

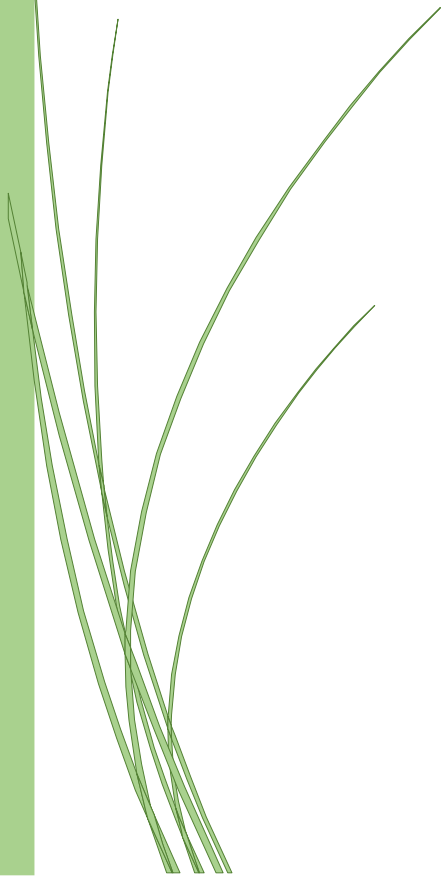


Trabajo Fin de Máster
Máster en Biología Avanzada:
Investigación y Aplicación
Curso 2022-2023

**APLICACIÓN DE BIOFERTILIZANTES
BACTERIANOS EN CULTIVO DE FRESA:
EFECTO EN SU PERFIL NUTRICIONAL E
IMPACTO EN LA COMUNIDAD
MICROBIANA RIZOSFÉRICA**

Departamento de Biología Vegetal y Ecología
Facultad de Biología
Universidad de Sevilla

Autora: Cristina Sola Elías
Tutora: Jennifer Mesa Marín



AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por su apoyo incondicional durante mis años de estudio y formación, por ayudarme a perseguir mis sueños.

A mi tutora, Jenny, por volver a confiar en mí, por todo lo que me ha enseñado, por su disposición, amabilidad y alegría contagiosa. Ha sido un placer volver a ser tu tutelada.

A Enrique Mateos Naranjo e Ignacio D. Rodríguez Llorente, por gestionar los fondos necesarios para el desarrollo de este trabajo, gracias al proyecto US-1262036 “Mejora de la sostenibilidad del cultivo de fresa mediante bioherramientas” (Proyectos I+D+i FEDER Andalucía, Universidad de Sevilla).

Al grupo de RNM-036 “Ecología Funcional Aplicada” (Dpto. Biología Vegetal y Ecología, Universidad de Sevilla) por los recursos y las instalaciones.

A la Facultad de Biología (Universidad de Sevilla), por facilitarme el espacio de los Laboratorios de Prácticas para llevar a cabo los experimentos; y en especial a Andrés e Irene, por su ayuda y amabilidad.

ÍNDICE

1. RESUMEN	5
2. INTRODUCCIÓN	6
3. OBJETIVOS	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS	10
4.1 Experimento en invernadero	10
4.1.1 Condiciones de crecimiento de las plantas y tratamientos	10
4.1.2 Selección de rizobacterias y diseño de inoculantes	11
4.1.3 Preparación de extractos para los análisis bioquímicos	13
4.1.4 Determinación de compuestos fenólicos totales	14
4.1.5 Determinación de flavonoides totales	15
4.1.6 Medida de la actividad antioxidante	16
4.1.7 Medida del contenido en antocianinas	17
4.1.8 Análisis estadístico	17
4.2 Experimento en finca	18
4.2.1 Condiciones de crecimiento de las plantas y tratamientos	18
4.2.2 Análisis metagenómico del suelo	18
5. RESULTADOS	19
5.1 Análisis bioquímico de frutos de fresa	19
5.2 Análisis metagenómico de rizosedimento de plantas de fresa	21
5.2.1 Comunidad bacteriana en rizosedimento	21
5.2.2 Comunidad fúngica en rizosedimento	24
6. DISCUSIÓN	28
7. CONCLUSIONES	32
8. BIBLIOGRAFÍA	33

1. RESUMEN

La biofertilización con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) es una técnica ecológica que podría optimizar la fertilización química y el aporte de agua en cultivos de fresa. Este tipo de cultivo recibe grandes proporciones de agua y fertilizantes para obtener una producción adecuada y satisfacer la demanda mundial, lo cual está relacionado con problemas medioambientales, como la contaminación de aguas, la salinización y la degradación del suelo. La provincia de Huelva, España, es uno de los principales productores de este fruto a nivel mundial, y el 75% de la producción se concentra en las inmediaciones del Parque Nacional de Doñana. Es del acuífero que alimenta a este entorno natural de donde se obtiene el agua para regar los cultivos. Todo ello supone una amenaza para el parque y los ecosistemas que de él dependen. Por esta razón se ha llevado a cabo un estudio sobre el efecto de la biofertilización bacteriana en cultivos de fresa en los que se ha reducido la fertirrigación en un 30%. Para ello, se ha analizado la calidad nutricional de las fresas en términos de metabolitos secundarios (fenoles totales, flavonoides y antocianinas) y de capacidad antioxidantes; y se ha estudiado la comunidad de hongos y bacterias de la rizosfera. Por un lado, la actividad antioxidante total se mantuvo, independientemente del tratamiento que se aplicó. Sin embargo, las concentraciones de polifenoles, flavonoides y antocianinas aumentaron, al reducir el aporte de insumos. Por otra parte, la biofertilización con insumos óptimos aumentó la concentración de metabolitos secundarios, pero estos se mantienen o disminuyen al reducir el aporte de fertilización química y agua. En cuanto a las comunidades microbianas de la rizosfera, no se observaron grandes diferencias en la estructura de estas, aunque la proporción de hongos micorrícicos arbusculares fue mayor en fresa inoculada con reducción de fertirrigación.

2. INTRODUCCIÓN

El sector de la fresa constituye un importante motor social y económico en Andalucía, siendo la provincia de Huelva la que produce casi la totalidad de las fresas andaluzas. En el año 2021, Andalucía produjo el 97,3% de la fresa española y casi el 29% de la fresa europea, lo que convierte a nuestro país en el segundo productor de este fruto, por detrás de Estados Unidos. Además, España es primer exportador a nivel mundial (FAOSTAT, 2022). En concreto, tres cuartas partes de la producción andaluza de fresa tiene como destino el mercado internacional, debido a la demanda de este producto en países como Alemania, Francia y Reino Unido (**figura 1**). Por ejemplo, en la campaña 2021/2022, la producción de fresa en Andalucía fue de 314.814 toneladas, de las cuales 233.781 se exportaron. Esta exportación se traduce en un valor económico de más de 580.000 euros (Observatorio de Precios y Mercados de Andalucía, 2022).

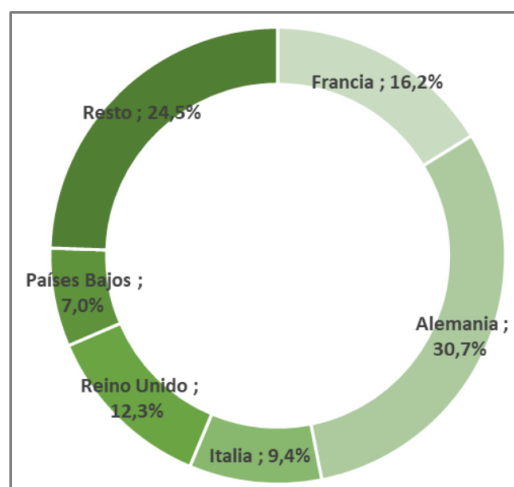


Figura 1. Destinos de las exportaciones de fresa andaluza de la campaña 2021/2022 (Observatorio de Precios y Mercado de Andalucía, 2022).

A pesar de la importancia que el cultivo de fresa supone para la economía rural y el empleo, tiene un gran impacto medioambiental. Por un lado, requiere grandes aportes de agua dulce para su riego. Las plantas de fresa tienen un sistema radicular poco profundo, un gran área foliar y un gran contenido de agua en sus frutos (Ariza *et al.*, 2021) (**figura 2**). Además, el cultivo se realiza en un suelo arenoso, con una capacidad de retención de agua muy baja que implica grandes pérdidas por percolación (Morillo, 2015). Por otro lado, requiere un elevado aporte de fertilizantes, lo cual está relacionado con problemas ambientales, como la

contaminación de aguas tanto superficiales como subterráneas, la salinización y la degradación del suelo (Valencia *et al.*, 2022; Valle-Romero *et al.*, 2023).

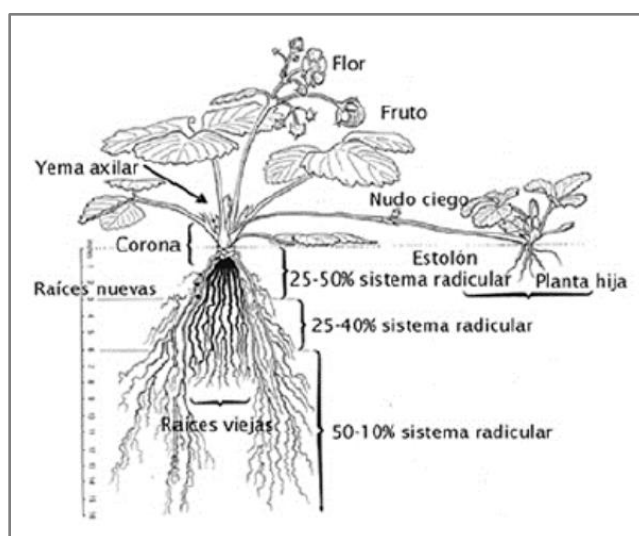


Figura 2. Representación esquemática de las partes de la planta de fresa (Miserendino, 2012).

Además, el 75% de la producción de fresas en Huelva se concentra en las inmediaciones del Parque Nacional de Doñana, un espacio natural catalogado por la UNESCO como Patrimonio de la Humanidad en 1994, Reserva de la Biosfera y Zona de Especial Protección para Aves (ZEPA), debido a su alto valor ecológico (Gavilán *et al.*, 2021). Doñana juega un papel fundamental en el mantenimiento de la biodiversidad global ya que es un espacio de gran importancia para la cría, invernada y lugar de paso de miles de aves acuáticas y terrestres migradoras (Bejarano & Torres, 2019; Paredes Losada, 2020). Por tanto, esta cercanía de las zonas de cultivo al Parque Nacional supone una preocupación por la sostenibilidad medioambiental de la producción de fresa debido a la contaminación y extracción de agua que se agrava con el paso del tiempo (Morillo, 2015).

La principal fuente de abastecimiento de agua en Huelva para la agricultura y el propio Parque Nacional de Doñana es el Acuífero Almonte-Marismas, el cual ha visto disminuidos sus niveles drásticamente, comprometiendo su buen estado y el de los ecosistemas terrestres que dependen de él (Confederación Hidrográfica del Guadalquivir, 2018; Gavilán *et al.*, 2021).

En el informe “El robo del agua en Doñana: Cinco casos de estudio” presentado por WWF España, Carmona *et al.* (2012) hacen referencia al conocimiento público que se tiene

del uso ilegal del agua subterránea del Parque Natural para el riego de cultivos, y que está recogido de forma oficial en informes y documentos desde los años 80. Este “robo del agua” tiene como consecuencia directa la pérdida de biodiversidad y la reducción de los beneficios que los servicios ecosistémicos aportan a la sociedad.

Por estos motivos se están buscando alternativas que permitan reducir el uso de fertilizantes industriales y de agua de riego, para menguar los efectos negativos que este tipo de horticultura intensiva tiene sobre el medio ambiente. Entre estas alternativas se encuentra la biofertilización, una estrategia ecológica basada en el suministro de microorganismos, capaces de interactuar a nivel rizosférico con la planta y el suelo, generando efectos beneficiosos sobre el desarrollo vegetal (Valle-Romero *et al.*, 2023).

Entre los microorganismos que tienen un efecto positivo sobre el desarrollo de las plantas están las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, de las siglas en inglés *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*). Estas han demostrado tener efectos beneficiosos sobre el crecimiento de las plantas, las enfermedades y el rendimiento del cultivo ya que son capaces de transformar elementos en nutrientes biodisponibles para la planta (fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, etc.), promover el crecimiento de raíces y ramas, controlar y suprimir enfermedades y mejorar la estructura del suelo (Alvarez *et al.*, 2018).

El presente Trabajo de Fin de Máster se enmarca dentro de un proyecto que propone el uso de PGPR en cultivos de fresa como una opción económicamente viable que ayude a reducir su impacto medioambiental (US-1262036 “Mejora de la sostenibilidad del cultivo de fresa mediante bioherramientas”). Para ello, se ha estudiado el efecto de la inoculación bacteriana sobre el perfil bioquímico de la fresa y sobre las comunidades de microorganismos del suelo al reducir un 30% la fertilización química y el riego. La hipótesis planteada es que la biofertilización bacteriana es capaz de mantener algunas de las propiedades nutricionales del fruto cuando se reducen un 30% los insumos, y que el impacto de su aplicación en las comunidades microbianas del suelo no conlleva implicaciones que desaconsejen su uso.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es evaluar el efecto de la inoculación de PGPR y la reducción de riego y fertilización química tradicional en el cultivo de fresa.

Para ello, se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Analizar la calidad nutricional en fresa en términos de producción de metabolitos secundarios y capacidad antioxidante, tras aplicar una reducción de insumos junto a biofertilizantes bacterianos.
- Estudiar la comunidad de bacterias y hongos de la rizosfera de cultivos de fresa, tras aplicar una reducción de insumos junto a biofertilizantes bacterianos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el presente Trabajo de Fin de Máster se llevaron a cabo, por un lado, ensayos en condiciones de invernadero para los análisis bioquímicos y, por otro lado, ensayos de campo para examinar las poblaciones microbianas de suelo. Ambos pasan a detallarse a continuación.

4.1 Experimento en invernadero

4.1.1 Condiciones de crecimiento de las plantas y tratamientos

Los plantones de fresa (variedad Rociera) y el suelo fueron suministrados por la empresa Agro GM S.L. (La Palma del Condado, Huelva). Los plantones se mantuvieron en una cámara a 5°C hasta su trasplante a macetas. Las macetas con suelo se colocaron en un módulo de invernadero (Servicio General de Invernadero, Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla, CITIUS II, Campus Reina Mercedes), se aplicaron 5 mL de H₂O₂ a cada una para desinfectar el suelo y se taparon con un plástico durante 24 horas. A continuación, se sembró un plantón de fresa en cada maceta y se regaron con 100 mL de solución de Hoagland. Se establecieron 2 tratamientos de fertirrigación (100% riego y fertilización NPK, 70% riego y fertilización NPK) y 3 tratamientos de biofertilización (control, inóculo 1, inóculo 2) (n=12 macetas para cada tratamiento x 6 tratamientos = 72 macetas) (**figura 3**). Se instaló un sistema de fertirrigación por goteo con 2 líneas, cada una para 36 macetas (**figura 4**).

Por otra parte, la inoculación bacteriana se realizó al inicio del experimento (noviembre) mediante riego y se repitió una vez al mes. Las fresas se recolectaron semanalmente desde enero hasta junio. El módulo del invernadero estuvo a 21-25 °C, 40-50% humedad relativa, y régimen luz/oscuridad 16/8h.

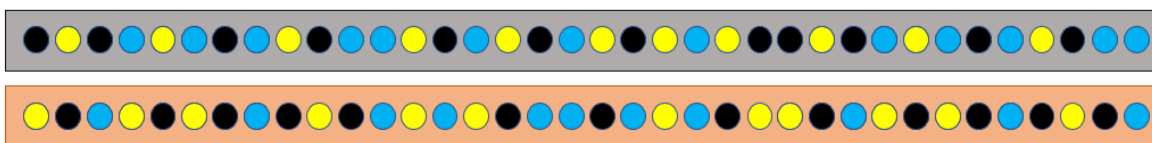


Figura 3. Esquemas de los tratamientos aplicados en el invernadero. Los rectángulos representan los tratamientos de fertirrigación (gris: 100% riego y fertilización, naranja: 70% riego y fertilización). Los círculos representan las macetas con los tratamientos de biofertilización (negro: control, amarillo: inóculo 1, azul: inóculo 2) (Modificado de García-López *et al.*, 2021).



Figura 4. Sistema de fertirrigación por goteo instalado en el invernadero (Imagen: Jesús Valentín García-López).

4.1.2 Selección de rizobacterias y diseño de inoculantes

Se diseñaron dos consorcios, inóculo 1 (I1) e inóculo 2 (I2), con cepas aisladas de la rizosfera y tejidos de cuatro especies de halófitas de las marismas de los ríos Tinto, Odiel y Piedras (Huelva, España) (**tabla 1**). Estas cepas fueron seleccionadas debido a sus propiedades promotoras del crecimiento vegetal. Además, se comprobó que podían crecer juntas y no mostraban antagonismo entre ellas.

Para preparar los dos inoculantes, las cepas se sembraron por separado en matraces con 50 mL de medio líquido TSB (*Tryptic Soya Broth*) durante 24 horas a 28°C en agitación a 200 rpm. Tras el tiempo de incubación, los cultivos se centrifugaron a 7000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante, se lavaron con solución salina estéril (NaCl) al 0,9% (p/v) y se volvió a centrifugar. Finalmente, los sedimentos se resuspendieron en agua de grifo y se mezclaron las bacterias pertinentes para preparar los consorcios.

Tabla 1. Cepas bacterianas seleccionadas para los inóculos y sus propiedad es promotoras del crecimiento vegetal. (+) actividad detectada, (-) actividad no detectada.

Inóculo	Cepa	Especie	Solubilización de fosfatos	Producción de sideróforos	Síntesis de IAA	Producción de biofilm	Síntesis de ACC desaminasa	Fijación de nitrógeno	Origen	Referencia
I1	SDT3	<i>Pseudomonas composti</i>	+	+	-	-	-	-	<i>Spartina densiflora</i> Brongn Marismas del Tinto (Huelva)	Andrades-Moreno <i>et al.</i> , 2014
	SMJ28	<i>Marinomonas spartinae</i>	+	+	+	-	+	+	<i>Spartina maritima</i> (Curtis) Marismas del Piedras (Huelva)	Mesa <i>et al.</i> , 2015b
	SMT48	<i>Priestia aryabhatai</i>	+	+	+	-	-	-	<i>Spartina maritima</i> (Curtis) Marismas del Tinto (Huelva)	Mesa <i>et al.</i> , 2015a
	RSO25	<i>Priestia aryabhatai</i>	+	+	+	-	-	+	<i>Spartina maritima</i> (Curtis) Marismas del Odiel (Huelva)	Paredes-Páliz <i>et al.</i> , 2016
	HPJ40	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	+	+	-	+	-	+	<i>Halimione portulacoides</i> (L.) Aellen Marismas del Piedras (Huelva)	Mesa <i>et al.</i> , 2019
I2	SDT3	<i>Pseudomonas composti</i>	+	+	-	-	-	-	<i>Spartina densiflora</i> Brongn Marismas del Tinto (Huelva)	Andrades-Moreno <i>et al.</i> , 2014
	SMT38	<i>Bacillus velezensis</i>	-	+	-	+	-	+	<i>Spartina maritima</i> (Curtis) Marismas el Tinto (Huelva)	Mesa <i>et al.</i> , 2015a
	SRT15	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	+	-	+	+	-	+	<i>Salicornia ramosissima</i> J. Woods Marismas del Tinto (Huelva)	Mesa <i>et al.</i> , 2019
	S110	<i>Variovorax paradoxus</i>	-	+	+	+	+	+	<i>Belgian Coordinated Collections of Microorganism</i>	-
	HPJ40	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	+	+	-	+	-	+	<i>Halimione portulacoides</i> (L.) Aellen Marismas del Piedras (Huelva)	Mesa <i>et al.</i> , 2019

4.1.3 Preparación de extractos para los análisis bioquímicos

Las fresas utilizadas para hacer los análisis bioquímicos fueron las cosechadas a mediados de marzo, una fecha clave puesto que coincide con la mitad del periodo de fructificación.

Las fresas se colectaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. Se liofilizaron y se molieron con un *TissueLyser* (Qiagen, Hilden, Alemania) hasta polvo fino. Se guardaron en tubos Falcon de 50 mL sellados con Parafilm, y estos en una bolsa “zip” con sílica gel, para proteger las muestras de la humedad.

Para la obtención del extracto vegetal se pesaron 75 mg de fresa con una balanza de precisión, se añadieron 15 mL de metanol y se agitó con vórtex. Para cada uno de los tratamientos se hicieron 3 extractos (6 tratamientos x 3 réplicas = 18 extractos). Se almacenaron en tubos Falcon de 15 mL a -20 °C durante 24h en oscuridad. Pasado ese tiempo, los extractos se filtraron con papel de filtro adaptado a un embudo para eliminar los restos sólidos, y el sobrenadante se almacenó en tubos Falcon de 15 mL limpios a -20 °C hasta su utilización. Para el análisis de antocianinas, la extracción se realizó de la misma forma, pero en metanol acidificado al 1% con HCl (37%).

4.1.4 Determinación de compuestos fenólicos totales

Los compuestos fenólicos (**figura 5**) se cuantificaron utilizando el método de Folin y Ciocalteu (Folin & Ciocalteu, 1927), con algunas modificaciones. Se trata de una prueba colorimétrica basada en una reacción a pH básico de los polifenoles del extracto vegetal con el reactivo de Folin-Ciocalteu, una mezcla de volframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico. El reactivo de color amarillo da lugar a una coloración azul cuando es reducido por los compuestos fenólicos. Esta coloración tiene un máximo de absorción a 765 nm. La intensidad del color azul es proporcional al número de grupos hidroxilo de la molécula, pudiendo así cuantificar los fenoles totales a partir de los extractos de los frutos.

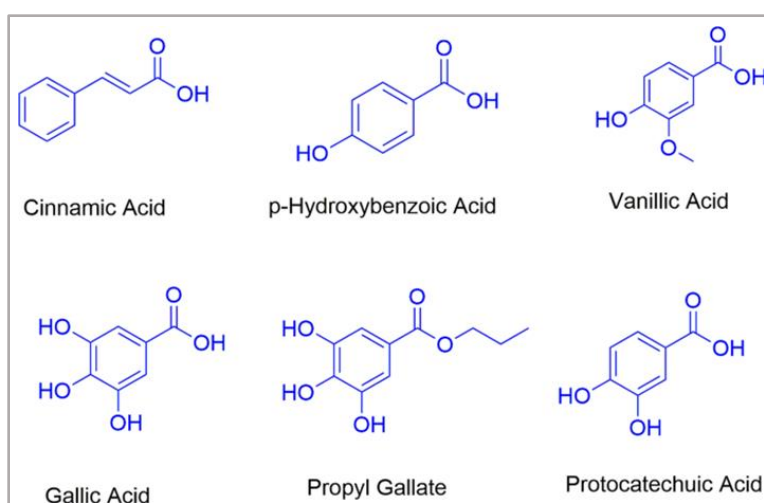


Figura 5. Estructura química de algunos polifenoles presentes en plantas (García-Pérez *et al.*, 2019).

Los polifenoles se cuantificaron en base a una recta patrón de ácido gálico en metanol, que osciló entre 20 y 100 mg L⁻¹ (**figura 6**), siguiendo el protocolo que se detalla en Redondo-Gómez *et al.* (2022). El contenido de polifenoles se expresó en miliequivalentes de ácido gálico por gamo de peso fresco de fresa. Las determinaciones se realizaron por triplicado (n = 54, 3 réplicas x 18 extractos).



Figura 6. Curva de calibración estándar de ácido gálico para la determinación de compuestos fenólicos totales de fresas siguiendo el método de Folin-Ciocalteu (Imagen: Cristina Sola Elías).

4.1.5 Determinación de flavonoides totales

Para la cuantificación de flavonoides se utilizó una técnica colorimétrica basada en la formación de complejos entre el cloruro de aluminio (AlCl_3) y los grupos hidroxilo de los flavonoides en etanol. La reacción hace que la solución adquiera una coloración amarilla, con un máximo de absorción a 420 nm. Los flavonoides son cuantificados mediante espectrofotometría en base a una recta patrón que utiliza como estándar la quercetina en metanol, por su analogía estructural básica con los flavonoides (**figura 7**). Mientras más intenso sea el tono amarillo, mayor cantidad de flavonoides hay en los extractos de fresa.

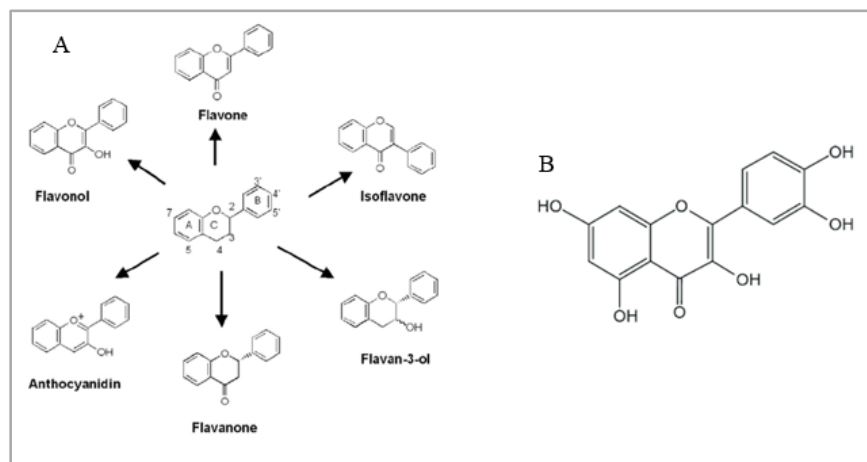


Figura 7. (A) Estructura básica de los flavonoides (Za *et al.*, 2011) y (B) de la quercetina (Zhang *et al.* 2020).

Se preparó una recta patrón de quercetina en un rango de 0,006 a 0,02 mg mL^{-1} (**figura 8**), y se siguió el protocolo detallado en Redondo-Gómez *et al.* (2022). El contenido

de flavonoides se expresó en microequivalentes de quercetina por gramo de peso fresco de fresa. Las determinaciones se realizaron por triplicado (n = 54, 3 réplicas x 18 extractos).



Figura 8. Curva de calibración estándar de quercetina para la determinación de flavonoides totales fresas mediante el uso de cloruro de aluminio (Imagen: Cristina Sola Elías).

4.1.6 Medida de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante se evaluó mediante la capacidad de los extractos de reaccionar con el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y extinguir los radicales libres. El DPPH es un radical libre que, al unirse a una sustancia que le puede donar un átomo de hidrógeno, se reduce y provoca un cambio en la coloración de la solución, de morado a amarillo (**figura 9**). Con esta técnica se puede conocer el porcentaje de inhibición de los radicales libres.

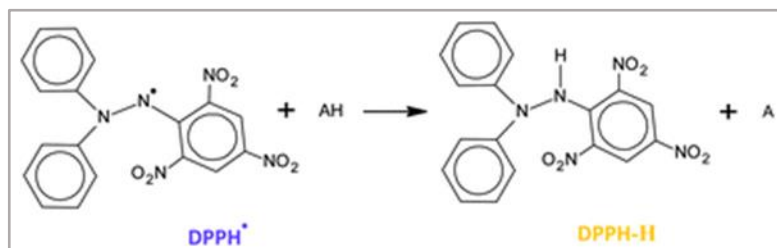


Figura 9. Estructura del DPPH y mecanismo de reducción por un antioxidante (AH) (Pyrzynska & Pękala, 2013).

Se preparó una solución de DPPH (0,05 mg/mL en metanol) y se añadió 1 mL de esta solución a los extractos y a 1 mL de metanol. Se incubó durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 515 nm. Por último, se calculó el porcentaje de inhibición siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{inhibición (\%)} = [(A_R - A_M) / A_R] \times 100$$

donde A_R representa la absorbancia de referencia (metanol + DPPH) y A_M la absorbancia de la muestra (extracto con metanol + DPPH). Las determinaciones se realizaron por triplicado ($n = 54$, 3 réplicas x 18 extractos).

4.1.7 Medida del contenido en antocianinas

Para la cuantificación de antocianinas (**figura 10**), se determinó la absorbancia del sobrenadante de los extractos a 530 nm y a 657 nm, y se calculó el contenido de antocianinas totales aplicando la fórmula:

$$\text{Antocianinas } \mu\text{g/g} = (A_{530} - 0,25 \cdot A_{657}) / M$$

Siendo A_{530} la absorbancia de los extractos a 530 nm, A_{657} la absorbancia de los extractos a 657 nm y M los gramos de material vegetal usados para la extracción. Las determinaciones se realizaron por triplicado ($n = 54$, 3 réplicas x 18 extractos).

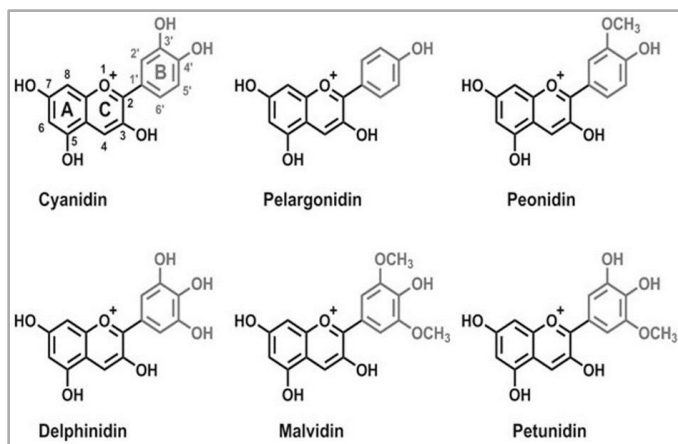


Figura 10. Estructura química de las principales antocianinas (Salehi *et al.*, 2020).

4.1.8 Análisis estadístico

El efecto de los tratamientos de inoculación bacteriana y fertirrigación sobre el contenido en metabolitos secundarios y la capacidad antioxidante total en fresa se determinó utilizando modelos lineales generalizados (GLM) mediante el software Statistica v. 10.0 (Statsoft Inc.). Se aplicó la prueba LSD post hoc para establecer diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

4.2 Experimento en finca

4.2.1 Condiciones de crecimiento de las plantas y tratamientos

Tras el primer ensayo en invernadero con dos inóculos, se procedió a realizar un experimento en campo con el inóculo I2, que ofreció mejores resultados de crecimiento y producción de fresa en invernadero (datos no mostrados). Se plantaron fresas de la variedad Rociera en una finca de AgroGM (La Palma del Condado, Huelva), en lomos bajo túneles de plástico (**figura 11**). Se aplicaron 4 tratamientos: 2 de fertirrigación (100% y 70%) y 2 de inoculación (inóculo 2 y sin inocular). Las plantas fueron inoculadas una vez al mes durante una campaña, esto es, desde octubre hasta mayo.



Figura 11. Cultivo de fresa experimental en la finca de AgroGM (Imagen: grupo Ecología Funcional Aplicada RNM036, Universidad de Sevilla).

4.2.2 Análisis metagenómico del suelo

Al final del experimento, tras la cosecha de los frutos, se recogieron muestras de rizosfera (suelo adherido a las raíces) de 5 plantas al azar por tratamiento. Una vez en el laboratorio, se mezclaron para generar un pool por tratamiento y se conservaron a -20°C hasta su procesamiento. Se extrajo el ADN total de 0,3 g de suelo (kit FastDNA® SPIN Kit for Soil, MP Biomedicals, EE.UU.), con 5 réplicas por tratamiento (4 tratamientos x 5 réplicas = 20 muestras). Las muestras de ADN se enviaron por mensajería a la empresa Novogene (Reino Unido), que llevó a cabo la secuenciación mediante Illumina HiSeq2500 y el análisis bioinformático, como se detalla en Mesa-Marín *et al.*, (2023). Se amplificaron las regiones hipervariables V3-V4 del ARNr 16S para conocer la diversidad de bacterias (341F 5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3', 806R 5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3') y la región ITS2 para la de los hongos (ITS3 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3', ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Klindworth *et al.* 2013).

5. RESULTADOS

5.1 Análisis bioquímico de frutos de fresa

El contenido de **fenoles totales** (**figura 12**) en las fresas analizadas fue significativamente diferente para los distintos tratamientos de fertirrigación e inoculación, y osciló entre los 10 y 16 meq GAL g⁻¹ peso seco de fruto, aproximadamente. Por un lado, la reducción de los insumos en las plantas sin inocular generó un aumento del 40% en el contenido de fenoles totales de los frutos. Por otro lado, el efecto de la biofertilización bacteriana fue más evidente en plantas que recibieron el 100% de fertirrigación. Tanto el I1 como el I2 provocaron en sus frutos un aumento aproximado del 50% en el contenido de fenoles totales.

En cuanto a los **flavonoides** (**figura 12**), su contenido varió entre 4 y 10 µeq Q g⁻¹ peso seco de fruto aproximadamente, y también fue significativamente diferente para los tratamientos de insumos y biofertilización. La reducción de insumos aumentó 2,16 veces el contenido de flavonoides en frutos sin inocular. La inoculación bacteriana en plantas a las que se administró un 100% de fertirrigación dio lugar a un aumento de la concentración de flavonoides de 2,24 y 2,03 veces en fresas inoculadas con I1 e I2, respectivamente. En plantas en las que se redujo un 30% la fertirrigación, el contenido de flavonoides disminuyó de forma similar para los dos tipos de inóculos, aproximadamente en un 45%.

De la misma forma, el contenido de **antocianinas** (**figura 12**) fue significativamente diferente para los distintos tratamientos de fertirrigación y biofertilización, obteniéndose valores entre 4 y 11 µg g⁻¹ peso seco de fruto, aproximadamente. La reducción de fertilización química y riego dio lugar a un aumento de la concentración de antocianinas 2,38 veces superior al control. En plantas de fresa con un 100% de insumos se observó un incremento de antocianinas para los dos inóculos. En el caso de I1, el aumento con respecto al control sin inocular fue de más del doble, y en el caso de I2 fue del 95%. En el caso de las plantas de fresa en las que se redujo el aporte de fertilizantes químicos y riego, las concentraciones de antocianinas disminuyeron para los dos tipos de inóculos. En plantas inoculadas con I1, la reducción de la concentración de antocianinas fue del 11%, y en aquellas inoculadas con I2 la reducción fue del 40%.

Por último, los frutos de fresa analizados presentaron una **actividad antioxidante** (figura 12) muy elevada, superior al 96% en todos los casos, y con diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Se observó una disminución del 2% de la actividad antioxidante del fruto al reducir el aporte de fertilizantes químicos y riego. Sin embargo, ese valor incrementó un 2,6% y un 1,88% al inocular con I1 e I2, respectivamente. En plantas de fresa con un 100% de fertirrigación e inoculadas se pudo observar una caída de aproximadamente el 0,9% de la actividad antioxidante, independientemente del inóculo.

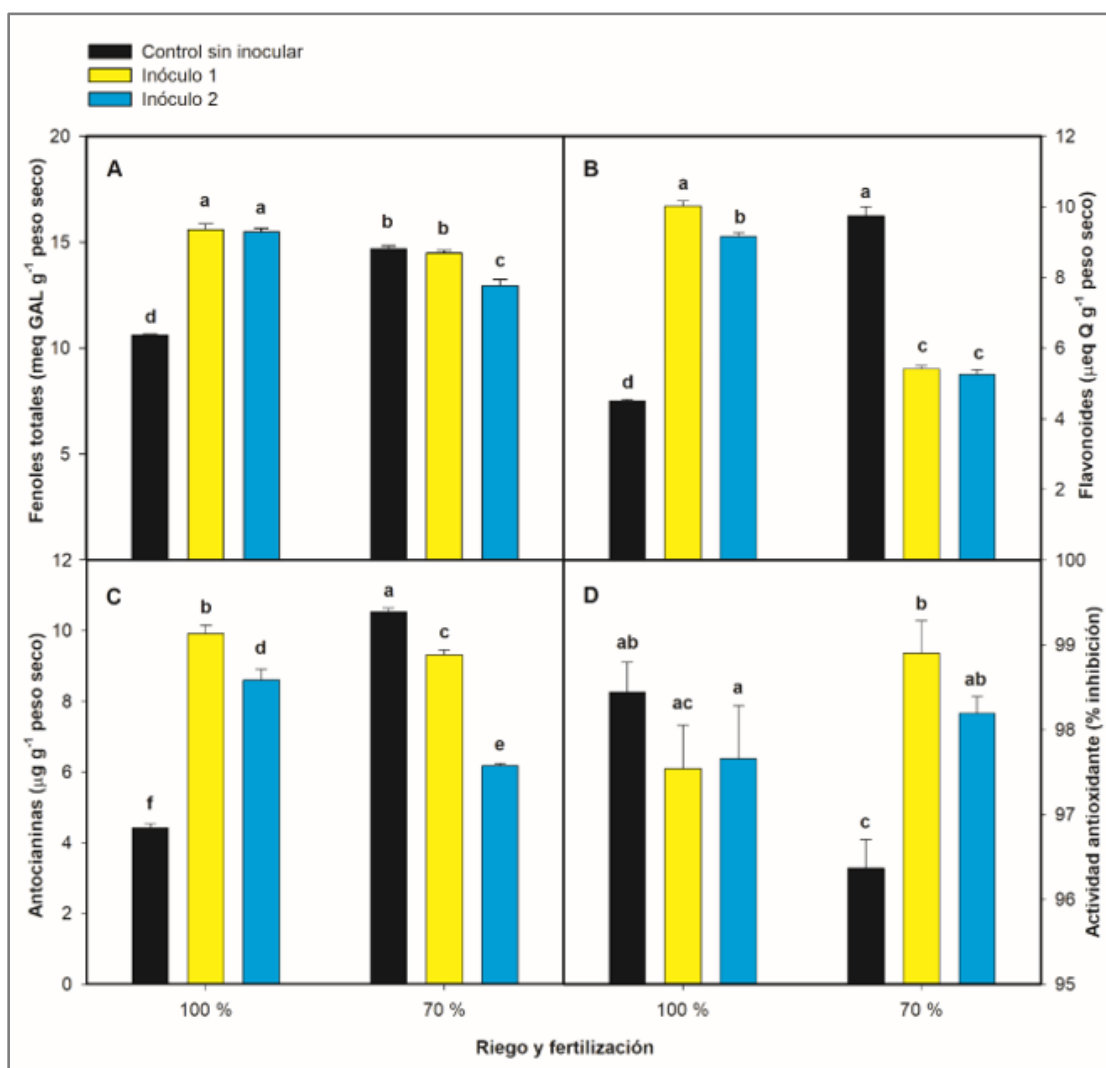


Figura 12. Concentración de fenoles totales, flavonoides y antocianinas, y capacidad antioxidante en frutos de fresa medida en plantas sometidas a tratamientos de 100% y 70% de fertirrigación y a tratamientos de biofertilización (negro: sin inocular, amarillo: inóculo 1, azul: inóculo 2). Las barras representan la media de 9 repeticiones \pm error estándar (ES).

5.2 Análisis metagenómico de rizosedimento de plantas de fresa

5.2.1 Comunidad bacteriana en rizosedimento

Como se puede observar en el gráfico de barras apiladas (**figura 13**), los dos filos de bacterias más representativos (50% del total) en los 4 tratamientos fueron Firmicutes y Proteobacteria. El primero con una abundancia relativa mayor en los suelos donde se aplicaron los tratamientos 100% fertirrigación e inoculación y 70% fertirrigación sin inocular (>25%). Las Proteobacterias estuvieron más representadas en el suelo con el tratamiento de 70% de riego y fertilización e inoculación, y su abundancia fue similar en los otros tres tratamientos.

El grupo de las Actinobacteriotas apareció representado con una abundancia aproximada del 20% en los tratamientos en los que se redujo la aplicación de insumos, mientras que en los otros dos aparecieron en menor medida.

En las muestras analizadas también se encontraron bacterias pertenecientes a los filos Acidobacteriota, Bacteroidota, Chloroflexi, y Gemmatimonadota con abundancias reducidas y muy similares en las cuatro muestras; y el filo Patescibacteria tuvo una abundancia relativa mayor en la muestra de suelo con el tratamiento 100% insumos e inoculado.

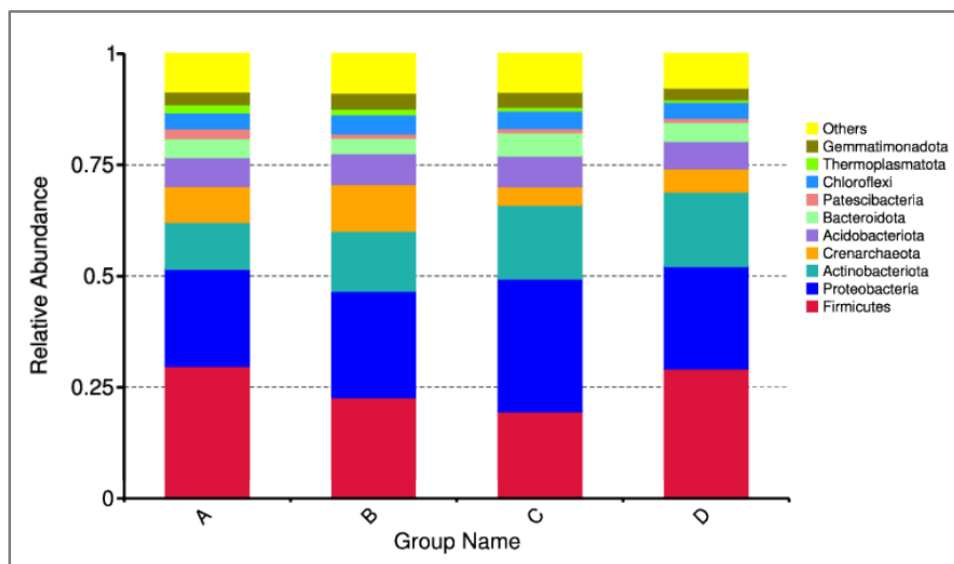


Figura 13. Gráfica de barras apiladas que representa la abundancia relativa de los 10 filos más representativos de bacterias de cada tratamiento. Los tratamientos vienen representados por las letras A (100% fertirrigación e inoculación), B (100% fertirrigación sin inocular), C (70% fertirrigación e inoculación) y D (70% fertirrigación sin inocular) (Novogene).

A nivel de género (**figura 14**) destacó notablemente el género *Bacillus*, con una mayor presencia en el tratamiento 100% insumos e inoculado.

El siguiente género más abundante en los 4 tratamientos fue *Bhargavaea*, presente principalmente en las muestras con 70% fertirrigación sin inocular y 100% fertirrigación inoculadas.

Los géneros *Nitrososphaeraceae* y *Candidatus_Nitrososphaera* fueron más abundantes en el suelo donde se aplicó el tratamiento 100% insumos sin inocular.

Bacterias pertenecientes al género *Streptomyces* tuvieron una mayor presencia en los suelos donde se aplicó un 70% de insumos, independientemente de la inoculación; y los géneros *Pseudomonas* y *Vicinamibacteraceae* aparecieron en todos los tratamientos con abundancias similares.

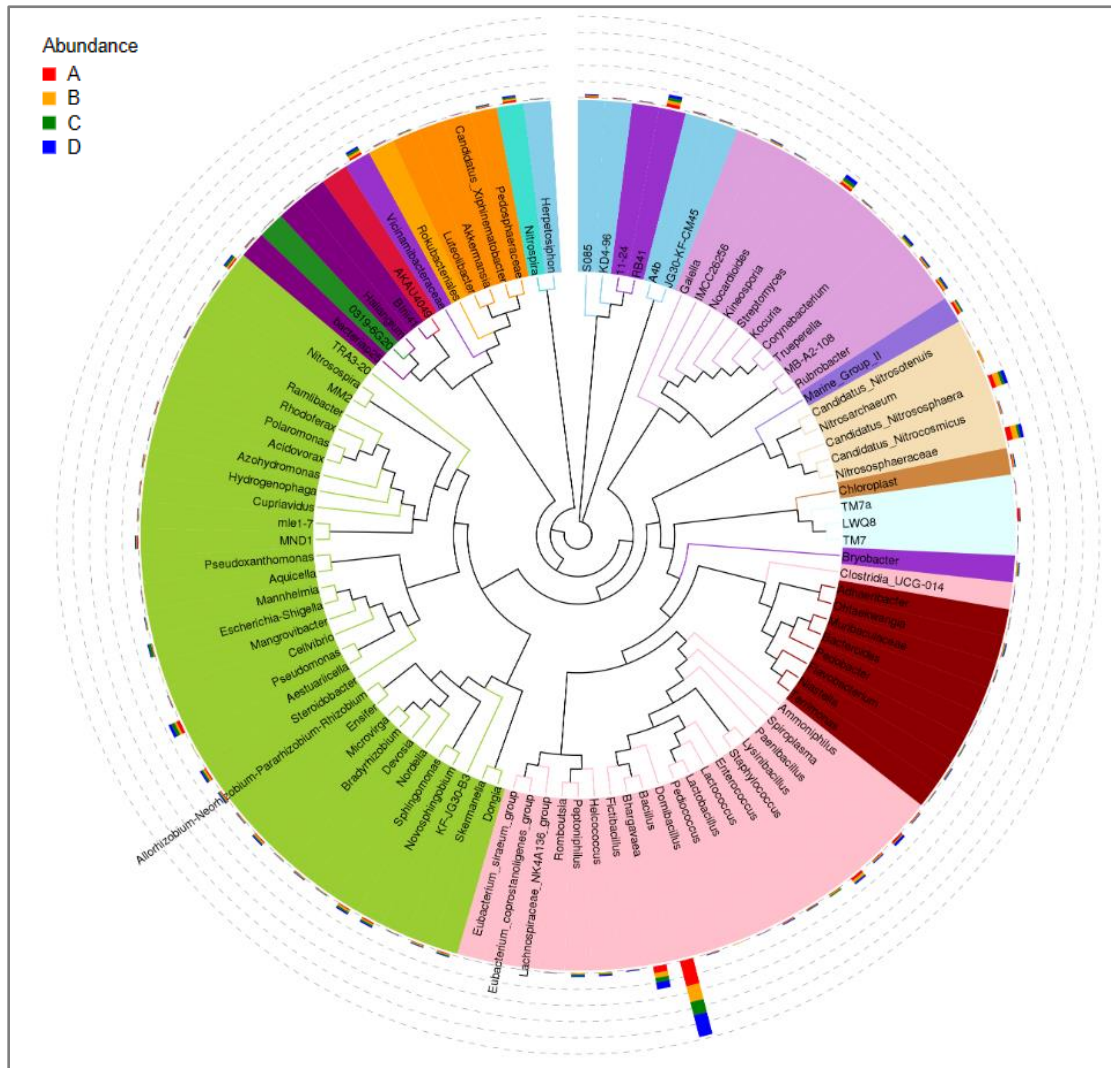


Figura 14. Árbol de los 100 géneros de bacterias más representativos y sus abundancias relativas encontrados en cada tratamiento. Los tratamientos vienen representados por las letras A (100% fertirrigación e inoculación), B (100% fertirrigación sin inocular), C (70% fertirrigación e inoculación) y D (70% fertirrigación sin inocular) (Novogene).

El análisis de coordenadas principales (PCoA) permitió reflejar las principales variaciones entre la comunidad de bacterias de las distintas muestras, teniendo en cuenta las abundancias relativas de los OTUs. Los dos ejes del PCoA explicaron hasta un 63.75 % de la variabilidad de las muestras (**figura 15**). Las muestras se agruparon principalmente en función de la fertirrigación recibida. Dentro de las muestras de suelo que han recibido los mismos insumos, la inoculación provocó más diferencia entre las comunidades bacterianas con el 70% de fertirrigación.

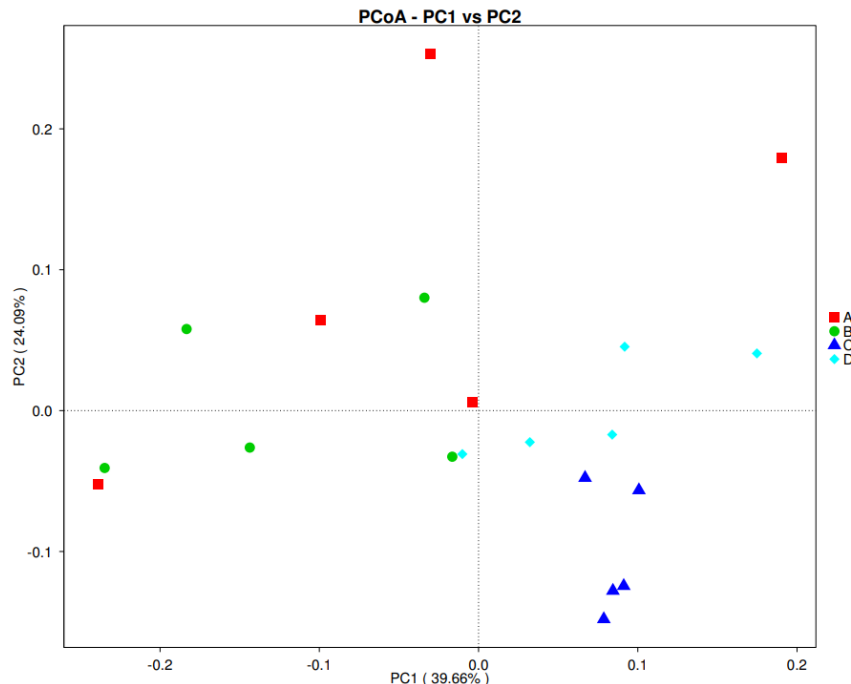


Figura 15. Análisis de coordenadas principales. Los datos representados son las réplicas de cada tratamiento. Cuanto más similar sea la composición de la comunidad bacteriana entre las muestras, más cercana será la distancia de sus puntos de datos. Los tratamientos vienen representados por las letras A (100% fertirrigación e inoculación), B (100% fertirrigación sin inocular), C (70% fertirrigación e inoculación) y D (70% fertirrigación sin inocular) (Novogene).

5.2.2 Comunidad fúngica en rizosedimento

En el gráfico de barras apiladas (**figura 16**) se puede distinguir claramente que la división de hongos más representativa en las muestras de los cuatro tratamientos fue Ascomycota, con una abundancia mínima del 65%, siendo mayor del 80% en los tratamientos con reducción de insumos. Al comparar en función de la biofertilización, los suelos a los que se aplicaron los inóculos tuvieron una abundancia menor que los que no fueron inoculados.

El segundo grupo más numeroso fue Basidiomycota, con una abundancia relativa cercana al 25% en los tratamientos con un 100% de fertirrigación. La abundancia fue menor al reducir los insumos. Únicamente en las muestras de suelo a los que se aplicó un 100% de fertirrigación, aparecen otros grupos con una representación significativa, como Olpidomycota, Chytridiomycota y Rozellomycota.

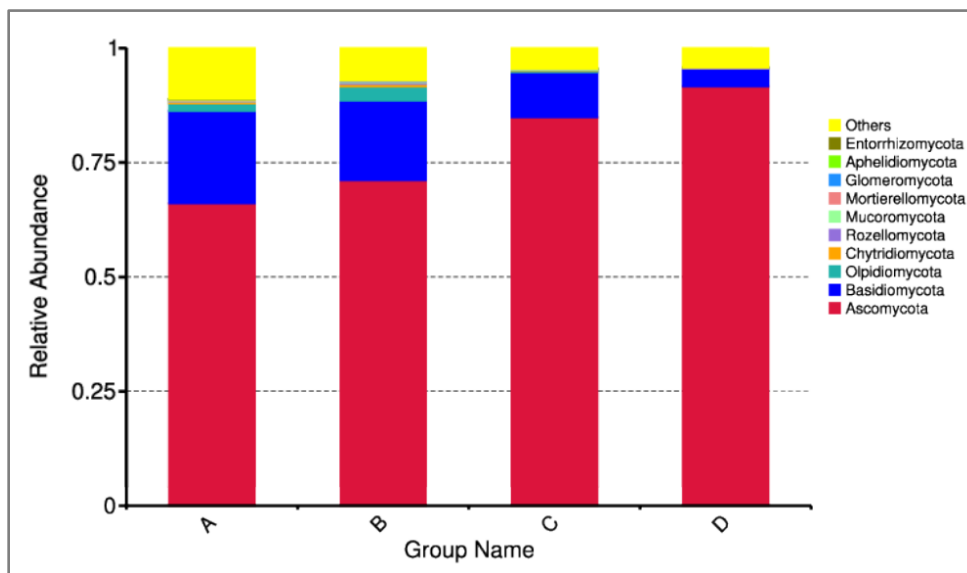


Figura 16. Gráfica de barras apiladas que representa la abundancia relativa de los 10 taxones de hongos más representativos de cada tratamiento. Los tratamientos vienen representados por las letras A (100% fertirrigación e inoculación), B (100% fertirrigación sin inocular), C (70% fertirrigación e inoculación) y D (70% fertirrigación sin inocular) (Novogene).

El árbol evolutivo (**figura 17**) muestra los géneros más representativos encontrados. El género *Mycosphaerella* fue el más abundante, principalmente en las muestras con el tratamiento 70% fertirrigación. El género *Plectosphaerella* fue el más abundante en las muestras con 70% fertirrigación e inoculadas. Los géneros *Eucasphaeria*, *Talaromyces*, *Calophoma* y *Penicillium* fueron los más abundantes en el suelo donde solo se aplicó el 70% de insumos; y *Aspergillus* fue el género más representativo en las muestras con un 100% de fertirrigación.

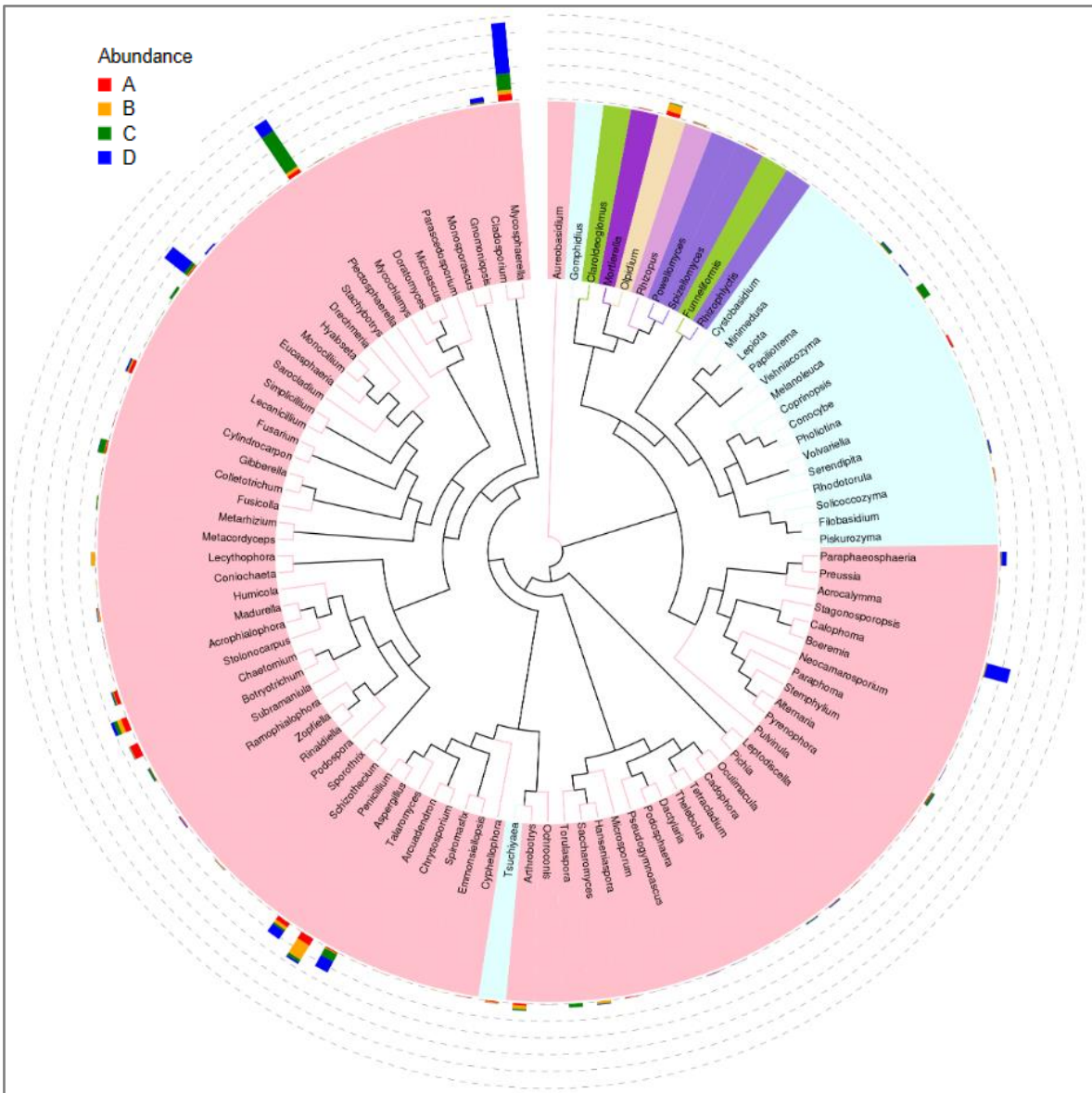


Figura 17. Árbol evolutivo de los 100 géneros principales de hongos y sus abundancias relativas en cada tratamiento. Los tratamientos vienen representados por las letras A (100% fertirrigación e inoculación), B (100% fertirrigación sin inocular), C (70% fertirrigación e inoculación) y D (70% fertirrigación sin inocular) (Novogene).

El análisis de coordenadas principales (PCoA) refleja las principales variaciones entre la comunidad de hongos de las distintas muestras, teniendo en cuenta las abundancias relativas de los OTUs. Los dos ejes del PCoA explican hasta un 68.34 % de la variabilidad de las muestras. La **figura 18** refleja que las muestras se agrupan, al igual que la comunidad bacteriana, principalmente en función de la fertirrigación recibida. De nuevo, dentro de las muestras de suelo que han recibido los mismos insumos, la inoculación ha provocado más

diferencia entre las comunidades de hongos en el caso del tratamiento con una reducción del 30% de fertirrigación

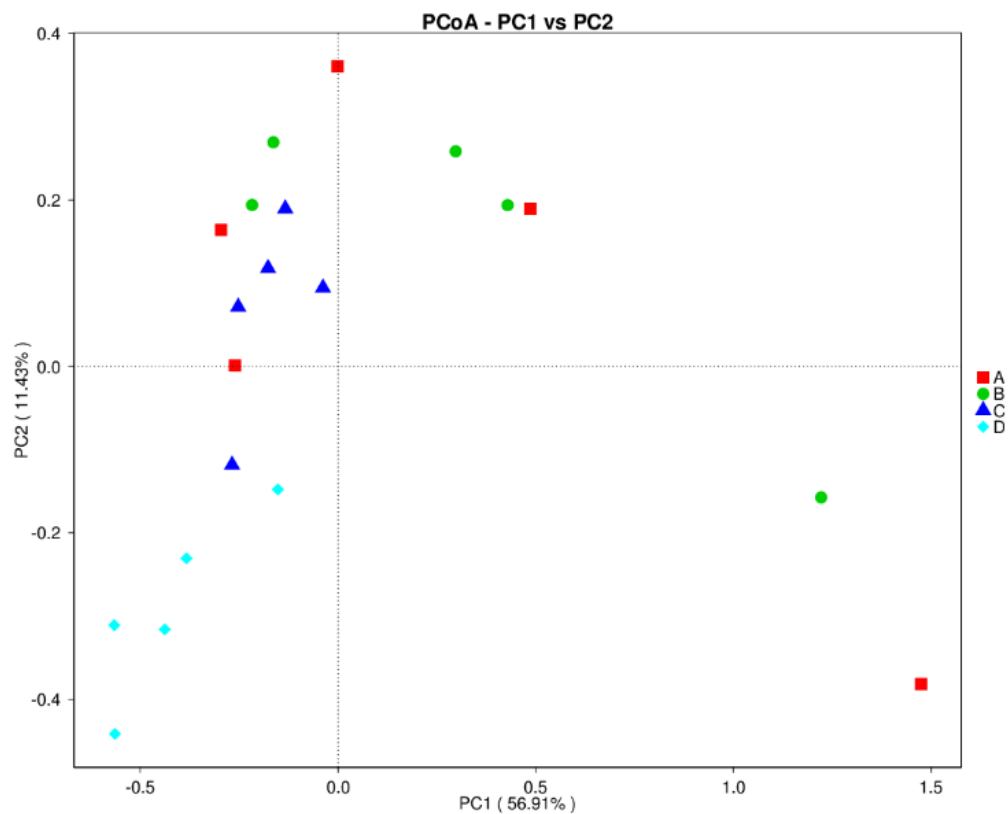


Figura 18. Análisis de coordenadas principales. Los datos representados son las réplicas de cada tratamiento. Cuanto más similar sea la composición de la comunidad bacteriana entre las muestras, más cercana será la distancia de sus puntos de datos. Los tratamientos vienen representados por las letras A (100% fertirrigación e inoculación), B (100% fertirrigación sin inocular), C (70% fertirrigación e inoculación) y D (70% fertirrigación sin inocular) (Novogene).

6. DISCUSIÓN

El primer objetivo de este trabajo fue analizar la calidad nutricional en fresa, en términos de producción de metabolitos secundarios y capacidad antioxidante, tras aplicar una reducción de insumos junto a los biofertilizantes bacterianos diseñados, I1 e I2. La fresa es un fruto rico en compuestos antioxidantes, compuestos esenciales para mantener el balance del sistema oxidativo. El desbalance en este sistema está relacionado con alrededor de 100 enfermedades, como cardiovasculares, gástricas, respiratorias, neurológicas, del sistema endocrino y cáncer (Coronado *et al.*, 2015)

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que intervienen en la interacción de la planta con su entorno, en la defensa de las infecciones producidas por microorganismos y en la tolerancia al estrés, como moléculas antioxidantes (López Mendoza, 2017; Khalil *et al.*, 2018), y su biosíntesis se ve afectada por numerosos factores, como describieron Rahimi *et al.* (2018). Nuestro estudio refleja un aumento de la concentración de fenoles totales frente a la reducción de insumos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores para *Mentha piperita* (Chiappero *et al.*, 2019), *Thymus vulgaris* (Khalil *et al.*, 2018) y varias plantas medicinales (Selmar & Kleinwächter, 2013), que demuestran que la concentración de fenoles es mayor cuanto más severa es la reducción de riego. En estos estudios, este incremento en la concentración de fenoles totales se ha relacionado con una mejora de la tolerancia al estrés por sequía. Aguilera *et al.* (2020) también obtuvieron un aumento de polifenoles en fruto de fresa tras la reducción de fertilización química, coincidiendo con nuestros resultados. Además, de forma similar a la metodología seguida por este trabajo, Chiappero *et al.* (2019) inocularon plantas de menta sometidas a distintos niveles de sequía con dos PGPR, obteniendo en todos los casos un aumento de polifenoles con respecto a los controles sin inocular. Por el contrario, los resultados obtenidos en este trabajo muestran ese aumento únicamente tras inocular en plantas regadas y fertilizadas de forma óptima (100%). Como demostraron Onofrei *et al.* (2017), el aumento de los compuestos fenólicos en condiciones de fertilización orgánica puede explicarse por la mejora de la accesibilidad de los nutrientes y de las funciones fisiológicas de la planta, que potencian algunas vías metabólicas como la síntesis de metabolitos secundarios, incluidos los

polifenoles. Esto demuestra que la inoculación o el estrés por sequía por sí solos o en sinergia son capaces de afectar al contenido de polifenoles.

Los flavonoides son un grupo de metabolitos secundarios, pertenecientes al grupo de los fenoles. Estos actúan como antioxidantes, neutralizando especies reactivas de oxígeno (ROS), confieren protección frente a la luz UV, regulan el transporte de auxinas, son responsables de la coloración de flores y frutos e intervienen en las comunicaciones biológicas de las rizosfera (Sugiyama & Yazaki, 2014). En el estudio de Asghari *et al.* (2020) la inoculación de PGPR en poleo (*Mentha pulegium sp.*) con riego normal no tuvo ningún efecto sobre estos metabolitos, mientras que sí se observó un aumento de la concentración de flavonoides cuando se sometió al cultivo a estrés por sequía moderada. Estos resultados fueron ligeramente distintos a los nuestros, ya que la inoculación en fresa con un 100% de fertirrigación dio lugar a un aumento de la concentración de flavonoides, mientras que las bacterias PGPR disminuyeron el contenido en flavonoides cuando se redujeron los insumos. Las plantas aumentan la biosíntesis de metabolitos secundarios antioxidantes en situaciones de estrés como medida de protección frente a los efectos nocivos de este (Asghari *et al.*, 2020). El aumento de flavonoides con reducción de insumos puede deberse al estrés que ello produce en la planta, y parece que la aplicación de PGPR disminuye el estrés ya que reducen la concentración de flavonoides en plantas menos regadas y fertilizadas.

En cuanto a la concentración de antocianinas, Lingua *et al.* (2013) observaron un aumento de esta en frutos de fresa inoculada con fertilización química común y reducida. Esto coincide con los resultados de nuestro estudio, y podría deberse a la reducción de aporte de nutrientes, como el nitrógeno y el fósforo, como explican Lingua *et al.* (2013). Las antocianinas son flavonoides pigmentados, almacenados en las vacuolas de las células, responsables de dar color a flores y frutos, aunque también se encuentran en hojas, tallos y raíces. Entre sus funciones se encuentran la atracción de polinizadores y la protección contra la luz UV y contra infecciones microbianas, y capacidad antioxidante (Garzón, 2008).

La actividad antioxidante, ejercida por compuestos antioxidantes enzimáticos (enzimas CAT, SOD, etc.) y no enzimáticos (como polifenoles), impide la formación de radicales libres, inhibe su acción y repara o reconstruye estructuras dañadas por estrés oxidativo (Magaña Sánchez, 2015; Khan *et al.*, 2020). En los resultados obtenidos, la

actividad antioxidante de las fresas no fue menor del 96% en ninguno de los tratamientos y los cambios derivados de los tratamientos fueron de máximo el 2,6%. Esto demuestra que la capacidad antioxidante total no se vio afectada por la reducción de insumos o la aplicación de biofertilizantes. Además, la elevada capacidad antioxidante obtenida muestra que la fresa es una fuente rica en compuestos antioxidantes. De hecho, el poder antioxidante de las fresas es 10 veces mayor que la de otras frutas estudiadas, como naranja, kiwi, mango o uva (Lingua *et al.*, 2013). El sistema antioxidante de las plantas previene de daños oxidativos en las membranas celulares y en el ADN, convirtiendo las especies reactivas de oxígeno (ROS) en formas no tóxicas, como H₂O y O₂ (Khan *et al.*, 2020). El aumento en la concentración de fenoles totales y la capacidad antioxidante en plantas como consecuencia de la biofertilización disminuye el daño oxidativo (Erdoğan *et al.*, 2016). Habría cabido esperar que la capacidad antioxidante total aumentara en los tratamientos en los que la concentración de polifenoles totales, flavonoides y antocianinas ha aumentado. Por tanto, sería interesante estudiar como varían, bajo estos tratamientos, otros sistemas que influyen en la capacidad antioxidante total, como actividades enzimáticas CAT, SOD, etc.

El segundo objetivo de este trabajo fue estudiar la comunidad de bacterias y hongos de la rizosfera de cultivos de fresa, tras aplicar una reducción de insumos junto al biofertilizante bacteriano I2. Se conoce como rizosfera la porción de suelo que se encuentra bajo la influencia de las raíces de las plantas. En esta zona, la composición microbiana puede ser diferente a la de su entorno debido a la presencia de exudados producidos por las raíces, que sirven de alimento para los microorganismos (Nadeem *et al.*, 2014).

En un estudio realizado en Québec, Canadá, por Fan *et al.* (2018) para conocer la estructura de las comunidades bacterianas asociadas a las raíces de las plantas de diferentes cultivos agronómicos (maíz, soja, colza y alfalfa), los investigadores aislaron bacterias de los filos Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria y Bacteroidetes. Los tres primeros filos aparecen también en las muestras de suelo con los cuatro tratamientos. A nivel de género, el estudio canadiense identificó *Pseudomonas* y *Bacillus* como los más representativos en las muestras, mientras que, en nuestro caso, fueron *Bacillus* y *Bhargavaea*, y en menor medida *Pseudomonas*. De igual manera, en un estudio de tesis sobre el efecto de la inoculación de *Pseudomonas fluorescens* sobre el bacterioma rizosférico del maíz (Urtis Flores, 2022)

dominaron los filos Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria y Gemmatimonadetes, entre otros, los cuales estuvieron presentes en nuestros resultados. Comparando los estudios, podemos determinar que la inoculación con PGPR no produjo cambios significativos en la estructura de comunidades bacterianas.

En 2021, Nallanchakravarthula *et al.* (2021), llevaron a cabo un estudio sobre los cambios en el microbioma fúngico de la raíz de fresa tras la aplicación de un biofumigante. Los resultados mostraron que los filos fúngicos dominantes fueron Ascomycota, Basidiomycota y Glomeromycota, con una representación del 87%, 9% y 4% respectivamente. Así mismo, Mirmajlessi *et al.* (2018), en su estudio sobre la caracterización de la estructura de comunidades fúngicas en suelos de parcelas que contenían plantas de fresa sanas y enfermas, utilizando la misma técnica empleada en nuestro trabajo, determinaron que los filos más abundantes fueron Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota y Glomeromycota, principalmente en las parcelas con fresas sanas. La destacada presencia del filo Ascomycota en ambos trabajos concuerda con los resultados obtenidos en nuestra investigación en aquellas macetas de fresa en las que se redujo un 30% la aportación de insumos, donde este filo tuvo una representación superior al 80%, siendo mayor en las macetas sin inocular.

Estos filos de hongos pertenecen al grupo de hongos micorrícicos arbusculares, los cuales presentan efectos beneficios sobre la protección frente a enfermedades producidas por patógenos, como *Fusarium*, *Verticillium* o *Rhizoctonia*, entre otros (Mirmajlessi *et al.*, 2018). Por tanto, la abundante presencia de estos hongos en fresa sometida a la reducción de fertirrigación, inoculadas o sin inocular, podría conferir una mayor protección frente a enfermedades.

7. CONCLUSIONES

A la vista de estos resultados podemos determinar que, a nivel bioquímico, por un lado, la actividad antioxidante se mantuvo, independientemente del tratamiento aplicado. Sin embargo, la inoculación bacteriana provocó un aumento de la concentración de fenoles totales, flavonoides y antocianinas en fresa con una fertirrigación óptima (100%). Por otro lado, las concentraciones de metabolitos secundarios disminuyeron y la actividad antioxidante aumentó en plantas de fresa inoculadas con una reducción del 30% de insumos. Esto sugiere que la inoculación PGPR redujo el estrés producido por la reducción de fertilización química y agua en términos de metabolitos secundarios, y pudo mantener la actividad antioxidante aumentando el funcionamiento de otros sistemas antioxidantes, como enzimas.

En cuanto a la caracterización de la estructura de las comunidades microbianas de la rizosfera, no se observaron grandes diferencias en estas a nivel de filo y de género en función de la fertirrigación y la inoculación. Sin embargo, en los hongos se pudo apreciar un aumento en la abundancia de filos pertenecientes a hongos micorrícicos arbusculares cuando las fresas fueron inoculadas y se les redujo el aporte de insumos. Estos hongos podrían mejorar la protección frente a enfermedades de origen microbiano.

Por tanto, podemos concluir que el uso de PGPR puede ser una alternativa efectiva a aplicar junto a la reducción del aporte de fertilizantes químico y agua, al menos en términos de poder antioxidante del fruto y estructura de las comunidades rizosféricas. Para confirmar la idoneidad de la estrategia sería necesario añadir a estos resultados otros complementarios, como el estado fisiológico de la planta, la composición química del suelo y, por supuesto, la producción de frutos. Con esta técnica podríamos conseguir que cultivos importantes desde el punto de vista económico y dependientes de grandes cantidades de agua y fertilizantes para su producción, como los frutos rojos, sean más sostenibles, ayudando así a la preservación del medio ambiente.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, A. F., Tereucán, G., Ercoli, S., Cornejo, P., Gomez, M. R., Uhlmann, L., Guigas, C., Esatbeyoglu, T., & Ruiz, A. (2020). Influence of Organic and Chemical Fertilisation on Antioxidant Compounds Profiles and Activities in Fruits of *Fragaria ananassa* var. Camarosa. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 20(2), 715-724. <https://doi.org/10.1007/s42729-019-00159-z>
- Alvarez, M. M. S., Tucta, F., Quispe, E., & Meza, V. (2018). Incidence of the inoculation of beneficial microorganisms in the strawberry (*Fragaria* sp.) crop. *Scientia Agropecuaria*, 9(1), 33-42. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.01.04>
- Andrades-Moreno, L., del Castillo, I., Parra, R., Doukkali, B., Redondo-Gómez, S., Pérez-Palacios, P., Caviedes, M. A., Pajuelo, E., & Rodríguez-Llorente, I. D. (2014). Prospecting metal-resistant plant-growth promoting rhizobacteria for rhizoremediation of metal contaminated estuaries using *Spartina densiflora*. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(5), 3713-3721. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2364-8>
- Ariza, M. G. F., Miranda, L. D., Gómez-Mora, J., Medina, J. P., Lozano, D., Gavilán, P., Soria, C., & Martínez-Ferri, E. (2021). Yield and Fruit Quality of Strawberry Cultivars under Different Irrigation Regimes. *Agronomy*, 11(2), 261. <https://doi.org/10.3390/agronomy11020261>
- Asghari, B., Khademian, R., & Sedaghati, B. (2020). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) confer drought resistance and stimulate biosynthesis of secondary metabolites in pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) under water shortage condition. *Scientia Horticulturae*, 263, 109-132. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109132>
- Bejarano, J. F., & Torres, A. (2019) La inalterable escasez de iniciativas agroecológicas en el paisaje agroindustrial de Doñana. *Ecología Política*, 58, 69-74.
- Carmona, J., Fuentelsaz, F., & Hernández, E. (2012). *El robo del agua en Doñana: Cinco casos de estudio*. WWF España.
- Chiappero, J., Del Rosario Cappellari, L., Alderete, L. G. S., Palermo, T. B., & Banchio, E. (2019). Plant growth promoting rhizobacteria improve the antioxidant status in *Mentha piperita* grown under drought stress leading to an enhancement of plant growth and total phenolic content. *Industrial Crops and Products*, 139, 111553. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111553>
- Confederación Hidrográfica del Guadalquivir. (2018). *Informe del Estado de los Acuíferos del Entorno de Doñana 2016/2017*; Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente de España: Madrid, Spain.
- Coronado, M., Vega y León, S., Gutiérrez, R., Vázquez, M., & Radilla, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista chilena de nutrición*, 42(2), 206-212. <https://doi.org/10.4067/s0717-75182015000200014>
- Erdoğan, Ü., Cakmakci, R., Varmazyari, A., Turan, M., Erdoğan, Y., & Kitir, N. (2016). Role of inoculation with multi-trait rhizobacteria on strawberries under water deficit stress. *Zemdirbyste-Agriculture*, 103(1), 67-76. <https://doi.org/10.13080/z-a.2016.103.009>

- Fan, D., Schwinghamer, T., & Smith, D. L. (2018). Isolation and diversity of culturable rhizobacteria associated with economically important crops and uncultivated plants in Québec, Canada. *Systematic and Applied Microbiology*, 41(6), 629-640. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.06.004>
- FAOSTAT (2022) Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics Division. Production/yield quantities of strawberries in world. (<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>) Consultado en mayo de 2023.
- Folín, O., & Ciocalteu, V. (1927). Sobre determinaciones de tirosina y triptófano en proteínas. *The Journal of Biological Chemistry*, 73, 627–650.
- García López, J.V., Flores-Duarte, N. J., Romano, E., Mesa-Marín, J., Rodríguez-Llorente, I. D., Redondo-Gómez, S., Pajuelo, E., & Mateos-Naranjo, E. (2021). Biofertilizantes: herramientas para optimizar la producción de fresa con reducciones de riego y fertilización química. *II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria (CUIISA)*, 16 y 17 de septiembre de 2021. Virtual.
- Garzón, G. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión. *Acta Biológica Colombiana*, 13(3), 27-36.
- García-Pérez, P., Losada-Barreiro, S., Gallego, P.P., & Bravo-Díaz, C. (2019). Adsorption of gallic acid, propyl gallate and polyphenols from Bryophyllum extracts on activated carbon. *Scientific Reports*, 9, 14830. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51322-6>
- Gavilán, P., Ruiz, N., Miranda, L. D., Martínez-Ferri, E., Contreras, J. I., Baeza, R. S., & Lozano, D. (2021). Improvement of Strawberry Irrigation Sustainability in Southern Spain Using FAO Methodology. *Water*, 13(6), 833. <https://doi.org/10.3390/w13060833>
- Khalil, N. M., Fekry, M. I., Bishr, M. M., El-Zalabani, S. M., & Salama, O. (2018). Foliar spraying of salicylic acid induced accumulation of phenolics, increased radical scavenging activity and modified the composition of the essential oil of water stressed *Thymus vulgaris* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 123, 65-74. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.12.007>
- Khan, N., Ali, S., Tariq, H., Latif, S., Yasmin, H., Mehmood, A., & Shahid, M. (2020). Water Conservation and Plant Survival Strategies of Rhizobacteria under Drought Stress. *Agronomy*, 10(11), 1683. <https://doi.org/10.3390/agronomy10111683>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., et al. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 41:e1. doi: 10.1093/nar/gks808
- Lingua, G., Bona, E., Manassero, P., Marsano, F., Todeschini, V., Cantamessa, S., Copetta, A., D'Agostino, G., Gamalero, E., & Berta, G. (2013). Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Plant Growth-Promoting Pseudomonads Increases Anthocyanin Concentration in Strawberry Fruits (*Fragaria x ananassa* var. Selva) in Conditions of Reduced Fertilization. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(8), 16207-16225. <https://doi.org/10.3390/ijms140816207>
- López Mendoza, S. (2017). *El frijol como fuente de compuestos fenólicos con actividad biológica y antioxidante y su variación por la inoculación con *Arthrobacter agilis* UMCV2* [Tesis de maestría, Instituto de Investigaciones Químico biológicas] Repositorio UMSNH. http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/3939

- Magaña Sánchez, M. M. (2015). *Efecto de Bacillus subtilis sobre el rendimiento, desarrollo y propiedades nutraceuticas de fresa* [Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional] Repositorio Dspace. <https://tesis.ipn.mx/handle/123456789/22298>
- Mesa, J., Mateos-Naranjo, E., Caviedes, M., Redondo-Gómez, S., Pajuelo, E., & Rodríguez-Llorente, I. (2015a). Scouting contaminated estuaries: Heavy metal resistant and plant growth promoting rhizobacteria in the native metal rhizoaccumulator *Spartina maritima*. *Marine Pollution Bulletin*, 90(1-2), 150-159. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.11.002>
- Mesa, J., Mateos-Naranjo, E., Caviedes, M. A., Redondo-Gómez, S., Pajuelo, E., & Rodríguez-Llorente, I. D. (2015b). Endophytic Cultivable Bacteria of the Metal Bioaccumulator *Spartina maritima* Improve Plant Growth but Not Metal Uptake in Polluted Marshes Soils. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01450>
- Mesa-Marín, J., Pérez-Romero, J. A., Mateos-Naranjo, E., Bernabeu-Meana, M., Pajuelo, E., Rodríguez-Llorente, I. D., & Redondo-Gómez, S. (2019). Effect of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on *Salicornia ramosissima* Seed Germination under Salinity, CO₂ and Temperature Stress. *Agronomy*, 9(10), 655. <https://doi.org/10.3390/agronomy9100655>
- Mesa-Marín, J., Marcos, M.S., Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gómez, S., & Idaszkin, Y.L. (2023). Heavy metal pollution and dominant halophyte vegetation as structuring factors in soil prokaryotic communities in a Patagonian salt marsh. Manuscrito en preparación.
- Mirmajlessi, S. M., Bahram, M., Mänd, M., Najdabbasi, N., Mansouripour, S. M., & Loit, E. (2018). Survey of Soil Fungal Communities in Strawberry Fields by Illumina Amplicon Sequencing. *Eurasian Soil Science*, 51(6), 682-691. <https://doi.org/10.1134/s106422931806011x>
- Miserendino, E. (2012). *FRUTILLAS: Implantación del cultivo en Patagonia*. Estación Experimental Agropecuaria Alto Valle Centro Regional Patagonia Norte. Publicaciones Regionales INTA.
- Morillo, J. G. (2015). Reducing Irrigation Inefficiencies in Water-Intensive Cropping: Evidence from Strawberry Production in South-West Spain. *Outlook on Agriculture*. <https://doi.org/10.5367/oa.2015.0204>
- Nadeem, S. M., Ahmad, M., Zahir, Z. A., Javaid, A., & Ashraf, M. (2014). The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology Advances*, 32(2), 429-448. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.12.005>
- Nallanchakravarthula, S., Marupakula, S., Alström, S., Finlay, R. D., & Mahmood, S. (2021). Changes in the root fungal microbiome of strawberry following application of residues of the biofumigant oilseed radish. *Applied Soil Ecology*, 168, 104116. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104116>
- Nishiumi, S., Miyamoto, S., Kawabata, K., Ohnishi, K., Mukai, R., Murakami, A., Ashida, H., & Terao, J. (2011). Dietary flavonoids as cancer-preventive and therapeutic biofactors. *Frontiers in bioscience*, 3, 1332-62
- Observatorio de Precios y Mercados de Andalucía (2022) (<https://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/observatorio/servlet/FrontController?action=RecordContent&table=11113&element=3729813&subsector=19&>) Consultado en mayo de 2023.

- Onofrei, V., Teliban, G., Burducea, M., Lobiuc, A., Sandu, C. B., Tocai, M., & Robu, T. (2017). Organic foliar fertilization increases polyphenol content of *Calendula officinalis* L. *Industrial Crops and Products*, 109, 509-513. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.055>
- Paredes Losada, I. (2020). *Presiones antrópicas y eutrofización en la marisma de Doñana y sus cuencas cercanas* [Tesis doctoral, Universidad de Sevilla]. Depósito de investigación de la Universidad de Sevilla. <https://idus.us.es/handle/11441/97501>
- Paredes-Páliz, K. I., Caviades, M. A., Doukkali, B., Mateos-Naranjo, E., Rodríguez-Llorente, I. D. & Pajuelo, E. (2016). Screening beneficial rhizobacteria from *Spartina maritima* for phytoremediation of metal polluted salt marshes: comparison of gram-positive and gram-negative strains. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(19): 19825-37. doi:10.1007/s11356-016-7184-1
- Pyrzynska, K., & Pełkala, A. (2013). Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analytical. Methods*, 5, 4288-4295. DOI: <https://doi.org/10.1039/C3AY40367J>
- Rahimi, Y. G., Taleei, A., & Ranjbar, M. (2018). Long-term water deficit modulates antioxidant capacity of peppermint (*Mentha piperita* L.). *Scientia Horticulturae*, 237, 36-43. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.04.004>
- Redondo-Gómez, S., Romano-Rodríguez, E., Mesa-Marín, J., Sola-Elías, C., & Mateos-Naranjo, E. (2022). Consortia of Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria Isolated from Halophytes Improve the Response of Swiss Chard to Soil Salinization. *Agronomy*, 12(2), 468. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020468>
- Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Cappellini, F., Reiner, Ž., Zorzan, D., Imran, M., Sener, B., Kilic, M., El-Shazly, M., Fahmy, N.M., Al-Sayed, E., Martorell, M., Tonelli, C., Petroni, K., Docea, A.O., Calina, D., & Maroyi, A. (2020). The Therapeutic Potential of Anthocyanins: Current Approaches Based on Their Molecular Mechanism of Action. *Frontiers in Pharmacology*. 11:1300. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01300>
- Selmar, D., & Kleinwächter, M. (2013). Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 42, 558-566. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.020>
- Sugiyama, A., & Yazaki, K. (2014). Flavonoids in plant rhizospheres: secretion, fate and their effects on biological communication. *Plant Biotechnology*, 31(5), 431-443. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.14.0917a>
- Urtis Flores, C. A. (2022). *Efecto de la inoculación de Pseudomonas fluorescens UM270 sobre el bacterioma rizosférico de maíz (Zea mays L.) en diferentes tipos de suelo* [Tesis de maestría, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas] Repositorio UMSNH. http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/bitstream/handle/DGB_UMICH/6755/II_QB-M-2022-0513.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Valencia, R. D. H., Maldonado, A., Hernández, A. Q., Lozano-Cavazos, C. J., González, A. H., & Fuentes, J. M. (2022). Influence of organic fertilizers and silicon on the physiology, yield, and nutraceutical quality of the strawberry crop. *Nova Scientia*, 14(28). <https://doi.org/10.21640/ns.v14i28.3032>

- Valle-Romero, P., García-López, J., Redondo-Gómez, S., Flores-Duarte, N. J., Rodríguez-Llorente, I. D., Idaszkin, Y. L., Pajuelo, E., & Mateos-Naranjo, E. (2023). Biofertilization with PGP Bacteria Improve Strawberry Plant Performance under Sub-Optimum Phosphorus Fertilization. *Agronomy*, 13(2), 335. <https://doi.org/10.3390/agronomy13020335>
- Zhang, Y., Zhang, Z., & Wang, R. (2020). Protective Mechanisms of Quercetin Against Myocardial Ischemia Reperfusion Injury. *Frontiers in Physiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00956>