



2025 | 16-20
GIJÓN | JUNIO
9º CONGRESO **FORESTAL** ESPAÑOL

9CFE-1764

Actas del Noveno Congreso Forestal Español
Edita: **Sociedad Española de Ciencias Forestales. 2025.**
ISBN: **978-84-941695-7-1**

Organiza





Aplicación de biofertilizantes comerciales como estrategia para la reducción de la fertilización mineral fosfatada en la producción de *Eucalyptus globulus* Labill.

ALVARENGA, P. (1), ESQUÍVEL, G. (1), RIBEIRO, H. (1), PEREIRA, M. (1), FLEUROT, E. (1), BRAGUÊS, M. (1), NOGALES, A. (2) y MOTA, M. (3)

(1) LEAF - Linking Landscape, Environment, Agriculture and Food Research Center, Associated Laboratory TERRA, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

(2).Sustainable Plant Protection Program, IRTA-Institute of Agrifood Research and Technology.Ctra.Cabrils km. 2, E-08348 Cabrils, Barcelona, Spain

(3) Hubel Verde SA., Parque Hubel, Bela Curral, Pechão 8700-179 Olhão, Portugal

Resumen

En Portugal, el eucalipto desempeña un papel fundamental en el sector forestal, principalmente en la producción de pasta y papel. Sin embargo, es necesario explorar alternativas sostenibles que contribuyan a preservar la fertilidad y biodiversidad del suelo sin comprometer la productividad. En este contexto, se llevó a cabo un ensayo para evaluar el uso de biofertilizantes como estrategia para reducir la dependencia de fertilizantes minerales. Se inocularon eucaliptos con dos inóculos comerciales: de *Glomus iranicum* (hongo micorrízico) y de bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico, en condiciones de fertilización diferenciada de P (100, 70 y 40% de la fertilización de referencia), y se analizaron parámetros fisiológicos y nutricionales de la planta y el suelo. Al final del experimento se observó que las dosis reducidas de fertilización fosfatada (70 % y 40 %) no daban lugar a pérdidas significativas en la productividad del eucalipto. Aunque todas las plantas presentaron colonización micorrízica, incluso las no inoculadas con *G. iranicum*, la tasa de colonización fue mayor bajo condiciones de mayor limitación nutricional, lo que pone de manifiesto la existencia de una comunidad micorrízica nativa funcional en estos suelos. Estos resultados sugieren que es posible reducir la fertilización mineral fosfatada en este tipo de suelos sin comprometer la productividad, lo que representa una alternativa sostenible para el manejo forestal.

Palabras clave

Hongo formador de micorrizas arbusculares (HMA), *Glomus iranicum*, bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPB), eucalipto, fósforo.

1. Introducción

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) son microorganismos que habitan en casi todos los suelos, incluidos los suelos forestales y agroecosistemas (Muhammad et al., 2025). Estos organismos forman simbiosis mutualistas con las raíces de las plantas, ayudándolas a incrementar la absorción de nutrientes y agua, el crecimiento y la tolerancia al estrés a través de diversos mecanismos, tanto directos como indirectos (Smith & Read, 2008; Backer et al., 2018). Por este motivo, algunas especies con efectos científicamente comprobados se encuentran



disponibles en el mercado como biofertilizantes (Backer et al., 2018; Ribeiro, 2021).

La legislación aplicable a los fertilizantes en Portugal (Decreto-Ley N° 30/2022 y Portaria N° 185/2022) se basa en la Directiva Europea sobre Fertilizantes más reciente (Reglamento (UE) 2019/1009), la cual integra su uso y establece claramente los tipos de productos que pueden clasificarse como biofertilizantes. Según esta normativa, un biofertilizante es "un producto cuyo principio activo sean microorganismos vivos, (...) que favorezcan la nutrición y/o el desarrollo de las plantas, sin afectar la diversidad biológica del suelo y del ambiente". De hecho, existe una amplia diversidad de microorganismos que pueden ser utilizados como biofertilizantes, pero la legislación mencionada solo contempla productos basados en: (i) bacterias fijadoras de nitrógeno, (ii) bacterias solubilizadoras de fosfato y (iii) hongos micorrícicos (Portaria N° 185/2022).

El eucalipto es un árbol ampliamente establecido en Portugal, siendo predominante la especie *Eucalyptus globulus* Labill., utilizada principalmente para la producción de madera destinada a la industria de pasta y papel (Reboredo & Pais, 2014; Malico & Gonçalves, 2021). Los bosques de eucaliptos se gestionan bajo un régimen de monte bajo (con rotaciones de 10-12 años), ocupando actualmente más de 844 mil hectáreas en el territorio continental, con rendimientos anuales de madera que varían entre 6 y 40 m³ ha⁻¹, dependiendo de las condiciones edafoclimáticas locales (ICNF, 2015; Reboredo et al., 2021). Según el 6º Inventario Forestal Nacional (ICNF, 2015), la superficie ocupada por eucaliptales representa aproximadamente el 26 % del área forestal del territorio continental, lo que refleja un incremento sistemático de la superficie ocupada a lo largo de los últimos 50 años.

Aunque en el sector agrícola el uso de biofertilizantes ya es una práctica común (O'Callaghan et al., 2022), en el sector forestal su aplicación sigue siendo limitada. Sin embargo, los retos que enfrenta el sector forestal, particularmente en la producción de eucalipto, son similares a los de la agricultura: reducir el uso de fertilizantes y productos fitosanitarios de síntesis, preservar la fertilidad y la biodiversidad del suelo, incrementar la productividad y disminuir el estrés biótico y abiótico al que están expuestos los eucaliptos (Tomé et al., 2021). En este contexto, resulta de gran interés evaluar las contribuciones que la aplicación de biofertilizantes puede aportar al sector forestal nacional.

2. Objetivos

En este contexto, surge el proyecto "Bioma Suelo: mejorar la relación suelo-planta", cuyo objetivo es evaluar el uso de biofertilizantes comerciales distribuidos por Hubel Verde, evaluando su influencia en el crecimiento del eucalipto, en un ambiente controlado (vivero). Estos incluyen uno basado en un HMA (*Glomus iranicum* var. *tenuihypharum*) y otro en dos bacterias solubilizadoras de fosfato del género *Pseudomonas*, aplicados de forma individual y conjunta, con el fin de reducir el uso de fertilizantes minerales en el sector forestal.

La hipótesis de partida establece que la inoculación conjunta de estos organismos potenciará sus efectos beneficiosos sobre la planta, en este caso *Eucalyptus globulus*, permitiendo una reducción de la fertilización mineral de P sin pérdidas en la productividad de biomasa y sin impactos negativos en sus parámetros fisiológicos.



3. Metodología

Características del suelo y materiales biológicos

El experimento se llevó a cabo en macetas en el Invernadero de Química Agrícola del Instituto Superior de Agronomía de la Universidad de Lisboa. Para llevar a cabo el experimento, se seleccionó un suelo natural, sin antecedentes de uso en la producción forestal. En concreto, se eligió un suelo con bajo contenido en P ($<10 \text{ mg kg}^{-1}$, en P_2O_5 extraíble, Egner-Rhiem), recolectado en la región de Pegões, Portugal (Concelho de Montijo; $38^\circ 39' 22.9'' \text{N}$ $8^\circ 35' 37.3'' \text{W}$) de la capa superficial ($\sim 0\text{-}50 \text{ cm}$). Se trata de un suelo de textura gruesa (arenosa), ligeramente ácido ($\text{pH} = 5.7$; relación suelo:agua $1:2.5 \text{ m/v}$), no salino (conductividad eléctrica = 0.02 mS cm^{-1} ; relación suelo:agua $1:2 \text{ m/v}$), con bajo contenido en materia orgánica (0.28% , m/m) y bajo contenido en otros nutrientes, como potasio (19 mg kg^{-1} , en K_2O extraíble, Egner-Rhiem).

En cuanto a los biofertilizantes comerciales, se utilizó un inóculo biológico basado en un HMA (*Glomus iranicum* var. *tenuihypharum*; nombre comercial: MycoUp®, marca Symborg), formulado en un sustrato mineral arcilloso, con 1.2×10^4 propágulos/100 mL, y un otro basado en bacterias solubilizadoras de fosfato (*Pseudomonas putida* 10^8 u.f.c./mL y *Pseudomonas fluorescens* 10^8 u.f.c./mL ; u.f.c.: unidades formadoras de colonias; nombre comercial: Natiphos®, marca HUBEL).

Diseño experimental

El experimento se llevó a cabo en dos fases. En la primera, se plantaron eucaliptos jóvenes en macetas de 3.5 L bajo condiciones controladas dentro del invernadero. En la segunda fase, se trasplantaron las plantas a macetas de mayor volumen (50 L), y se mantuvieron en el exterior, en condiciones semicontroladas.

En la primera fase, las plantas jóvenes de eucalipto, proporcionadas por los Viveros Aliança (clone G1202), se instalaron en macetas de 3.5 L de capacidad, utilizando el suelo mencionado anteriormente. Durante el trasplante, que tuvo lugar el 16 de febrero de 2023, se inocularon 12 plantas con *G. iranicum* (Gi), 12 plantas con *P. putida* y *P. fluorescens* (Pp), y otras 12 plantas fueron inoculadas con ambos inóculos (GiPp). La aplicación de *G. iranicum* se hizo preparando una suspensión de MycoUp® en agua, y aplicando un volumen de suspensión calculado de forma que se suministraran 2 g de inóculo por planta. La aplicación de *P. putida* y *P. fluorescens* se realizó aplicando 4 mL de inóculo Natiphos® por planta, previamente diluido en agua desionizada. Se utilizaron otras 12 plantas como control, no inoculadas (Cont).

Las plantas se mantuvieron a un 70 % de la capacidad de retención de agua del suelo durante todo el experimento. Para asegurar que el nivel de humedad en el suelo permaneciera constante, las plantas se regaban ajustando la cantidad de agua en función del peso de las macetas, lo cual permitía controlar la humedad del sustrato de manera precisa.

Una semana después del trasplante y la inoculación, las plantas fueron fertilizadas con la misma dosis de N y K, y con dosis diferenciadas de P (100 %, 70 % y 40 % de la dosis habitual de P, por vía mineral, considerando las características del suelo, pobre en P). Para ello, todas las plantas recibieron 47,14 g de un fertilizante de liberación controlada (N:P:K 14:11:9), siendo ésta la dosis más baja de P suministrada (40 % de P; 5,2 g P_2O_5 /planta). En los tratamientos con dosis superiores de P (70 % y 100 %), la suplementación se realizó mediante la aplicación de superfosfato al 18 % en fertilización de fondo (3.9 y 7.8 g P_2O_5 /planta,



respectivamente, para los tratamientos del 70 % y 100 %).

Transcurridas 7 semanas desde el inicio del ensayo, comenzó la segunda fase del estudio, en la cual las plantas fueron trasplantadas a macetas de 50 L de capacidad, utilizando el mismo tipo de suelo, y se colocaron al aire libre en un ambiente semi-controlado, es decir, sin protección frente a la precipitación, temperatura y luminosidad, pero con riego ocasional cuando fue necesario. El riego se mantuvo sin control de peso, pero suministrando la misma cantidad de agua por planta en cada riego. El ensayo se prolongó durante 31 semanas.

Parámetros fisiológicos y de crecimiento de las plantas

Periódicamente, se registraron varios parámetros fisiológicos de la planta, como el índice relativo de clorofila, medido con el sensor CL-01 Chlorophyll Meter de Hansatech Instruments Ltd, el índice fotoquímico de reflectancia (PRI) y el índice de diferencia normalizada de la vegetación (NDVI), medidos con los sensores PlantPen PRI 200 y PlantPEN NDVI 300, respectivamente, y la conductancia estomática (gs ; en $mol\ m^{-2}\ s^{-1}$), determinado inicialmente con un analizador de gases por absorción de radiación infrarroja (CIRAS-3- PP_systems, USA) y, posteriormente, un LI-COR 600. Los tres índices, de clorofila, NDVI y PRI, son adimensionales.

Al finalizar del experimento, las plantas fueron recolectadas y separadas en diferentes partes: tronco, ramas, hojas y raíces. Se registró el peso de la biomasa fresca y seca (tras 48 h de secado a $60^{\circ}C$) de cada parte, y finalmente la biomasa seca total de la parte aérea se determinó mediante su suma.

Análisis de suelo y foliares

El fósforo (P) extraíble del suelo, expresado como P_2O_5 (m/kg), se determinó mediante el método de extracción con lactato de amonio-ácido acético (procedimiento de Egner-Riehm), y se cuantificó en la solución de extracción mediante espectrometría de emisión óptica, con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES), utilizando un espectrómetro ICP 7000, serie iCAP 7000, Thermo Fisher Scientific.

Tras la cosecha, las hojas de eucalipto secas a $60^{\circ}C$ se molieron para analizar los nutrientes foliares, tras su digestión con agua regia, una metodología adaptada de la norma europea EN 13650 (CEN, 2001a). La concentración total de P en las hojas se cuantificó mediante espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES), utilizando un espectrómetro ICP serie iCAP 7000, Thermo Fisher Scientific, tendo sido expresado en mg/kg de peso seco a $105^{\circ}C$.

Colonización micorrízica

Al final del ensayo, se estimó la colonización micorrízica, para lo cual 1 g de raíz fina de cada planta se clarificó en KOH 10 % y H_2O_2 , se acidificó con HCl 1 % y se tiñó con azul de tripán 0,05 % (Phillips & Hayman, 1970). Se utilizó el método de intersección de líneas de cuadrícula (Giovannetti & Mosse, 1980) para determinar el porcentaje de raíces colonizadas por los HMA. Se realizaron 100 observaciones por planta y por tratamiento.

Tratamiento estadístico de los resultados

Los resultados fueron analizados mediante estadística descriptiva (cálculo de la media y desviación estándar). Se verificó la homogeneidad de la varianza y la normalidad de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. En los casos correspondientes, los datos fueron sometidos a un análisis Factorial ANOVA con

tres factores, para evaluar el efecto de los factores principales (1 - Inoculación con *G. iranicum*(Gi), 2 - inoculación con *Pseudomonas* (PP), y 3 - dosis de fertilización fosfatada) y su interacción. Los datos que no cumplían con los supuestos del ANOVA fueron analizados con un enfoque no paramétrico utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, basada en el análisis de rangos. En los casos en los que se observó un efecto significativo de los factores o de su interacción ($p \leq 0.05$), se utilizó la prueba de Tukey HSD para identificar las diferencias entre las medias ($p < 0.05$). El tratamiento estadístico de los resultados se realizó con el software STATISTICA 7.0 (Software™ Inc., PA, EE. UU., 2004).

4. Resultados

Al final del ensayo (31 semanas después de la inoculación), se observó una ligera tendencia a la reducción de la biomasa total de la parte aérea del eucalipto (hojas, ramas y tronco) cuando la fertilización fosfatada se redujo al 70 % y 40 % de la dosis de referencia. Las diferencias fueron estadísticamente más evidentes para la biomasa total de la parte aérea (Table 1), que mostró una influencia significativa de la fertilización fosfatada (ANOVA factorial de tres factores, $p < 0.001$). En un análisis más detallado de los resultados de la biomasa aérea del eucalipto (Figura 1), se observó que el efecto significativo de la aplicación de diferentes dosis de P tan solo era significativo en las plantas inoculadas con *Pseudomonas*, donde las plantas que llevaron un 100% de la fertilización de P tuvieron una biomasa aérea significativamente mayor que las plantas con 40% de fertilización de P.

Tabla 1. Resumen del análisis ANOVA factorial para los efectos de los factores "Gi", "Pp" y "Fertilización", así como de sus interacciones, en la biomasa seca de plantas de eucalipto al final del ensayo (hojas, ramas, tronco, y total de biomasa aérea) y en la colonización micorrícica por HMA (n = 4) Gi:G. iranicum; Pp:Pseudomonas; Significativo con: *** $P \leq 0,001$; ** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$; ns: no significativo.

Valor de F				
Hojas	Ramas	Tronco	Biomasa aérea	Colonización micorrícica
Factores principales				
0.068 ns	0.272 ns	1.187 ns	1.43 ns	1.765 ns
1.134 ns	0.208 ns	0.777 ns	2.60 ns	4.661 *
4.718 *	4.125 *	2.886 ns	12.82 ***	3.744 *
Interacciones				
2.936 ns	0.307 ns	2.476 ns	0.07 ns	4.661 *
1.665 ns	0.726 ns	0.261 ns	1.80 ns	1.481 ns
0.248 ns	2.335 ns	0.500 ns	1.82 ns	3.125 ns
1.986 ns	0.557 ns	2.816 ns	2.70 ns	2.122 ns

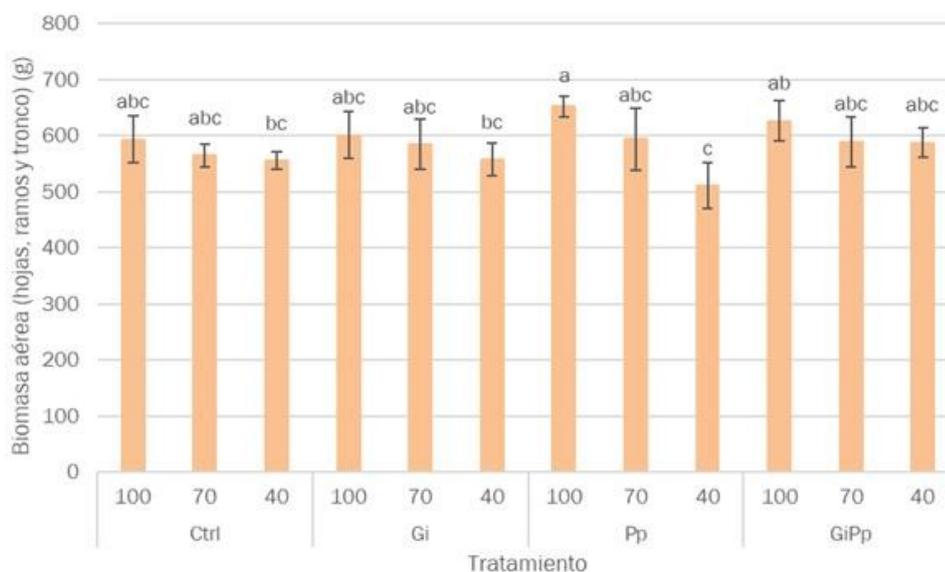


Figura 1. Resultados obtenidos para la biomasa seca total de la parte aérea del eucalipto (hojas, ramas y tronco) al final del ensayo (media \pm desviación estándar, $n = 4$). Las columnas marcadas con la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí (prueba de Tukey, $p > 0.05$). Ctrl: control; Gi: *G. iranicum*; Pp: *Pseudomonas*; GiPp: inoculación con *G. iranicum* y *Pseudomonas*.

En relación con los resultados obtenidos para los índices de vegetación analizados (índice relativo de clorofila, NDVI y PRI; Tabla 2), se observó que el único factor significativo fue la fertilización fosfatada sobre el índice relativo de clorofila ($p < 0.05$). No se detectaron efectos significativos de otros factores o interacciones entre los tratamientos (Gi, Pp y dosis de fertilizante fosfatado), ni diferencias significativas entre los resultados registrados en esta fase del crecimiento (prueba de Tukey, $p > 0.05$). Sin embargo, se detectó una interacción significativa en la conductancia estomática, g_s , entre Pp y dosis de fertilizante ($p < 0.01$), lo que demuestra una influencia mutua de los factores (Tabla 2).

En los análisis del suelo al final del ensayo, se pudo confirmar que los niveles de P_2O_5 extraíble en los tratamientos con dosis de P del 100% y del 70% seguían siendo de medios (51-100 mg/kg de P_2O_5 extraíble) a altos (101-200 mg/kg de P_2O_5 extraíble) al final del ensayo (Tabla 3). En los tratamientos con la dosis más baja de fertilización fosfatada (40% de la dosis de referencia), este valor fue bajo (26-50 mg/kg de P_2O_5 extraíble) e incluso muy bajo en el caso de la inoculación con *G. iranicum*, en ausencia de la inoculación con *Pp* (<25 mg/kg de P_2O_5 extraíble). En todos los casos de co-inoculación de *G. iranicum* con *Pp*, los niveles de P_2O_5 extraíble se mantuvieron ligeramente superiores en comparación con los otros tratamientos (Control, Gi, Pp) para los diferentes niveles de aplicación de fertilización fosfatada (Tabla 3). En cuanto a los demás nutrientes principales, cabe mencionar el contenido de N (Kjeldahl) (valores no mostrados aquí), que también presentó un valor ligeramente superior en el tratamiento de co-inoculación y aplicación del 100 % de P.

El análisis foliar mostró resultados consistentes con el análisis del suelo, ya que la concentración de P se vio significativamente influenciada por la dosis de fertilizante ($p < 0.05$), aunque no se encontraron diferencias significativas entre las



medias (prueba de Tukey, $p > 0.05$). En cuanto a los demás nutrientes (N y K), no se registraron variaciones significativas (valores no mostrados aquí).

Tabla 2. Resultados obtenidos para el índice relativo de clorofila, índice de diferencia normalizada de la vegetación (NDVI), índice de reflectancia fotoquímica (PRI) y conductancia estomática (gs) en los diferentes tratamientos de inoculación y fertilización con fósforo (media \pm desviación estándar, $n = 4$). Las columnas marcadas con la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí (test de Tukey, $p > 0.05$). También se presentan los valores p del análisis ANOVA factorial para los efectos de los factores "Gi", "Pp" y "Fertilización", así como de sus interacciones, en plantas de eucalipto al final del ensayo (significativo con: *** $P \leq 0,001$; ** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$; n.s.: no significativo). Gi:G. iranicum; Pp:Pseudomonas.

Tratamiento	Fertilizante P (%)	Índice relativo de clorofila	NDVI	PRI	gs	(mol m ⁻² s ⁻¹)			
Ctrl	100	12 \pm 4	0.455 \pm 0.009	0.461 \pm 0.008	0.462 \pm 0.007	0.21 \pm 0.02	0.20 \pm 0.03	0.21 \pm 0.03	98 \pm 66 a
	70	12. \pm 3							57 \pm 33 abc
	40	12 \pm 3							18 \pm 17 b
Gi	100	13 \pm 3	0.458 \pm 0.026	0.453 \pm 0.020	0.459 \pm 0.012	0.21 \pm 0.05	0.23 \pm 0.02	0.23 \pm 0.02	85 \pm 16 bc
	70	12 \pm 3							27 \pm 11 b
	40	13 \pm 3							19 \pm 10 b
Pp	100	13 \pm 4	0.460 \pm 0.017	0.468 \pm 0.004	0.471 \pm 0.014	0.22 \pm 0.03	0.21 \pm 0.03	0.23 \pm 0.02	32 \pm 11 bc
	70	14 \pm 1							20 \pm 11 b
	40	14 \pm 3							21 \pm 5 b
GiPp	100	12 \pm 2	0.463 \pm 0.015	0.443 \pm 0.008	0.459 \pm 0.018	0.19 \pm 0.05	0.21 \pm 0.03	0.22 \pm 0.03	28 \pm 8 b
	70	12 \pm 1							28 \pm 4 b
	40	15 \pm 2							10 \pm 5 b
Gi	0.613 ns	0.807 ns	0.852 ns						1.649 ns
Pp	0.016 ns	0.120 ns	0.371 ns						17.36 ***
Fertilizante	3.617 *	0.699 ns	1.011 ns						15.01 ***
Gi*Pp	0.848 ns	0.437 ns	0.005 ns						0.747 ns
Gi*Fertilizante	0.463 ns	0.655 ns	0.210 ns						0.050 ns

<i>Pp</i> *Fertilizante	0.952 ns	0.628 ns	0.600 ns	7.060 **
<i>Gi</i> * <i>Pp</i> *Fertilizante	1.964 ns	0.021 ns	0.045 ns	1.086 ns

Tabla 3. Resultados obtenidos para el contenido de P_2O_5 en el suelo y de P en la planta, en los diferentes tratamientos de inoculación y fertilización de fósforo (media \pm desviación estándar, $n = 4$) y para los valores p de la prueba ANOVA factorial para los efectos de los factores “Gi”, “Pp” y “Fertilización” y sus interacciones al final del ensayo (*: significativo a $p < 0.05$). Las columnas marcadas con la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí (test de Tukey, $p > 0.05$). Gi: *G. iranicum*; Pp: *Pseudomonas*; Significativo con: *** $P \leq 0,001$; ** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$; n.s.: no significativo.

Tratamiento	Fertilizante P (%)	Contenido de P_2O_5 extraíble en el suelo (mg/kg)	Contenido de P en la planta (mg/kg)
<i>Ctrl</i>	100	70	± 16 cd
	70	62 ± 14 de	104 ± 19
	40	38	± 9 efg
<i>Gi</i>	100	115 ± 36 ab	100 ± 8
	70	67	± 21 cd
	40	21	± 4 g
<i>Pp</i>	100	92 ± 22 bc	105 ± 10
	70	55 ± 15 def	92 ± 9
	40	31 ± 8 fg	94 ± 8
<i>GiPp</i>	100	127	± 24 a
	70	77	± 20 cd
	40	38	± 25 efg
<i>Gi</i>	7.839 **		0.004 ns
<i>Pp</i>	1.761 ns		3.387 ns
Fertilizante	47.60 ***		4.890 *
<i>Gi</i> * <i>Pp</i>	0.802 ns		0.376 ns
<i>Gi</i> *Fertilizante	5.124 *		1.504 ns
<i>Pp</i> *Fertilizante	0.752 ns		0.755 ns
<i>Gi</i> * <i>Pp</i> *Fertilizante	0.800 ns		0.908 ns

Al finalizar el ensayo, se llevó a cabo una evaluación para cuantificar la colonización micorrícica en las raíces y determinar si la aplicación del inóculo de *G. iranicum* había sido eficaz (Figura 2). Se constató que todos los individuos, en todos los tratamientos, presentaban colonización micorrícica en las raíces. La proporción de colonización fue relativamente baja, nunca superior al 28 %. Las diferencias en este parámetro tan solo fueron significativas en las plantas control no inoculadas, alcanzando valores significativamente superiores en aquellas que recibieron el 40% de la dosis de fertilización fosfatada en comparación con las que recibieron el 100% (Figura 2).

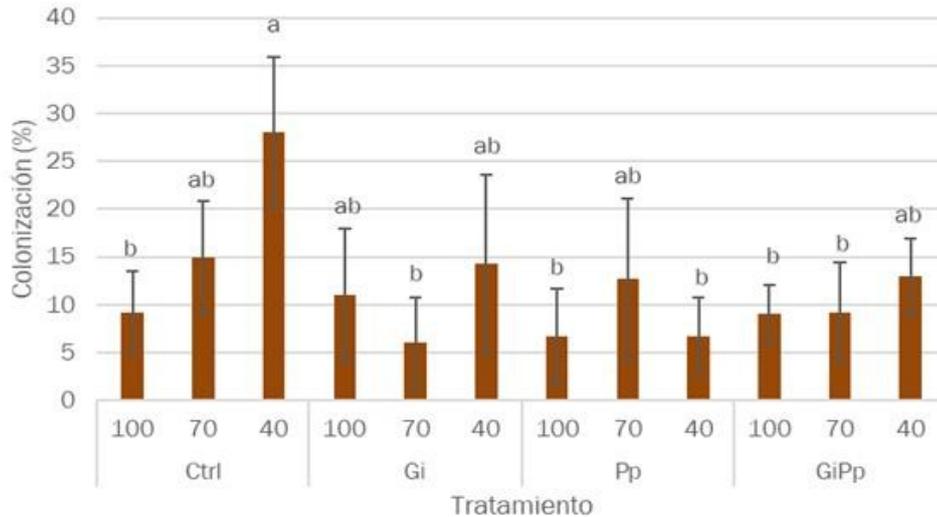


Figura 2. Resultados obtenidos para la colonización micorrícica en las raíces del eucalipto al final del ensayo (media \pm desviación estándar, $n = 4$). Las columnas marcadas con la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí (prueba de Tukey, $p > 0.05$). Ctrl: control; Gi: *G. iranicum*; Pp: *Pseudomonas*; GiPp: inoculación con *G. iranicum* y *Pseudomonas*.

5. Discusión

En el presente estudio, cuyo objetivo fue evaluar si la aplicación de biofertilizantes basados en HMA o PGPB podrían ayudar a satisfacer las necesidades nutricionales de P en plantas de eucalipto bajo condiciones de aporte mínimo de este nutriente, se observó una respuesta moderada en el crecimiento de las plantas. Es importante destacar que las dosis de fertilización inicialmente establecidas fueron diseñadas para satisfacer las necesidades de las plantas durante un período de un año. No obstante, la duración del experimento fue de 7 meses, ya que se decidió finalizarlo antes debido al crecimiento superior al esperado de las plantas. De esta manera, se evitó que el confinamiento de las raíces y la parte aérea afectara los resultados, asegurando que los efectos de la inoculación y la fertilización no se vieran sesgados por limitaciones de espacio. Por tanto, es posible que la dosis más baja de fertilizante hubiese sido suficiente para cubrir completamente las necesidades nutricionales de las plantas. Esto podría explicar la ausencia de diferencias estadísticas más notables en el crecimiento entre los diferentes tratamientos.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en los índices de vegetación, considerados como indicadores de la vitalidad y salud de las plantas (Vélez et al., 2023), entre los tratamientos de inoculación y las dosis de fertilizante



(Tabla 2). Esto sugiere que, incluso en condiciones de baja disponibilidad de P mineral, los eucaliptos fueron capaces de satisfacer sus necesidades sin mostrar signos de estrés vegetativo.

Sin embargo, la conductancia estomática es uno de los parámetros que se vio más afectado por los tratamientos experimentales. De hecho, situaciones de estrés pueden ocasionar una reducción en este parámetro y, en general, en los intercambios gaseosos de la planta. En el contexto de este estudio, el principal factor de estrés al que las plantas estuvieron expuestas fue el estrés nutricional, debido a la deficiencia de P. Por otro lado, las simbiosis que establecen las plantas con microorganismos del suelo también pueden influir significativamente en los valores de gs, mejorando su capacidad para regular la apertura de las estomas y, en consecuencia, los intercambios gaseosos, tanto en condiciones normales como en situaciones de estrés. De hecho, estos cambios se han observado tanto con la inoculación de PGPB (Efthimiadou et al., 2020), como con la de HMA (Watts-Williams et al., 2019), lo que podría explicar la existencia de interacciones entre los factores Pp y dosis de fertilizante ($p < 0.01$) (Tabla 2).

En cuanto a la concentración de P en el suelo, tal como se esperaba, la aplicación de la dosis más alta de fertilizante fosfatado resultó en las mayores concentraciones de P_2O_5 . Sin embargo, se observó una interacción significativa entre el factor fertilizante y el factor Gi (Tabla 3). Las concentraciones más altas se registraron en los tratamientos Gi y GiPp con la dosis del 100%, mientras que en el tratamiento control con la misma dosis, la concentración fue significativamente menor. Esto sugiere que el HMA inoculado pudo haber contribuido en la mejora de la biodisponibilidad de P del suelo. Los mecanismos para ello no han podido verificarse en este estudio, pero entre ellos, podría estar la secreción de fosfatasa ácida por las hifas (Sato et al., 2015).

Por otro lado, el hecho de que todas las plantas, incluso las no inoculadas con *G. iranicum*, estuvieran micorrizadas evidencia la presencia de una comunidad micorrízica nativa funcional, incluso en suelos pobres en P, como es el caso. Interesantemente, el porcentaje de colonización fue superior en las plantas no inoculadas, especialmente cuando la disponibilidad de P se redujo al 40%. Esto podría indicar que las plantas experimentan una mayor necesidad de establecer relaciones simbióticas con este tipo de hongos en condiciones de baja disponibilidad de P, y que probablemente los eucaliptos tienen más afinidad por los HMA nativos del suelo para cumplir con la función de captar este nutriente. De hecho, algunos autores demuestran las cepas autóctonas (tanto de HMA como de PGPB) se adaptan mejor a las condiciones ambientales del lugar y son más competitivas y efectivas que las cepas no nativas, sugiriendo su utilización en la producción de biofertilizantes (Kızılkaya, 2008, Efthimiadou et al. 2020).

Aunque los HMA mejoran la absorción de P inorgánico disponible a través de sus hifas extraradicales, ampliando el área de absorción en el suelo (Bhantana et al., 2021), en nuestro estudio no fue posible determinar si la inoculación con el hongo mejora la absorción de P. Esto se debe a que no pudimos compararlo con un control no colonizado, ya que todos los individuos en los distintos tratamientos presentaron colonización micorrízica en las raíces. Sin embargo, el potencial papel beneficioso de los HMA, tanto nativos como inoculados, en la nutrición de P por parte de la planta, se ve respaldado por el hecho de que no se observaron diferencias en la concentración de P en las hojas, incluso en situaciones de reducción de fertilización de fosfato a 70 y 40% de la dosis de referencia (Tabla 3).



Esto sugiere nuevamente que, incluso en condiciones de baja disponibilidad de P mineral, los eucaliptos lograron cubrir sus necesidades nutricionales de manera eficiente, probablemente gracias a la simbiosis con HMA.

6. Conclusiones

En las condiciones del estudio, se comprobó que la hipótesis inicial, que sugería que la reducción de la dosis de fertilización fosfatada no afectaría negativamente al rendimiento del eucalipto, es válida. Esto se debe a que no se observó ninguna disminución significativa de la biomasa de las plantas ni efectos adversos en los parámetros fisiológicos, incluso cuando se redujo al 40% la cantidad de fertilizante fosfatado aplicado. Esto sugiere que, bajo ciertas condiciones, el uso de biofertilizantes u otras prácticas sostenibles pueden ser una alternativa viable para reducir la dependencia de fertilizantes minerales sin comprometer la producción.

Sin embargo, la existencia de una comunidad nativa de hongos en el suelo impide atribuir este resultado de manera exclusiva a los inóculos comerciales utilizados. Por lo tanto, se sugiere continuar con la evaluación de estos biofertilizantes, preferentemente en un estudio a más largo plazo, con una duración mínima de un año y con contenedores mayores. Así mismo, sería de gran interés llevar a cabo un análisis de la diversidad y composición de los HMA presentes en el suelo, para comprender mejor su papel en la dinámica del ecosistema edáfico y su potencial contribución a la mejora de la fertilidad del suelo y el rendimiento de las plantas.

7. Agradecimientos

Este estudio fue realizado en el marco del proyecto PI.3.6. - Programa “BIOMA SOLO: mejorar la relación suelo-planta”, financiado por IAPMEI/PRR/Aviso 02/C05-i01/2022 - Agendas Mobilizadoras para la Innovación Empresarial. Agradecemos el apoyo de los socios del proyecto: a Hubel Verde, por el suministro de los biofertilizantes, a Viveiros Aliança, por el suministro de los clones de eucalipto, y la asesoría técnica de The Navigator Company (Ing. José Rafael).

8. Bibliografía

BACKER, R.; ROKEM, J. S.; ILANGUMARAN, G.; LAMONT, J.; PRASLICKOVA, D.; RICCI, E.; SUBRAMANIAN, S. & SMITH, D. L.; 2018. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Frontiers in Plant Science*, N° 9.

BHANTANA, P., RANA, M.S., SUN, X.C.; MOUSSA, M.G.; SALEEM, M.H.; SYAIFUDIN, M.; SHAH, A.; POUDEL, A.; PUN, A.B.; BHAT, M.A.; MANDAL, D.L.; SHAH, S.; ZHIHAO, D.; TAN, Q. & HU, C.-X.; 2021. Arbuscular mycorrhizal fungi and its major role in plant growth, zinc nutrition, phosphorous regulation and phytoremediation. *Symbiosis*, 84, 19–37 (2021). <https://doi.org/10.1007/s13199-021-00756-6>

DECRETO-LEI n.º 30/2022, de 11 de abril, establece as regras a que deve obedecer a colocação no mercado de matérias fertilizantes. *Diário da República*, 1.ª série - No.71 - 11 de abril de 2022. Presidência do Conselho de Ministros. pp. 2-22.

EFTHIMIADOU, A.; KATSENIOS, N.; CHANIOTI, S.; GIANNOGLOU, M.; DJORDJEVIC, N. & KATSAROS, G.; 2020. Effect of foliar and soil application of plant growth promoting bacteria on growth, physiology, yield and seed quality of maize under



Mediterranean conditions. *Scientific reports*, 10(1), 1-11.

GIOVANNETTI, M., & MOSSE, B.; 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular Mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, 84(3), 489–500.

ICNF (2015) - 6º Inventário Florestal Nacional; Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas: Lisboa, Portugal.

JAKOBSEN, I.; ROSENDAHL, L.; 1990. Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. *The New Phytologist*, v.115, p.77-83.

KIZILKAYA, R.; 2008. Yield response and nitrogen concentrations of spring wheat (*Triticum aestivum*) inoculated with *Azotobacter chroococcum* strains. *Ecological Engineering* 33, 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.02.011>

MALICO, I. & GONÇALVES, A.C.; 2021. Eucalyptus globulus Coppices in Portugal: Influence of Site and Percentage of Residues Collected for Energy. *Sustainability*, N° 13, 5775.

MUHAMMAD, M.; WAHAB, A.; WAHEED, A.; HAKEEM, K.R.; MOHAMED, H.I.; BASIT, A.; TOOR, M.D.; LIU, Y.-H.; LI, L. & LI, W.-J.; 2025. Navigating Climate Change: Exploring the Dynamics Between Plant–Soil Microbiomes and Their Impact on Plant Growth and Productivity. *Glob Change Biol*, 31: e70057. <https://doi.org/10.1111/gcb.70057>

O'CALLAGHAN, M.; BALLARD, R. A. & WRIGHT, D.; 2022. Soil microbial inoculants for sustainable agriculture: Limitations and opportunities. In *Soil Use and Management* (Vol. 38, Issue 3, pp. 1340–1369). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/sum.12811>

PHILLIPS, J. M., & HAYMAN, D. S.; 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55(1), 158-181.

Portaria n.º 185/2022, de 21 de julho, aprova os tipos de matérias fertilizantes não harmonizadas. *Diário da República*, 1.ª série - No.140 - 21 de julho de 2022. Ministérios da Economia e Mar, Ambiente e Ação Climática e Agricultura e Alimentação. pp. 5-44.

REBOREDO, F.; PAIS, J.; 2014. Evolution of forest cover in Portugal: A review of the 12th–20th centuries. *Journal of Forestry Research*, N° 25, p. 249–256.

REBOREDO, F.H.; PELICA, J.; LIDON, F.C.; PESSOA, M.F.; SILVA, M.M.; GUERRA, M.; LEITÃO, R.; RAMALHO, J.C.; 2021. The Tolerance of *Eucalyptus globulus* to Soil Contamination with Arsenic. *Plants*, N° 10, 627.

REGULATION (EU) 2019/1009 of the European Parliament and of the Council of 5 June 2019 laying down rules on the making available on the market of EU fertilising products and amending Regulations (EC) No 1069/2009 and (EC) No 1107/2009 and repealing Regulation (EC) No 2003/2003. Assessed at: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2019/1009/oj>, on 16/12/2024.

RIBEIRO, H.; (2021) Biofertilizantes. O que são e que benefícios têm para a agricultura? *Revista da Associação Portuguesa de Horticultura*. N° 145, p. 26-27.

SMITH, S.E.; READ, D.J.; 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd Edition, Academic Press, London.



TOMÉ, M.; ALMEIDA, M. H.; BARREIRO, S.; BRANCO, M. R.; DEUS, E.; PINTO, G.; SILVA, J. S.; SOARES, P. & RODRÍGUEZ-SOALLEIRO, R.; 2021. Opportunities and challenges of Eucalyptus plantations in Europe: the Iberian Peninsula experience. *European Journal of Forest Research*, 140(3), 489-510. <https://doi.org/10.1007/s10342-021-01358-z>

VÉLEZ, S.; MARTÍNEZ-PEÑA, R.; CASTRILLO, D.; 2023. Beyond Vegetation: A Review Unveiling Additional Insights into Agriculture and Forestry through the Application of Vegetation Indices. *J- Multidisciplinary Scientific Journal*, 6, 421–436.

WATTS-WILLIAMS, S. J.; CAVAGNARO, T. R., & TYERMAN, S. D.; 2019. Variable effects of arbuscular mycorrhizal fungal inoculation on physiological and molecular measures of root and stomatal conductance of diverse *Medicago truncatula* accessions. *Plant, Cell & Environment*, 42(1), 285-294.