5M.

La reacción de Salkowski se realiza tomando 1 mL de muestra a la que se le añaden 4 mL de reactivo de Salkowski, se agita y se deja incubar 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se mide la absorbancia a 530 nm (Glickmann y Deesaux, 1995).

En la determinación de la auxina, se utilizó el medio de cultivo al cual se le agregó triptófano para inducir a la producción de ésta; numerosos estudios han demostrado que el ácido indol acético es sintetizado a partir del triptófano y el

proceso es llevado a cabo por microorganismos a través de una conversión oxidativa (Muller y Weiler, 2000). De esta forma se obtiene la concentración de AIA que es capaz de sintetizar el cultivo bacteriano y así diferenciarlo del total de compuestos indólicos que haya en el medio de cultivo.

Por tanto, para determinar la capacidad de producción de AIA por la cepa de *Azotobacter chroococcum* que tenemos, se procedió a incubar 4 muestras de 50 mL de medio de cultivo de *Azotobacter chroococcum* de 10^7 UFC/mL. A una muestra no se le añadió nada como control, y a las otras muestras se le añadió 1, 2 y 5 mg de triptófano/mL. Las 4 muestras se dejaron en agitación constante a 120 rpm a 26°C durante 15 días. Posteriormente se midió el AIA producido a los 3, 7 y 15 días. Cada muestra constaba de 2 mL del medio que se centrifugaba 15 minutos a 3000 rpm. Seguidamente se tomaba 1 mL del sobrenadante que se utilizaba para la reacción de Salkowski previamente descrita. La cantidad de AIA se expresa como $\mu\text{g AIA/mL}$ de medio y la reacción se realizó por cuadruplicado.

Para conocer la concentración de AIA necesitamos realizar una curva patrón o de calibrado con concentraciones conocidas de AIA. Para hacer la recta de calibrado partimos de una solución madre de AIA de 0,01 g/100 mL, que vamos diluyendo hasta realizar doce concentraciones diferentes: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 40, 50 y 60 ppm, para minimizar errores hemos hecho cada concentración por triplicado. A cada una de estas disoluciones se le realizó la reacción de Salkowski previamente descrita y la recta patrón obtenida tiene una r^2 de 0.990 y se representa en la figura 15.

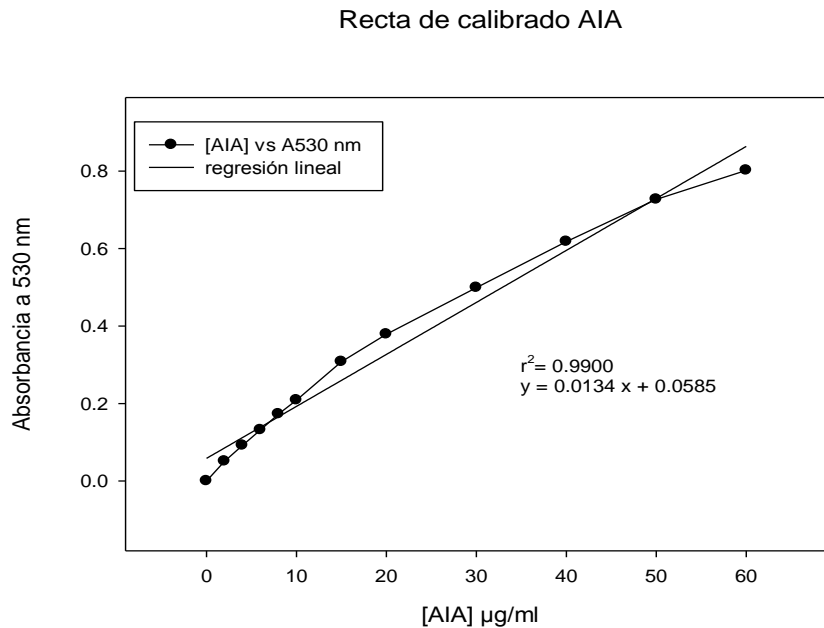


Figura 15: Recta de calibrado para la determinación del AIA

3.5.3 DETERMINACIÓN DE ACIDO GIBERÉLICO (AG)

La determinación de AG en disoluciones microbiológicas se realizó por espectrofotometría con el método de Graham y Henderson (1961). Este método se basa en la utilización del reactivo fosfomolibdico (Folin y Wu, 1920) que permite la reducción del ácido fosfomolibdico a molibdeno azul por método colorimétrico. Cuando la respuesta es positiva se obtiene una coloración azul claro a intenso dependiendo de la concentración del AG presente.

El reactivo fosfomolibdico, actualizado por Graham y Henderson (1961), se prepara con 35 g de ácido molibdico más 5 g de tungstano sódico que se ponen en un vaso de 1 L, al cual se añaden 200 mL de hidróxido sódico al 10% y 200 mL de agua destilada. Después se hierve 40 minutos vigorosamente y se deja enfriar a temperatura ambiente. La disolución se lleva a 350 mL con agua destilada y se añade 125 mL de ácido ortofosfórico al 85%, disolución que se lleva a 500 mL con agua destilada.

La determinación de AG se realizó tomando 1 mL de muestra a la que se le añaden 15 mL de reactivo fosfomolibdico, se hierve 1 hora y después se para la reacción con hielo hasta temperatura ambiente de la disolución. Esta se lleva a 25 mL con agua destilada y se mide la absorbancia a 780 nm (Graham y Henderson, 1961).

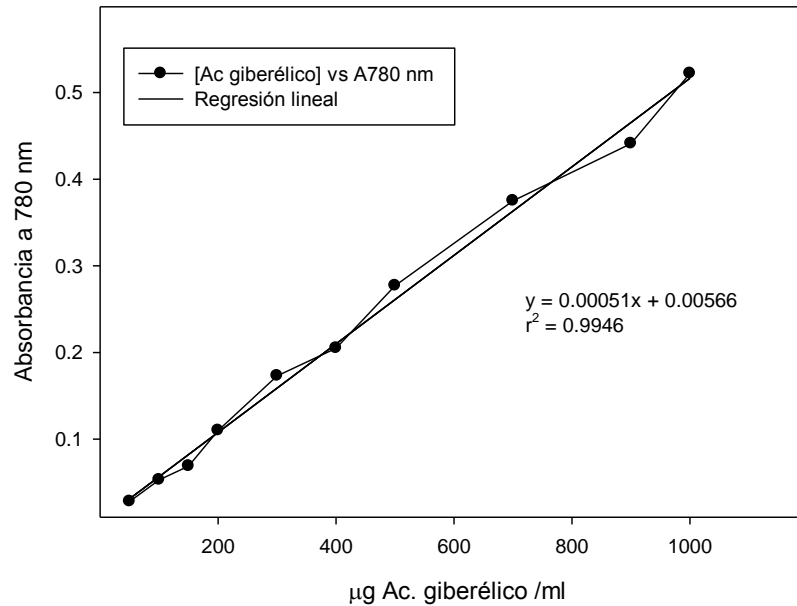
Por tanto, para determinar la capacidad de producción de AG por la cepa de *Azotobacter chroococcum* que tenemos, se procedió a incubar 1 muestra de 50 mL de medio de cultivo de *Azotobacter chroococcum* de 10^7 UFC/mL, que se dejó en agitación constante a 120 rpm a 28°C durante 3 días. Posteriormente se midió el AG producido. Cada muestra constaba de 2 mL del medio que se centrifugaba 30 minutos a 3000 rpm. Seguidamente se tomaba 1 mL del sobrenadante que se utilizaba para la reacción fosfomolibdica previamente descrita. La cantidad de AG se expresa como $\mu\text{g AG/mL}$ de medio y la reacción se realizó por quintuplicado.

Para conocer la concentración de AG necesitamos realizar una curva patrón o de calibrado con concentraciones conocidas de AG. Para hacer la recta de calibrado partimos de una solución madre de AG de 0,01 g/10 mL, que vamos diluyendo hasta realizar once concentraciones diferentes: 0, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 700, 900 y 1000 ppm. A cada una de estas disoluciones se le realizó la reacción fosfomolibdica previamente descrita por duplicado (fotografía 43) y la recta patrón obtenida tiene una r^2 de 0.9946 y se representa en la figura 16.



Fotografía 43: Visualización de los diferentes patrones preparados para la curva.

Recta de calibrado del ácido giberélico

**Figura 16:** Recta de calibrado para la determinación de AG

3.5.4. DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS

La determinación cualitativa de la solubilización de fosfatos se llevó a cabo por siembra directa, previa dilución en suero fisiológico estéril, en el medio de cultivo NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth médium) sólido: Glucosa 10g, $\text{Ca}_3(\text{PO})_4$ 5g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25g, KCl 0,2g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1g, H_2O destilada 1L, pH 7.0, Agar 15g (Nautiyal, 1999). El medio de cultivo se esterilizó durante 15 minutos a 121 °C en autoclave y se distribuyó en placas Petri en condiciones de asepsia, en cabina de flujo laminar. Las placas se incubaron en posición invertida a 28 ± 1 °C durante 4 días. Alrededor de las colonias que se desarrollen debe formarse un halo claro que indica la solubilización del fosfato.

3.6. DETERMINACIONES DE LAS PLÁNTULAS DE LECHUGAS Y ESCAROLAS

3.6.1. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE GERMINACIÓN.

El cálculo del porcentaje de germinación se realizó contando las plántulas germinadas en cada alveolo de cada tratamiento y especie por separado, con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ germinación} = (\text{Número de semillas germinadas} / \text{Número de semillas totales}) \times 100$$

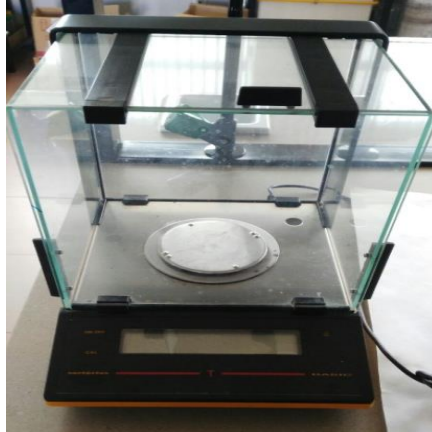
En la fotografía 44 se observa una bandeja con alveolos sin germinar.



Fotografía 44: Vista de las plántulas de escarola en semillero.

3.6.2. DETERMINACIONES DE PESO

La determinación del peso de las plántulas se realizó con una balanza de precisión Sartorius Basic, modelo B 120 S (fotografía 45).



Fotografía 45: balanza de precisión
Sartorius Basic, modelo B 120 S.

En la fotografía 46 se observan las plántulas dispuestas para determinar su peso.



Fotografía 46: Plántulas de escarola limpias y secas

3.6.3. DETERMINACIONES DE LONGITUD

La longitud de las plántulas se realizó con una regla graduada (fotografía 47). Se midió tanto la parte radicular de la plántula como su parte aérea.



Fotografía 47: Regla graduada

3.6.4. DETERMINACIONES DEL CONTENIDO EN CLOROFILAS

La determinación del contenido en clorofilas de las plántulas se realizó siguiendo el método de la AOA (1990) mediante espectrofotometría. 0,2 g de muestra de lechuga o escarola se trituran en mortero con 10 mL de acetona al 80% como disolvente y 3 g de arena de mar para ayudar a la extracción del pigmento. Después se centrifuga a 12.000 rpm 15 minutos a 5°C para la separación de fases (Fotografía 48). La centrifuga utilizada es Sigma modelo 3-18K (Fotografía 48). El sobrenadante se toma y se lleva a 10 mL con acetona al 80% y posteriormente se mide la absorbancia a 647 y 664 nm con el espectrofotómetro UNICAM HELIOS α (Fotografía 49). El cálculo de las clorofilas a, b y totales, se realiza con las siguientes fórmulas:

$$\text{Clorofila a} = [(12.7 \times A_{664} - 2.69 \times A_{647}) \times \text{Volumen}] / (10 \times \text{peso})$$

$$\text{Clorofila b} = [(22.9 \times A_{647} - 4.68 \times A_{664}) \times \text{Volumen}] / (10 \times \text{peso})$$

$$\text{Clorofilas totales} = [(20.2 \times A_{647} + 8.02 \times A_{664}) \times \text{Volumen}] / (10 \times \text{peso})$$

Los resultados se expresan como mg de clorofila/100 g de peso fresco. Las determinaciones se realizaron por sextuplicado.



Figura 48: centrífuga SIGMA 3-18K



Figura 49: Espectrofotómetro UNICAM HELIOS α

3.6. DETERMINACIONES ANALÍTICAS DE LAS LECHUGAS Y ESCAROLAS

3.6.1. DETERMINACIONES DEL PESO Y LA PRODUCCIÓN

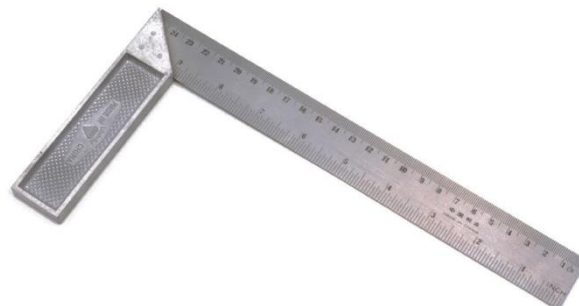
La determinación del peso de las plantas en campo se determinó con una balanza Jata hogar máximo 5 kg \pm 1 g (fotografía 50) y se determinó a 35 plantas por tratamiento y especie. La producción se calculó multiplicando el peso medio de cada tratamiento por el número de lechugas o escarolas según su marco de plantación.



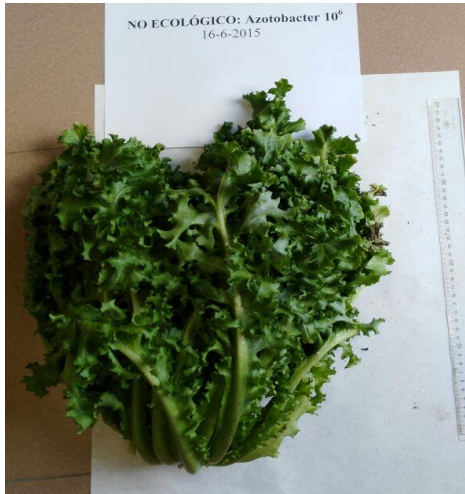
Fotografía 50: Balanza Jata

3.6.2. DETERMINACIONES DE LONGITUD Y DE DIÁMETRO

Las determinaciones de la longitud y el diámetro se realizaron con una escuadra y regla graduada (fotografía 51) a 6 plantas por tratamiento y especie.



Fotografía 51: Escalímetro



Fotografía 52: Escarola con tratamiento 10^6 .



Fotografía 53: Lechuga con tratamiento 10^6 .

3.6.4. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Para la determinación de proteínas se utilizó el método de Bradford (1976), empleando albúmina de suero bovino (BSA) como patrón de calibración.

Se empleó el ensayo colorimétrico simple de proteínas Bio-Rad para medir la concentración de proteínas totales que se basa en el cambio de color del azul brillante de Coomassie G-250 que se une a restos de aminoácidos (Bradford, 1976) y que permite detectar pequeñas concentraciones de proteínas.

Para las determinaciones, se añadieron a tubos de ensayo de 5 ml volúmenes de muestra que oscilaron de 10 a 50 μl , a los que se les añadía tampón tris-acetato 50 mM, pH 6,0 hasta un volumen de 800 μl . A continuación, se añadían 200 μl del reactivo de Bio-Rad y se agitaba enérgicamente en un agitador vortex. Los tubos se mantenían a temperatura ambiente, entre 5-60 minutos y se medía la absorbancia a 595 nm.

La concentración de proteínas de las muestras ensayadas se determinaba por interpolación en una recta de calibrado (figura 17) construida con concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino. La ecuación de la recta de calibrado (Figura x) que se empleó fue $y = 0,057x + 0,017$, donde y = unidades de absorbancia a 595 nm y x = [BSA] (μg), siendo $r^2 = 0,998$. Los resultados finales se expresaron en mg de proteína por cada 100 gramos de peso fresco, siendo estos la media \pm E.S. de 4 mediciones por muestra.

Los resultados finales se expresaron en mg de proteína por cada 100 gramos de peso fresco, siendo estos la media \pm E.S. de 4 mediciones por muestra.

Recta de calibrado para proteínas totales

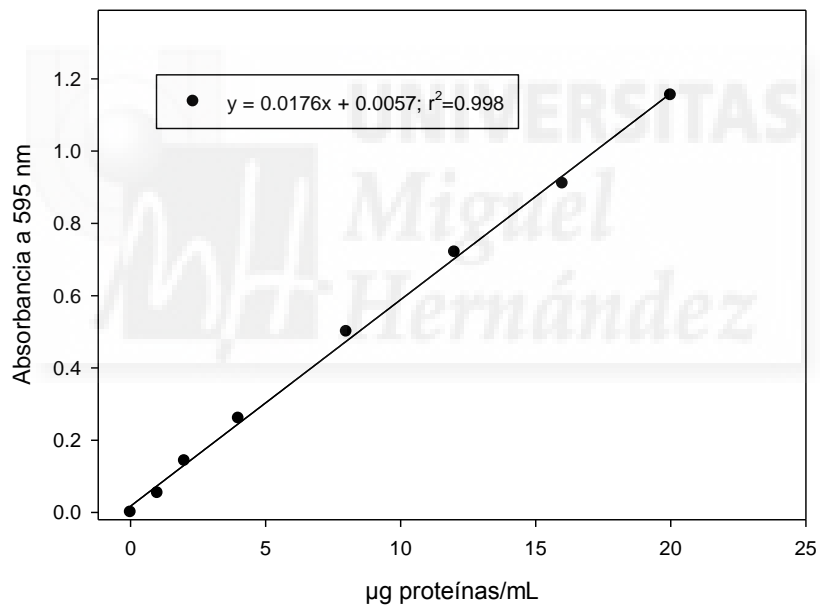


Figura 17: Recta de calibrado para proteínas totales.

3.6.5. DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

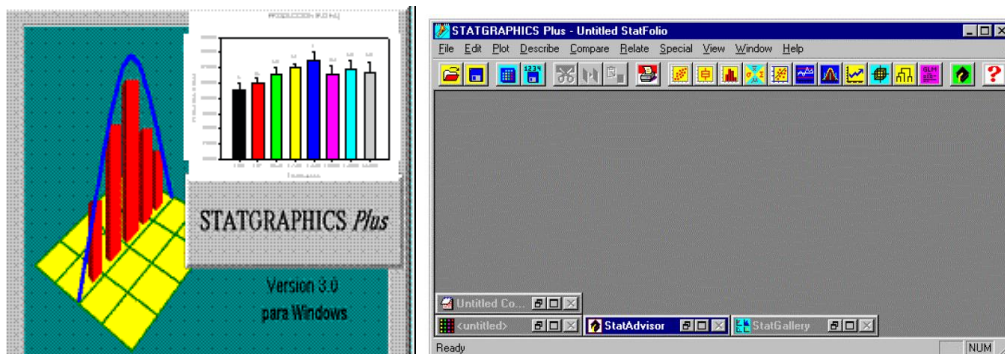
La determinación de la humedad se realizó en estufa a 60 °C hasta que se alcanzó un peso constante de las muestras de hortalizas. La estufa de secado utilizada es marca Binder (Fotografía 54). Los resultados finales se expresaron como % de humedad, siendo estos la media \pm E.S. de 5 mediciones por muestra.



Fotografía 54: Estufa blinder

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico, con el fin de establecer una significación de los datos recogidos en el estudio de los diferentes parámetros se ha utilizado el programa estadístico "Statgraphic plus 3.0" realizando un análisis de varianza simple de un solo factor (ANOVA) y un test de rango múltiple en aquellas comparaciones que aparecían diferencias estadísticamente significativas.





RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

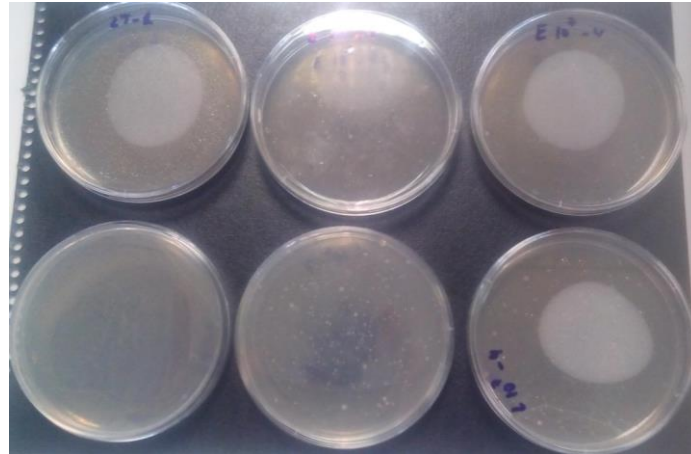
4.1. Investigación y recuento de *Azotobacter chroococcum* en sustratos

4.1.1. Investigación y recuento de *Azotobacter chroococcum* en sustratos al final del semillero

Las semillas de lechuga y escarola se trataron en semillero con 1 mL de la disolución correspondiente de *A. chroococcum* utilizadas en este trabajo, 10^6 y 10^7 UFC/mL. Al final del periodo de semillero se hizo un recuento de las colonias de *A. chroococcum* que había en el sustrato donde se encontraban las plántulas (Fotografías 55 y 56), ya que la finalidad del trabajo es colonizar con ellas el suelo a la vez que se trasplantaban a la parcela. El resultado se muestra en la Tabla XVIII. Como se puede observar el recuento de colonias es menor significativamente en el sustrato de las plántulas de lechuga y de escarola testigos, que no han sido tratadas, y la concentración de colonias es mayor significativamente en los sustratos tratados con 10^6 colonias y también es significativamente diferente y más alto en los sustratos tratados con 10^7 colonias, tanto en lechugas como en escarolas. Además, se puede observar que no hay diferencias significativas entre los sustratos de lechuga y de escarola a la misma concentración de *Azotobacter*.



Fotografía 55: Muestras de sustratos al final del semillero y suelos ecológico y no ecológico antes del trasplante.



Fotografía 56: Colonias de *A. chroococcum* en turba, izquierda testigo, centro 10^6 y derecha 10^7 .

Tabla XVIII. Investigación y recuento de *Azotobacter* en muestras representativas de los substratos utilizados para la siembra de semillas de lechuga y escarola.

Muestras	log UFC/g
LT	6.69 ± 0.05 c*
L 10^6	7.24 ± 0.15 b
L 10^7	7.59 ± 0.05 a
ET	6.68 ± 0.04 c
E 10^6	7.26 ± 0.12 b
E 10^7	7.60 ± 0.07 a

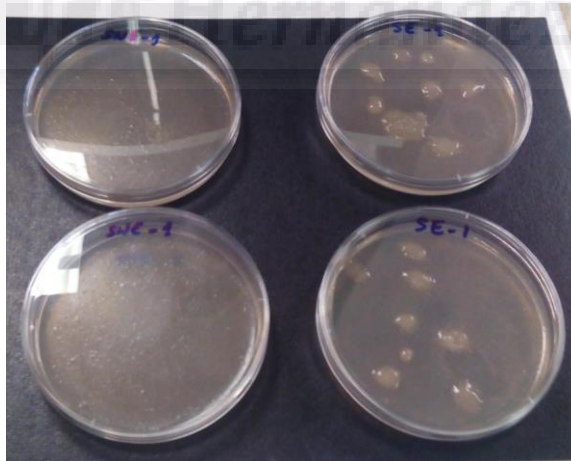
LT: Lechuga testigo; **L 10^6 :** Lechuga tratada con una concentración de azotobacter de 1.10^6 UFC/mL; **L 10^7 :** Lechuga tratada con una concentración de azotobacter de 1.10^7 UFC/mL; **ET:** Escarola testigo; **E 10^6 :** Escarola tratada con una concentración de azotobacter de 1.10^6 UFC/mL; **E 10^7 :** Escarola tratada con una concentración de azotobacter de 1.10^7 UFC/mL

*Las medias \pm desviación estándar seguidas por letras distintas son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Es interesante destacar que los sustratos de plántulas de lechuga y de escarola presenten un recuento tan alto de *A. chroococcum* sin haber sido tratados previamente con la bacteria. Hay que descartar la posible contaminación de los alveolos con las disoluciones bacterianas, ya que los tratamientos se realizaron cuidadosamente con pipeta automática en cada alveolo y en filas separadas por filas sin tratamientos para que no hubiera contacto posible entre dos alveolos seguidos tratados con diferentes soluciones. Por tanto, la mejor explicación posible, es que el sustrato formado por una mezcla de turba y perlita (8:2), ya presentara una alta concentración de *Azotobacter* antes de los tratamientos, lo mismo que también poseen de forma natural los suelos, ya que es una bacteria de vida libre en este medio (Bhardwaj et al. 2014).

4.1.2. Investigación y recuento de *Azotobacter chroococcum* en suelos al principio y al final del cultivo

Se hizo un recuento de colonias en los suelos ecológicos y no ecológicos antes del trasplante de las plántulas correspondientes, para conocer el contenido en *A. chroococcum* que poseían los suelos de forma natural (Fotografía 57). Estos resultados se encuentran en las dos primeras líneas de la tabla XIX.



Fotografía 57: Colonias de *A. chroococcum* en suelo ecológico y no ecológico.

Como se puede observar, ambos suelos poseían una alta concentración de unidades formadoras de colonias, ligeramente inferiores a los contenidos de estas bacterias en los sustratos de turba mostrados en la tabla anterior. Es de destacar que aunque el contenido es mayor en el suelo ecológico respecto al no ecológico, no presentan diferencias significativas entre ellos, al contrario de lo que cabría esperar, ya que un suelo ecológico presenta unas técnicas agronómicas más naturales, menos

abusivas tanto físicas como químicas, que impiden el desarrollo óptimo de fauna, flora y microorganismos beneficiosos (Gliessmann, 2002) como son, entre otros, *A. chroococcum*.

Tabla XIX. Investigación y recuento de *Azotobacter* en muestras representativas de los suelos antes y después del cultivo de lechuga.

Muestras	log UFC/g
SE	6.49 ± 0.07 cd*
SNE	6.40 ± 0.13 d
SET	6.58 ± 0.05 bc
SE10 ⁶	6.61 ± 0.05 bc
SE10 ⁷	6.79 ± 0.03 a
SNET	6.58 ± 0.06 bc
SNE10 ⁶	6.62 ± 0.07 b
SNE10 ⁷	6.76 ± 0.04 a

SE: Suelo ecológico; SNE: Suelo no ecológico

* Las medias seguidas por letras distintas son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Posteriormente se hizo un recuento de las UFC de los suelos al final del ciclo de cultivo de las hortalizas. Los resultados se encuentran en las 6 últimas líneas de la tabla XIX. Como se puede observar, los máximos contenidos de UFC en los suelos, tanto ecológicos como no ecológicos, los presentan los suelos en los que se han cultivado las hortalizas tratadas con *Azotobacter* a la máxima concentración (10⁷ UFC/mL). Los suelos con las plantas tratadas con 10⁶ UFC/mL presentan menor contenido de UFC, con diferencias significativas respecto a las tratadas con 10⁷, pero sin diferencias significativas con los suelos con plantas no tratadas con bacterias. Este comportamiento se ha repetido igual en los suelos ecológicos y no ecológicos y no hay diferencias significativas entre ambos suelos con el mismo tratamiento.

El contenido en *A. chroococcum* en el suelo tratado tiende a disminuir hasta la concentración en el suelo no tratado, es decir, parece que tienda a llegar al equilibrio

inicial. Esto puede ser debido, entre otras causas, a que la cepa de *A. chroococcum* utilizada en este trabajo, no ha sido obtenida de forma natural del suelo de la finca utilizada en este estudio, sino que ha sido adquirida a la Colección Española de Cultivos Tipo, y sus condiciones óptimas de crecimiento, pueden no ser específicas del suelo utilizado en este estudio, por lo que las bacterias han podido no desarrollarse de forma óptima por no estar bien adaptadas o por entrar en competencia con las bacterias de la misma especie (o de otra) mejor adaptadas a este suelo. Esta razón es importante, ya que otros estudios, han utilizado cepas de esta especie que previamente han sido aisladas *in situ* en los suelos que luego se van a tratar con este microorganismo, para asegurar su adaptación, aumentar su número con más facilidad y, así, mejorar su efecto sobre las plantas tratadas (Ahmad et al., 2005; Mali y Bodhankar, 2009; Lara et al., 2011 a y b).

Además, en nuestro caso hemos realizado los tratamientos de las semillas con *A. chroococcum* en semillero y no hemos vuelto a repetir los tratamientos una vez realizado el trasplante, con lo que al final del cultivo las concentraciones de las UFC de los suelos presentaban una menor concentración que en la turba de las plántulas antes del trasplante en campo (tablas XVIII y XIX). Estas diferencias eran significativas, por lo que parece que el número de estas bacterias en el suelo ha ido disminuyendo en su concentración incluso a valores no significativos respecto al suelo de los cultivos testigo, tanto en lechugas como en escarolas y en suelo ecológico y no ecológico para la menor concentración aplicada de bacterias. Sólo han mostrado diferencias significativas las UFC de los suelos con plántulas tratadas con 10^7 UFC/mL de medio respecto a los suelos de las plantas control, pero incluso en este caso los recuentos de UFC han bajado respecto a la concentración en la turba de semillero tratada inicialmente. Como no hicimos recuentos de colonias en los suelos en un tiempo intermedio del cultivo no sabemos exactamente cuándo empezaron a disminuir las concentraciones de bacterias en los suelos. Para mantener la concentración de bacterias en el suelo otros autores han seguido varias estrategias. Así, González-Rodríguez et al. (2013) realizaron pulverizaciones de *A. chroococcum* cada 4 semanas durante la aclimatación de plántulas micropropagadas de piña. Ghilavizadeh et al. (2013) han tratado las semillas en semillero pero luego han realizado una pulverización de una mezcla de *Azotobacter chroococcum* y de *Azospirillum lipoferum* en la base de los tallos de plántulas de *Carum copticum* en campo. Kumar et al., (2014 a y b; 2015) prepararon una matriz orgánica en forma granular donde quedan atrapados los biofertilizantes (*A. choococcum* y *Bacillus subtilis*) por lo que se van liberando poco a poco con lo que no disminuye la concentración bacteriana en el suelo durante el cultivo del trigo. Sin embargo nosotros no hemos realizado repeticiones de los tratamientos en campo, razón por la que ha disminuido significativamente el número de UFC en el suelo tanto ecológico como no ecológico.

4.2. CAPACIDAD DE *Azotobacter chroococcum* DE PRODUCCIÓN DE FITOHORMONAS Y SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS INSOLUBLES

4.2.1. CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE AIA

El medio en el que se ha incubado *A. chroococcum* para el análisis de su capacidad de síntesis de AIA, es el medio Norris libre de N_2 , y las bacterias se encontraban en incubación en Erlenmeyer tapado durante 14 días a temperatura ambiente. Como el AIA es un compuesto con N_2 (Figura 18), las bacterias no pueden sintetizar AIA en este medio ya que no pueden fijar el N_2 atmosférico al estar en el Erlenmeyer tapado, tal como se puede observar en la figura 19 (trip 0). Para poder conocer la capacidad productora de AIA, se ha añadido triptófano al medio de cultivo utilizado para determinar la auxina, ya que es el precursor de la síntesis de esta hormona, pues numerosos estudios han demostrado que el AIA es sintetizado a partir del triptófano en un proceso llevado a cabo por microorganismos, no sólo por las plantas, a través de una conversión oxidativa (Müller y Weiler, 2000), mediante una ruta metabólica que transforma el triptófano en indol 3-acetamida por acción de la triptófano mono-oxigenasa, y posteriormente a ácido 3 indol acético por acción de la indol 3-acetamida hidrolasa (Taiz y Zeiger, 2006). Para comprobar si el triptófano es convertido en AIA se ha añadido al medio en diferentes concentraciones: 0, 1, 2 y 5 ppm, y así también saber la capacidad limitante de síntesis de la cepa de *Azotobacter* estudiada. Además esta metodología sirve para comprobar que la cuantificación de AIA es debida específicamente a este compuesto, ya que el método de Salkoswki utilizado en este estudio no distingue entre este compuesto y otros compuestos indólicos. Los resultados de la capacidad productora de AIA por *A. chroococcum* se muestran en la figura 19.

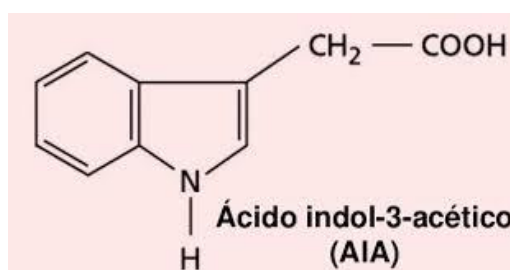


Figura 18: Estructura del ácido indol-3-acético (AIA).

Como se puede comprobar la producción de AIA es prácticamente nula sin triptófano e incrementa significativa y proporcionalmente al aumentar la concentración de triptófano añadido, independientemente de los días que se incuben las bacterias. Sin embargo, al incrementar los días de incubación de la bacteria, se produce una respuesta diferente según la concentración de triptófano añadido. Así, cuando se incuba con 1 ppm de triptófano, a los 7 días ya se produce una disminución de la concentración de AIA sintetizado, lo que indica que el cultivo bacteriano ha gastado el triptófano y empieza a disminuir la síntesis de hormona en esta fecha. Sin embargo, cuando se incorpora al medio triptófano a 2 ppm, a los 7 días sigue incrementando la síntesis de AIA respecto al día 1 a la misma concentración de triptófano, pero a los 14 días ya disminuye la síntesis de esta fitohormona. Finalmente, cuando se incorpora al medio triptófano 5 ppm, se produce un incremento máximo de AIA de 105.71 μl AIA/ml de medio de incubación. En este caso, también el máximo se obtiene a los 7 días de incubación y disminuye drásticamente a los 14 días, lo que indica que también las bacterias han completado la síntesis de AIA a partir del triptófano 5 ppm en 7 días. Por este comportamiento se puede decir que lo que estamos cuantificando con la reacción de Salkowski es AIA u otros compuestos indólicos, pero no cuantificamos compuestos indólicos no auxínicos que pudieran haber en el medio de cultivo, ya que todos los compuestos indólicos procedentes de la síntesis a partir de triptófano son compuestos con propiedades auxínicas (Müller y Weiler, 2000). Todos estos compuestos indólicos de tipo auxínico los hemos cuantificado en la figura x como μl AIA/ml de medio de incubación.

En cuanto a la capacidad sintetizadora de AIA, la cepa 4103 utilizada en este trabajo presenta una capacidad media-alta, ya que con 1 día de incubación con triptófano a 1 ppm ya presentaba una síntesis de 21.77 μl AIA/ml, mientras que otras cepas de *A. chroococcum* aisladas de suelos de Maharashtra en la India estaban, a los 3 días de incubación, entre 2 y 56 μl AIA/ml (Mali y Bodhankar, 2009), 19.24 (Verma et al., 2014), entre 3.3 y 39.3 en cepas aisladas en Córdoba (Colombia) (Lara et al., 2011b), entre 3.3 y 44.3 en cepas aisladas en Córdoba (Colombia) (Lara et al., 2011a) y entre 7.30 y 28.9 a los 15 días de incubación con triptófano a 5 ppm en cepas aisladas de Aligarh en la India, cuando nosotros tenemos 45.93 μl AIA/ml, a los 15 días de incubación con la misma concentración de triptófano.

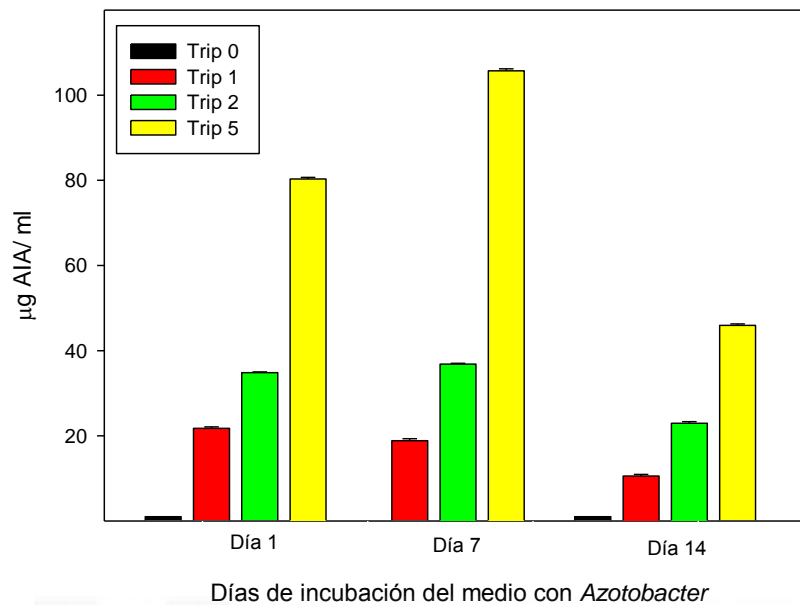
Producción de AIA por *Azotobacter*

Figura 19: Producción de AIA de las cuatro muestras diferentes: Con 0, 1, 2 y 5 mg/mL de triptófano. Cada dato es la media \pm ES de 4 medidas.

Los valores presentados por la cepa 4103 utilizada en este trabajo, son muy buenos, ya que está demostrado que bajas concentraciones de fitohormona son capaces de estimular el desarrollo vegetal y altas concentraciones inhiben y reducen la zona de alargamiento (Lara et al., 2011b). Además el AIA es la auxina más ampliamente distribuida en las plantas. Los efectos demostrados en investigaciones llevadas a cabo, contemplan, entre otras, la elongación, aumento en la respiración celular, promoción del crecimiento en raíces o incremento en la división celular, factores que favorecen el desarrollo vegetal (Acosta et al., 2000).

4.2.2. CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO GIBERÉLICO

La cantidad encontrada de sustancias tipo giberelinas en este trabajo es de $3902.84 \pm 245.51 \mu\text{g eq. giberélico/mL}$ de medio bacteriano de *Azotobacter*

chroococcum. Es una cantidad altísima si se compara con las encontradas en otras cepas de esta bacteria, que estaban entre 2 y 62 μg eq ác. giberélico/mL de medio (Mali y Bodhankar, 2009) que utilizaron el mismo método de análisis de ác giberélico que se ha usado en este trabajo. Ciertamente la cantidad encontrada puede ser debida a algún problema con la metodología empleada, aunque se ha repetido la experiencia en 4 ocasiones, obteniendo valores similares todas ellas. Esta metodología no es específica para giberelinas, sino para compuestos tipo giberelinas como ácido giberélico , giberelinas y productos de degradación de ácido giberélico como $\text{ácido allogiberélico}$, ácido gibérico , ácido epigibérico y $\text{ácido giberelénico}$, entre otros, y también aminoácidos y azúcares (Graham y Henderson, 1961), por lo que puede ser que haya otros compuestos en el medio que no sean giberelinas y que se hayan cuantificado como tales, aunque la recta de calibrado utilizada haya sido de ácido giberélico . Como las bacterias no liberan al medio de cultivo ni aminoácidos ni azúcares, esta metodología debería poder utilizarse para la cuantificación de compuestos tipo giberelinas o sus productos de degradación, tal como han hecho otros autores en las mismas circunstancias (Mali y Bodhankar, 2009). Sin embargo, en nuestro estudio, la concentración tan alta encontrada parece que indica que se han cuantificado otros compuestos no giberélicos como tales. En todo caso, parece que la cepa utilizada de *Azotobacter chroococcum* es gran productora de giberelinas.

4.2.3. CAPACIDAD DE SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS INSOLUBLES

La cepa 4103 de *Azotobacter chroococcum* ha mostrado ser negativa en el análisis de su capacidad de solubilización de fosfatos insolubles, como se puede observar en la fotografía 58, ya que no presenta un halo claro alrededor de las colonias. Nuestros datos están en contraposición con los obtenidos en otras cepas de esta bacteria que sí presentan capacidad de solubilización de fosfatos insolubles (Murty y Ladha, 1988; Kundu y Gaur, 1980; Kumar et al., 2001; Reddy y Saravanan, 2013; Sharma et al., 2013; Verma et al., 2014).



Fotografía 58: Colonias de *A. chroococcum***4.3. EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LAS PLÁNTULAS EN SEMILLERO****4.3.1. PORCENTAJE DE GERMINACIÓN**

Los resultados del cálculo del porcentaje de germinación de las semillas de lechuga y de escarola que estaban en semillero, están mostrados en las figuras 20 y 21, respectivamente. Como se puede observar, en el caso de las semillas de lechuga el porcentaje de germinación estuvo rondando el 100% sin diferencias entre los distintos tratamientos, llegando al 100% en el caso de las semillas tratadas con *Azotobacter* a 10^6 UFC/ml. Sin embargo, en las escarolas, el porcentaje de germinación fue mucho más reducido y, en este caso, sí que hubo diferencias muy altas entre los diferentes tratamientos. Al incrementar la concentración bacteriana en el medio inoculado a las semillas, se produjo un incremento del porcentaje de germinación, que pasó del 59.2% en las semillas control, al 68.37% de germinación en las tratadas con 10^6 UFC/ml y al 83.67% en las semillas tratadas con *A. chroococcum* a 10^7 UFC/ml. En las escarolas, por tanto, se observa que el incremento del porcentaje de germinación ha sido proporcional a la dosis aplicada. Por tanto, con la aplicación de 10^6 UFC/ml se ha obtenido un incremento del 15.49% y con 10^7 UFC/ml se ha obtenido un incremento del 41.33%. Estos datos son muy altos, ya que Bákoniy et al. (2013) obtuvieron un incremento del 20% de la germinación de semillas de maíz al ser tratadas con un biofertilizador formado por una mezcla de *A. chroococcum* y de *Bacillus megaterium*, lo que creen que es debido a que estos excretan fitohormonas lo que incrementa la movilización de nutrientes desde las semillas.

Sin embargo, en nuestro experimento se ha producido una diferencia entre el comportamiento de las semillas de lechuga y de escarola al tratamiento bacteriano. Las semillas control de lechuga han presentado un 98.98% de germinación por lo que, al ser un porcentaje tan alto, el tratamiento bacteriano no ha podido presentar un incremento alto de la germinación. Aun así, el tratamiento con 10^6 UFC/ml ha incrementado al 100% de germinación, pero, lógicamente, la respuesta se ha notado menos que en el caso de las semillas de escarola, en las que el porcentaje de germinación de las semillas control ha sido de sólo el 59.2%.

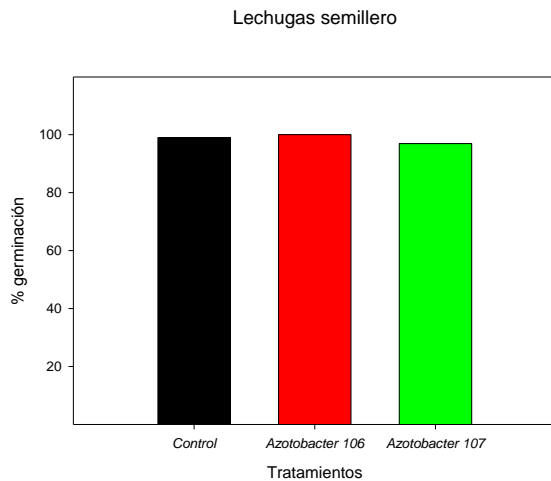


Figura 20: Porcentaje de germinación de semillas de lechuga en los distintos tratamientos.

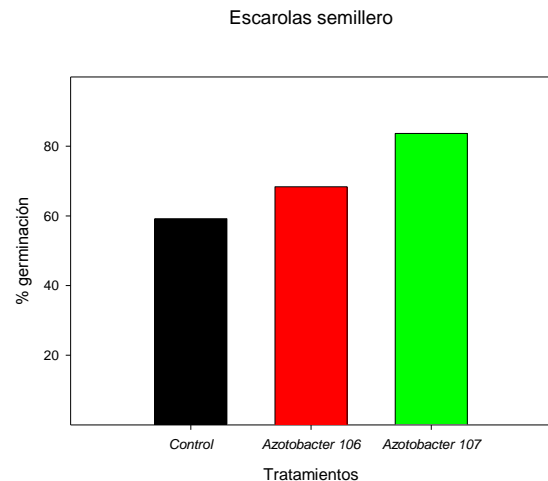


Figura 21: Porcentaje de germinación de semillas de escarola en los distintos tratamientos

4.3.2. NÚMERO DE HOJAS

También se contabilizaron las hojas de las plántulas al final del periodo de semillero, antes de ser plantadas en suelo, y los resultados se muestran en las figuras 22 y 23. Este parámetro no mostró diferencias significativas, ni en lechugas ni en escarolas, tal como tampoco han encontrado Mitra y Mojtaba (2014) al tratar plantas de *Aloe vera* con *A. chroococcum*. Sin embargo, tanto Amirhandeh et al. (2013) como Madaan et al. (2013) sí que han encontrado incrementos significativos en el número de hojas de tabaco y banana, respectivamente, al ser tratados con *A. chroococcum*, pero en plantas adultas, no en plántulas como es nuestro caso. Esta puede ser la razón por la que no hemos encontrado diferencias significativas, ya que las plántulas sólo han estado 1 mes en semillero, y en este tiempo tan corto no han podido incrementar significativamente el número de hojas, aunque Mitra y Mojtaba (2014) también realizaron su estudio sobre plantas adultas de *Aloe vera*, por lo que parece que este parámetro no siempre es afectado en el mismo sentido por el tratamiento bacteriano con este diazótrofo.

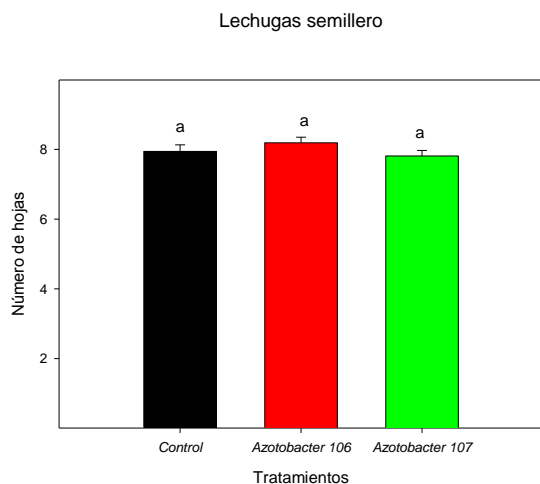


Figura 22: Número de hojas en plántulas de lechuga con los distintos tratamientos. Cada dato es la media \pm ES de 15 medidas.

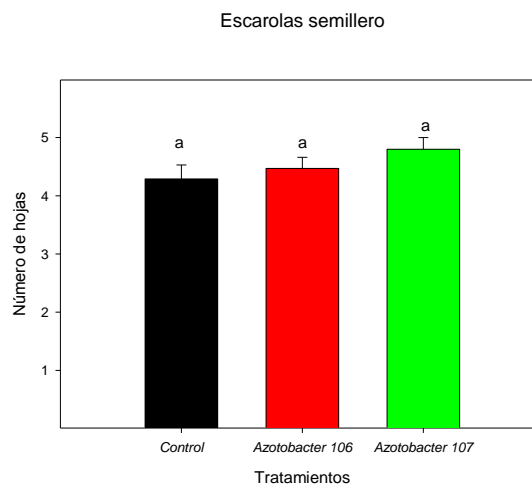


Figura 23: Número de hojas en plántulas de escarola con los distintos. Cada dato es la media \pm ES de 15 medidas.

4.3.3. PESO TOTAL

El peso fresco total de las plántulas control de lechuga y de escarola, y de las tratadas con el medio de cultivo, se muestran en las figuras 24 y 25 respectivamente. Como se puede observar, existe un incremento dosis dependiente del peso al aumentar la concentración de *Azotobacter* aplicada a las semillas, aunque el incremento sólo ha sido significativo en el caso de la máxima concentración aplicada a las semillas, de 10^7 UFC/ml de medio. Este incremento final ha sido del 13.14% en lechugas y del 76.12% en escarolas. Estos datos están de acuerdo con la bibliografía consultada, puesto que otros autores han encontrado incrementos del peso seco de plántulas de banana (Madaan et al. 2013) y de maíz (Bákonyi et al., 2013). Estos incrementos pueden ser debidos a que las bacterias excretan fitohormonas (AIA y giberelinas) al medio, lo que incrementa la movilización de nutrientes desde la semilla e incrementa la velocidad de germinación y crecimiento de las plántulas.

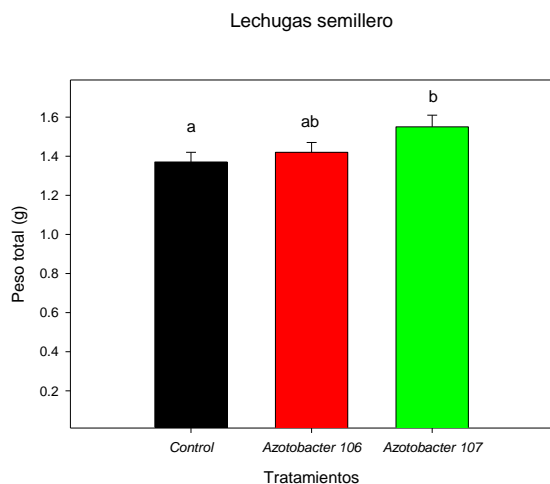


Figura 24: Peso total de las plántulas de lechuga en los distintos tratamientos. Cada dato es la media \pm ES de 15 medidas.

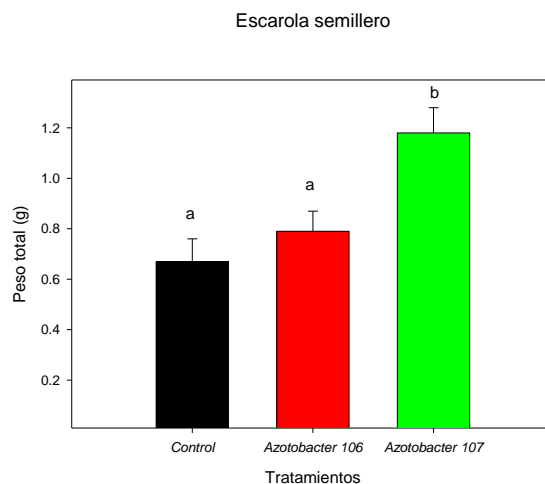


Figura 25: Peso total de las plántulas de escarola en los distintos tratamientos. Cada dato es la media \pm ES de 15 medidas.

4.3.4. PESO PARTE AÉREA

El incremento del peso total de las plántulas de lechuga y de escarola ha sido proporcional al incremento del peso de la parte aérea, como se puede observar en las figuras 26 y 27, donde se observa que el incremento, aunque ha sido dosis dependiente, sólo ha sido significativo para la mayor concentración de UFC de *A. chroococcum* aplicada. Estos datos están de acuerdo con la bibliografía consultada en plántulas de banana (Madaan et al. 2013) y de maíz (Bákonyi et al., 2013).

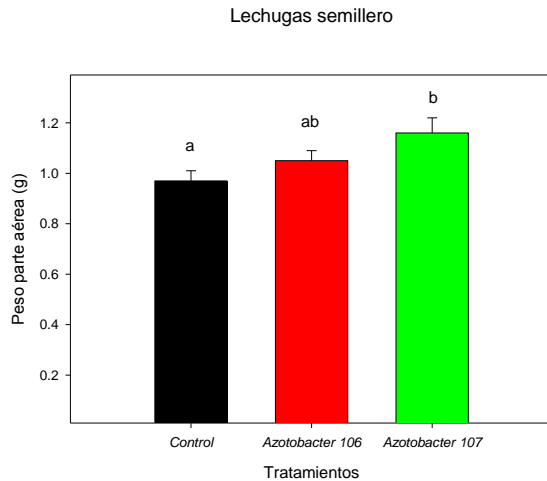


Figura 26: Peso de la parte aérea de las plántulas de lechuga en los distintos tratamientos. Cada dato es la media \pm ES de 15 medidas.

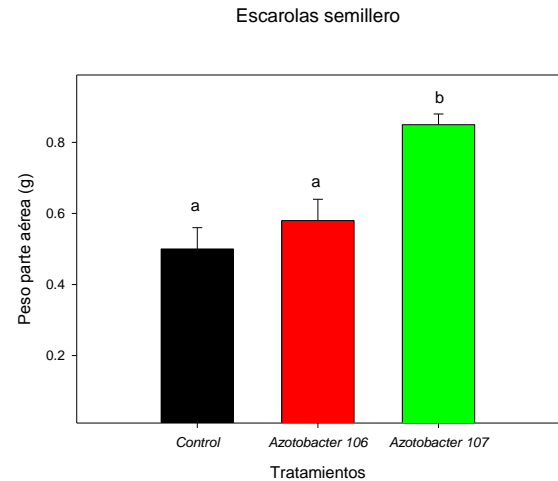


Figura 27: Peso de la parte aérea de las plántulas de lechuga en los distintos tratamientos. Cada dato es la media \pm ES de 15 medidas.

4.3.5.- PESO PARTE RADICULAR

Las plántulas de escarola también han mostrado un incremento significativo del peso de su parte radicular, con un 94.12% de incremento al ser tratadas las semillas con 10^7 UFC/mL de medio (Figura 29). Esto es importante, ya que el tratamiento con *Azotobacter* mejorará sensiblemente el enraizamiento de las plántulas en el suelo al trasplante. Estos incrementos pueden ser debidos a que las bacterias excretan fitohormonas (AIA y giberelinas) al medio lo que incrementa la movilización de nutrientes desde la semilla e incrementa la velocidad de germinación y crecimiento de las plántulas. Estos datos están de acuerdo con la bibliografía consultada (Madaan et al. 2013; Bákonyi et al., 2013). Sin embargo, las plántulas de lechuga no han mostrado diferencias significativas respecto a las semillas control en cuanto a este parámetro (Figura 28), por lo que todo el incremento del peso total de las plántulas de lechuga se debe sólo a un incremento del peso de la parte aérea.

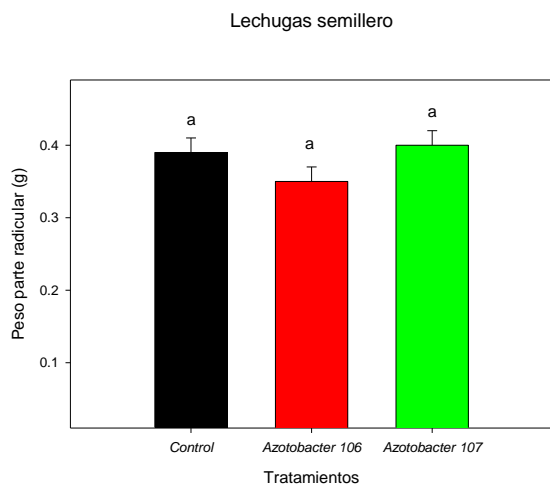


Figura 28: Peso de la parte radicular de las plántulas de lechuga en los distintos tratamientos. Cada dato es la media \pm ES de 15 medidas.

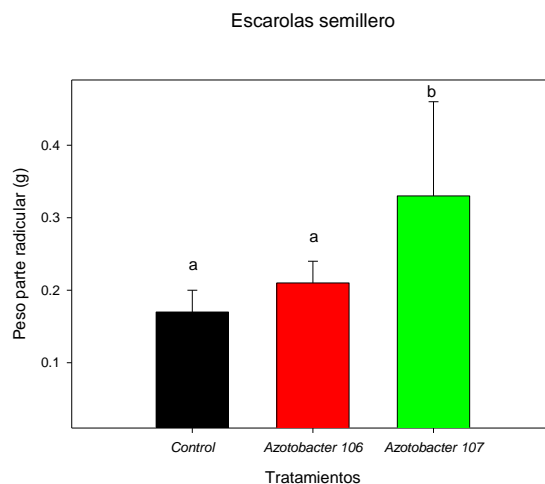


Figura 29: Peso de la parte radicular de las plántulas de escarola en los distintos tratamientos. Cada dato es la media \pm ES de 15 medidas.



4.3.6. LONGITUD PARTE AÉREA

Las plántulas de lechuga y escarola tratadas también han presentado incrementos significativos de la longitud de la parte aérea, aunque ha habido diferencias en el comportamiento de ambas especies (Figuras 30 y 31). Así, los tratamientos en semillas de escarolas han producido incrementos dosis dependientes de la longitud de la parte aérea de las plántulas tratadas y que han sido significativos para ambas concentraciones de *A. chroococcum* aplicadas. Estos incrementos han sido del 17.62% y del 42.31% a 10^6 y 10^7 UFC/ml, respectivamente. Sin embargo, en las plántulas de lechuga también se ha producido un incremento de la longitud de las plántulas tratadas a ambas concentraciones, pero sólo ha sido significativo a la concentración menor. Estos incrementos en la longitud de la parte aérea están de acuerdo con la bibliografía consultada, ya que tanto Lara et al. (2011 b) en césped, como Madaan et al. (2013) en banana y Jumar et al. (2015) en *Jatropha curcas*, han incrementado significativamente la longitud de la parte aérea de las plántulas de estas

especies, efecto atribuible al incremento en AIA y en giberelinas que provoca esta bacteria, cuyos efectos, entre otros, son el incremento en la velocidad de crecimiento de los tallos vegetales.

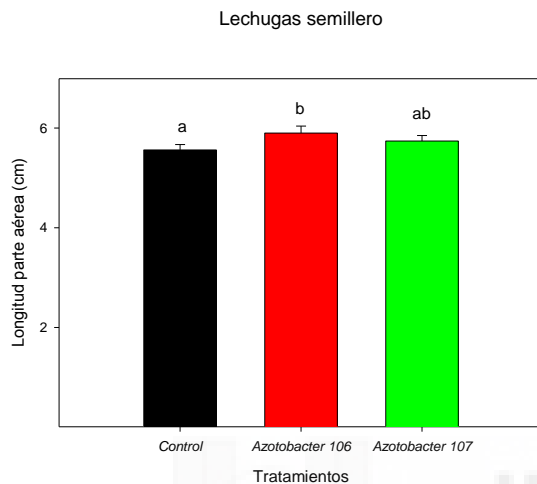


Figura 30: Longitud de la parte aérea de las plántulas de lechuga en los distintos tratamientos. Cada dato es la media \pm ES de 15 medidas.

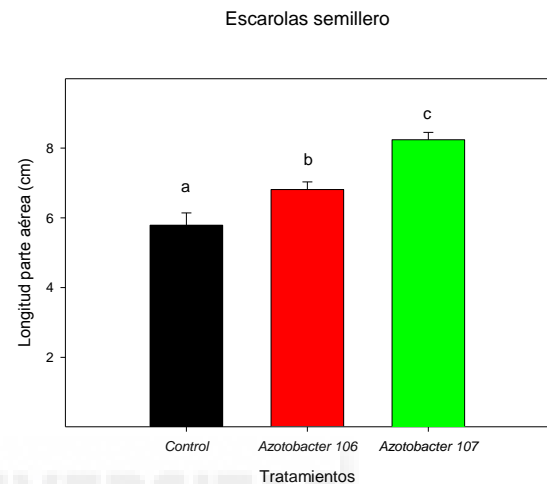


Figura 31: Longitud de la parte aérea de las plántulas de escarola en los distintos tratamientos. Cada dato es la media \pm ES de 15 medidas.

4.3.7. LONGITUD PARTE RADICULAR

La longitud de la parte radical de las plántulas de ambas especies también ha mostrado diferentes comportamientos al ser tratadas con *Azotobacter*. Así, en lechugas ha habido un incremento significativo de este parámetro en las plántulas de las semillas tratadas a la máxima concentración de bacterias aplicada. Sin embargo, este parámetro no ha mostrado diferencias significativas en las plántulas de las semillas de escarola tratadas a ninguna concentración aplicada (Fotografías 32 y 33). En la bibliografía consultada sí que se ha observado incrementos de la longitud de las raíces de las plántulas tratadas con *Azotobacter chroococcum* y que ha sido significativa en *Vigna radiata* (Ahmad et al., 2005), en césped (Lara et al., 2011 b), en banana (Madaan et al., 2013) y en *Jatropha curcas* (Jumar et al., 2015).

El incremento en el peso radicular en escarolas pero no en su longitud se debió a que el tratamiento bacteriano provocó en esta especie un incremento en el número de raíces, mientras que en lechugas pasó lo contrario, incrementó la longitud pero no el peso radicular, ya que se mantuvo el número de raíces y, al ser más largas, eran más finas.

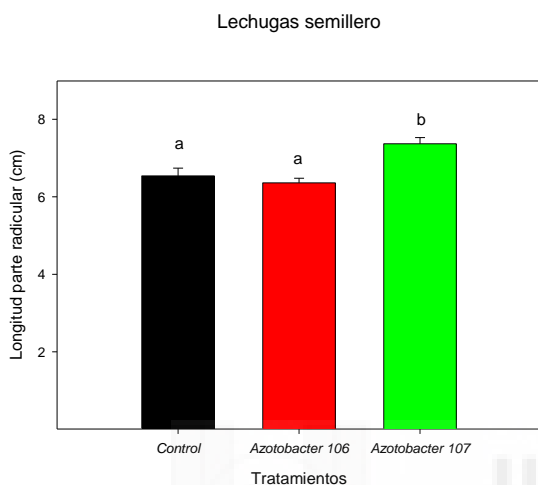


Figura 32: Longitud de la parte radicular de las plántulas de lechuga en los distintos tratamientos. Cada dato es la media \pm ES de 15 medidas.

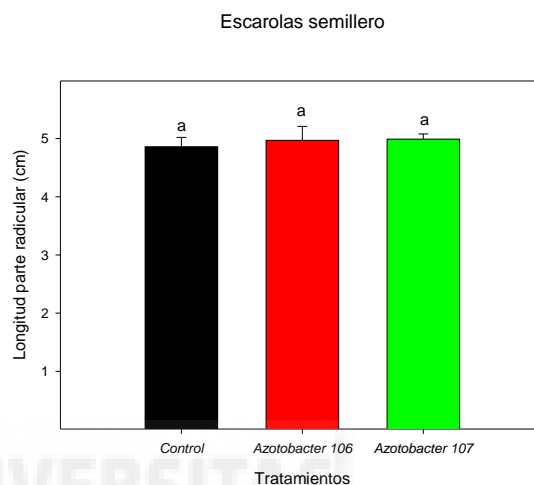


Figura 33: Longitud de la parte radicular de las plántulas de escarola en los distintos tratamientos. Cada dato es la media \pm ES de 15 medidas.

4.3.8. CLOROFILA a

Como se puede observar en las figuras 34 y 35, el contenido en clorofila a no se ha visto modificado significativamente ni en plántulas de lechuga ni en escarola debido a los tratamientos con *Azotobacter chroococcum*. Sin embargo, González-Rodríguez et al. (2013), al pulverizar plántulas micropropagadas de piña con un medio que contenía esta bacteria, sí que han conseguido incrementar el contenido de clorofila a de sus hojas.

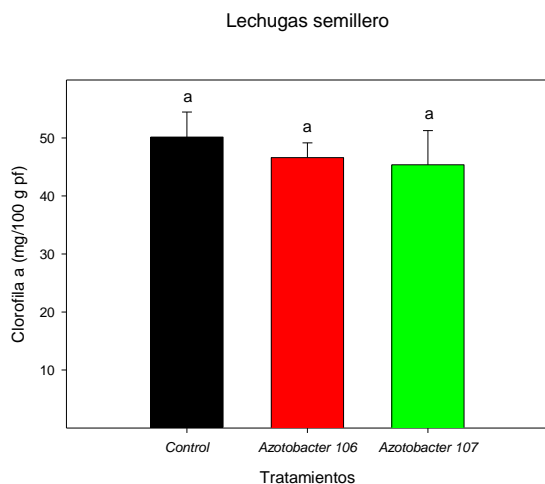


Figura 34: Contenido de clorofila a en lechuga con los distintos tratamientos. Cada dato es la media \pm ES de 6 medidas

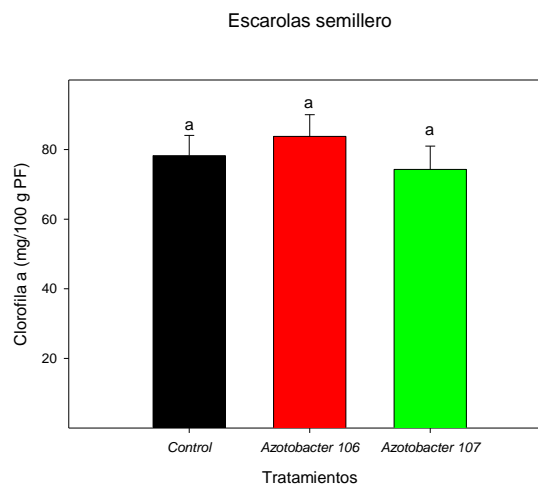


Figura 35: Contenido de clorofila a en escarola con los distintos tratamientos. Cada dato es la media \pm ES de 6 medidas

4.3.9. CLOROFILA b

Como se puede observar en las figuras 36 y 37, el contenido en clorofila b tampoco se ha visto modificado significativamente ni en plántulas de lechuga ni en escarola debido a los tratamientos con *Azotobacter chroococcum*. Sin embargo, González-Rodríguez et al. (2013), al pulverizar plántulas de piña con un medio que contenía esta bacteria, sí que han conseguido incrementar el contenido de clorofila b de sus hojas.

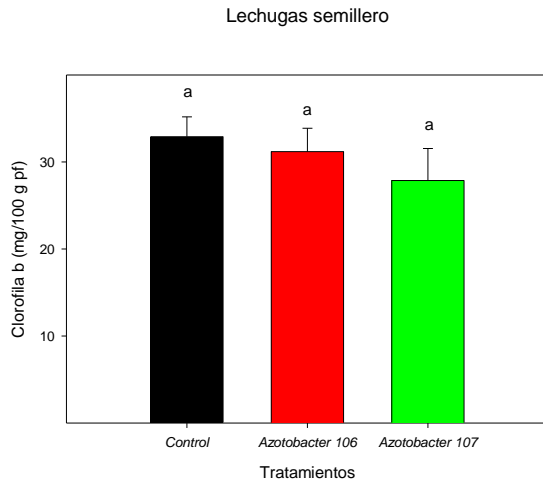


Figura 36: Contenido de clorofila b en lechuga con los distintos tratamientos. Cada dato es la media \pm ES de 6 medidas

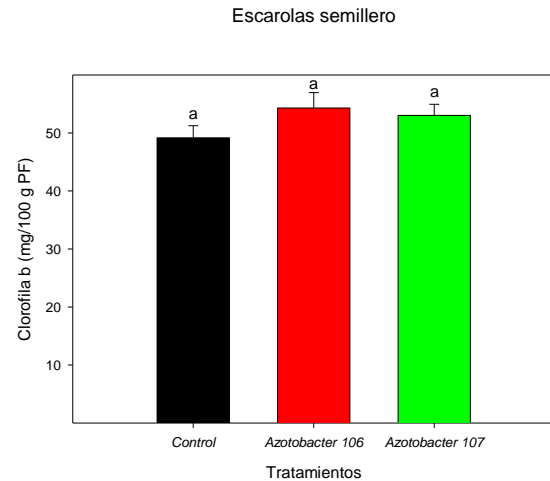


Figura 37: Contenido de clorofila b en escarola con los distintos tratamientos. Cada dato es la media \pm ES de 6 medidas

4.3.10. CLOROFILAS TOTALES

En las figuras 38 y 39, se puede observar que el contenido en clorofilas totales no se ha visto modificado significativamente ni en plántulas de lechuga ni en escarola debido a los tratamientos con *Azotobacter chroococcum*. Sin embargo, el tratamiento de semillas de *Jatropha curcas* con una mezcla de *A. chroococcum* y de hongos micorrízico-arbusculares sí que ha logrado incrementar el contenido en pigmentos fotosintéticos de sus hojas. Madaan et al. (2013) también han conseguido incrementar los contenidos de clorofilas totales de las hojas de plantas micropropagadas de banana al ser tratadas con una mezcla de *A. chroococcum* y de *Piriformospora indica*. Así mismo, González-Rodríguez et al. (2013) al pulverizar plántulas micropropagadas de piña con un medio que contenía *A. chroococcum*, sí que han conseguido incrementar el contenido de clorofilas totales de sus hojas, lo que ha provocado un incremento de la eficiencia del fotosistema II y de su fotosíntesis neta.

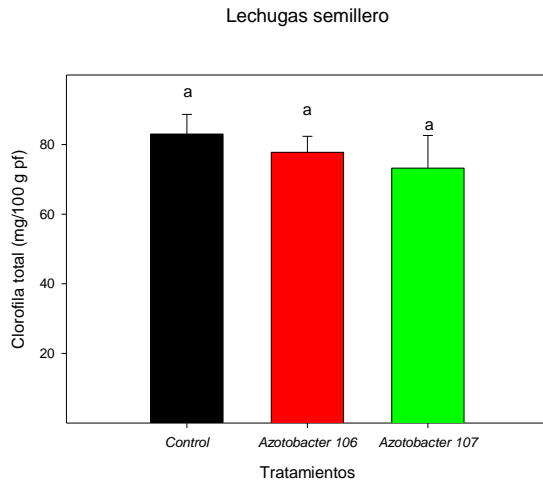


Figura 38: Contenido de clorofila total en lechuga con los distintos tratamientos. Cada dato es la media \pm ES de 6 medidas

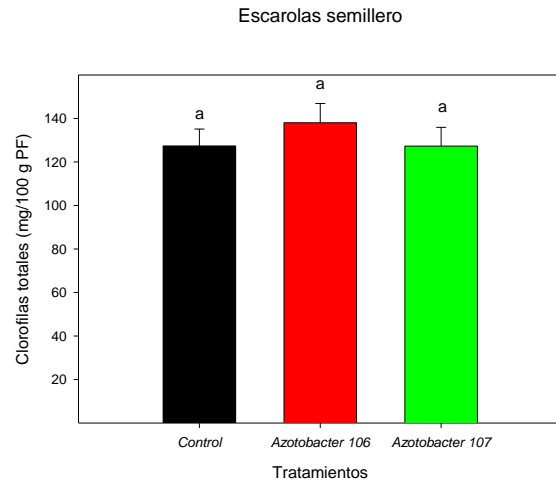


Figura 39: Contenido de clorofila total en escarola con los distintos tratamientos. Cada dato es la media \pm ES de 6 medidas

4.4. EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS EN LECHUGAS Y ESCAROLAS

4.4.1. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LA PRODUCCIÓN TOTAL

Como se puede observar en las figuras siguientes, los tratamientos con *A. chroococcum* no han incrementado significativamente la producción ni de las lechugas ni escarolas, excepto en las escarolas en producción ecológica y con el tratamiento bacteriano a la menor concentración (Figuras 40, 41, 42 y 43). En la bibliografía consultada, los tratamientos con esta bacteria sí que han conseguido incrementar la producción en lechugas y fresas (Balode, 2009), en bananas (Madaan et al., 2013), en trigo (Kumar et al., 2014 a y b; 2015), en brócoli (El-Magd et al., 2014), en pepino (Kanitkar et al., 2013), en producción de aceites esenciales en *Carun copticum* (Ghilavizadeh et al., 2013), en hojas de tabaco (Amirhandeh et al., 2013) y en garbanzo (Verma et al., 2014). Estos últimos autores relacionan el incremento productivo con el incremento en la producción de AIA y el incremento en la producción de amonio y de Fe por los sideróforos de estas bacterias, así como al incremento en la solubilización del fosfato, y a un incremento en la resistencia a enfermedades provocados todos estos efectos por este diazótrofo.

Como hemos comentado anteriormente, el contenido bacteriano en suelo ha sido parecido en los suelos con plantas tratadas y en las no tratadas al finalizar el cultivo, por lo que esta disminución de las bacterias en el suelo de las plantas tratadas ha podido ser suficiente para que no se notaran los efectos en la producción. El único tratamiento que ha mostrado un incremento significativo en la producción ha sido el de 10^6 UFC/mL en escarolas en suelo ecológico. Esto puede ser debido a que el cultivo ecológico no fue abonado mientras que el cultivo no ecológico sí lo fue. Por tanto, la fijación de nitrógeno provocada por *Azotobacter* pudo incrementar la disponibilidad de nitrógeno orgánico a las escarolas en el cultivo ecológico y así notarse sus efectos respecto a las escarolas testigo en el suelo ecológico. Sin embargo, el suelo no ecológico sí que se abonó con fertilizantes nitrogenados, por lo que las plantas, tanto lechugas como escarolas, en realidad disponían del suficiente abono nitrogenado para su crecimiento y el nitrógeno fijado por las bacterias no tuvo un efecto suficiente en las plantas tratadas que crecieron con *Azotobacter*. Además, las bacterias diazótroficas que disponen de suficiente nitrógeno en suelo no fijan el N_2 atmosférico porque es un proceso muy costoso energéticamente (Aparicio-Tejo et al., 2000) por lo que las bacterias en el suelo no ecológico pudieron no realizar una fijación de N_2 extra, sino consumir el nitrógeno del suelo y ser competitivas en el consumo de nitrógeno del abono con las plantas.

Por otro lado, el tratamiento bacteriano ha podido incrementar la producción de escarolas debido a que éstas han presentado una gran cantidad de mosca blanca que las lechugas apenas presentaban, por lo que las escarolas estaban más estresadas que las lechugas por este motivo. Esto puede ser debido a que el tratamiento con *Azotobacter* incrementa la resistencia a diversos factores de estrés, tanto bióticos como abióticos. Así, El-Hifny y El-Sayed (2011), encuentran que plantas de pimiento en suelos salinos incrementaron su producción al tratarse con esta bacteria y Balode (2009) encontró que plantas de lechuga infectadas con *Botrytis cinerea* incrementaban su producción al ser tratadas con *A. chroococcum* y Verna et al. (2014), también obtuvieron mayores producciones de garbanzos infectados con *Fusarium oxysporum* y/o *Rhizoctonia solani* al ser tratados con *A. chroococcum*.

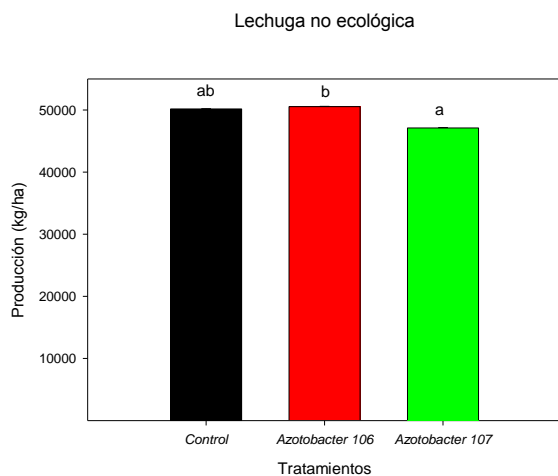


Figura 40: Producción de lechuga no ecológica. Cada dato es la media \pm ES de 35 medidas

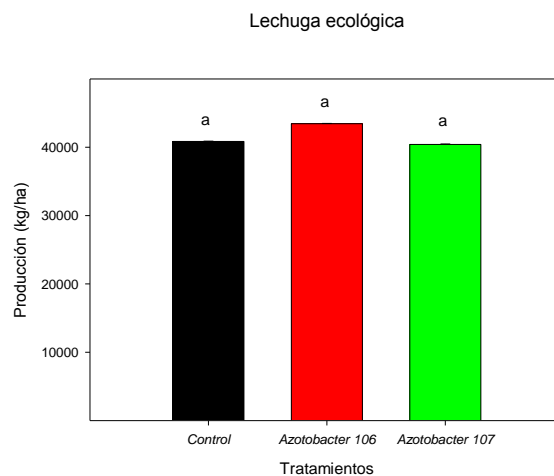


Figura 41: Producción de lechuga ecológica. Cada dato es la media \pm ES de 35 medidas

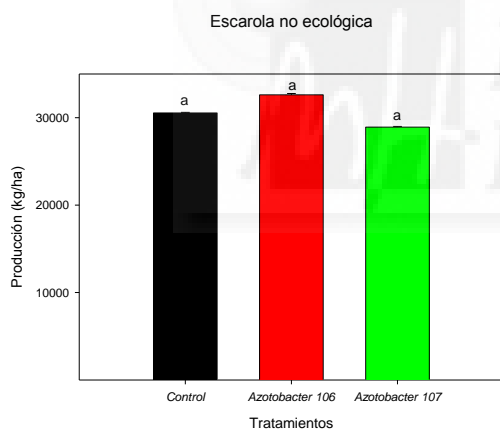


Figura 42: Producción de escarola no ecológica. Cada dato es la media \pm ES de 35 medidas

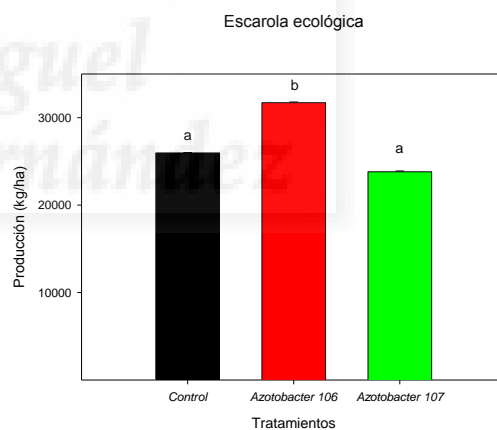


Figura 43: Producción de escarola ecológica. Cada dato es la media \pm ES de 35 medidas

4.4.2. PESO

Como se puede observar en las figuras 44 y 45 el peso de las lechugas no ha variado con los tratamientos aplicados ni en suelo ecológico ni en no ecológico. Sin embargo, en escarola los tratamientos bacterianos aplicados a ambas concentraciones han producido incrementos significativos de los pesos de las escarolas en suelo ecológico (Figuras 47), aunque no han tenido efecto en suelo no ecológico (Figura 46). Otros autores sí que han obtenido plantas con incrementos del peso al ser tratadas con *A. chroococcum*, como en brócoli (El-Magd et al., 2014), en plantas de *Aloe vera* (Mitra y Motjaba, 2014), en plantas de tabaco (Amihandeh et al., 2013) y en plantas de garbanzo (Verma et al., 2014), entre otras. En el caso de las lechugas de este estudio, esto puede ser debido a que las plantas control han presentado un crecimiento enorme, con un peso medio de 1757.17 ± 109.42 g en suelo no ecológico y 1633.95 ± 95.00 g en suelo ecológico, menor en este último ya que no se les ha abonado. Con estos pesos es difícil que las lechugas incrementen significativamente su peso, sobre todo en los suelos no ecológicos que ya tenían su abonado, y puede que el incremento de nitrógeno provocado por las bacterias diazótrofes haya provocado un incremento no necesario de nitrógeno para su crecimiento. Sin embargo, las lechugas en suelo ecológico que no estaban abonadas, sí que han incrementado su peso, aunque este incremento no haya sido significativo.

Sin embargo, en el caso de las escarolas se puede observar que en las cultivadas en suelo no ecológico, se ha producido un incremento no significativo de los pesos de las escarolas, y ha sido en los suelos ecológicos, donde el incremento del peso ha sido significativo para ambas concentraciones aplicadas. Esto puede ser debido a que el suelo ecológico no ha sido abonado y, por tanto, *A. chroococcum* fija nitrógeno atmosférico porque no dispone de suficiente cantidad de otra fuente nitrogenada en el suelo, y como resultado incrementa el contenido de compuestos nitrogenados disponibles para la planta en el suelo. Sin embargo, los suelos no ecológicos sí que estaban abonados, por lo que la bacteria sí dispone de otras fuentes nitrogenadas en el suelo por lo que no fija el nitrógeno atmosférico, ya que es un proceso energético muy costoso (Aparicio-Tejo et al., 2000).

También puede ser que haya una diferencia en la afinidad de ambos cultivos a la cepa de bacteria utilizada para los tratamientos. Así, González (2000) también encontró diferencias en las respuestas de diferentes cultivos (lechugas y tomates) tratados con *A. chroococcum*, por lo que concluyó que hay diferentes afinidades entre el microorganismo (e incluso según la cepa de la que se trate), y cada cultivo. Además este mismo autor encontró que las lechugas respondían mejor al tratamiento de *A.*

chroococcum pulverizado sobre la planta en lugar de aplicado a suelo, al contrario que los tomates.

Además, las escarolas sufrieron un ataque muy grande de mosca blanca que se trató con productos ecológicos, pero no disminuyó sensiblemente y las escarolas sufrieron este estrés biótico. Como se ha dicho en el punto anterior, *A. chroococcum* también presenta un efecto beneficioso sobre la resistencia de las plantas tratadas a las plagas, por lo que por esta razón los tratamientos bacterianos también han podido influir positivamente sobre el peso de las escarolas tratadas y cultivadas en suelo ecológico.

El conjunto de todas las causas especificadas anteriormente ha tenido como consecuencia que el peso de las escarolas tratadas con 10^6 UFC/mL en suelo ecológico (1163.17 ± 107.97), prácticamente ha alcanzado el peso de las escarolas controles cultivadas en suelo no ecológico (1177.50 ± 117.00). Por tanto, el abono nitrogenado echado a las plantas en el cultivo no ecológico podría ser sustituido por el biofertilizante y se conseguiría el mismo peso de las escarolas, tal como otros autores han encontrado en otras especies (Bhardwaj et al., 2014).



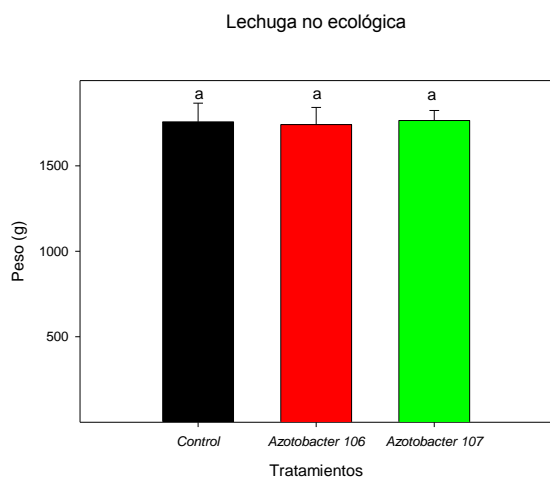


Figura 44: Peso de lechuga no ecológica. Cada dato es la media \pm ES de 6 medidas

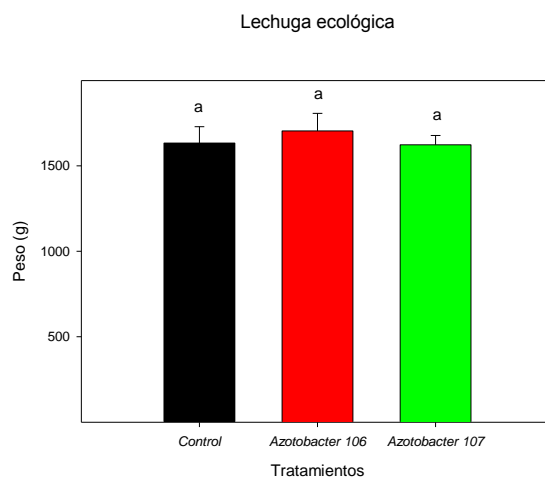


Figura 45: Peso de lechuga ecológica. Cada dato es la media \pm ES de 6 medidas

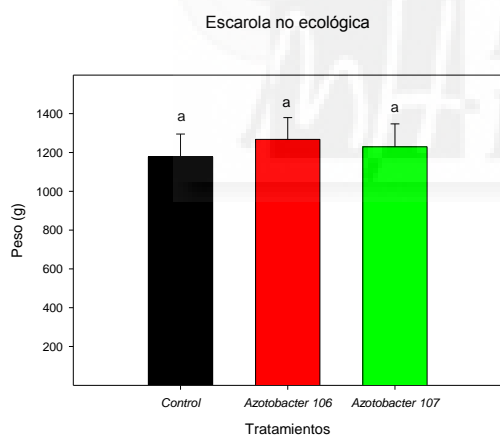


Figura 46: Peso de escarola no ecológica. Cada dato es la media \pm ES de 6 medidas

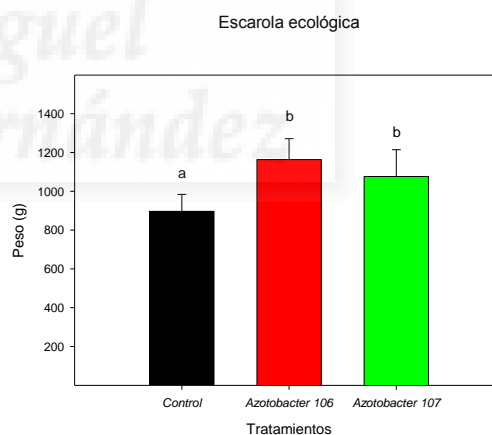


Figura 47: Peso de escarola ecológica. Cada dato es la media \pm ES de 6 medidas

4.4.3. LONGITUD

En las gráficas siguientes se representa la longitud de las lechugas y escarolas, ecológicas y no ecológicas. Como se puede observar en lechugas no hay una diferencia significativa entre la longitud de las plantas tratadas y las controles ni en las cultivadas en suelo ecológico ni en no ecológico. Las escarolas tratadas han incrementado un poco la longitud respecto a las controles, aunque estas diferencias sólo han sido

significativas en el caso de las cultivadas en suelos no ecológicos (figuras 48, 49, 50, y 51) En la bibliografía consultada los tratamientos con *Azotobacter* han conseguido incrementos en la longitud de las plantas en especies como en plantas de *Aloe vera* (Mitra y Mojtaba (2014), banana (Madaan et al., 2013), brócoli (El-Magd et al., 2014), plantas de garbanzo (Verma et al., 2014), pimiento (El-Hifny y El-Sayed, 2011), y en plantas de tabaco (Amirhandeh et al., 2013).

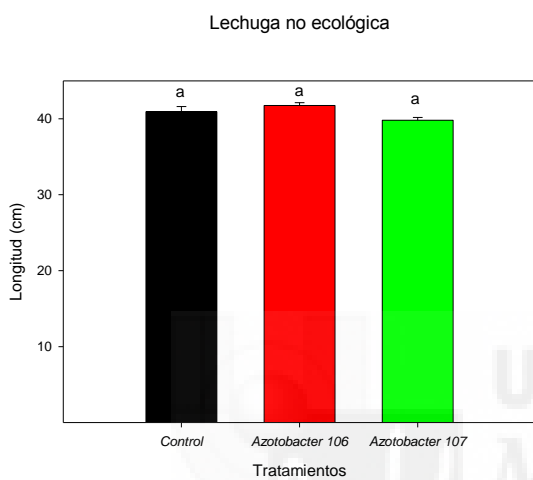


Figura 48: Longitudes de las lechugas no ecológicas en los distintos tratamientos. Cada dato es la media \pm ES de 6 medidas.

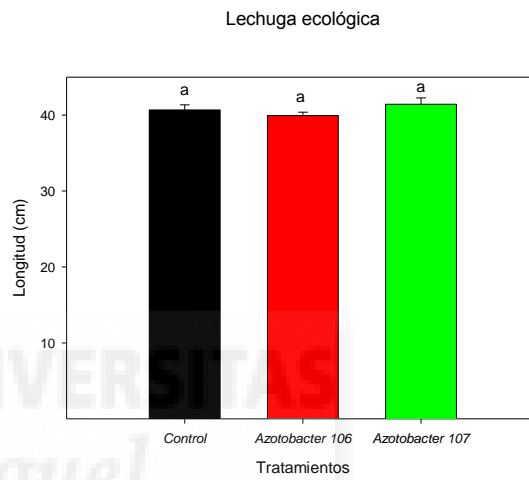


Figura 49: Longitudes de las lechugas ecológicas en los distintos tratamientos. Cada dato es la media \pm ES de 6 medidas

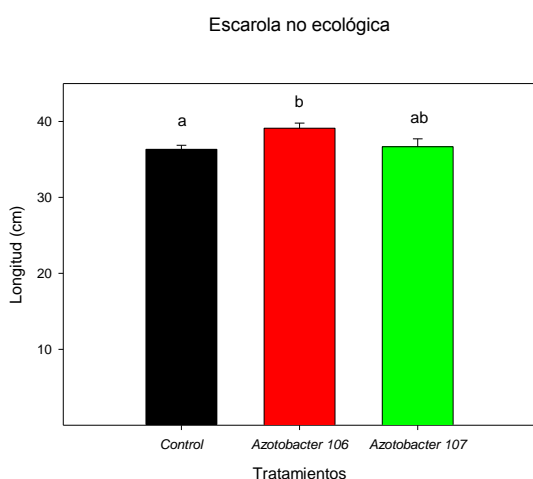


Figura 50: Longitudes de las escarolas no ecológicas en los distintos tratamientos. Cada dato es la media \pm ES de 6 medidas

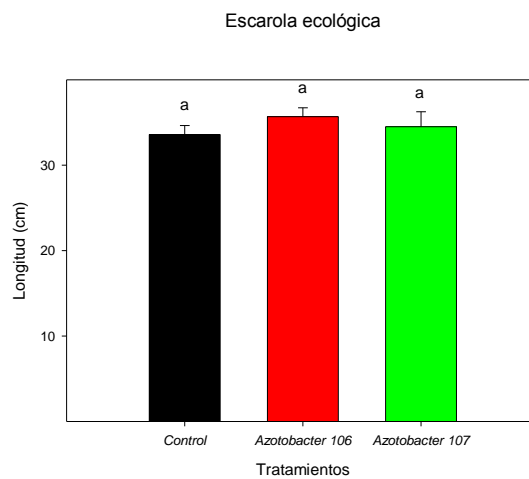


Figura 51: Longitudes de las lechugas ecológicas en los distintos tratamientos. Cada dato es la media \pm ES de 6 medidas

También realizamos las mediciones de los diámetros de las lechugas y escarolas, pero debido a que se tuvieron que apilar un fin de semana antes de realizar esta medida, las piezas estaban algo chafadas y consideramos que los resultados no eran adecuados por lo que no los hemos presentado.

4.4.4. PROTEÍNAS TOTALES

Como se puede observar en las figuras siguientes, el tratamiento con *Azotobacter* produjo un incremento en el contenido de proteínas en todos los tratamientos realizados, tanto en lechugas como en escarolas cultivadas tanto en suelo ecológico como en no ecológico y en ambas concentraciones bacterianas. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros investigadores (González-Rodríguez et al., 2013; Kumar et al., 2015).

La característica principal de los diazotrofos como el *Azotobacter* es la fijación de nitrógeno atmosférico, lo que incrementa el nitrógeno en el suelo y también activa la nitrogenasa en suelo (Yamprai et al., 2014). Además estas bacterias también realizan la reducción de nitrato, todo lo cual pone a disposición de las plantas una gran cantidad de nitrógeno asimilable por ellas (Wani et al., 2013). Así, Tandon (1991) estima que la aplicación de *Azotobacter* como biofertilizante equivale a una fertilización de 20 kg de N/ha. Además, también se ha comprobado que *Azotobacter* incrementa el transporte de nitratos, nitritos, amonio y fosfatos desde el suelo a la planta (Kumar et al., 2014 b). Esto provoca que las plantas incrementen su contenido en aminoácidos (González-Rodríguez et al., 2013) y éstos sean usados para la síntesis proteica.

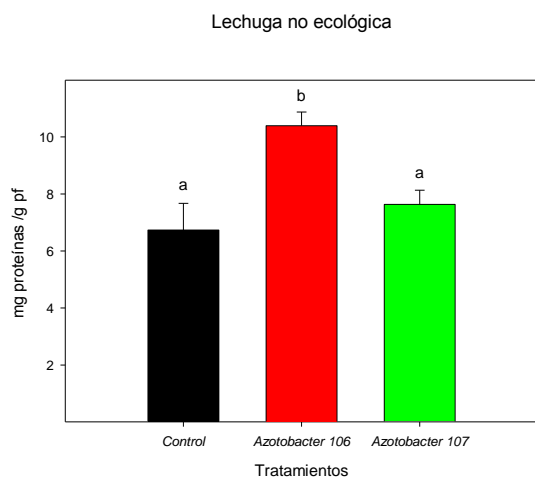


Figura 52: Proteínas en lechuga no ecológica con los distintos tratamientos. Cada dato es la media \pm ES de 4 medidas

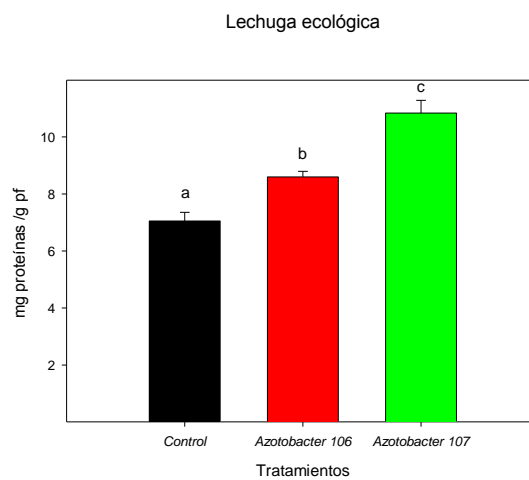


Figura 53: Proteínas en lechuga ecológica con los distintos tratamientos. Cada dato es la media \pm ES de 4 medidas

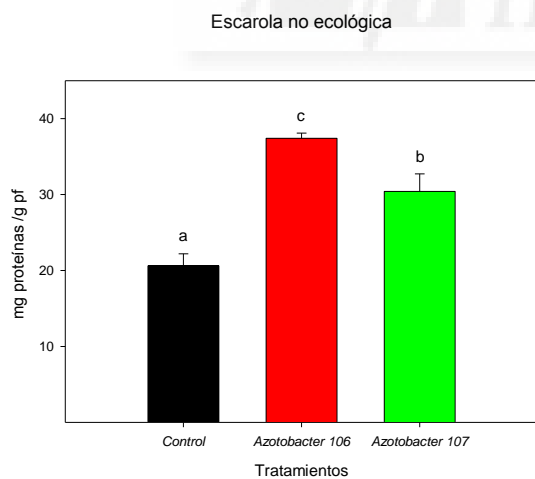


Figura 54: Proteínas en escarola no ecológica con los distintos tratamientos. Cada dato es la media \pm ES de 4 medidas

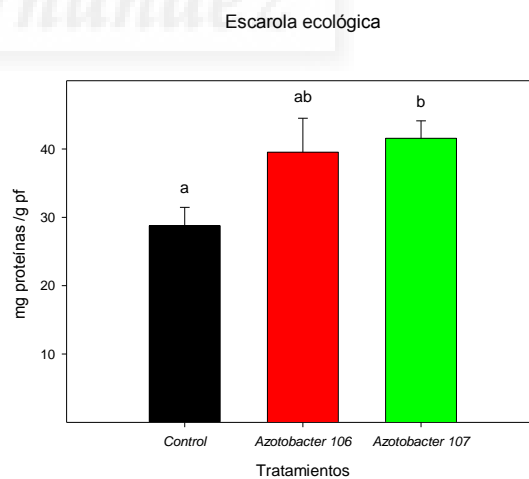


Figura 55: Proteínas en escarola ecológica con los distintos tratamientos. Cada dato es la media \pm ES de 4 medidas

4.4.6. PORCENTAJE DE HUMEDAD

En las figuras 56, 57, 58 y 59 se encuentra representado el porcentaje de humedad de las lechugas y escarolas control y tratadas en suelo ecológico y no ecológico. Tanto en lechugas como en escarolas, se observa una disminución de este parámetro en las plantas tratadas respecto a las controles, excepto en las lechugas cultivadas en suelos no ecológicos que no presentan diferencias significativas en este parámetro. Dicho de otro modo, el tratamiento con *A. chroococcum* ha incrementado significativamente el peso seco de las plantas tratadas respecto a las controles, lo que se puede explicar por el mayor contenido proteico visto en el apartado anterior. Estos resultados están en consonancia con los encontrados por otros autores en otras especies tratadas con esta misma bacteria como en banana (Madaan, et al. 2013), en pimiento (El-Hifny y El-Sayed, 2011) y en brócoli (El-Magd et al., 2014). Esto puede estar relacionado con una mayor actividad fotosintética de las plantas tratadas (González-Rodríguez et al., 2013) que activa la síntesis de carbohidratos y el mayor crecimiento no solo en peso fresco sino también en peso seco de las plántulas tratadas. Este incremento del peso seco también se puede relacionar con el efecto de las auxinas y giberelinas que excretan las bacterias a la rizosfera de la planta, lo que provoca un incremento de la velocidad de crecimiento (Wani et al., 2013), ya que hemos visto en apartados anteriores que esta cepa sí que tiene una alta tasa de síntesis de estas hormonas, tal como también han encontrado otros autores en tratamientos con esta bacteria (Ahmad et al., 2005; Lara et al., 2011 b).

Por otro lado, el incremento en el exudado bacteriano a la rizosfera de compuestos nitrogenados asimilables por la planta, también incrementa la velocidad de crecimiento de las plantas tratadas, con incrementos tanto de su peso fresco como de su peso seco (Wani et al., 2013).

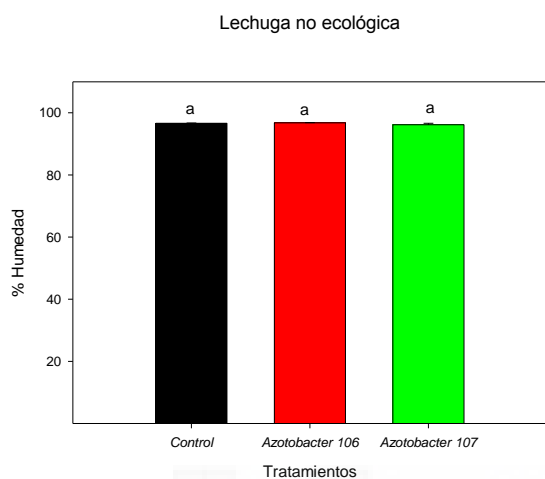


Figura 56: Porcentaje de humedad en lechuga no ecológica. Cada dato es la media \pm ES de 5 medidas

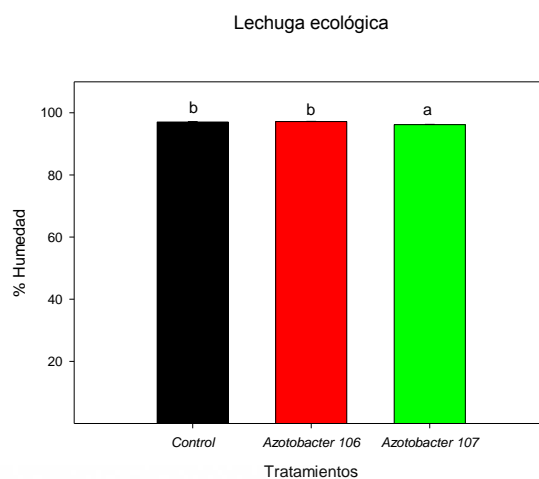


Figura 57: Porcentaje de humedad en lechuga ecológica. Cada dato es la media \pm ES de 5 medidas

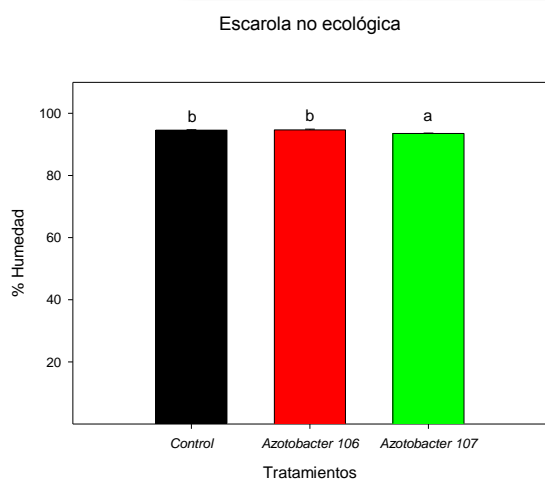


Figura 58: Porcentaje de humedad en escarola no ecológica. Cada dato es la media \pm ES de 5 medidas.

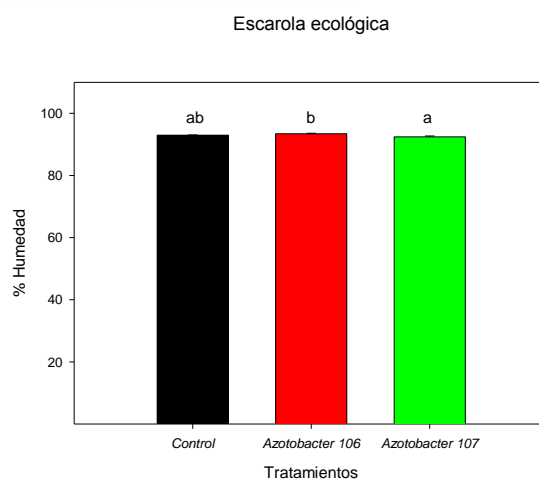


Figura 59: Porcentaje de humedad en escarola ecológica. Cada dato es la media \pm ES de 5 medidas



CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se pueden obtener de los tratamientos con *Azotobacter chroococcum* a 10^6 y 10^7 UFC/mL de medio de cultivo en lechugas y escarolas, cultivadas en suelos ecológicos y no ecológicos son las siguientes:

1. La cepa utilizada de la bacteria ha sido la 4103, que es la cepa tipo de esta especie de la Colección Española de Cultivos Tipo de la Universidad de Valencia. Esta cepa ha presentado una síntesis de AIA medio-alta con una capacidad de síntesis de 105.71 μ l AIA/mL de medio, a los 7 días de incubación con triptófano 5 ppm. También ha presentado una alta capacidad de síntesis de compuestos giberélicos, mientras que no ha presentado capacidad de solubilización de fosfatos insolubles.
2. Los tratamientos con *A. chroococcum* a las semillas provocaron un incremento en el porcentaje de germinación sólo en escarolas. Las plántulas tratadas, tanto de lechuga como de escarola, presentaron el mismo número de hojas que las control, pero produjeron un incremento dosis dependiente del peso fresco total, que fue proporcional al incremento del peso y longitud de la parte aérea. Sin embargo, el peso fresco radical incrementó en escarolas de forma dosis dependiente pero se mantuvo constante en lechugas, al contrario que la longitud de las raíces que se incrementaron significativamente en plántulas de lechugas pero no en escarolas. Finalmente, el tratamiento bacteriano no modificó el contenido en clorofilas de las plántulas tratadas en ningún caso.
3. Las plántulas de semillero fueron trasplantadas a campo en suelo ecológico y no ecológico y al final del cultivo el análisis microbiológico de suelos mostró una disminución del número de UFC de los suelos con plantas tratadas y que fueron no significativos respecto a los controles, tanto en suelos ecológico como en no ecológicos, a la menor concentración de bacterias aplicadas, y sólo fueron significativos a la mayor concentración. Por lo que para mantener la concentración de *A. chroococcum* de esta cepa en el suelo parece que se debió repetir los tratamientos en los suelos a lo largo del cultivo.

4. Las lechugas y escarolas tratadas no han presentado diferencias significativas en cuanto a la producción y peso fresco, a excepción de las escarolas cultivadas en suelos ecológicos y a la menor concentración de *A. chroococcum* tratadas. También han presentado la misma longitud excepto las escarolas en suelos no ecológicos que han sido ligeramente más largas. Sin embargo, todos los tratamientos han incrementado el contenido proteico de todas las lechugas y escarolas, tanto en suelo ecológico como en no ecológico y a ambas concentraciones aplicadas. Finalmente, el porcentaje de humedad ha disminuido en todas las plantas tratadas, excepto en lechugas en suelo no ecológico, siendo significativo a la máxima concentración de bacterias aplicadas, por lo que el peso seco ha incrementado con la aplicación.





BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Abou el-magd, M. M; Zaki, M.F, Abo Sedera, S. A. 2014. Effect of bio-nitrogen as a partial alternative to mineral-nitrogen fertilizer on growth, yield and head quality of broccoli(*Brassica oleracea* L. var. italica). World applied sciences journal. 31(5):661-691.

Acosta Echeverría, M; Sánchez Bravo, J; Bañón Arnao, M. 2000. Auxinas. . EN: Fundamentos de fisiología vegetal. Editores. Azcón-Bieto, J; talón, M. Ed Mc Graw Hill interamericana. pp:325-342.

Ahmad, F, Ahmad, I; Khan, M. S. 2004. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent pseudomonas in the presence and absence of tryptophan. Turk J biol. 29: 29-34.

Alarcón, A., Morales, J.A., Oliva, E., Vega, A., Boicet, T. 2008. Efecto de la aplicación de *Azotobacter chroococcum* y *Glomus* sp en el cultivo del boniato (*Ipomoea batatas* (L.), Lam). En: Revista Electrónica Granma-Ciencia, 12 (2):35-41.

Amirhandeh, M. A. S; Norouzi, M; Nosratabad, A. R. F. 2013. Effects of nitrogen fertilization on nitrogen use efficiency of coker(flue-cured) tobacco inoculated with *Azotobacter chroococcum*. Advances in Environmental Biology. 7: 968-977.

Ansttet, A. 1967. El abono de la lechuga en función de las técnicas de cultivo. La lechuga: su cultivo y comercialización. Adapt. De A. García Palacios. Ed. Oikos Tau. Vilassar de Mar (Barcelona).147-167.

Aparicio-Tejo, P.M; Arrese-Igor, C; Becana, M. 2000. Fijación biológica de nitrógeno. EN: Fundamentos de fisiología vegetal. Editores. Azcón-Bieto, J; talón, M. Ed Mc Graw hull interamericana. Pp:247-260.

Aquilanti, L., Favilli, F., Clementi, F. 2004. Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples. Soil Biology and Biochemistry, 36:1475-1483.

Ashraf, M.A., Asif, M., Zaheer, A., Malik, A., Ali, Q., Rasool, M. 2013. Plant growth promoting rhizobacteria and sustainable agriculture: A review. African Journal of Microbiology Research, 7 (9):704-709

Asian, J. 2009. Antifungal and phytohormone production potential of *Azotobacter chroococcum* isolates from Groundnut (*Arachis hypogea* L.). Department of Microbiology, Bharati Vidyapeeth.; 23:,293-297.

Bakonyi, N; Bott, S; Gajdos, E; Jakab, A; Toht, B; Makleit, P; Veres, S. 2013. Using biofertilizers to improve seed germination and early development of maize. Polis journal of environment studies. 22(6): 1595-1599.

Balode, A. 2009 Influence of biological products-trihodermin and biomikss on the yield of lettuce and strawberries. 15th annual international scientific conference- Research for rural development.86-89.

Behl, R.K., Ruppel, S., Kothe, E., Narula, N. 2007. Wheat x Azotobacter x VA mycorrhiza interactions towards plant nutrition and growth. A review. Journal of applied Botany and Food Quality, 81:95-109.

Bhardwaj, D; Wahid, M; Kumat, R; Tuleja, N.2014. Biofertilizers function as key player in sustainable agricultura by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. Microbial cell factories. 13:66.

Brown ME, Burlingham SK. 1968 Production of plant growth substances by Azotobacter chroococcum. J Gen Microbiol 53:135-144.

Casanova, E.P. 1996. El cultivo de la lechuga en la Región de Murcia. Agrícola Vergel nº 178: 580-581.

Chilekampalli, R y Ramu, S. 2013. Polymicrobial multi-functional approach for enhancement of crop productivity. Advances in applied microbiology. 82: 53-101.

Davis, R.M.; Subbarao, K.V.; Raid, R.N.; Kurtz, E.A. 1997. Compendium of lettuce diseases. Ed. Pas-Press. USA by The American phytopathological society.

Dibut, B., Martínez-Viera, R., Acosta, M.C., Martínez, A. 1993. Evaluación de cepas de Azotobacter chroococcum aisladas de suelos de Cuba. I Actividad estimuladora del crecimiento vegetal en plántulas de tomate. Ciencia y Técnica de la Agricultura 40: 11-16.

Dibut, B.A. 2009. Biofertilizantes como insumos en la agricultura sostenible. Ciudad de La Habana, Cuba. Editorial Universitaria. ISBN 978-959-16-1032-4. 113 pp.

Eady, R. 1981. Regulation of nitrogenase activity. En current perspectives in nitrogen fixation. pp.172-181. Australian academy of sciences, Camberra.

El-hifny, I. M. M; El-Sayed, M. A. M. 2011. Response of sweet pepper plant growth and productivity to application of ascorbic acid biofertilizer under saline conditions. Australian journal of basic and applied sciences. 5:1273-1283.

FAO. 1986. Soil surveys Investigation for Irrigation. Bull nº 42. Roma.

Fernandez, A y Pedraza, R. 2013. The role of siderophores in plant growth-promoting bacteria.

Foly, H.M.H., Dakhly, O.F., El-Mawad, H., Abdel-Mageed, Y., Hassan, E.A. 2002. Using some isolates and transformants of Azotobacter to reduce chemical nitrogen fertilizer rates in garlic production. Journal Agric. Sci. Mansoura Univ., 27(11):7667-7684.

Gallon, R. J. 1992. Reconciling the incompatible: N₂ fixation and O₂. Transley rev no 44. New. Phytol.122:571-609.

Ghilavizadeh, A; Darzi, M . T, hadi. M. H. S. Effects of biofertilizer and plant density on essential oil content and yield traits of ajowan(carum copticum). Middle east journal of scientific research. 14(11):1508-1512.

Gliessman, S. 2002. Agroecología: Procesos ecológicos en agricultura sostenible. Costa Rica. Ed.: CATIE. 380 p. ISBN: 9977-57-385-9

González, M. 2000. Efecto de un inoculante microbiano a partir de cepas nativas de Azotobacter chroococcum sobre el rendimiento en secuencias de cultivos hortícolas. Trabajo fin de máster. Universidad de Camaguey. Cuba.

Gonzalez, R. M; Serrato, R; Molina, J; Aragón, C.E. 2013. Biochemical and physiological changes produced by azotobacter chroococcum on pineapple in vitro-plantlet during accimatizacion. Acta phisiol plant. 35:3483-3487.

Hajnal, T., Jarak, M., Milošević, N. 2004. Bacterization of maize: yield response of maize to inoculation. 10 th International symposium on microbial ecology ISME-10, Book of abstracts, 207, Cancun, Mexico. pp 22—27.

Hassan, S., Hassan, T. 2013. Effect of biofertilization by using three Azotobacter isolates and two levels of mineral nitrogen fertilizer on Jerusalem Antichoke (*Helianthus tuberosus* L.) growth, yield and some chemical constituents. Journal of American Science, 9(1):437-446.

Infoagro. 2015: Consultada en los siguientes enlaces:
<http://www.infoagro.com/hortalizas/escarola.htm>;
<http://www.infoagro.com/hortalizas/lechuga.htm>

Jackson RM, Brown ME, Burlingham SK 1964 Similar effects on tomato Plants of Azotobacter inoculation and application of gibberellins. Nature 203:851-852.

Jarak, M., Duric, S.S., Dordevic, B.D. 2010. Benefits of inoculation with Azotobacter in the growth and production of tomato and pepper. Proceedings for Natural Sciences. Matica Srpska, Novi Sad, Serbia, No 119: 71-76.

Kanitkar, S; jones, P; Raut, V.M. **2013.** Field biofficacy and phytotoxicity of vitormone(Azotobacter chroococcum) in cucumber. Postology. 37(8): 15-20.

Kenneddy C, Rudnick P, MacDonald M, Melton T 2005 Genus III: Azotobacter. En: Garrity GM (ed) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second edition. Vol. Two. The Proteobacteria. Part B. The Gammaproteobacteria. Springer, New York, 384-402.

Kennedy, C y Toukdarian, A. 1987. Aplication to nitrogen fixation and related aspects of metabolism. Ann. Rev. Microbiol. 41:227-258

Kennedy, C y Toukdarian, A. 1987. Aplication to nitrogen fixation and related aspects of metabolism. Ann. Rev. Microbiol. 41:227-258.

Khan, S., Pariari, A. 2012. Effect of N-fixing biofertilizers on growth, yield and quality of chilli (*Capsicum annuum* L.). *The Bioscan*, 7 (3):481-482.

Kizilkaya, R. 2008. Yield response and nitrogen concentrations of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) inoculated with *Azotobacter chroococcum* strains. *Ecological Engineering*, 33:150-156.

Kuma, S; Bauddh, K; Barman, S.C; Singh, R.P.2014. organic matrix entrapped bio-fertilizers increase growth, productivity, and yileld of *triticum aestivum* L. and transport of NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ and PO_4^{-3} from soil to plant leaves. *Journal of agricultural science and technology*. 16(2):315-329.

Kumar, M; Bauddh, K; Sainger, M; Sainger, P.A; singh,R.P.2015. Increase in growth, productivity and nutritional status of wheat(*triticum aestivum* L.) and enrichment in soil microbial population aplplied with biofertilizers entrapped with organic matrix. *Journal of plan nutrition*. 38(2).260-276.

Kumar, R., Bhatia, R., Kurereja, K., Behl, R.K., Narula, N. 2007. Establishment of *Azotobacter* on plant roots: chemotactic response, development and analysis of root exudates of cotton and wheat. *Journal of Basic Microbiology*, 47:675-682.

Kumar, R., Bhatia, R., Sikka, V., Suneja, S., Narula, N. 2006. Genetic tagging of *Azotobacter chroococcum* for colonization on wheat (*Triticum aestivum*) and cotton (*Gossypium* sp) roots. *Arch. Agron. Soil Sci.*, 52:1-6.

Kumar, S; bauddh, K; Barman, S.C; Pratap; R. 2014. Amendments of microbial biofertilizers and organic substances reduces requirement of urea and DAP with enhaced nutrient availability and productivity of wheat(*triticum aestivum* L.). *Ecological engineering*. 71:432-437.

Kumar, S; jones, P; Borowake, A; Raut, V. M. 2013. Field bioefficacy and phytotoxicity of vitormone(*Azotobacter chroococcum*) in cucumber. *Pestology*. 37:15-20

Kundu B S, Gaur A C. 1980. Establishment of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria in rhizosphere and their effect on yield and nutrient uptake of wheat crop. *Plant Soil*. 57:223-230.

Lara, C.; Oviedo,L y Alemán A. 2011. Aislados nativos con potencial en la producción de ácido indol acético para mejorar la agricultura. *Rev. Bio. Agro* vol.9 No 1.

Lara, C; Oviedo, L; Betancur, C. 2011. Bacterias nativas con potencial en la producción de ácido indolacético para mejorar los pastos. *Zootecnia Trop.*, 29(2): 187-194..

Lipton, W.J.; Stewart, J.K.; Whitaker, T.W. 1972. An illustrated guide to the identification of some market disorders of Head Lettuce. *USDA Marketing Research Report* nº 950.

Madaan, G; Gosal, S. K.; Saroa, G. S.2013. Effect of microbial inoculants on the growth and yield of micropropagated banana(*Musa indica*) cv. Grand Naine. *Journal of horticultural science and biotechnology*.88(5): 643-649.

- Mahajan, A., Choudhary, A.K., Jaggi, R.C., Dogra, R.K. 2003.** Importance of bio-fertilizers in sustainable agriculture. Farmers' Forum, April, 2003.
- Mallar, A. 1978.** La lechuga. Edit. Hemisferio Sur. Buenos Aires.
- Manchal, J., and J. Vanderleyden. 2000.** The "oxygen paradox " of dinitrogen-fixing bacteria. Biol. Fertil. Soils. 30:363-373.
- Maroto, J.V. 1995.** Horticultura herbácea especial. Ed. Mundi-Prensa. (4ª Edición). Madrid.
- Maroto, J.V. 1997.** Etiología y descripción de las principales fisiopatías de la Horticultura mediterránea. Ediciones y Promociones Lav S.L. Valencia.
- Maroto, J.V. 2002.** Horticultura herbácea especial. Ed. Mundi-Prensa. (5ª Edición). Madrid.
- Maroto, J.V.; Gómez, A.M.; Baixauli, C. 2000.** La lechuga y la escarola. Cuadernos de agricultor nº 6. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- Martínez-Viera, R. Dibut, B, Acosta, M.C., Martínez, A. 1997.** Acción estimuladora del *Azotobacter chroococcum* sobre el cultivo del tomate en el suelo Ferralítico Rojo. I. Efecto sobre los semilleros. Agrotecnia de Cuba, 27(1):23-26.
- Mezei, S., Popovic, M., Kavacev, L., Mrkovacki, N., Nagl, N., Malencic, D. 1998.** Effect of *Azotobacter* strains on sugar beet callus proliferation and nitrogen metabolism enzymes. Biología Plantarum, 40(2):277-283.
- Milic, V., Jarak, M., Mrkovacki, N., Milosevic, N., Govedarina, M., Duric, S, Marinkovic, J. 2004.** Microbiological fertilizers use and study of biological activity for soil protection purposes. A periodical Scientific Research of Institute of Field and Vegetable Crops. 40: 153-171. Novi Sad, Serbia.
- Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente (MAGRAMA):** Anuario de estadística 2013: <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/2013/default.aspx?parte=3&capitulo=13&grupo=6&seccion=10>
- Misaghi, I.L.; Grogan, R.G. 1978.** Physiological Basis for tipburn development in head lettuce. Phytopathology, 68: 1744-1753.
- Mitra, A y Mojtaba, Y. 2014.** Effect of bacterial bio-fertilizers on growth traits and quantity and quality of aloe (aloe vera) gel. Research on crops. 15(3): 697-700.
- Moshiri, F., B. R. Crouse, M. K. Johnson, and M. J. Maier. 1995.** The "nitrogenase protective" FeSII protein of *Azotobacter vinelandii*: overexpression, characterization and crystallization. Biochemistry 34:12973-12982.
- Murty M G, Ladha J K. 1988.** Influence of *Azospirillum* inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. Plant Soil. 108:281-285.

- Nautiyal, S.C. 1999.** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganism. *FEMS Microbiology Letters*, 170: 265-275.
- Newton, W., Fisher, K. 2002.** Nitrogen Fixation – A General Overview in Nitrogen Fixation at the Millenium. G. Jeffery Leigh, Editor. Elsevier Publications. p. 1-34.
- Nieto KF, Frankenberger WT . 1991** Influence of adenine, isopentyl alcohol and *Azotobacter chroococcum* on the vegetative growth of *Zea mays*. *Plant Soil* 135:213-221.
- Nieto KF, Frankenberger, WTJr 1990** Influence of adenine, isopentyl alcohol and *Azotobacter chroococcum* on the growth of *Raphanus sativus* (radish). *Plant and Soil* 127:147-156
- Postgate, J.R. 1982.** The fundamentals of nitrogen fixation . Cambridge university press, Cambridge.
- Prakash, J; Yadah, J; Nath, K; Kumar, D. 2013.** Evaluation of plant growth promoting activities of microbial strains and their effects on growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum L.*) India. *Soil biology and Biochemistry*.70:33-37.
- Ramakrishnan, K., Selvakumar, G. 2012.** Effect of biofertilizers on enhancement of growth and yield on tomato (*Solanum lycopersicum L.*). *International Journal of Research in Botany*, 2(4):20-23.
- Revilla, E.,Llovel A y Paneque,A. 1986.** The assimilatore nitrate uptake in *Azotobacter chroococcum* . Induction by nitrate and by cyanate . *J. plant. Physiol*,118, 165-176
- Revillas, J.J., Rodelas, B., Pozo, C., Martínez-Toledo, M.V., González-López, J. 2000.** Production of B-group vitamins by two *Azotobacter* strains with phenolic compounds as sole carbon source under diazotrophic and adiazotrophic conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 89:486-493.
- Robson, R. L., and J. R. Postgate. 1980.** Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. *Annu. Rev. Microbiol.* 34:183-207
- Sarhan, T.Z., Mohammed, G.H., Teli, J.A. 2011.** Effect of bio and organic fertilizers on growth yield and fruit quality of summer squash. *Sarhad J. Agric.* 27 (3): 377-383.
- Sharma, B. S; Sayyed , R. Z; Trivedi, M. H; Thivakaran, A. G.2013.** Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer*. 587(2):1-14.
- Tahir, M.M., Sarwar, M.A. 2013.** Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A budding complement of synthetic fertilizers for improving crop production. *Pakistan Journal of Life and Social Sciences*, 11 (1):1-7.
- Taiwo, L. B. 2005.** Growth performance of tomato (*Solanum lycopersicum L.*) inoculated with *Azotobacter chroococcum*. *Moor Journal of Agricultural Research*, 5(1):13-18.
- Tayz, L ; Zeiger, E. 2006.** Fisiología vegetal. Publicacions de la universitat Jaume I de Castellón.

Thorneley, R. N., and G. A. Ashby. 1989. Oxydation of nitrogenase iron protein by dioxygen without inactivation could contribute to high respiration rates in *Azotobacter* species and facilitate nitrogen fixation in other aerobic environments. *Biochem. J.* 261:181-187.

Torres-Rubio, M.G., Valencia-Plata, S.A., Bernal-Castillo, J., Martínez-Nieto, P. 2000. Isolation of *Enterobacteria*, *Azotobacter* and *Pseudomonas* sp. producers of IAA and siderophores from Colombian rice rhizosphere. *Latinamerican Journal of Microbiology*, 42:171-176.

Tsavkelova, E.A., Klimova, S.Y., Cherdyntseva, T.A., Netrusov, A.I. 2006. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42:117-126.

Vela, G. R. 1974. Survival of *Azotobacter* in dry soil. *Appl. Microbiol.* 28:77-79

Verma, S., Kumar, V., Narula, N., Merbach, W. 2001. Studies "in vitro" production of antimicrobial substances by *Azotobacter chroococcum* isolates/mutants. *Journal of Plant Dis. Protection*, 108:152-165.

Wani, S. A; Chand, S; Ali, T.2013. potential use of *azotobacter chroococcum* in crop production: An overview. *Current agriculture research journal.* 1: 35-38.

Wen-Xing, H., Tuo, Y., Shong, Y., Lin, S.A. 2008. PGPR biofertilizers producing and its effect on *avena sativa* growth and quality development. *Acta Pratac Sinica*, 17:75-84.

Whitaker, T.W.; Ryder, V.E.; Rubatky, V.E.;Vail, P.V. 1974. Lettuce production in the United States. USDA. Agric. Handbock nº 22. Washington.

Yamprai, A; Mala, T; Sinma, K. 2014. The study on the fixed nitrogen and nitrogenase activity in the day-round of *azotobacter* and *azospirillum* grown with maize in *kamphaengsaen* soil series. *Canadian center of science and education.* 8(6):27-36.

Yaso, I.A., Abdel-Razzak, H.S., Wahab-Allah, M.A. 2007. Influence of biofertilizer and mineral nitrogen on onion (*Allium cepa* L.) growth, yield and quality under calcareous soil conditions. *Journal of Agric. Env. Sci. Alex. Univ.*, 6(1):245-264.

Yazdani, M., Bahmanyar, M.A., Pirdashti, H., Esmaili, M.A. 2009. Effect of phosphate solubilization microorganisms (PSM) and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and yield components of corm (*Zea mays* L.). *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 37:90-92.