

*FACULTAD DE CIENCIAS*

*Efecto de las micorrizas vesículo-arbusculares en las relaciones  
hídricas y en el crecimiento de plantas sometidas a estrés salino*

*Ma Victoria Estañ Morell*

*Tesis Doctoral*

*UNIVERSIDAD DE GRANADA*

*1991*

*Efecto de las micorrizas vesículo-arbusculares en  
las relaciones hídricas y en el crecimiento de  
plantas sometidas a estrés salino*

*Memoria presentada para optar  
al grado de Doctora en Ciencias Biológicas*



*Fdo. Ma Victoria Estain Morell  
Licenciada en Biología*



*El Director de Tesis*

*Fdo. Dr. José Miguel Barea Navarro  
Profesor de Investigación del CSIC*

## *Agradecimientos*

Este ha sido un trabajo que ha pasado por muchas etapas, y, en todas ellas, ha habido personas, a mi lado, que me han ayudado a seguir adelante y a llegar al final. A todas ellas quiero expresarles mi gratitud por su valiosa ayuda.

Deseo expresar mi agradecimiento al profesor del CSIC José Miguel Barea Navarro, director de la Estación Experimental del Zaidín, por la dirección de este trabajo monográfico, y, a la doctora Carmen Lluch, de la Universidad de Granada, su labor como tutora.

Al Director General del IRTA, Dr. Josep Tarragó, al Director del Centro de Investigación de Cabrils, Barcelona, Dr. Joan-Juli Bonet, y al Jefe del Departamento de Patología Vegetal, Dra Isabel Alvarez, debo agradecer la autorización otorgada y los medios materiales que me han concedido, para realizar este trabajo, englobado en el proyecto de investigación financiado por el INIA nº 8079.

Deseo agradecer a los miembros del Departamento de Microbiología y de la estación Experimental del Zaidín, en general, su hospitalidad en mis frecuentes visitas, en especial a las doctoras Conchi y Charo Azcón de Aguilar.

Mis compañeros de Departamento, en particular Cinta Calvet y Amelia Camprubí, me han ayudado y alentado a lo largo de todo este trabajo, desde el planteamiento y realización de los ensayos, hasta la discusión científica de los resultados. A M<sup>a</sup> del Valle Montero, auxiliar del Departamento, le doy las gracias por el cuidado de las plantas en el invernadero.

Agradezco a todos los compañeros del Departamento de Tecnología Hortícola, la ayuda que me han prestado en la realización de las determinaciones analíticas y fisiológicas, en especial a Robert Savé, Carmen Olivella y Asunción Martínez.

Quiero agradecer, también, a Cinta, Amelia y Robert sus valiosas críticas y sugerencias y la minuciosa revisión del manuscrito.

A Martin Fallon le doy las gracias por las horas empleadas, delante del ordenador, ayudándome a preparar gráficos, figuras y texto, a Clemente Estaún, por tener la paciencia y voluntad de revisar las primeras pruebas, a Armando Parrilla por la preparación de las diapositivas y a Montse Grau por sus cenas y comprensión.

Finalmente, gracias a mi familia, que siempre me ha apoyado en mis decisiones, a mis padres Clemente y Teresa, porque con su ejemplo de fe y tenacidad, me han enseñado que las ilusiones pueden convertirse en realidades, a mi hermano Javier por estar siempre de mi parte y a mi marido Martin, sin el cual todo hubiera sido mucho más difícil.

## *Indice*

<i>Objetivos</i>	1
<i>Introducción general</i>	3
<i>1 Características generales de las micorrizas Vesículo-Arbusculares VA</i>	4
1.1 <i>Taxonomía de los hongos formadores de micorrizas VA</i>	6
1.2.1 <i>Precolonización</i>	12
1.2.1.1 <i>Germinación de esporas</i>	13
1.2.1.1.2 <i>Potencial hídrico del suelo</i>	15
1.2.1.1.3 <i>pH</i>	16
1.2.1.1.4 <i>Nutrientes inorgánicos del suelo</i>	17
1.2.1.2 <i>Crecimiento de hifas a partir de propágulos germinados</i>	18
1.2.2 <i>Desarrollo de la Micorriza</i>	19
<i>2 Efectos de las micorrizas VA en el crecimiento</i>	21
2.1 <i>Nutrición</i>	21
2.1.1 <i>Fosfato</i>	22
2.1.2 <i>Otros nutrientes</i>	23
2.2 <i>Efectos no nutricionales</i>	24
2.2.1 <i>Depresión del crecimiento</i>	24
2.2.2 <i>Estimulación del crecimiento</i>	25
2.3 <i>Efectos diferenciales de distintas especies y cepas</i>	26
<i>3 Ecología de los hongos formadores de micorrizas VA</i>	27
3.1 <i>Dependencia micorrízica</i>	27
3.2 <i>Supervivencia y diseminación de propágulos de hongos formadores de micorrizas VA</i>	29
3.2.1 <i>Factores bióticos</i>	29
3.2.2 <i>Factores abióticos</i>	31
<i>4 Relaciones hídricas y salinidad</i>	34
4.1 <i>Absorción y transporte de agua</i>	34
4.1.1 <i>El agua en el suelo</i>	35
4.1.2 <i>Absorción de agua por las raíces</i>	36
4.1.3 <i>Transporte de agua por la raíz</i>	41
4.1.4 <i>Transporte de agua desde las raíces hasta las hojas</i>	43

4.2	<i>Relaciones hídricas en las células vegetales</i>	45
4.3	<i>Relaciones hídricas en tejidos vegetales</i> <i>Sus características e implicaciones ecológicas</i>	46
4.3.1	<i>Potencial matricial</i>	47
4.3.2	<i>Potencial osmótico</i>	48
4.3.3	<i>Turgencia</i>	49
4.4	<i>Estrés hídrico y salinidad</i>	50
4.4.1	<i>Estrés hídrico</i>	50
4.4.2	<i>Salinidad</i>	52
4.4.2.1	<i>Sequía osmótica</i>	54
4.4.2.2	<i>Toxicidad salina</i>	55
4.4.2.3	<i>Deficiencias nutritivas</i>	56
4.5	<i>Mecanismos de resistencia</i>	57
4.5.1	<i>Resistencia al estrés hídrico</i>	57
4.5.1.1	<i>Ajuste osmótico</i>	58
4.5.2	<i>Resistencia a la salinidad</i>	59
4.5.2.1	<i>Osmoregulación</i>	61
5	<i>Relaciones hídricas de la simbiosis VA</i>	62
5.1	<i>Cambios en las relaciones hídricas de las plantas debidos a la simbiosis</i>	63
5.2	<i>Relaciones hídricas de las plantas micorrizadas en condiciones de sequía</i>	65
5.3	<i>Relaciones hídricas del hongo formador de micorrizas VA</i>	67
6	<i>Estrés salino y micorrizas VA</i>	68
	<i>Capítulo 1: Estudio de la presencia de hongos formadores de micorrizas Vesículo-arbusculares en el Delta del Ebro</i>	69
1.1	<i>Introducción</i>	70
1.2	<i>Materiales y métodos</i>	71
	<i>Diseño del muestreo</i>	71
	<i>Procesado del suelo</i>	72
	<i>Metodología de aislamiento</i>	76

	<i>Metodología para la purificación y multiplicación de los hongos aislados</i>	78
	<i>Identificación de los hongos aislados</i>	79
1.3	<i>Resultados y discusión</i>	81
	<i>Presencia de esporas y de MVA</i>	81
	<i>Aislamiento</i>	86
	<i>Purificación e identificación de los hongos</i>	89
	 <i>Capítulo 2: Pistacia sp. y micorrizas vesículo-arbusculares</i>	 95
2.1	<i>Introducción</i>	96
2.2	<i>Materiales y métodos</i>	97
	<i>Metodología de muestreo</i>	97
	<i>Procesado del suelo</i>	99
	<i>Síntesis de la simbiosis MVA y curva al fósforo de P. vera , P. atlantica y P. terebinthus</i>	101
	<i>Germinación de semillas</i>	101
	<i>Inoculación</i>	102
	<i>Síntesis de la simbiosis</i>	103
	<i>Curvas al fósforo</i>	104
2.3	<i>Resultados y discusión</i>	105
	<i>Muestreo</i>	105
	<i>Aislamiento de hongos</i>	108
	<i>Síntesis de la simbiosis</i>	118
	<i>Curvas al fósforo</i>	121

<i>Capítulo 3: Efecto de la presión osmótica en la fase de germinación y crecimiento inicial de micelio de dos aislados de Glomus mosseae</i>		127
3.1	<i>Introducción</i>	128
3.2	<i>Materiales y métodos</i>	129
	<i>Cultivo de los hongos</i>	129
	<i>Obtención de esporas</i>	129
	<i>Preparación de las soluciones de NaCl y manitol</i>	129
	<i>Metodología general de los ensayos en condiciones axénicas</i>	132
	<i>Experimento nº 1: Efecto del NaCl y del manitol sobre la germinación de G. mosseae en condiciones axénicas</i>	135
	<i>Experimento nº 2: Efecto del NaCl y del manitol en el crecimiento inicial de G. mosseae en condiciones axénicas</i>	135
	<i>Experimento nº 3: Efecto de dosis máxima de NaCl y manitol en la recuperación del potencial germinativo de las esporas de G. mosseae en condiciones axénicas</i>	136
	<i>Metodología general de los ensayos de germinación de esporas en medio no estéril</i>	137
	<i>Experimento nº 4: Comparación entre la germinación de esporas de G. mosseae en medio axénico y en 'Unidades Hepper'</i>	139
	<i>Experimento nº 5: Efecto del NaCl y del manitol sobre la germinación de dos aislados de G. mosseae</i>	139
	<i>Experimento nº 6: Efecto del NaCl y del manitol en el crecimiento de micelio de dos aislados de G. mosseae</i>	140
3.3	<i>Resultados</i>	141
	<i>Experimento nº1: efecto de NaCl y de manitol sobre la germinación de G. mosseae en condiciones axénicas</i>	141

	<i>Experimento nº 2: Efecto del NaCl y del manitol sobre el crecimiento inicial de G. mosseae en condiciones axénicas</i>	143
	<i>Experimento nº 3: Efecto de dosis máxima de NaCl y manitol en la recuperación del potencial germinativo de las esporas de G. mosseae en condiciones axénicas</i>	145
	<i>Experimento nº 4: Comparación entre la germinación de esporas de G. mosseae en medio axénico y en 'Unidades Hepper'</i>	147
	<i>Experimento nº 5: Efecto del NaCl y del manitol sobre la germinación de dos aislados de G. mosseae</i>	148
	<i>Experimento nº 6: Efecto del NaCl y del manitol sobre el crecimiento de micelio de dos aislados de G. mosseae</i>	152
3.4	<i>Discusión</i>	156
	 <i>Capítulo 4: Interacción entre NaCl y la colonización MVA en el crecimiento y las relaciones hídricas de P. vera</i>	159
4.1	<i>Introducción</i>	160
4.2	<i>Materiales y métodos</i>	161
	<i>Germinación de las semillas y condiciones de cultivo</i>	161
	<i>Estudio de las relaciones hídricas</i>	162
	<i>Medida del potencial hídrico</i>	162
	<i>Medida del potencial osmótico</i>	163
	<i>Manipulación de las plantas</i>	164
	<i>Medida del potencial de turgencia</i>	164
	<i>Determinación de la prolina</i>	165
	<i>Determinación de la conductividad eléctrica</i>	168
	<i>Estudio de los parámetros de crecimiento de la planta y el hongo</i>	169
	<i>Diseño experimental</i>	170

	<i>Experimento 1: Respuesta de P. vera no inoculado a concentraciones crecientes de sal</i>	170
	<i>Experimento 2: Respuesta de P. vera inoculado con hongos formadores de MVA a concentraciones crecientes de NaCl</i>	170
	<i>Experimento 3: Efecto del abonado y de la inoculación con hongos formadores de MVA en las relaciones hídricas de P. vera en condiciones de estrés salino</i>	171
	<i>Experimento 4: Respuesta de P. vera inoculado con dos aislados distintos de G. mosseae a tres niveles de salinidad</i>	171
4.3	<i>Resultados</i>	173
	<i>Experimento 1: Respuesta de P. vera no inoculado a concentraciones crecientes de sal</i>	173
	<i>Experimento 2: Respuesta de P. vera inoculado con hongos formadores de MVA a concentraciones crecientes de NaCl</i>	176
	<i>Experimento 3: Efecto del abonado y de la inoculación con hongos formadores de MVA en las relaciones hídricas de P. vera en condiciones de estrés salino</i>	182
	<i>Experimento 4: Respuesta de P. vera inoculado con dos aislados distintos de G. mosseae a tres niveles de salinidad</i>	185
4.4	<i>Discusión</i>	201
	<i>Discusión general</i>	203
	<i>Conclusiones</i>	209
	<i>Bibliografía</i>	211

# *Objetivos*

## *Objetivos de este trabajo*

Con este trabajo se pretende clarificar las interacciones entre micorrizas VA y salinidad.

En un primer tiempo, se aislarán hongos, formadores de micorrizas, de entornos salinos y se estudiará el efecto de la salinidad sobre el hongo, a nivel de germinación y crecimiento de micelio a partir del tubo germinativo, comparando, un hongo aislado de un entorno salino, con un hongo de un entorno no salino.

En un segundo tiempo, se estudiarán, las interacciones entre la simbiosis VA y la salinidad en las relaciones hídricas de la planta hospedadora. Evaluando el crecimiento, la colonización del hongo y los cambios en las relaciones hídricas de las plantas, en función de cantidades crecientes de sal (NaCl) en el medio.

Como planta modelo, se ha escogido *Pistacia vera*, ya que es una planta glicofítica, pero halotolerante, lo cual puede permitir extrapolar los resultados obtenidos a plantas glicofíticas, con características de halotolerancia, introducidas o no, mediante mejora genética, adaptadas a zonas con problemas de salinidad. Antes de utilizarla, habrá que determinar su susceptibilidad a la colonización VA y la efectividad de la simbiosis en condiciones normales.

# *Introducción General*

## 1. Características generales de las micorrizas Vesículo-Arbusculares (VA)

Las raíces de las plantas constituyen un nicho ecológico muy rico en nutrientes en el que coexisten una serie de microorganismos: protozoos, nematodos, insectos, bacterias incluyendo actinomicetes y hongos, la mayoría de los cuales viven a expensas de los exudados radiculares mientras que unos pocos establecen relaciones biotróficas con las raíces. Estas relaciones pueden ser de tipo parasitario como patógenos de raíz, o bien de tipo simbiótico. La relación simbiótica más extendida en el Reino Vegetal es la establecida entre hongo y raíz denominada micorriza por Frank en 1885. Dos años después este mismo autor (Frank, 1887) distingue dos grupos de micorrizas, que serían las luego denominadas ectomicorrizas y endomicorrizas cuyas características morfológicas diferenciales fueron definidas posteriormente por Harley (1969).

Las ectomicorrizas o micorrizas ectotróficas son características de especies arbóreas forestales y ornamentales de zonas templadas pertenecientes a las familias *Pinaceae*, *Salicaceae*, *Betulaceae*, *Fagaceae*, *Tiliaceae*, así como algunas especies de las familias *Rosaceae*, *Leguminosaceae*, *Ericaceae* y *Juglandaceae* (Trappe, 1962) (Meyer, 1973).

Los hongos que las forman son *Basidiomycetes* y algunos géneros de *Ascomycetes*. Sus características morfológicas son la formación de un manto miceliar externo, detectable a simple vista, que envuelve las raíces tróficas de la planta hospedadora y la distribución de sus hifas, siempre intercelulares, en un entramado en la zona cortical denominado Red de Hartig. El manto externo reemplaza a los pelos radiculares por hifas y cordones miceliar que aumentan notablemente la superficie de absorción radical.

Las endomicorrizas o micorrizas endotróficas se distinguen de las ectomicorrizas en que no se producen cambios morfológicos en la estructura externa de la raíz micorrizada y en la presencia de hifas inter e intracelulares en el córtex radical. Para su observación hay que recurrir a métodos de tinción y microscopía.

Dentro de este grupo cabe diferenciar dos tipos de micorrizas según el hongo simbiote (Trappe, 1987):

micorrizas formados por hongos *Zygomycetes*

micorrizas formadas por hongos *Basidiomycetes* y *Ascomycetes*

Las endomicorrizas formadas por hongos *Basidiomycetes* y *Ascomycetes* tienen hifas inter e intracelulares septadas y en algunos casos pueden llegar a formar un manto externo (ectendomicorrizas y micorrizas arbutoides). Se encuentran asociadas principalmente con especies de la familia *Ericaceae* y con algunas especies de nutrición heterótrofa como *Monotropa*. Mención especial dentro de este grupo merecen las micorrizas de las orquídeas ya que sus semillas al carecer de endospermo son heterótrofas y fisiológicamente dependientes del hongo micorrícico al menos en la fase inicial de su ciclo vital (aclorofílica).

Las endomicorrizas formadas por hongos *Zygomycetes* tienen hifas inter e intracelulares no septadas y forman unas estructuras características, vesículas y arbusculos que les han dado nombre: micorrizas vesículo-arbusculares.

La simbiosis vesículo-arbuscular (VA) se ha encontrado en la mayoría de las familias de plantas examinadas. A esta amplia distribución de la simbiosis VA en el Reino Vegetal hay que añadir que se presenta en todo tipo de ecosistemas desde acuáticos hasta desérticos, desde zonas tropicales hasta el ártico (Mosse *et al.*, 1981).

### 1.1. Taxonomía de los hongos formadores de micorrizas VA

Los hongos formadores de micorrizas VA son simbioses obligados, es decir que no completan su ciclo de vida si no es en asociación con la planta hospedadora y no se ha conseguido cultivarlos en medios nutritivos. Estos hongos no presentan especificidad respecto al micosimbionte ni hacia la planta hospedadora aunque existe cierta evidencia de que algunos endófitos forman asociaciones preferenciales con algunas plantas hospedadoras.

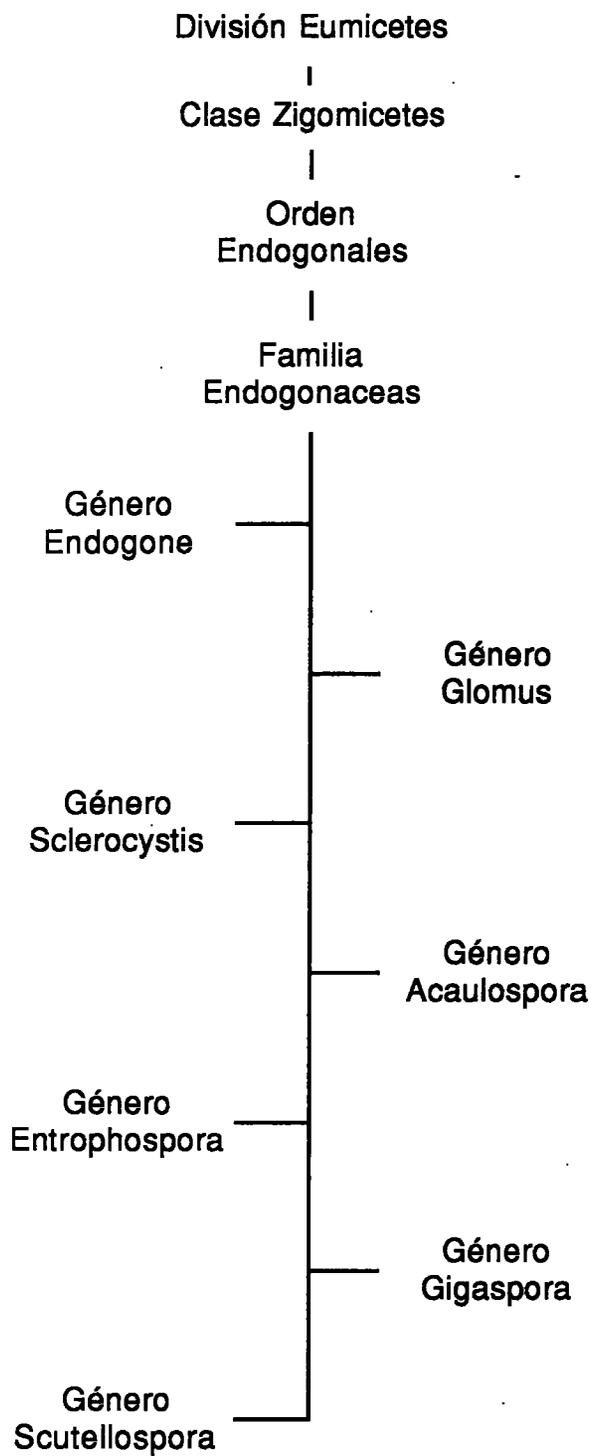
Las esporas de los endófitos VA se encuentran en el suelo libres, asociadas al micelio extraradical y a veces agrupadas en esporocarpos. Son globosas u ovaladas, casi siempre se forman en posición terminal o en ramas laterales cortas del micelio, miden de 20 a 150  $\mu\text{m}$  de diámetro en general aunque pueden alcanzar hasta 400  $\mu\text{m}$ . Tienen una pared externa gruesa y un contenido citoplasmático denso y rico en gotas lipídicas. No se les conocen fenómenos de sexualidad, por lo tanto son formas anamorfas. En 1974 Gerdemann y Trappe establecieron un marco taxonómico para estos hongos, segregando el género *Glomus* del género *Endogone* y adscribiendo la familia *Endogonaceae* al orden Mucorales. Benjamín (1979) restringió la definición de los Mucorales y revalidó el orden Endogonales propuesto por Moreau (1953). Trappe propuso en 1982 la clasificación que se ha venido utilizando hasta ahora: División Eumycetes, Clase Zygomycetes, Orden Endogonales, Familia Endogonaceas. Desde entonces dos géneros pertenecientes a esta familia se han adscrito a otras: *Modicella* a las *Mortierellaceae* (Trappe y Schenck, 1984) y *Glaziella* se ha identificado como el anamorfo de un Ascomicete (Gibson *et al.*, 1986), y un nuevo género, *Scutellospora*, se ha creado escindiendo del género *Gigaspora* (Walker y Sanders, 1986). Resumiendo, hasta Junio de 1990 la familia *Endogonaceae* contaba con seis géneros formadores de micorrizas: *Glomus*, *Sclerocystis*, *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora*. Pyrozinsky y Dalpé en 1989 sugirieron la agrupación de *Glomus* y *Sclerocystis* en una nueva familia: *Glomaceae*, basándose en características morfológicas y en especímenes fósiles que relacionaban a ambos géneros. Después de detallados estudios sobre las características morfológicas, la ontogenia y la filogenia de los hongos formadores de MVA (Morton, 1988), (Morton, 1990a), (Morton, 1990b) Morton y Benny (1990) han propuesto un nuevo marco

taxonómico en el que escinden el orden Endogonales en dos, Orden Endogonales que queda con una sola familia *Endogonaceae* y un solo género *Endogone* y Orden Glomales. Dentro de este último orden y basándose en estudios cladísticos Morton y Benny proponen dos subordenes: *Glominae* y *Gigasporinae*, el primero con dos familias: *Glomaceae* y *Acaulosporaceae* y el segundo con una : *Gigasporaceae*.

La nueva clasificación propuesta y los cambios respecto a la antigua quedan detallados en el esquema 1 y 2.

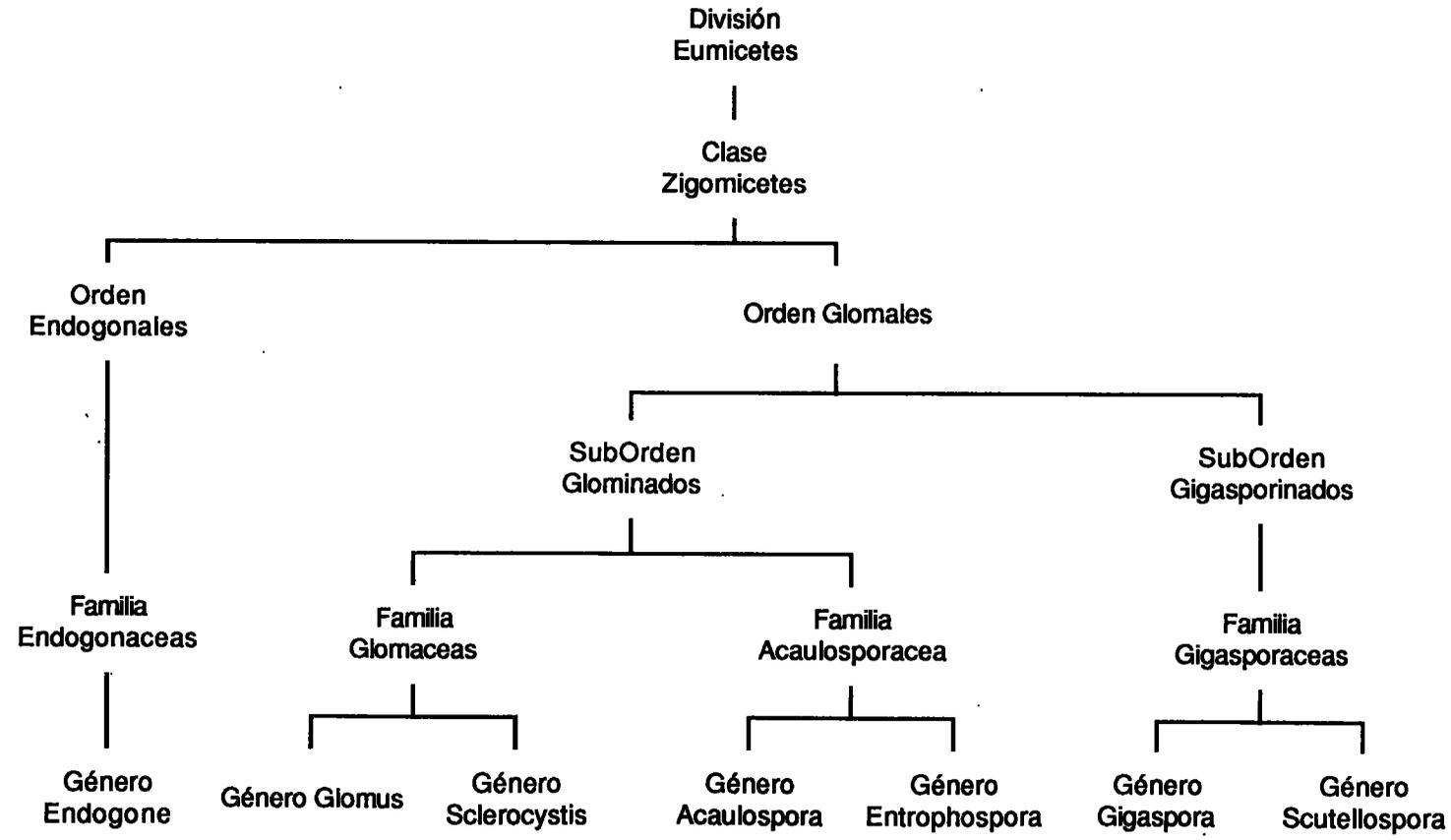
*Esquema 1:*

Taxonomía de los hongos formadores de micorrizas VA (Trappe 1982).



*Esquema 2:*

Taxonomía de los hongos formadores de micorrizas VA (Morton y Benny 1990).



A continuación se resumen las características morfológicas básicas de los seis géneros formadores de micorrizas VA incluidos en el orden Glomales.

Suborden *Glominae* Familia *Glomaceae*

*Glomus* : Especies formadoras de clamidosporas en esporocarpos hipogeos o epigeos, libres en el suelo o dentro del parénquima cortical de la planta hospedadora colonizada. Las clamidosporas se forman normalmente al extremo de una única hifa de sustentación y pueden presentar una o varias paredes, rara vez ornamentadas. La germinación se produce a partir de la hifa de sustentación o a través de la pared. Forman endomicorrizas con vesículas y arbusculos.

*Sclerocystis* : Especies formadoras de clamidosporas parecidas a las de *Glomus* pero agrupadas en esporocarpos muy densos donde las esporas se ordenan en una capa alrededor de un plexo central. Algunas especies tienen peridio. Forman endomicorrizas con vesículas y arbusculos.

Familia *Acaulosporaceae*

*Acaulospora* : Especies formadoras de azigosporas que se encuentran en solitario y ectocárpicamente en el suelo. La formación de la espora empieza por la de un saco esporógeno de pared delgada al final de una hifa gruesa. El contenido de este saco emigra hacia una posición del cuello del mismo y se condensa en una espora sétil. Tiene dos o más paredes a menudo con ornamentación externa. Forman micorrizas vesículo-arbusculares, en el caso de *A.laevis* las vesículas son característicamente lobuladas.

*Entrophospora* : Género que forma sus esporas de resistencia de forma parecida a *Acaulospora*, sin embargo, a diferencia de ésta, las esporas se forman dentro de la hifa parental, en el cuello del saco esporógeno. Las esporas tienen una pared externa gruesa y ornamentada y una pared interna membranosa. En muchas de las esporas permanece intacta la pared de la hifa parental rodeando la espora. En 1988 Morton confirmó al género como formador de micorrizas vesículo-arbusculares, hasta entonces se había considerado como probable hiperparásito (Ames y Schneider, 1979).

Suborden *Gigasporinae* Familia *Gigasporaceae*

*Gigaspora* : Especies formadoras de azigosporas ectocárpicas sobre una hifa de sustentación de base engrosada que presenta una o más proyecciones laterales de función desconocida. La pared puede tener de 1 a 20 capas en un solo grupo, la más externa a menudo ornamentada. La germinación se produce mediante uno o más tubos germinativos que se forman directamente cerca de la base. La mayoría de las especies estudiadas forman micorrizas con arbuscúlos pero sin vesículas en las células colonizadas de la planta huésped, sin embargo se ha observado la presencia de estructuras de tipo vesicular en el suelo, formadas a partir de las hifas del hongo.

*Scutellospora* : Género de reciente creación (Walker y Sanders, 1986) que agrupa especies anteriormente adscritas al género *Gigaspora* y caracterizadas por tener dos o más grupos de paredes, con una o más paredes flexibles, membranosas o coriáceas en el grupo o grupos internos. La germinación se realiza por uno o más tubos producidos cerca de la base de la espora a partir de una estructura especial llamada escudo o concha de germinación formado sobre o dentro de una pared flexible.

## *1.2. Biología y fisiología de las micorrizas VA y su desarrollo*

### *1.2.1. Precolonización*

Con este término se denominan los sucesos previos a la entrada en contacto entre hongo y raíz, es decir, la activación de los propágulos del hongo que persisten en el suelo y el crecimiento de hifas a partir de estos propágulos.

Se acepta que existen en el suelo tres formas de inóculo, las cuales, con diferencias en su capacidad de supervivencia y potencial infectivo, pueden originar la simbiosis. Estas son:

esporas de resistencia de hongos VA.

raíces micorrizadas o sus fragmentos procedentes de plantas preexistentes o coexistentes.

agregados de hifas que sobreviven en el suelo.

Ni la germinación ni la dirección inicial del crecimiento de las hifas están influenciadas por la presencia de raíces de una planta hospedadora, sino que dependen mayoritariamente de factores extrínsecos característicos del suelo y en el caso de las esporas de factores intrínsecos de las mismas.

### 1.2.1.1. Germinación de esporas

La germinación de las esporas de resistencia de los hongos viene afectada por características del medio ambiente y por factores intrínsecos que son los responsables de la desigualdad en la germinación de una población de esporas homogénea a primera vista. Tommerup (1983) introdujo el concepto de dormancia referente a esporas VA para explicar la existencia de este desfase en la germinación. Durante este periodo de dormancia existirían cambios fisiológicos esenciales para permitir la germinación o, alternativamente, se difundirían unos factores de inhibición que al desaparecer permitirían que la germinación tuviese lugar. Una vez transcurrido este periodo de dormancia las esporas estarían en un periodo de quiescencia, es decir listas para germinar una vez las condiciones ambientales fueran las idóneas. Se ha demostrado que el periodo de dormancia es de 6 a 12 semanas para *Gigaspora calospora*, de 6 meses para *Acaulospora laevis* (Tommerup, 1983) e inexistente para *Glomus mosseae* (Camprubí *et al.*, 1990). Estos periodos de dormancia evitarían que las esporas germinaran a destiempo, en momentos en que no hubieran plantas susceptibles de ser infectadas.

#### *1.2.1.1.1. Temperatura del suelo*

Daniels y Trappe (1980) consideran la temperatura del suelo como uno de los factores ambientales principales que afectan a la germinación. En las especies de *Glomus* y *Acaulospora* estudiadas parece haber una temperatura mínima, por debajo de la cual las esporas no germinan, que varía entre 10 y 18°C y una temperatura máxima de 30°C, las temperaturas óptimas oscilan entre 20 y 25°C.

### 1.2.1.1.2. *Potencial hídrico del suelo*

Por regla general la disminución del potencial hídrico del suelo conlleva una disminución del porcentaje de germinación de las esporas, sin embargo se han observado diferencias importantes entre distintas especies de hongos. *Gigaspora gigantea* disminuye su % de germinación hasta 15% a -1 MPa (Wilson, 1984), mientras que a -1.8 MPa *Glomus epigaeus* alcanzaba tan solo 20% (Daniels y Trappe, 1980). La germinación de *Gigaspora calospora*, *Glomus caledonium* y *Acaulospora laevis* se retrasa a partir de potenciales de -2.2 MPa (Tommerup, 1984). Este retraso observado en la germinación de muchas esporas al disminuir el potencial hídrico del suelo es debido a la necesidad de un periodo de tiempo superior para conseguir la hidratación de la espora previa a la germinación (Tommerup, 1983). Hay que considerar, sin embargo, que la mayor parte de la hidratación de la espora se hace a partir de la fase vapor del agua en el suelo, por lo que se necesitarían potenciales de -3 a -4 MPa para inhibir completamente la germinación.

### 1.2.1.1.3. pH

El pH óptimo para la germinación de la mayoría de los hongos para los que ha sido determinado oscila entre pH 6-7, aunque se han observado germinaciones a pH inferiores y superiores, con variaciones interespecíficas. La variación de las respuestas de las plantas a la colonización por un determinado hongo VA, según el pH alcalino o ácido del suelo, han sido atribuidas a un efecto del pH en las fases del hongo en el suelo (Mosse *et al.*, 1981).

#### *1.2.1.1.4. Nutrientes inorgánicos del suelo*

Se ha demostrado la existencia de un efecto negativo de ciertos nutrientes inorgánicos, por ejemplo fosfato, en la germinación de esporas en agar. Los niveles en los que este efecto depresivo ocurre no suelen corresponderse con los niveles reales de nutrientes observados en suelo. Los metales pesados tienen un efecto negativo en la germinación y en el crecimiento de hifas pero no se sabe si existe variación entre cepas, aisladas o no, de lugares contaminados. De forma similar se han encontrado elevadas concentraciones de esporas en suelos salinos, sin embargo no se conocen sus características ni si han desarrollado factores de ajuste osmótico.

### *1.2.1.2. Crecimiento de hifas a partir de propágulos germinados*

Las esporas contienen una elevada cantidad de material de reserva (lípidos) y la maquinaria metabólica y genética necesarias para iniciar el crecimiento de las hifas (Beilby y Kidby, 1980). Esta red de hifas coloniza un volumen del suelo hasta encontrarse con la raíz de un hospedador potencial, durante este periodo se establece un flujo citoplasmático rápido y bidireccional entre las hifas y la espora (Pons y Gianinazzi, 1984). Los métodos par el estudio de este crecimiento son escasos y laboriosos ya que implican observaciones microscópicas junto con técnicas de tinción suplementadas, según los casos por técnicas bioquímicas, inmunológicas y pedológicas.

Durante el crecimiento saprofítico del hongo, antes de la colonización del hospedador, el micelio se ve sujeto a la influencia de distintos factores. En el micelio los efectos del potencial hídrico son más marcados que en la germinación de esporas (Tommerup, 1983), así mismo se han observado efectos de la temperatura en el crecimiento de micelio, pero las observaciones son contradictorias y varían según la colección de esporas estudiada. El impacto de la microbiota del suelo en el crecimiento saprofítico del micelio VA puede ser determinante para el éxito de la colonización, Calvet (1989) demostró la existencia de interacciones positivas y negativas sobre el crecimiento del micelio asociadas a la presencia de microorganismos estimuladores o inhibidores en el sustrato de crecimiento.

### 1.2.2. Desarrollo de la Micorriza

Una vez que la hifa infectiva llega a la superficie de la raíz se forma un aprensorio sobre las células de la epidermis. Se ignoran los mecanismos de reconocimiento entre hongo y raíz y si la penetración de este es mecánica o si viene mediada por un sistema enzimático. Lo cierto es que el hongo no penetra por lesiones de la raíz, es decir que se necesita un 'sitio' fisiológicamente funcional para la penetración (Hayman, 1983). Una vez que el hongo ha penetrado en la raíz se extiende mediante hifas distributivas inter e intracelularmente en la parte externa del córtex radical. A los pocos días de iniciada la infección y por divisiones dicotómicas repetidas de hifas intracelulares se forman los arbuscúlos, estructuras especializadas de las micorrizas VA en el intercambio de nutrientes y metabolitos con la planta hospedadora. Este intercambio se realiza en la interfase de los arbuscúlos con el citoplasma de la célula cortical, entre los plasmalemas del hongo y de la célula hospedadora. La pared del hongo en las penetraciones intracelulares queda reducida a un mínimo y prácticamente desaparece en las ramas finas del arbuscúlo (Bonfante-Fasolo, 1984). El plasmalema del hongo se enriquece de inclusiones de glucógeno, polifosfatos, lípidos y polisacáridos, su pared pasa a ser de pluri a monoestratificada y no es quitinosa como la membrana de las hifas del micelio externo. La membrana plasmática de la célula vegetal se pliega alrededor de las hifas ramificadas del hongo (Toth y Miller, 1984) y se producen cambios que son fruto de un aumento considerable del metabolismo celular por el incremento de la respiración, aumento del tamaño del nucléolo, del retículo endoplasmático y de la actividad del aparato de Golgi. Ambas membranas, la del hongo y la del hospedador, tienen actividad ATPásica incrementada, mientras que tal actividad disminuye considerablemente en los arbuscúlos degenerados (Marx *et al.*, 1982), indicando la existencia de una modificación especializada de la membrana del hospedador alrededor del arbuscúlo. Esta interfase intracelular, donde se reduce al mínimo el material de la pared y donde están presentes, en ambos simbioses, los sistemas enzimáticos capaces de generar gradientes de energía para el transporte activo, es propia de las MVA. Estos cambios que revierten totalmente en el momento de la degeneración del arbuscúlo son característicos de la simbiosis y denotan un alto grado de especialización. No se encuentran en infecciones patogénicas en las que el

transporte es unidireccional (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988).

Posteriormente a la formación de arbusculos se forman las vesículas que tienen función de almacenamiento de reservas, mayoritariamente de tipo lipídico, aunque también pueden contener glucógeno en algunas ocasiones. Estas vesículas se desarrollan inter e intracelularmente y se asemejan a clamidosporas incipientes. La colonización intraradical se extiende hasta llegar a su nivel máximo que depende de la planta (Estaún *et al.*, 1987), de su estado nutricional (Buwalda *et al.*, 1984), del hongo colonizador (Wilson, 1984) (Abbott y Robson, 1985a) y de las características del suelo (Abbott y Robson, 1985a).

Simultáneamente al desarrollo intraradical, las hifas de penetración se ramifican externamente y dan lugar a una red tridimensional de micelio sobre la que se forman esporas de resistencia. La mayor o menor extensión del micelio externo y su distribución son factores clave en la respuesta de la planta a su micorriza (Abbott y Robson, 1985b) (Graham *et al.*, 1982) y depende de la especie del hongo, de la planta hospedadora y de factores característicos del suelo.

## *2. Efectos de las micorrizas VA en el crecimiento*

### *2.1. Nutrición*

Los hongos formadores de micorrizas VA empezaron a ser estudiados en detalle una vez demostrada su importancia en la captación de nutrientes de las plantas hospedadoras (Mosse, 1957). Esta mejora en la nutrición y por consiguiente en el crecimiento de las plantas micorrizadas en relación con las no micorrizadas puede ser debida a tres factores:

Reducción de la distancia de recorrido de los nutrientes asimilables del suelo hasta la raíz (Rhodes y Gerdemann, 1975).

Diferencias entre características de absorción radical de nutrientes entre plantas micorrizadas y no micorrizadas (Cress *et al.*, 1979).

Modificación de la disponibilidad de los nutrientes para las plantas hospedadoras a través de las hifas del hongo VA.

A la vista de los resultados publicados, el primero de los factores parece ser el más importante, por lo que los efectos de las micorrizas en la nutrición serán más evidentes para aquellos nutrientes que difunden lentamente del suelo a la raíz y para aquellas plantas hospedadoras con raíces de tipo magnoloide, gruesas y con pocos pelos radicales (Baylis, 1975).

### *2.1.1. Fosfato*

La captación de fosfato por las plantas está limitada por el movimiento del fosfato hacia la raíz de la planta y no por la tasa de absorción de este nutriente por la superficie radical (Nye, 1977). Alrededor de la planta se crea una zona deficiente en fosfato debida a una tasa de absorción de P por la raíz superior a la de su difusión en la solución del suelo.

Las micorrizas favorecen la captación del P del suelo mediante un mecanismo físico ya que sus hifas al extenderse más allá de la zona de deficiencia de P alrededor de la raíz multiplican el número de sitios de absorción de P. Una vez dentro de la hifa el P se transloca hacia las estructuras intraradicales del hongo como gránulos de polifosfato, a una velocidad 1000 veces superior a la de su difusión pasiva en el suelo (Barea,1991). Una vez en las estructuras intraradicales del hongo el P se transfiere desde el hongo hasta las células radicales en el arbusculo mediante un proceso que se basa en un mecanismo activo a través de membranas vivas de hongo y planta (Smith, 1980) (Smith y Smith, 1990).

### *2.1.2. Otros nutrientes*

La absorción de otros nutrientes por las MVA sera más evidente en el caso de nutrientes que al igual que el P se desplacen por difusión ya que para éstos también se crearán zonas de agotamiento alrededor de la raíz. Este es el caso del amonio (Barea,1991) y de algunos micronutrientes como el Cu y el Zn (Gilmore, 1971), (Lambert *et al.*, 1979), (Tinker y Gildon, 1983). Las deficiencias en algunos micronutrientes observadas en situaciones con un exceso de abonado en P podrían ser debidas a una disminución en la colonización VA, causada por el exceso de este nutriente, y que dificultaría la absorción de los micronutrientes más allá de la zona de agotamiento radical.

## *2.2. Efectos no nutricionales*

### *2.2.1. Depresión del crecimiento*

Existen descripciones sobre el efecto negativo que la inoculación con hongos formadores de MVA tiene en algunas ocasiones sobre el crecimiento de las plantas, sobretodo los casos en los que el P no es un elemento limitante. La depresión del crecimiento observada puede persistir o ser transitoria. Puede deberse a la introducción inadvertida de patógenos de raíz junto con el inóculo (Hall y Kelson, 1981), en este caso la depresión del crecimiento será persistente. En los casos en que esta depresión no esté asociada a un patógeno se ha sugerido que podría ser debida a la competencia entre el hongo y la planta por fotosintato. Una de las causas de esta competencia podría ser una colonización interna desequilibrada, especialmente en el momento del trasplante de un sustrato a otro. Este tipo es transitorio y cesa al ajustarse la colonización VA con los factores ambientales (Abbott y Robson, 1984).

### *2.2.2. Estimulación del crecimiento*

La estimulación del crecimiento en las plantas colonizadas por hongos formadores de MVA es debida fundamentalmente a una mejora nutricional. Sin embargo se han sugerido otros mecanismos por los que las MVA pueden afectar al crecimiento de la planta mediante una acción no nutricional (Schultz *et al.*, 1979):

Producción de fitohormonas (Allen *et al.*, 1982).

Mejora de la estructura del suelo mediante la formación y estabilización de agregados (Thomas *et al.*, 1986).

Protección de la planta frente a patógenos (Calvet, 1989).

Mejora de la absorción hídrica (Safir y Nelsen, 1981).

Estos mecanismos, aunque no han sido estudiados en profundidad, no parecen ser totalmente independientes de la nutrición de la planta, sino que representarían una faceta más sofisticada de los resultados de la mejora nutricional debida a las MVA.

### *2.3. Efectos diferenciales de distintas especies y cepas*

La simbiosis MVA se ha considerado como no específica ya que dada una planta hospedadora en un suelo de características determinadas cualquier hongo adaptado a dichas características formará la simbiosis. Se han determinado, sin embargo, efectos diferenciales en la respuesta de distintas plantas hospedadoras a la colonización por un mismo hongo en las mismas condiciones (Azcón y Ocampo, 1981) y, por otra parte, se han observado efectos diferenciales de distintos hongos en la colonización de una misma planta hospedadora.

Esta respuesta que corresponde a la eficacia de la simbiosis viene determinada por, al menos, 4 factores que dependen del hongo (Abbott y Robson, 1982):

Capacidad para formar una red de hifas extensa y bien distribuida en el suelo.

Capacidad para colonizar el sistema radical en crecimiento (especialmente en lo que se refiere a la formación de arbusculos).

Capacidad de las hifas para absorber P del suelo.

Longevidad del sistema de transporte de P a lo largo de las hifas hacia la raíz.

Estos factores pueden variar según las especies e incluso las según cepas y ecotipos de hongos VA. La única de estas cuatro características, que varía experimentalmente entre hongos VA, colonizando la misma especie de planta hospedadora, es la capacidad para colonizar el sistema radical.

### *3. Ecología de los hongos formadores de micorrizas VA*

#### *3.1. Dependencia micorrízica*

La presencia de micorrizas VA es general en ecosistemas naturales y agrícolas en todos los climas que permiten el desarrollo vegetal ya sea en zonas tropicales, templadas o desérticas.

Se han observado, sin embargo, familias enteras de plantas que no son hospedadoras de los hongos VA, ni forman ningún otro tipo de simbiosis micorrízica, Trappe (1987) las denomina autotróficas. Esta 'autotrofia' puede asociarse con características fungicidas intrínsecas de la planta como la vía metabólica glucosinolato-mirosinasa (Capparales) o la producción de betalaínas en lugar de antocianinas (Caryophyllales), en estos casos la aparición de la 'autotrofia' habría sido una necesidad derivada de la evolución de estos sistemas metabólicos antifúngicos que además de afectar a hongos patógenos afectan a los hongos simbioses.

Por el contrario otro grupo de plantas aparecen como micotrofas obligadas, es decir no pueden crecer adecuadamente sin formar la simbiosis, cualquiera que sea el tipo y la cantidad de abonado (Cítricos).

Finalmente podemos distinguir un tercer grupo de plantas, el más numeroso, las plantas micotrofas facultativas, plantas que forman la simbiosis pero que en determinadas condiciones pueden crecer sin ella. En este grupo podemos definir grados de dependencia de cada una de las especies e incluso cultivares o ecotipos respecto de la micorrización y observar una serie de tendencias que están asociadas con el hábitat de la planta. Las especies recolectadas en entornos tropicales son generalmente micorrízicas, mientras que en ecosistemas ártico-alpinos se encuentra un mayor porcentaje de plantas no colonizadas por hongos VA. Los hábitats xéricos tienen una proporción elevada de micotrofismo, que aumenta si excluimos a las cariofiláceas que crecen en este tipo de hábitats y que son 'autótrofas' por sus características de familia. En los hábitats halófitos encontramos un porcentaje de micotrofia moderado, con un número elevado de micotrofas facultativas que apuntan la hipótesis de la existencia de algunas especies de hongos

mejor adaptadas a estos hábitats que otras. En los hábitats hidrófitos la norma es la 'autotrofia' aunque se han observado algunas micotrofas facultativas formando la simbiosis en dichas condiciones.

;

## 3.2. Supervivencia y diseminación de propágulos de hongos formadores de micorrizas VA

Los factores que influyen en la supervivencia y en la diseminación de los hongos formadores de MVA pueden agruparse en dos grandes grupos: factores bióticos y factores abióticos.

### 3.2.1. Factores bióticos

Los hongos formadores de micorrizas VA se desarrollan en el seno de la micorrizosfera y por tanto su supervivencia y su diseminación estarán determinadas por los factores que interaccionan con la microbiota asociada, que dependerá de la planta y del sustrato de cultivo. La interacción entre la microbiota propia de varios sustratos de cultivo y los hongos formadores de micorrizas ha sido tema de un trabajo reciente (Calvet, 1989) en el cual se han descrito interacciones positivas en las que una cepa de *Trichoderma aureoviride* estimulaba el crecimiento saprofito y la colonización de las plantas mientras que una cepa de *Penicillium* spp. no tenía efecto y una cepa de *Penicillium decumbens* afectaba negativamente tanto al crecimiento como a la colonización de *Glomus mosseae*.

El efecto de la especie de planta en el desarrollo del hongo VA no ha sido aún suficientemente estudiado ya que se han encontrado resultados diversos, algunas veces contradictorios. Las plantas hospedadoras pueden promover el establecimiento de pequeños núcleos de colonización en plantas no hospedadoras (Ocampo *et al.*, 1980), mientras que las plantas no hospedadoras pueden afectar negativamente a la colonización de las plantas hospedadoras (Morley y Mosse, 1976). La existencia previa de plantas hospedadoras puede favorecer (Trinick y Mosse, 1975) o entorpecer (Ocampo *et al.*, 1980) la colonización de una nueva planta hospedadora, ello dependerá del tipo de planta y de las condiciones de crecimiento.

La especie o variedad de la planta hospedadora influirá también en el desarrollo del micelio del hongo y en su esporulación (Schenck y Kinloch, 1980) (Camprubí y Calvet, com. pers.).

Además de los efectos de la planta y del sustrato de cultivo en la microbiota hay que considerar otros factores que influirán en el desarrollo y diseminación de los hongos VA, como la intervención de roedores, insectos y pájaros en la diseminación de propágulos (Trappe y Maser, 1976) (McIlven y Cole, 1976). El efecto de las prácticas agronómicas en el desarrollo y extensión de la colonización y en la supervivencia de los propágulos. Tanto el barbecho como el cultivo de una planta no hospedadora tienen como efecto la disminución de la colonización de la siguiente cosecha de plantas hospedadoras. Esta disminución, más marcada en el caso del barbecho, no es permanente, sino que al final del ciclo vegetativo las plantas hospedadoras alcanzan un nivel similar de colonización, independientemente de los niveles de inóculo iniciales (Daft y Nicolson, 1968). Los pesticidas tienen, en general, un efecto negativo sobre los hongos VA, aunque en algunas ocasiones se han observado hongos aislados de parcelas agrícolas que, incluso, eran estimulados mediante la aplicación de algunos tipos de pesticidas (Plenchette y Perrin, 1991).

### 3.2.2. Factores abióticos

En la dispersión y supervivencia de hongos V. intervienen muchos factores abióticos interrelacionados que influyen en el estado de la planta hospedadora que es determinante en la supervivencia del hongo VA (Mosse *et al.*, 1981).

#### Temperatura:

La temperatura tiene efectos complejos, por una parte su aumento moderado favorece la colonización interna, la esporulación, el crecimiento de raíces y por lo tanto del micelio fúngico, la germinación de esporas y, probablemente, el número de puntos de infección. Sin embargo el aumento de temperatura al incrementar toda actividad metabólica aumentará la actividad de la microbiota, y por lo tanto la lisis de micelio fúngico y el hiperparasitismo de esporas.

#### Luz:

El aumento de luz ya sea en intensidad (Furlan y Fortin, 1977) como en periodo (Johnson *et al.*, 1982) favorece la colonización de las raíces de la planta hospedadora.

#### pH:

El pH del suelo afecta a la supervivencia de los hongos VA en cuanto existe una adaptación de especies y aislados a ciertos pH del suelo, dependiendo la germinación de estos pH. Siqueira (Siqueira *et al.*, 1982) ha demostrado que existe una interacción entre el pH y el contenido nutritivo del medio en la germinación de esporas, aunque el mecanismo por el cual el pH afecta a la germinación, parece no estar ligado a efectos secundarios del pH en la disponibilidad de nutrientes, ya que la germinación de esporas no se ve afectada por la concentración de nutrientes inorgánicos en el suelo (Koske, 1981).

### Nutrientes inorgánicos:

A pesar que los nutrientes inorgánicos no parecen tener un efecto importante en la germinación de esporas, si lo tienen en la colonización de las raíces de la planta hospedadora y posterior esporulación del hongo (Hayman, 1975). Este efecto detrimental de la simbiosis causado por el fósforo y otros nutrientes como el nitrógeno y el zinc, siempre en interacción con dosis moderadas-elevadas de fósforo viene mediado por la planta (Menge *et al.*, 1978) (Graham *et al.*, 1981) que creciendo en un sustrato rico en fósforo produce esta disminución en la colonización interna y en la esporulación.

### Nutrientes orgánicos:

La adición de compuestos orgánicos al suelo, esterilizado o no, y a medios de agar tienen un efecto inhibitorio de la germinación. El mecanismo de este efecto podría ser en los casos de medios estériles un efecto fungistático (Siqueira *et al.*, 1982) y en los casos de suelo no esterilizado se ha sugerido que la adición de un compuesto orgánico como la glucosa produciría un incremento de la actividad de la microbiota rizosférica (Koske, 1981), que tendría como consecuencia un incremento en la lisis e hiperparasitismo de las esporas de hongos VA y por lo tanto una disminución en la germinación y subsiguiente eficacia colonizadora del hongo.

### Potencial hídrico:

El potencial hídrico del suelo influye en la colonización interna de la planta hospedadora, probablemente a través de un mecanismo mediado por la disponibilidad de nutrientes, que será inferior en un suelo con bajo potencial hídrico, junto con la propia disponibilidad hídrica. Así se produce una mayor colonización en condiciones de fertilidad elevada. Un potencial hídrico bajo influye en la germinación de esporas, ya que éstas, al no poder hidratarse, permanecerán en estado de quiescencia, es decir, que un potencial hídrico bajo favorece la conservación del inóculo en forma de esporas (Hall, 1979). Sin embargo, los propágulos constituidos por trozos de micelio y de raíces no resultarán favorecidos por este sistema de conservación (Gould y Liberta, 1981), aunque se ha descrito una buena conservación de este tipo de propágulos, en suelo parcialmente seco, en comparación con su conservación

en suelo húmedo (Tommerup y Abbott, 1981).

## *4. Relaciones hídricas y salinidad*

### *4.1. Absorción y transporte de agua*

La pérdida de agua por las hojas en la transpiración de la planta es un proceso inevitable pero necesario para la vida vegetal, ya que entre otros, contribuye a constituir un sistema circulatorio abierto y posibilita el intercambio de CO<sub>2</sub> para la fotosíntesis.

Para compensar esta pérdida, las raíces absorben agua a partir del suelo con lo cual se establece un flujo de agua a través de la planta desde el suelo hasta la atmósfera, es el denominado continuo suelo-planta-atmósfera (Van der Honst, 1948) (Phyllips, 1966) (Passioura, 1982).

La absorción hídrica radicular se realiza activamente a causa de la absorción pasiva, generada por el flujo transpiratorio y de la diferencia de potencial osmótico establecido entre la raíz y el suelo, actuando ésta como un osmómetro. Es la llamada presión radical, que da lugar, entre otros, a la gutación, a la recuperación nocturna de los déficits hídricos, a la primavera de los árboles caducifolios. Ambos mecanismos actúan sinérgicamente (Kramer y Kozlowski, 1979).

### 4.1.1. *El agua en el suelo*

El agua que forma parte de un determinado volumen de suelo es la procedente del riego o de la precipitación incidente en la superficie más lo que llegue lateralmente por escorrentía superficial o desplazamiento subsuperficial. Una vez el agua está en el suelo se distribuirá en él de acuerdo con sus características físicas, textura y estructura, que condicionarán la disponibilidad del agua para los vegetales. El agua en el suelo igual que en las plantas (Slatyer y Taylor, 1960) presenta un potencial inferior al agua pura, por lo que su energía potencial denominada potencial hídrico ( $\Psi_h$ ) tiene valores negativos; es decir que para extraer el agua de donde se encuentra y llevarla a las mismas condiciones del agua pura habría que realizar un trabajo externo. Este potencial hídrico de un suelo (de una zona determinada), puede expresarse como una suma de potenciales:

$$\Psi_h = \Psi_m + \Psi_\pi + \Psi_g + \Psi_p$$

$\Psi_m$ : Potencial matricial. El más importante en suelos no saturados, depende esencialmente de las características del suelo: textura, composición, formación de agregados, etc, que determinan las atracciones adsorptivas e interfaciales entre el agua del suelo y la matriz del suelo. Es función del contenido en agua del suelo.

$\Psi_\pi$ : Potencial osmótico. Depende del acúmulo de sales solubles en el suelo. Es importante en suelos salinos y suelos muy abonados de zonas con escasa precipitación.

$\Psi_g$ : Potencial gravitacional. Representa el agua que se pierde de un punto determinado por gravedad. Es función lineal de la profundidad de la zona de suelo que estamos considerando, respecto al nivel de las aguas freáticas. Suele ser igual a cero en suelos no encharcados.

En muchos casos no se distingue entre  $\Psi_m$  y  $\Psi_\pi$  asimilándose el último al primero, de forma que:

$$\Psi_h = \Psi_m + \Psi_g$$

Por lo que el potencial matricial dependerá de las características físico-químicas del suelo.

$\Psi_p$ : Potencial de turgencia, es decir la presión que ejercerá el agua sobre la matriz del suelo. Tiene valores positivos, y solo se produce en suelos saturados.

A fin de describir la dinámica del estado del agua en el suelo Darcy (1859) estableció la siguiente ecuación para describir el flujo de agua entre dos puntos del suelo separados por una distancia S:

$$J \text{ (flujo de agua)} = -K \, d\Psi_h/dS$$

K= conductividad hidráulica

$d\Psi_h/dS$ = gradiente hidráulico

K no es un valor constante sino que es función del grado de saturación del suelo.

#### 4.1.2. Absorción de agua por las raíces

Para que la absorción por las raíces tenga lugar ha de haber un flujo de agua desde el suelo hacia la superficie de la raíz, lo que implica la existencia de un gradiente de  $\Psi_h$  en el suelo perirrízico (suelo rodeando cada una de las raíces). La importancia de este gradiente dependerá de la velocidad de flujo del agua hasta la superficie de la raíz y de la conductancia hidráulica del suelo en la superficie radical.

Passioura (1983) establece una ecuación que describe este flujo de agua hacia la raíz, introduciendo el concepto de difusibilidad  $D$  como función de la conductividad hidráulica  $K$ , del potencial matricial  $\Psi_m$  y del contenido volumétrico en agua del suelo  $\theta$ .

$$\int_{\theta_b}^{\theta_a} D(\theta) d\theta \approx l (1/2 - \ln b/a)/2\pi$$

siendo :

$l$	=	unidad activa de raíz
$a$	=	radio de la raíz
$b$	=	radio del cilindro perirrízico

Este modelo ha sido confirmado por algunos resultados experimentales (Passioura, 1980), sin embargo no puede aplicarse a otros (Faiz y Weatherley, 1978), en los cuales parece existir una resistencia hidráulica inusual en la interfase raíz-suelo. La existencia de esta resistencia en la interfase dependería de la proporción de epidermis de la raíz que estuviese en contacto con la solución del suelo, este valor sería función de  $\theta$  (contenido en agua del suelo), de forma que la conductancia hidráulica del sistema suelo-raíz dependería más de  $\theta$  que de  $D$  (Hekelrath *et al.*, 1977). Si esto fuera cierto la mayor resistencia a la entrada de agua en la raíz (y por consecuencia en la planta) residiría en la epidermis radical y no en la endodermis (Banda de Caspary).

Passioura (1982) atribuye esta resistencia a que a medida que el suelo va desecándose la raíz encoge y hay pérdida de contacto hidráulico entre ésta y el suelo. Si la sede de la resistencia hidráulica radical es la endodermis el potencial hídrico del córtex estará más próximo al potencial hídrico del suelo que al potencial hídrico del xilema. El potencial hídrico del xilema es característicamente más negativo que el potencial hídrico del suelo. En cuanto se produce un retraimiento de la raíz, ésta pierde contacto con el suelo y por consecuencia el potencial hídrico del córtex tiende a igualarse con el potencial hídrico del xilema lo cual causaría un retraimiento aún mayor, disminuyendo la proporción de epidermis radical en contacto con la solución del suelo.

En los casos en que el secado del suelo es progresivo, las raíces pueden mantener su turgencia mediante osmoregulación, sin embargo si la disminución del potencial hídrico del suelo se produce rápidamente las raíces pueden no mantener su turgencia y producirse retraimiento, pérdida de contacto y aparición de resistencia hidráulica en la interfase raíz-suelo.

Una vez el agua ha llegado a la superficie de la raíz, uno de los mecanismos que participan en su absorción por el córtex radical es la diferencia de potencial osmótico establecida entre la raíz y el suelo. Sabanin (1925) ya determinó que en una planta 'decapitada' el flujo de exudación del xilema era función de la diferencia de potencial osmótico entre la savia bruta y el medio externo, es decir:

$$J_v = L\Delta\pi$$

siendo L constante, el coeficiente de conductancia hidráulica.

Al considerar una planta entera hemos de tener en cuenta la transpiración, ya que el flujo de savia bruta ha de estar equilibrado con el agua perdida por las hojas. Este flujo es el segundo de los dos mecanismos que participan, de forma sinérgica en la absorción radical. La transpiración crea pues un potencial de succión que se extiende hasta las raíces a través del xilema. En el córtex de la raíz y en la endodermis existe una resistencia al flujo de agua que produce una caída de presión hidrostática a nivel de las tráqueas de la

raíz en respuesta a la cual el agua pasa del medio externo a la endodermis. Este flujo puede describirse mediante la siguiente ecuación:

$$J_v = L \Delta P$$

siendo  $\Delta P$  la diferencia de potencial hídrico entre el xilema y el medio externo.

$J_v$  es el flujo de agua a través de la raíz, flujo que en un sistema en equilibrio será igual a la transpiración. En una planta entera también hay transporte de sales junto con el agua, de forma que al combinar las dos ecuaciones que describen el flujo de agua a través de una planta se obtiene:

$$J_v = L(\sigma \Delta \pi + \Delta P)$$

Los dos términos de la suma tendrán mayor o menor importancia dependiendo de la velocidad de transpiración. Si la velocidad de transpiración es baja,  $\Delta P$  también será baja y  $J_v$  dependerá mayoritariamente de  $\Delta P$ , al revés, si aumenta la velocidad de transpiración se incrementa la importancia de  $\Delta P$  en el flujo. El incremento de  $\Delta P$  para velocidades de transpiración elevadas deja de ser lineal (Lopushinsky, 1964) sugiriéndose un cambio en la conductancia hidráulica ( $L$ ) de la raíz. La existencia de este cambio en la conductancia hidráulica ha sido apoyado por posteriores trabajos (Black, 1974) (Michel, 1977) pero también refutado (Fiscus, 1975) (Newman *et al.*, 1974).

Investigaciones anatómicas y fisiológicas de las zonas de absorción en las raíces (Esau, 1960) (Brouwer, 1965) han demostrado que la zona donde la absorción de agua se produce con mayor rapidez reside entre los meristemos apicales y la zona donde se inicia la suberización. A partir del inicio de la suberización la velocidad de absorción disminuye rápidamente.

La zona de absorción rápida coincide con la zona de mayor desarrollo de pelos radicales, y aunque su conductancia hidráulica no parece ser mayor que la de otras células epidérmicas no suberizadas, incrementan sensiblemente la superficie de absorción efectiva.

En el mismo sentido puede considerarse el micelio de las micorrizas, tanto ecto como endomicorrizas. Este micelio puede inducir un efecto similar al de los pelos radicales, que sin embargo persistirá en partes de la raíz ya suberizadas en las que normalmente no se encuentran pelos radicales.

### *4.1.3. Transporte de agua por la raíz*

El córtex, la endodermis y la estela de la raíz imponen una resistencia hidráulica de cinco órdenes de magnitud superior a la impuesta por las tráqueas del xilema y constituyen la mayor resistencia al flujo del agua a través de la planta.

Existen tres vías de transporte del agua a través de estos tejidos:

- vía vacuolar
- vía apoplasto
- vía simplasto

Indudablemente habrá transporte de agua mediante las tres vías, sin embargo el porcentaje de agua transportado por cada una de ellas dependerá de su resistencia relativa al flujo de agua.

Vía vacuolar:

El agua para llegar al xilema mediante esta vía se encontrará con dos puntos de resistencia en cada una de las células, uno a la entrada y otro a la salida. Únicamente considerando el córtex radical el número de células oscila de 5 a 10. Parece pues evidente que, a menos que las células de la raíz de una planta determinada sean excepcionalmente permeables al agua, la vía vacuolar no tiene preponderancia en el flujo de agua a través de la raíz.

Vía apoplasto:

El agua pasa a través de las paredes celulares, entre las fibras de celulosa, uniéndose en respuesta a un gradiente de presión hidrostática. Esta vía se ve interrumpida por la banda de Caspary, impermeable al agua, que fuerza la penetración del agua en la célula endodérmica, para llegar vía simplasto a las células de la estela, desde dónde puede volver al apoplasto para su transporte hasta las traqueidas del xilema.

**Vía simplasto:**

El agua y las sales minerales penetran en el plasmalema de las células epidérmicas y llegan a las traqueidas del xilema atravesando el córtex y la estela mediante los plasmodesmos existentes entre las células de estos tejidos.

Ambas vías simplasto y apoplasto entrañan el cruce de dos membranas por el agua y los solutos. Se diferencian sin embargo en el lugar del cruce y en la naturaleza física de la vía de transporte. En la vía apoplasto el agua y solutos discurren entre fibrillas de celulosa y en la vía simplasto a través del citoplasma y de los plasmodesmos.

#### *4.1.4. Transporte de agua desde las raíces hasta las hojas*

El transporte de agua desde la raíz hasta las hojas a través del tallo tiene lugar en los capilares del xilema (vasos y traqueidas del sistema vascular). Este transporte es un fenómeno puramente físico, de flujo en masa, que no implica células vivas, como ya demostró Strasburger (1891) observando el transporte de ácido pícrico en plantas 'decapitadas'. Dixon (1914) propuso una teoría que explicaba el transporte de agua en el xilema por la existencia de una columna continua de agua en los capilares sometida a tensión, causada por la transpiración que arrastaba la columna hacía las hojas. Sin embargo no fue hasta que Scholander (1965) midió la presión negativa del xilema que la teoría inicialmente postulada por Dixon se generalizó. Las premisas de esta teoría aceptadas actualmente son las siguientes:

El agua líquida en una planta intacta se considera como una fase continua que se extiende desde las paredes de los microcapilares del mesófilo hasta las paredes de los microcapilares de las raíces a través del sistema conductor del xilema.

Las columnas de agua persisten en los vasos y traqueidas del xilema debido a la cohesión entre moléculas de agua, a la adhesión con las paredes del sistema y al tamaño del menisco que se produce en la interfases agua-aire.

La energía necesaria para el ascenso del agua es generada por la transpiración en las hojas, lo cual promueve que el conjunto se encuentre bajo tensión (Tyree y Sperry, 1989).

Todo ello significa que la transpiración reduce el contenido de agua a nivel foliar, y por lo tanto  $\Psi_{\text{hoja}}$  disminuye. Teniendo en cuenta la necesidad de equilibrio entre potenciales hídricos de tejidos adyacentes y la continuidad de la fase líquida, la presión negativa generada es transmitida por cohesión a lo largo del xilema hasta la raíz donde influirá en el flujo de agua del medio externo que atraviesa el córtex radical (determina  $\Delta P$ ).

El potencial medido por Scholander *et al.*, (1965) es el  $\Psi_{\text{xilema}}$  pero debido al equilibrio entre potenciales  $\Psi_{\text{xilema}} = \Psi_{\text{hoja}}$ .

## *4.2. Relaciones hídricas en las células vegetales*

El agua líquida aunque representa una fase continua en células y tejidos de una planta viva puede considerarse que a nivel celular está distribuida en dos regiones metabólica y morfológicamente distintas:

Agua del protoplasto englobada por las membranas citoplasmáticas, denominada agua del simplasto.

Agua del apoplasto, contenida en los espacios intercelulares, en contacto con la membrana plasmática, ligada a las paredes.

El agua líquida presente en el protoplasto está generalmente contenida en vacuolas, junto con solutos orgánicos e inorgánicos. Estos solutos son los que determinan la presión osmótica del contenido vacuolar que, a su vez, determina la presión osmótica celular. Sin embargo, el potencial osmótico no es el único componente del potencial hídrico de una célula, sino que tenemos que considerar el potencial matricial y el potencial de presión o turgencia.

El potencial de presión o turgencia, tiene valores generalmente positivos que resultan de los flujos osmóticos hacia el interior de la célula. La entrada de agua conlleva un aumento de volumen y por lo tanto la extensión de las paredes celulares. Esta extensión ha de resultar de la aplicación de una fuerza a la pared. La magnitud de esta fuerza es la turgencia. La turgencia puede tener valores negativos en fenómenos como la gutación.

El potencial matricial es debido, mayoritariamente, al potencial hídrico del agua en el apoplasto retenida en las paredes celulares por fenómenos de adhesión.

El agua en el apoplasto de las células foliares está prácticamente libre de solutos, ya que, si contuviera solutos disueltos se acumularían depósitos de sal en las células del mesófilo, con consecuencias desastrosas para la planta.

### *4.3. Relaciones hídricas en tejidos vegetales. Sus características e implicaciones ecológicas*

Los tejidos vegetales consisten en células interconectadas que funcionan formando un conjunto. Pueden estar constituidos por células homólogas o distintas, y, en ambos casos, estas células pueden tener protoplasto funcional o no.

En una situación de equilibrio, los potenciales hídricos de todos los tejidos de una planta son iguales, sin embargo, se observan variaciones en sus distintos componentes: potencial matricial, potencial osmótico y turgencia.

### 4.3.1. *Potencial matricial*

El potencial matricial de un tejido se concibió, originariamente, por analogía al potencial matricial del suelo, definiéndose como la componente del potencial hídrico, que dependía de las interacciones entre la matriz y el agua (Taylor y Slatyer, 1961). Tyree y Karamanos (1980) redefinieron este concepto, utilizando relaciones termodinámicas y de mecánica estadística. Las fuerzas matriciales son fuerzas interfaciales entre líquido y sólido. Estas fuerzas son de corto alcance y solo influyen a una pequeña fracción del volumen total de agua, incluso en aquellos sistemas con una relación superficie/volumen elevada, como en paredes celulares.

Como ejemplo, se puede considerar un poro de 20 nm de diámetro lleno de agua con un  $\Psi_h = -1,5$  MPa. La capa de agua, que se encuentra sujeta mediante fuerzas matriciales, es  $< 0.2$  nm. Para que esta capa de agua fuera parte substancial en la proporción de agua presente,  $\Psi_h$  debería ser inferior a -14 MPa, estos valores no se dan, normalmente, en tejidos vegetales vivos. Así pues, se puede considerar que el potencial matricial de los tejidos tiene valores prácticamente nulos y, por lo tanto, no representa una componente importante del potencial hídrico total.

### *4.3.2. Potencial osmótico*

La magnitud del potencial osmótico en las células vegetales determina el grado de hidratación del citoplasma y por lo tanto tiene implicaciones metabólicas y por consiguiente ecológicas considerables. Sin embargo en vegetales normales es difícil de medir el potencial osmótico de células individuales, y se evalúa el potencial osmótico de tejidos o estructuras. Al determinar el potencial osmótico de tejidos o estructuras vegetales se pueden cometer errores por sobrevaloración de  $\pi$ , ya que en la mayoría de los métodos medimos  $\pi_{\text{simplasto}} + \pi_{\text{apoplasto}}$  (ej. método del psicrómetro) y como ya hemos visto el agua en el apoplasto no contiene prácticamente solutos disueltos. No obstante cuando el valor que nos interesa no es el valor absoluto de  $\pi$  sino sus variaciones, el error cometido queda compensado.

La variación de  $\Psi_{\pi}$  que más se ha estudiado es su disminución en condiciones de estrés hídrico y salino (Walter, 1955) (Kreeb, 1963). En algunos casos la variación de  $\Psi_{\pi}$  se ha asociado a pérdida de agua de forma pasiva, aunque más recientemente se cree que existen fenómenos de ajuste osmótico y osmoregulación, particularmente importantes en plantas resistentes a la salinidad y a la sequía (Turner, 1979) (Wyn Jones, 1981).

### 4.3.3. Turgencia

La turgencia es una medida de la presión existente dentro de la célula como resultado de la cantidad de agua en el interior de la célula y de la elasticidad del tejido considerado (módulo de elasticidad).

$$\varepsilon = dP/dW \cdot W$$

dP = valor medio de la turgencia del tejido

W = peso del agua en el simplasto

La turgencia se mantiene aún cuando exista una disminución moderada del potencial hídrico de la planta. Ello permite que los estomas sigan funcionando y por lo tanto que la planta continúe asimilando CO<sub>2</sub> y creciendo. El mantenimiento de la turgencia se considera debido a cambios concomitantes en  $\Psi_{\pi}$  aunque no pueden descartarse variaciones en el módulo de elasticidad media,  $\varepsilon$ , que cada vez parecen más probables (Tyree y Jarvis, 1982).

Debido a las dificultades existentes para medir la turgencia de células y tejidos, actualmente se infiere el valor de la turgencia de los valores de  $\Psi_h$  y  $\Psi_p$ , considerando  $\Psi_m \approx 0$  y la ecuación:

$$\Psi_h = \Psi_{\pi} - P$$

## *4.4. Estrés hídrico y salinidad*

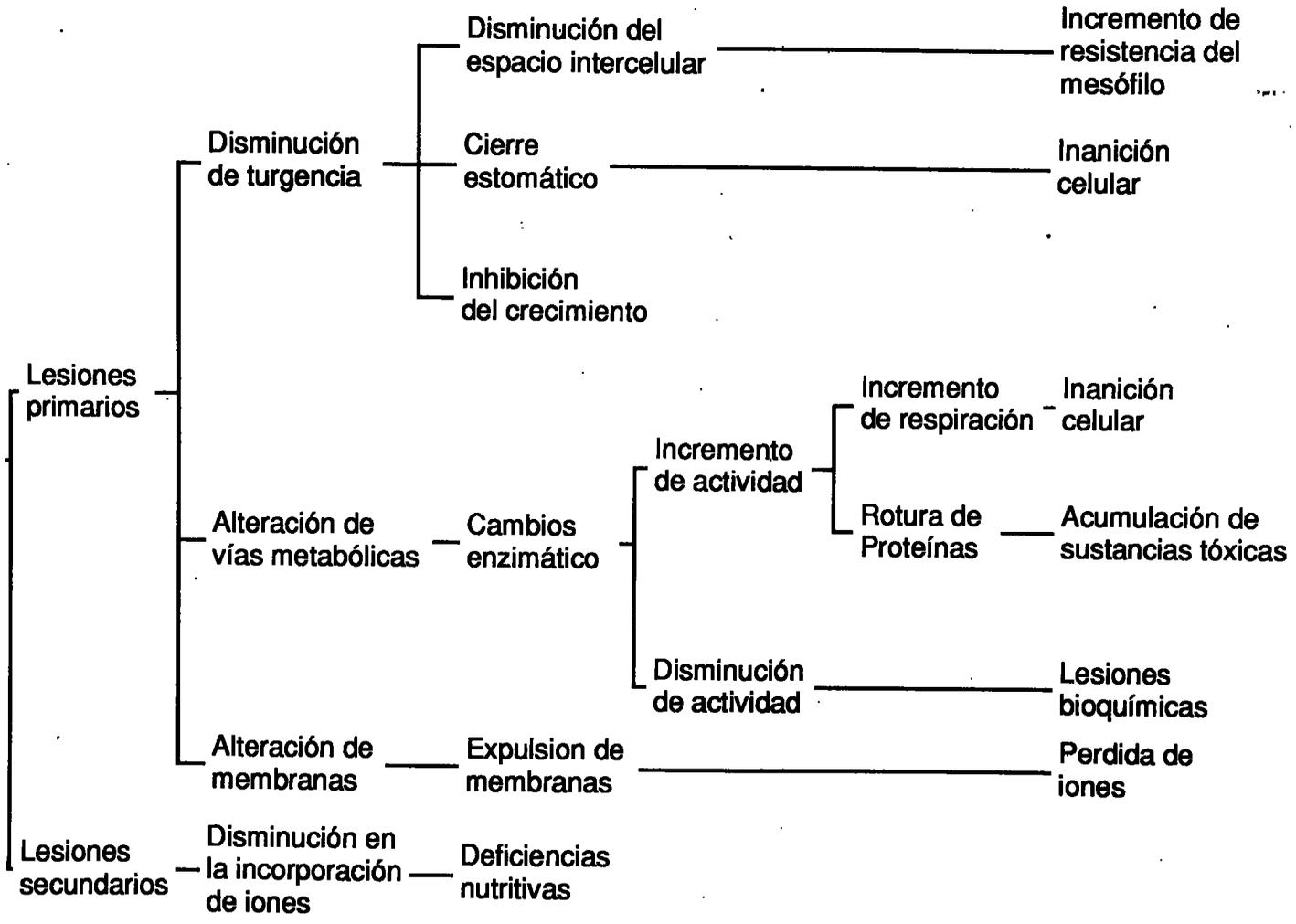
### *4.4.1. Estrés hídrico*

El abastecimiento de agua es un factor clave en la distribución de especies y las respuestas y adaptaciones de las especies al estrés hídrico son determinantes para su éxito en un nicho ecológico determinado.

Los déficits hídricos se producen por un desfase entre absorción y transpiración, que establece potenciales hídricos negativos en los tejidos vegetales, necesarios para crear un gradiente favorable de potencial entre la planta y el suelo. Los valores de los potenciales hídricos del suelo y de la atmósfera determinarán los potenciales hídricos desarrollados en la planta, y por lo tanto la magnitud del estrés hídrico a que estará sometida. El estrés hídrico no se desarrolla de forma homogénea en todo el vegetal, ya sea debido a diferencias microclimáticas o a diferencias en la especialización de los tejidos de la planta. Así las hojas más jóvenes tienen déficits hídricos menores que las hojas adultas ya que obtienen agua de éstas acelerando su senescencia.

Entre las lesiones causadas, Esquema 3, (Lewitt,1980) por el estrés hídrico cabe destacar la pérdida de turgencia lo cual dificulta la expansión celular, reduce el tamaño foliar y favorece el cierre estomático, incidiendo directamente en la fotosíntesis. También se producen alteraciones del metabolismo del nitrógeno y de los carbohidratos, de la síntesis de clorofilas y secundariamente se produce una disminución de captación de iones del suelo que causa deficiencias nutritivas.

Estrés hídrico:  
Deshidratación



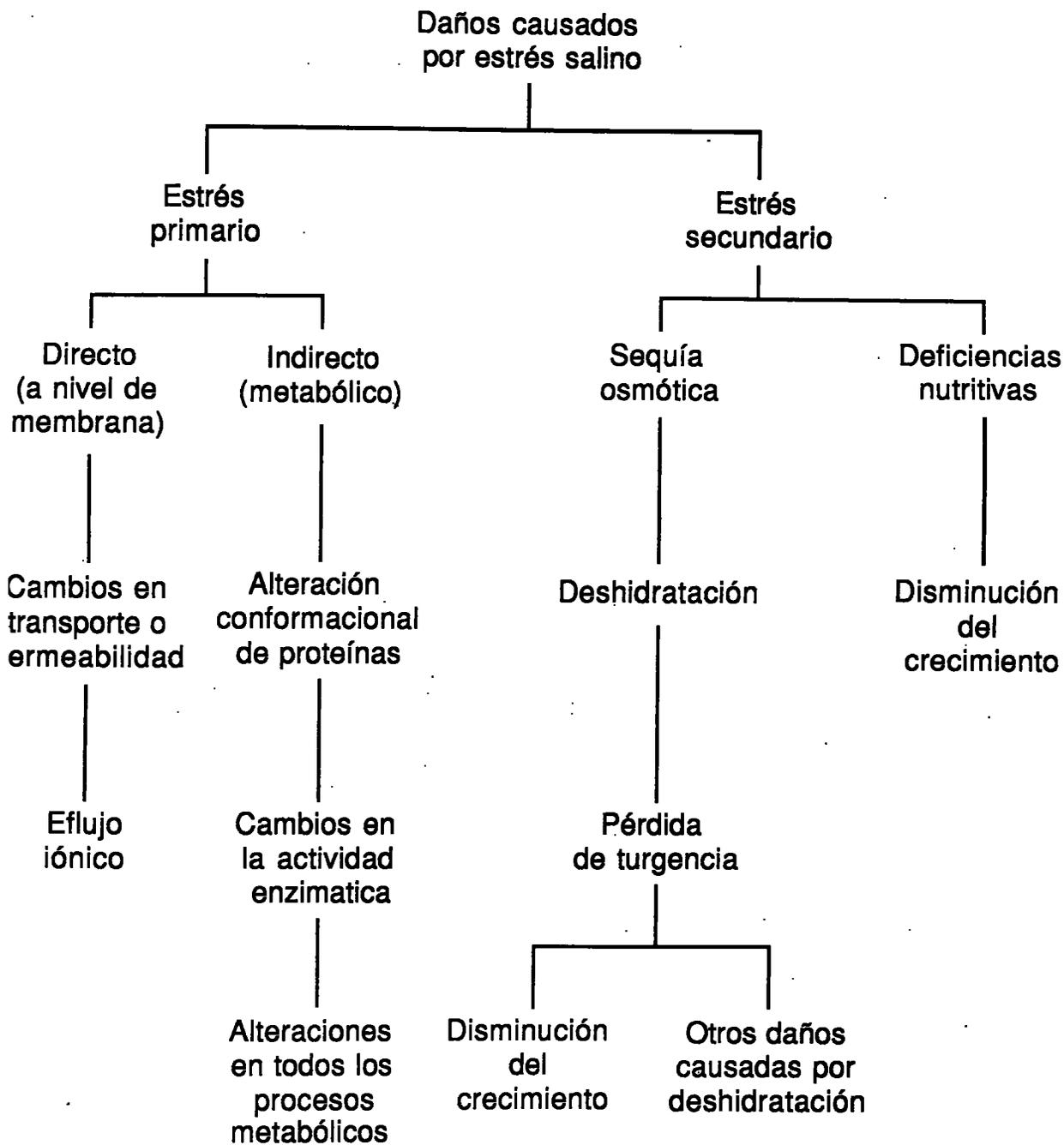
*Esquema 3:*  
Alteraciones causadas por el estrés hídrico.

#### *4.4.2. Salinidad*

Se considera como estrés salino aquel causado por concentraciones de sal que disminuyen el potencial hídrico de forma apreciable (0.5-1.0 bar). La mayoría de situaciones en que se produce están causadas por un exceso de sales sódicas en particular de NaCl. Los efectos de la salinidad pueden subdividirse en dos grandes grupos: estrés secundario: sequía osmótica y deficiencias nutritivas y estrés primario o toxicidad salina propiamente dicha cuyas características están esquematizadas en el Esquema 4 (Lewit, 1980).

**Esquema 4:**

Alteraciones causadas por el estrés salino.



#### *4.4.2.1. Sequía osmótica*

Existe una relación directa e inseparable entre estrés salino y estrés hídrico. La adición de sales produce una disminución del potencial osmótico del agua y por lo tanto el estrés salino expone a la planta a un estrés osmótico secundario o sequía osmótica. Cuando una planta es transferida desde un medio normal a otro medio con elevada concentración salina se produce un efecto de deshidratación osmótica, incluso a nivel foliar, aunque sean las raíces las únicas que estén en contacto directo con la solución salina. Esta deshidratación puede ser la causa directa de los daños debidos al estrés salino como son las disminuciones de crecimiento y de producción observadas en arroz (Ehrler, 1960) y en pistacho (Behboudian *et al.*, 1986) entre otros cultivos.

Este efecto tan marcado de la salinidad únicamente ocurre cuando el soluto no penetra en la planta, ya que si el soluto puede penetrar, y la planta es relativamente resistente a la presencia de NaCl en su citoplasma, el gradiente osmótico se reduce y los efectos no son tan extremos.

#### ***4.4.2.2. Toxicidad salina***

Las soluciones salinas producen además de sequía osmótica unos efectos directos de la sal sobre la planta que se han denominado efectos de toxicidad salina. La toxicidad salina es independiente del estrés osmótico ya que no se observa en soluciones de solutos orgánicos y es específica de la sal considerada ya que distintas sales tiene diferentes umbrales osmóticos de toxicidad.

La mayoría de los efectos de toxicidad salina se dan a nivel metabólico, aunque hay que tener en cuenta la existencia de una disminución del crecimiento, no explicable por fenómenos de sequía osmótica, y que ha sido atribuida a una redistribución energética para mantener bajos los niveles de Na celulares cuando la planta está inmersa en un medio de elevada concentración salina.

Los efectos de la toxicidad salina en el metabolismo son de difícil generalización ya que varían con la especie e incluso con la variedad de planta considerada y están asociados a mecanismos de resistencia/tolerancia a la salinidad específicos.

#### *4.4.2.3. Deficiencias nutritivas*

En condiciones de estrés salino se ha observado una disminución en la absorción de distintos iones que crea situaciones de deficiencias nutritivas secundarias al estrés que acentúan la reducción del crecimiento de la planta. Los elementos nutritivos más afectados por este antagonismo iónico a nivel de la absorción son el fósforo, potasio, calcio y magnesio.

## *4.5. Mecanismos de resistencia*

### *4.5.1. Resistencia al estrés hídrico*

A niveles de estrés hídrico elevado la respuesta de las plantas es el cierre estomático que impide la pérdida de agua por transpiración, pero también la asimilación fotosintética de  $\text{CO}_2$ . Los mecanismos de resistencia al estrés hídrico tienden a posponer este cierre estomático, es decir a mantener la planta asimilando  $\text{CO}_2$  durante el mayor tiempo posible. Los mecanismos que la planta emplea son varios, desde adaptaciones fisiológicas como en el caso de las plantas  $\text{C}_4$  y CAM hasta adaptaciones morfológicas como en las plantas xeromórficas. El objetivo final de todas las adaptaciones es mantener la turgencia de las células acompañantes de los estomas que regulan su cierre y su apertura. Uno de los mecanismos más importantes en el mantenimiento de la turgencia es el ajuste osmótico.

#### *4.5.1.1. Ajuste osmótico*

El ajuste osmótico consiste en la acumulación activa de solutos en la célula a fin de mantener el equilibrio con el potencial hídrico del xilema. Esta acumulación de solutos inducida por un estrés hídrico excesivo viene mediada, en parte, por efectos hormonales. En plantas sometidas a estrés hídrico se han observado niveles elevados de ácido abscísico, y éste cuando se aplica a plantas normales induce respuestas típicas de plantas en condiciones de estrés hídrico: acúmulo de solutos en células y senescencia acelerada.

Por otra parte, los niveles de citoquininas en plantas sometidas a estrés hídrico son relativamente bajos. Las citoquininas se sintetizan mayoritariamente en las raíces, en condiciones de estrés hídrico se ha postulado que habría una disminución de flujo en el xilema y por lo tanto habría menor cantidad de citoquininas traslocadas hacia las hojas; se ha visto sin embargo que la actividad citoquinina en exudados de raíz de plantas en condiciones de estrés hídrico era menor que la de plantas en condiciones normales, con lo cual parece existir un efecto directo del estrés sobre la producción de citoquininas.

Además de estos mecanismos para eludir la salinidad la mayoría de las plantas glicófitas moderadamente resistentes y las halófilas utilizan sistemas para incrementar su tolerancia al estrés salino. La tolerancia a la salinidad implica la existencia de mecanismos de osmoregulación además de mecanismos que permiten evitar otros efectos directos e indirectos de la salinidad tales como deficiencias nutritivas y toxicidad salina.

#### *4.5.2. Resistencia a la salinidad*

La resistencia a la salinidad puede representarse como el mantenimiento de la homeostasis de una planta en un ambiente cargado de sales, este mantenimiento requiere una serie de adaptaciones fisiológicas y morfológicas muchas veces confluyentes con las adaptaciones desarrolladas en relación con el estrés hídrico.

Las plantas utilizan dos tipos de estrategias, muchas veces combinadas, para sobrevivir en un ambiente salino:

Eludir la salinidad

Tolerar la salinidad

Podemos distinguir hasta tres mecanismos usados por las plantas para eludir la salinidad: exclusión, extrusión y dilución. Aunque en cada especie, e incluso variedad determinada haya preponderancia de uno de ellos, por regla general se dan los tres de forma complementaria.

La exclusión pasiva de la sal depende del mantenimiento de la impermeabilidad de la membrana a la sal en presencia de elevadas concentraciones externas. Para conseguir mantener los niveles bajos de sal en la parte aérea puede impedirse la absorción a nivel radical (Ahmad y Wainwright, 1976) o bien la traslocación de la sal de las raíces a la parte aérea (Solovev, 1967) (Satyanarayana y Rao, 1963). Este mecanismo pasivo va acompañado generalmente de un mecanismo activo de extrusión de la sal mediante una bomba (normalmente  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) que requiere gasto energético. Esta extrusión a nivel molecular puede resultar en fenómenos de excreción (acumulación de sal en hojas viejas) y de secreción (en glándulas secretoras específicas). Complementariamente a estos dos mecanismos se han observado fenómenos de dilución de la sal mediante estimulación del crecimiento e inducción de succulencia.

#### 4.5.2.1. Osmoregulación

La sequía osmótica debida a la salinidad crea una situación de estrés osmótico causando la pérdida de turgor celular que resulta en el mantenimiento de las células en un estado de no crecimiento. Para restablecer el crecimiento hay que recuperar el turgor celular, para ello la célula ha de rebajar su potencial osmótico por debajo del potencial hídrico de la solución que la rodea. Al igual que en el ajuste osmótico consecuente al estrés hídrico la adecuación del potencial osmótico celular se realiza mediante acumulación de solutos que pueden ser orgánicos o inorgánicos.

En muchas plantas, especialmente en las halófitas, la osmoregulación se consigue principalmente mediante acumulación de iones del medio externo (Wallace y Kleinkopf, 1974). El ión acumulado es generalmente el  $K^+$  que se transporta de forma activa hasta las vacuolas. El equilibrio entre vacuola y citoplasma se mantiene gracias a la síntesis de una serie de productos orgánicos que actúan como solutos compatibles, entre éstos cabe destacar la prolina y la betaína, aminoácidos cuya síntesis y acumulación están directamente relacionadas con el nivel de estrés al que se ha sometido a la planta. Otros productos orgánicos que ejercen funciones similares son inositol, glucosa y otros azúcares. Existen además productos orgánicos cuyo papel reside en la prevención de la fitotoxicidad de la salinidad, como por ejemplo la síntesis de ácido oxálico en *Salicornia europaea* que precipita los iones alcalinotérreos absorbidos en exceso.

## *5. Relaciones hídricas de la simbiosis VA*

El estudio de las relaciones hídricas de las plantas micorrizadas es un tema de investigación relativamente reciente en el que hay que distinguir tres aspectos:

1. Cambios en las relaciones hídricas de las plantas debidas a la simbiosis.
2. Relaciones hídricas de plantas micorrizadas en condiciones de sequía.
3. Relaciones hídricas del hongo formador de micorrizas VA

### *5.1. Cambios en las relaciones hídricas de las plantas debidos a la simbiosis*

Todos los estudios realizados coinciden en señalar un incremento de la transpiración en plantas micorrizadas. Normalmente estos incrementos están asociados a una disminución de la resistencia foliar y a un incremento de la conductividad hidráulica (Safiret *al.*, 1971), (Safiret *al.*, 1972), (Levy y Krikun, 1980), (Hardie y Leyton, 1981). Estos tres fenómenos están ligados entre sí e implican una menor resistencia al flujo del agua a través de la planta. Se han postulado cinco hipótesis mediante las cuales las micorrizas podrían afectar las relaciones hídricas de las plantas colonizadas.

1. Mejora del estado nutritivo de la planta que revertiría en una captación de agua más eficaz. La mejora en la nutrición fosfatada ha sido considerada por algunos autores la causa del incremento en la transpiración observado en las plantas micorrizadas (Nelsen y Safir, 1982), (Graham y Syversten, 1984), (Koide, 1985), (Fitter, 1988); mientras que otros autores sugieren que dichos cambios son independientes del estado nutritivo fosforado de la planta (Augé *et al.*, 1986) y otros destacan la importancia del K en las interacciones entre micorrizas VA y parámetros hídricos (Sieverding y Toro, 1988).

Ambos elementos, P y K, además de su efecto a nivel nutritivo pueden alterar la permeabilidad de la membrana celular que es la barrera más importante para el flujo del agua a través de las raíces.

2. Incremento de la superficie de absorción radical a través de las hifas externas del hongo (Hardie y Leyton, 1981), (Allen, 1982), (Hardie, 1985).

Esta hipótesis ha sido considerada improbable por algunos autores (Sanders y Tinker, 1973), (Fitter, 1985). Sin embargo el hecho de que en algunos casos la colonización VA beneficie a las plantas en condiciones de estrés hídrico (Allen y Allen, 1986), (Hetrick *et al.*, 1987) no permite descartarla totalmente.

3. Funcionamiento de las hifas del hongo como vías de baja resistencia para el transporte del agua.

En todo caso habrían de funcionar como vías de transporte pasivo ya que mediante la utilización de PCNB Safir *et al.*, (1972) descartaron cualquier papel activo del hongo en los cambios de las relaciones hídricas observados.

#### 4. Modificación de la morfología y extensión del sistema radical.

La existencia de cambios en la morfología radical a consecuencia de la simbiosis VA es cada día más evidente (Bonfante-Fasolo y Vian, 1989), (Berta *et al.*, 1990). La importancia de estos cambios en las relaciones hídricas no se ha determinado con precisión aunque Hardie y Leyton (1981) sugirieron que el aumento en la extensión y el engrosamiento del sistema radical que observaron en trébol micorrizado influía en el incremento de la conductividad hidráulica radical.

#### 5. Alteraciones en el balance hormonal

Ya se ha indicado como las situaciones de estrés hídrico alteran el balance ABA/citoquininas en raíz y parte aérea. Las micorrizas pueden incidir en este balance alterando los parámetros hídricos de las plantas colonizadas (Levy y Krikun, 1980).

## 5.2. Relaciones hídricas de las plantas micorrizadas en condiciones de sequía

El incremento en la conductividad hidráulica de plantas micorrizadas resulta en una recuperación más rápida de estas en situaciones de estrés puntuales como las observadas por Hardie y Leyton (1980) y Safir *et al.*, (1972). Esta recuperación se observó midiendo los potenciales hídricos foliares y los valores de turgencia.

En el momento en que las condiciones de sequía se prolongan, el mayor flujo de agua característico de las plantas micorrizadas puede vaciar más rápidamente el suelo de agua, sobretodo en cultivos en contenedor, produciendo cuadros de estrés hídrico antes que en las plantas no micorrizadas.

Los resultados obtenidos en relación con el crecimiento de plantas micorrizadas en condiciones de sequía son contradictorios. Zjacek *et al.*, (1987) observan un mayor crecimiento de las plantas micorrizadas en suelos con baja concentración de fósforo. Nelsen y Safir (1982) en un ensayo en campo de cebollas observan que a pesar de un buen abonado en P, las plantas no micorrizadas no tiene acceso a este elemento en condiciones de sequía, de forma que se enfrentan a un doble estrés: nutritivo e hídrico, mientras que las plantas micorrizadas tan solo sufren estrés hídrico. Allen y Allen (1986) han observado que *Agropyron smithii* se beneficia de la micorrización especialmente en condiciones de sequía, al igual que *Andropogon gerardii* (Hetrick *et al.*, 1987); mientras que en el caso de *Zea mays* (Hetrick *et al.*, 1984) y *Sorghum vulgare* (Hetrick *et al.*, 1987) desaparecen los efectos beneficiosos de la micorrización cuando las plantas se someten a condiciones de estrés hídrico. Nelsen y Maiti (1983) trabajando con trigo observaron un efecto negativo de la micorrización en condiciones de sequía sin que hubiera ningún efecto del abonado con P.

Sieverding y Toro (1988) y Allen y Bosalis (1983) describen efectos diferenciales frente al estrés hídrico debidos a la inoculación con distintos hongos. Allen y Bosalis destacan la eficacia de *Glomus fasciculatum* en reducir el potencial osmótico y mantener la turgencia. Esta eficacia podría ser un efecto indirecto de un incremento en la eficiencia de captación de nutrientes por este hongo o bien podría ser un efecto directo de la colonización.

Los efectos de la micorrización VA en condiciones de estrés hídrico no son claros, en parte debido a la heterogeneidad de métodos utilizados, tanto a nivel de especies de hongos como de plantas, tipo de suelos y sistemas de medida. Todo ello dificulta la síntesis e integración de los resultados de los diversos ensayos.

### 5.3. Relaciones hídricas del hongo formador de micorrizas VA

No se han hecho experimentos para investigar el efecto directo sobre el hongo sino que se ha evaluado el efecto del estrés hídrico sobre la colonización de una planta determinada y sobre la producción de esporas de resistencia (Redhead, 1975). Se ha visto que existe una coincidencia entre los niveles óptimos de agua para la planta y para la esporulación del hongo, mientras que la colonización interna permanece inalterada. Sylvia y Schenck (1983) estudiaron la germinación de tres especies de *Glomus* a distintos potenciales hídricos del suelo, *G. etunicatum* fue el más resistente a la sequía y *G. macrocarpum* el más sensible. Los mismos autores observaron un efecto indirecto del potencial hídrico sobre la germinación a través de la microbiota acompañante, saprófita y parásita que variaba con el nivel de humedad del suelo.

Si las plantas micorrizadas son más resistentes al estrés hídrico que las plantas no micorrizadas, los hongos formadores de micorrizas V.A adaptados a suelos secos pueden ser especialmente beneficiosos. El estudio de las micorrizas VA en regiones áridas y semi-áridas y su aplicación ha de contemplar la caracterización de la supervivencia, germinación y crecimiento de estos hongos en condiciones de bajo potencial hídrico.

## 6. Estrés salino y micorrizas VA

A pesar de ser la salinidad un factor limitante importante en la producción agrícola, la interacción entre micorrizas VA y salinidad se ha empezado a estudiar muy recientemente. Al igual que en las interacciones con el estrés hídrico, los resultados obtenidos en los estudios simbiosis VA-salinidad son contradictorios, ya que dependerán de la planta utilizada, niveles de salinidad, tipo de suelo, abonado, especie y aislado de hongo, parámetros medidos, sistemas de medidas y controles.

Hirrel y Gerdemann (1980) observaron un mejor crecimiento en cebolla y pimiento micorrizado, respecto a los tratamientos no micorrizados, en condiciones de estrés salino. Ojala *et al.*, (1983) describieron, a su vez, un incremento en el crecimiento de cebolla micorrizada, notando efectos diferenciales entre distintos hongos. Pond *et al.*, (1984) también encontraron un incremento en el crecimiento del tomate y Pfeiffer y Bloss (1988) en *Parthenium argentatum*. El incremento en el crecimiento de las plantas micorrizadas observado por estos autores es atribuido a una mejora en la nutrición.

Esta mejora comporta la disminución de uno de los efectos secundarios del estrés salino que es la deficiencia nutritiva por antagonismos iónicos, permitiendo un crecimiento mayor en las plantas que forman la simbiosis.

Ojala *et al.*, (1983) observaron una tendencia a la disminución del porcentaje de colonización interna que estaría de acuerdo con los resultados obtenidos por Guttay (1976), Hirrel y Gerdemann (1980) y Duke *et al.*, (1986). Sin embargo Graham y Syvertsen (1987) trabajando en cítricos no observaron ninguna variación en el porcentaje de colonización de *Glomus intraradices* al aumentar la salinidad, ni tampoco El-Atrach *et al.*, (1989) observaron disminuciones notables de la colonización interna con la salinidad.

Todos los autores coinciden en señalar la importancia de la mejora en la nutrición fosforada en el incremento del crecimiento logrado por las plantas micorrizadas en condiciones de salinidad, sin embargo Duke *et al.*, (1986) han sugerido la existencia de otros factores que aumentarían la tolerancia a la salinidad de las plantas colonizadas.

*Estudio de la presencia de hongos formadores de micorrizas vesículo-arbusculares en el Delta del Ebro*

## *1.1. Introducción*

Las dunas costeras han sido uno de los pocos ecosistemas en los que se han realizado estudios acerca de las micorrizas VA (Nicolson, 1960) (Koske y Halvorson, 1981) (Giovannetti y Nicolson, 1983) (Puppi y Reiss, 1987). Estos ecosistemas tienen como características comunes una baja cantidad de nutrientes, altos niveles de evaporación, elevada salinidad y movimientos de terreno. En todos los sistemas de dunas investigados se ha observado la presencia de micorrizas VA. Se ha demostrado además que las micorrizas VA favorecen la estabilización de las dunas incrementando significativamente los agregados de arena (Sutton y Sheppard, 1976) (Foster y Nicolson, 1981), así mismo se han evidenciado efectos positivos sobre el crecimiento de algunas de las gramíneas más habituales en este tipo de ecosistemas, como son *Agropyron junceiforme* y *Ammophila arenaria* (Nicolson y Johnston, 1979). En resumen, se puede decir que las condiciones de estrés características de las dunas costeras (marítimas) y la amplia distribución de micorrizas VA observada parecen conferir a esta simbiosis un papel especialmente importante en este tipo de ecosistemas.

El Delta del Ebro es una llanura de aluvión de origen relativamente reciente (siglo XIV-XIX) con unas peculiaridades topográficas y edáficas muy distintas a las de áreas vecinas que definen una población vegetal muy característica (Camarasa *et al.*, 1977).

Los objetivos del primer grupo de ensayos, basados en muestreos en el Delta eran investigar la presencia de micorrizas VA en un área de origen tan reciente y en aislar hongos a partir de este tipo de hábitats, sometidos a condiciones de estrés extremas, en especial de estrés salino, para así más tarde poder evaluar su efectividad en comparación con hongos conocidos procedentes de ambientes distintos.

## *1.2. Materiales y métodos*

### *Diseño del muestreo*

El muestreo se realizó al nordeste del Delta entre las zonas denominadas 'Punta del Fangar', 'Platja de la Marquesa', 'Riomar' y 'El Canal Vell'. Las áreas muestreadas pueden dividirse en dos zonas principales:

A) Zona cercana a 'El Canal Vell', con suelos de tipo arcilloso y preponderancia de cultivos de arroz, pequeñas huertas con maíz, sorgo y alcachofa y arrozales abandonados invadidos por plantas halófilas y helofíticas.

B) Zona de dunas con un mosaico de vegetación psamófila, halófila y helofítica.

En total se tomaron muestras de 6 áreas en cada una de las cuales se determinaron 3 parcelas de 1 x 1 m en las que se tomaron 5 muestras de suelo y cuando fue posible de plantas con sus correspondientes raíces. El suelo y raíces obtenidos se guardaron en bolsas de plástico a 4°C en la oscuridad hasta ser procesadas.

## *Procesado del suelo*

### *Determinación de las características físico-químicas*

El fósforo del suelo se determinó mediante el método de Olsen-Watanabe modificado por Porta (1986), y el nitrógeno mediante el método de Kjeldahl. Debido a la dificultad de realizar el método de la pasta saturada en suelos arenosos como los de las dunas, la conductividad eléctrica se determinó en una solución 1:5 que luego se corrigió para obtener la C.E.<sub>25</sub> (Aragües *et al.*, 1979). El pH se determinó en una dilución 1:5 en agua desmineralizada.

*Determinación de la presencia de esporas de hongos formadores de micorrizas V.A en el suelo*

Para investigar la presencia de esporas de hongos formadores de micorrizas VA en los suelos muestreados estos se procesaron utilizando un método de centrifugado en sacarosa para los suelos arcillosos de la zona A y un método de decantación y tamizado húmedo para los suelos arenosos de la zona B, ambos adaptados de Daniels y Skipper (1982).

**Método de centrifugado en sacarosa**

Se mezcla una cantidad conocida, alrededor de 100 g, de suelo rizosférico con 1000 ml de agua, trabajándose con los dedos para deshacer los agregados.

Se vierte el líquido a través de un tamiz grueso (0.5 cm), se conserva el filtrado descartándose la fracción retenida.

Se resuspende el filtrado y se pasa por un tamiz de 50  $\mu\text{m}$ , descartándose el filtrado.

La fracción retenida en el tamiz de 50  $\mu\text{m}$  se resuspende en agua y se centrifuga 4 min a 3000 rpm. Se descarta el sobrenadante.

Se resuspende el precipitado en una solución al 30% de sacarosa y se centrifuga durante 15 seg. a 3000 rpm.

Se recoge el sobrenadante en un tamiz de 40  $\mu\text{m}$ , se lava abundantemente, se resuspende en agua y la muestra está lista para su observación.

**Método de decantación y tamizado húmedo**

Se mezcla bajo presión del grifo una cantidad conocida de suelo rizosférico (alrededor de 100 g) en 1000 ml de agua. Se trabaja con los dedos para deshacer los agregados.

Se vierte el líquido a través de un tamiz grueso (0.5 cm) para retener los fragmentos gruesos de materia orgánica, recogiendo el líquido vertido.

Se resuspende el líquido vertido dejando reposar 30 seg.

Se decanta el líquido a través de una batería de tamices desde 250  $\mu\text{m}$  hasta 50  $\mu\text{m}$  (250  $\mu\text{m}$ , 125  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ ).

Se lava el material retenido en los tamices para asegurarse que no queda material coloidal enganchado

Se transferir con ayuda de frasco lavador el material de los tamices a una o varias placas de petri para su observación.

Se hizo un recuento de las esporas observadas, aunque no se creyó oportuna su identificación, proceso que sí se efectuó con las esporas multiplicadas en cultivo puro, como se indica más adelante. El número de esporas observadas se corrigió para 100 g de peso seco de suelo.

### *Tinción de raíces*

Las raíces de las plantas muestreadas se tiñeron según el método de Phillips y Hayman (1970) modificado, quedando el procedimiento de la manera siguiente:

Se sumergen las raíces en una solución de KOH al 10% a 60°C durante 12 h.

Se lavan repetidas veces con agua fría corriente.

Se sumergen en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 volúmenes durante 30 min aquellas raíces que presenten una coloración fuerte.

Se aclaran con agua corriente.

Se sumergen las raíces en HCl 2% durante 5 min.

Se vierte el ácido clorhídrico y se tiñen con azul tripan al 0.5% en ácido láctico durante 12 h a temperatura ambiente.

Se conservan en ácido láctico.

Una vez teñidas las raíces se observaron por la lupa binocular y al microscopio óptico para determinar presencia o ausencia de colonización VA.

## *Metodología de aislamiento*

Para proceder al aislamiento de los hongos formadores de micorrizas VA se utilizaron dos métodos distintos: aislamiento mediante planta trampa y aislamiento mediante planta propagadora.

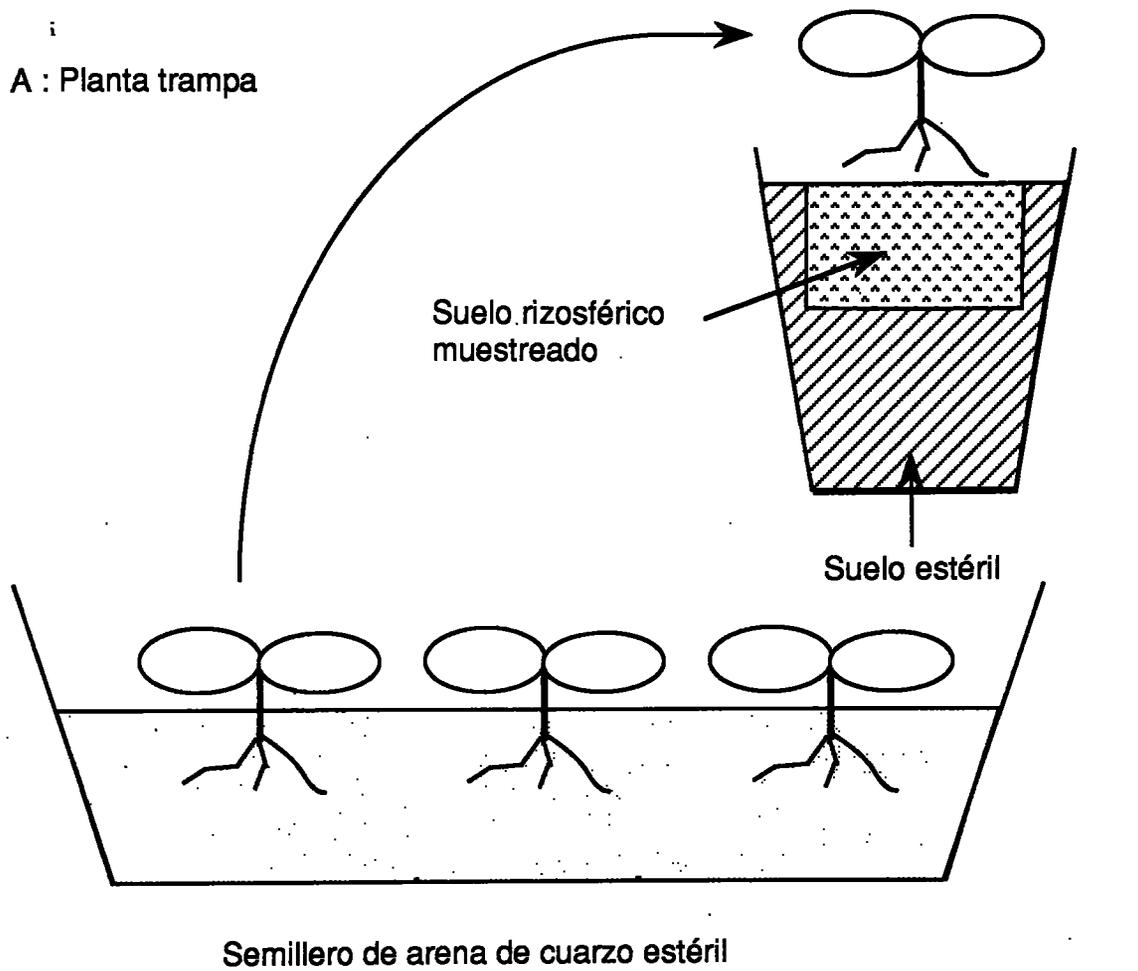
### *Aislamiento mediante planta trampa (fig 1a)*

Este sistema consiste en utilizar parte del suelo problema como inóculo de una plántula germinada en condiciones estériles (trébol o cebolla). A las 6 semanas se observa si se ha establecido colonización VA en la planta inoculada. En caso negativo se descarta la planta, en caso afirmativo se mantiene la planta en cultivo 4 meses momento en que se muestrea el suelo para determinar si el (o los) hongo (s) colonizador (es) ha(n) esporulado. En caso negativo se mantiene la planta en cultivo 4 meses más, si para entonces no hay esporulación se descarta la planta, en caso afirmativo se seleccionan 40-50 esporas lo más semejantes posible que se mantienen a 4°C durante una semana, para romper su dormancia, en caso de que existiera, y se utilizan para inocular una nueva plántula.

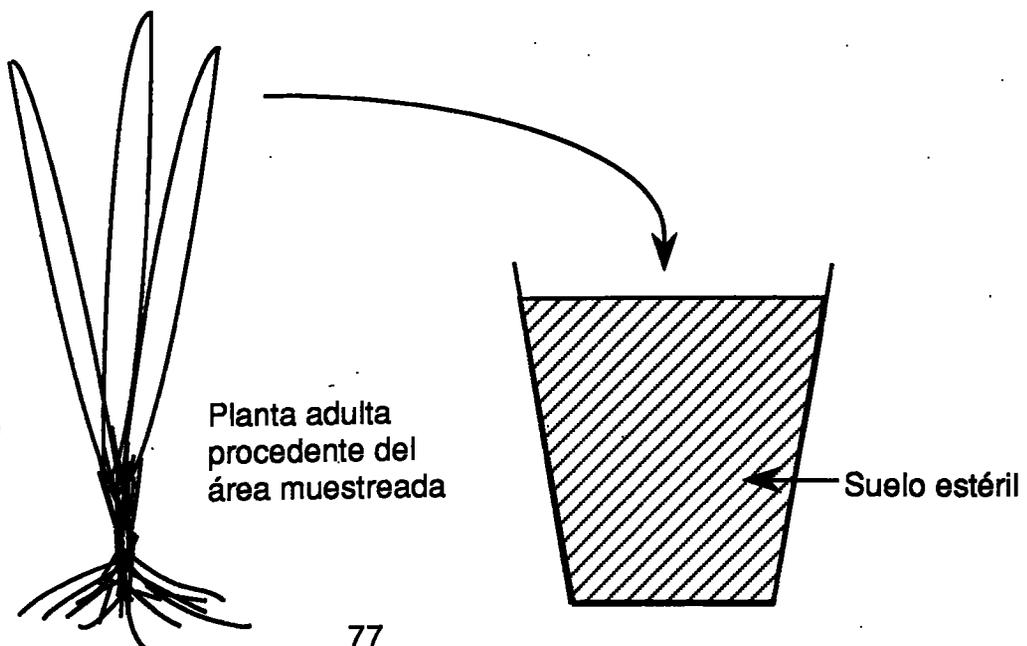
### *Aislamiento mediante planta propagadora (fig 1b)*

Este sistema precisa de la existencia de una planta obtenida del lugar muestreado que presente colonización MVA. Esta planta se cultiva en una maceta con suelo estéril y se va controlando periódicamente para ver si hay esporulación. En el momento en que se produce esporulación se seleccionan 40-50 esporas, que se mantienen una semana a 4°C, como en el caso anterior, para inocular plántulas germinadas en condiciones estériles, para así purificar y multiplicar el inóculo.

*Figura 1:* Métodos utilizados para el aislamiento de hongos nativos formadores de micorrizas VA



B : Planta propagadora



## *Metodología para la purificación y multiplicación de los hongos aislados*

Se parti6 de plántulas de trébol o cebolla germinadas en condiciones estériles e inoculadas con 40-50 esporas, lo más semejantes posible, obtenidas en el proceso de aislamiento.

Estas plantas inicialmente se cultivan en macetas de tamaño reducido (9 cm de diámetro), para facilitar la exploración del suelo por las raíces e incrementar así las posibilidades de encuentro hongo-raíz. A las 4 semanas de la inoculación se comprueba la presencia de MVA y si es positivo el control la planta, se pasa a una maceta más grande (11 cm de diámetro), donde se cultiva 12 meses, controlando periódicamente el desarrollo de la infección y la presencia de esporas. En caso de observarse más de un tipo de esporas, éstas se agrupan según su morfología y se repite el proceso hasta obtener esporas morfológicamente idénticas.

## *Identificación de los hongos aislados*

Como ya se ha señalado anteriormente tan solo se procedió a la identificación de los hongos aislados y multiplicados en cultivo puro.

Para ello se montaron un mínimo de 30 esporas para su observación al microscopio en : agua

polivinillactoglicerol

reactivo de Metzler

### *Características del medio acuoso*

El agua mantiene la coloración y las dimensiones normales permitiendo la observación de la espora entera sin factores que la alteren. Sin embargo, la observación de las paredes no es clara y la preparación no es permanente.

### *Características del PoliVinilLactoGlicerol (PVLG)*

Este medio permite la conservación de especímenes durante largo tiempo, manteniendo muchas de sus características originales y facilitando la observación de las paredes en esporas rotas.

Fórmula:	Alcohol de PoliVinilo	16.6	g
	Acido Láctico	100	ml
	Glicerina	10	ml

### *Características del reactivo de Metzler*

Este reactivo permite observar la reacción de las esporas al yodo, criterio que puede ser de gran ayuda para su acertada clasificación.

Fórmula:	Hidrato de Cloral	100	g
	Yodo	1.5	g
	Yoduro Potásico	5	g
	Agua Destilada	100	ml

Para que las esporas puedan conservarse en el reactivo de Metzler, hay que mezclar el reactivo de Metzler con PVLG en una proporción 1:1. En este caso puede reemplazarse el hidrato de cloral de la fórmula por PVLG, ya que la función como conservante y clarificante que tiene el hidrato de cloral la realiza el PVLG.

Una vez observadas las esporas éstas se describen utilizando los microgramas preconizados por Walker (1983) y se identifican según el manual de Schenck y Pérez (1988).

### 1.3. Resultados y discusión

#### *Presencia de esporas y de MVA*

Observamos una diferencia notable entre el número de esporas obtenidas en el suelo estabilizado y las obtenidas en las muestras de dunas (Tabla 1). En la zona anterior a las dunas, de vegetación consolidada, el número de esporas varía entre  $32 \pm 7$  y  $46 \pm 5$ , mientras que en las zonas de dunas llegamos, como máximo, a 4 esporas por 100 g de suelo. Aunque exista colonización VA en las plantas muestreadas en las dunas, las esporas son muy escasas, resultado que coincide con el obtenido por Khan (1974), que encontraba un número muy inferior de esporas en las dunas que en otras zonas, salinas, pero con vegetación consolidada. El número de esporas obtenidas está dentro del rango descrito en estudios de zonas similares (Puppi y Riess, 1987) aunque siempre en la fracción baja, acercándose más a los resultados de Nicolson (1960) que encontró niveles elevados de colonización VA pero ausencia de esporas en el muestreo realizado. Se podría postular la presencia de esporas muy pequeñas, irrecuperables mediante el método utilizado, al igual que Nicolson. Sin embargo el hecho que al realizar el aislamiento se hayan recuperado esporas pertenecientes a *Glomus mosseae* y *Glomus claroideum*, de mayor tamaño, hace pensar que la ausencia de esporas, sea más bien debida a características inherentes a este sistema, como la movilidad, lo cual significa que la propagación de la simbiosis reside, mayoritariamente, en las raíces colonizadas.

Las plantas típicas de dunas presentan la simbiosis (Tabla 2), *Limoniastrum*, especie característica de la zona, forma en todos los casos la micorriza, así como *Avena* sp., *Ononis natrix*, *Aster tripolium* y *Triglochin* sp. Tres géneros que no se observan frecuentemente asociados a MVA forman las simbiosis en este medio: *Salicornia* sp., *Juncus* sp. y *Cyperus* sp., de todo ello se puede inferir la importancia que la simbiosis MVA tiene en estos sistemas ya que, incluso géneros normalmente no micotróficos, presentan la simbiosis. Por otra parte, también es de destacar la ausencia total de micorrizas VA en suelos cultivados, que podría atribuirse al cambio radical que ha de hacerse para transformar estos suelos, arcillosos y con una salinidad considerable, en

suelos aptos para el cultivo, transformación que, en muchos casos es reciente, lo que lleva a postular que, el cambio operado ha eliminado los hongos nativos, que no han sido, todavía, reemplazados por hongos más adaptados a las condiciones existentes en un área cultivada.

Localización	Sector	Tipo de suelo	C.E. (dS/m)	Esporas de MVA en suelo (x/100 g)	Plantas recolectadas	Colonización VA en raíces
Zona anterior a las dunas	Orilla del canal	Arcilloso	1.3-1.4	32 ± 7	Avena sp	+
					Graminea no ident	+
					Vulpia sp	+
					Plantago major	+
					Ononis natrix	+
	Campo de cultivo de maiz	Arcilloso	0.5	0	Zea mays	-
	Campo de arroz preparado para plantar	Arcilloso	0.4	0	Yermo	
Dunas	Primera línea	Arenoso	12.8-12.9	4	Salicornia europaea	-
					Cakile maritima	-
					Triglochin sp	+
			5.4-6.0	3	Amnophila arenaria	+
					Salicornia europaea	+
			3.3-4.1	0	Atriplex sp	-
					Salsola kali	-
					Salicornia europea	+

*Tabla 1:* Presencia de esporas en el suelo y de colonización VA en las plantas recolectadas en el Delta del Ebro.

Localización	Sector	Tipo de suelo	C.E. (dS/m)	Esporas de MVA en suelo (x/100 g)	Plantas recolectadas	Colonización VA en raíces			
84	Dunas	Segunda línea	Arenoso	0.4-0.7	3	Liliacea noident	+		
							Cyperus sp	+	
							Ononis natrx	+	
						2.1-3.2	2	Triglochin maritimu	+
								Atriplex sp	-
								Salicornia europaea	-
						1.4-1.6	0	Juncus sp	+
								Salsola kali	-
								Aster tripolium	+
					Eryngium maritimum	+			
					Limoniastrum sp	+			

*Tabla 1:* Presencia de esporas en el suelo y de colonización VA en las plantas recolectadas en el Delta del Ebro.

*Tabla 2* : Porcentaje de plantas con colonización VA de cada una de las especies muestradas

Plantas muestradas	% con colonización interna positiva
Avena sp	100
Amnophila arenaria	100
Vulpia sp	100
Plantago major	100
Zea mays	0
Equisetum sp	0
Ononis natrix	100
Aster tripolium	78
Salicornia europaea	42
Cakile maritima	0
Atriplex sp	0
Salsola kali	0
Triglochin maritimum	100
Juncus sp	100
Cyperus sp	100
Limoniastrum sp	100

## *Aislamiento*

El proceso de aislamiento y purificación entraña un proceso de selección, ya que se despreciaron aquellos hongos que aunque sean suficientemente agresivos para iniciar la colonización de plantas en un tiempo prudencial (8 semanas), no producen esporas en 8 meses (4+4). Además se introduce una nueva restricción al purificar y multiplicar el inóculo. Todas estas restricciones tienden a favorecer a aquellos hongos más agresivos y que producen más esporas y más rápidamente.

Aunque el objeto de este trabajo no era, en sí, la selección de hongos idóneos para unas condiciones determinadas, se pensó que en cualquier caso, la selección de hongos, ya sea para su introducción en zonas degradadas o para su uso en sistemas agrícolas, ha de tener como una de sus principales cualidades la agresividad, ya que, en caso contrario, independientemente de su eficacia como simbiote, se vería imposibilitado para competir con otros hongos más agresivos presentes en la rizosfera.

### *Zona anterior a las dunas*

Esta zona se caracteriza por un suelo arcilloso y en ella se pueden delimitar 3 áreas según sus distintas conductividades eléctricas: la orilla del canal con C.E. de 1.2 a 1.3 dS/m, la zona agrícola con conductividades eléctricas más bajas (C.E. 0.3-0.5 dS/m) y la zona lindante con las dunas con C.E. = 2.1 dS/m.

En el área cercana al canal se han utilizado los dos sistemas de aislamiento descritos. El método de la planta trampa permitió una buena colonización VA de las dos especies utilizadas (cebolla 87%, trébol 82%) y se obtuvieron esporas pequeñas, traslúcidas, formando agregados con profusión de micelio. Estos agregados se separaron y utilizaron para inocular plantas y proceder a la purificación del (los) hongo(s).

Para el método de la planta propagadora se emplearon dos de las plantas recogidas: *Avena* sp. y *Plantago* sp., previa comprobación de que en sus raíces se hallaba establecida la simbiosis. En el caso de la *Avena* se observó

una colonización del 67%, pero no se encontraron esporas en el suelo tamizado. En el caso de *Plantago* tampoco se encontraron esporas en el suelo tamizado, sin embargo se observaron multitud de esporas intraradicales que se extrajeron para la obtención de cultivos puros.

En la zona agrícola no dio resultado el método de la planta trampa, el único que se podía emplear debido a la ausencia en esta zona de plantas colonizadas.

En la zona lindante con las dunas también se utilizaron los dos métodos de aislamiento.

Para el aislamiento con planta trampa se usaron tréboles, que a los tres meses, presentaban una colonización VA de 62%, y una población de esporas pequeñas y vacuoladas formando agregados que se utilizaron para la inoculación de plántulas.

El aislamiento con planta propagadora se hizo a partir de *Ononis natrix*. A los tres meses *O. natrix* presentaba un 79% de colonización VA, predominantemente arbuscular. La población de esporas era del tipo *Glomus* intra y extraradicales, aunque siempre asociadas a la raíz. Estas esporas se utilizaron para inocular plantas.

### *Zona de dunas*

Caracterizada por suelos de tipo arenosos. Se distinguieron primera y segunda línea de dunas con respecto a la orilla del mar.

#### Primera línea de dunas

Esta zona se caracteriza por C.E. elevadas debido a que recibe la influencia directa del mar.

En la primera área de esta zona muestreada, con C.E. = 12.8 dS/m, se utilizaron los dos métodos de aislamiento descritos. En el aislamiento con planta trampa se observó que, en todos los casos, las plantas utilizadas desarrollaban la simbiosis, extrayéndose de un cultivo establecido en trébol

esporas de tipo *Glomus* que se utilizaron para inocular plántulas.

El aislamiento mediante planta propagadora se hizo con *Triglochin maritimum*. A los tres meses de su establecimiento *T. maritimum* presentaba un 77% de colonización interna y esporas intra y extrarradicales utilizadas para inocular plántulas.

En las otras dos áreas muestreadas de la zona solo se utilizó el método de la planta trampa.

En el área con C.E.= 5.4 dS/m tan solo una de las plantas utilizadas presentó colonización VA (trébol 34%) y no se encontraron esporas.

En el área con C.E.=3.3 dS/m la simbiosis se presentó en todas las plantas y se obtuvieron esporas tipo *Glomus* para inocular plántulas.

#### Segunda línea de dunas

En esta zona de dunas las conductividades eléctricas son notablemente más bajas (0.7-2.1 dS/m). En las tres áreas muestreadas se utilizó el método de la planta trampa únicamente. En todos los casos se observó colonización interna. En el área de C.E.= 0.7 dS/m se observaron esporas del tipo *Glomus*, pequeñas, translúcidas, formando agregados. En las otras dos zonas también se observaron esporas tipo *Glomus* pero no formaban agregados. En los tres casos se extrajeron esporas para inocular plántulas y purificar los cultivos.

## *Purificación e identificación de los hongos*

En las zonas muestreadas, aunque se observaron distintos tipos de hongos, potencialmente formadores de la simbiosis VA, tan solo se obtuvieron 3 en cultivo puro. Estos hongos tienen pues las características de agresividad y reproducción del ciclo rápido inherentes a nuestro sistema de selección.

Los tres tipos de hongos obtenidos pertenecen al género *Glomus*.

### *Tipo 1 (Fig 2)*

Procede del aislamiento con planta trampa efectuado en suelo de primera línea de dunas con C.E. 3.3-4.1 dSm<sup>-1</sup>.

Esporas de globosas a ovoides, libres o agrupadas en esporocarpos. Esporocarpos formados por un peridio miceliar de color marrón claro. Esporas de color amarillo claro, con vacuolas grandes e irregulares. Tamaño muy disperso desde 100 µm hasta 250 µm. De 2 a 3 esporas por esporocarpo. Pedúnculo de la espora en forma de embudo. Contenido de la espora separado del contenido miceliar por un septo. La pared de la espora consta de una pared exterior unitaria evanescente y de una pared interna laminada.

Identificación: *Glomus mosseae* (Nicol.& Gerd.) Gerdemann & Trappe

*Glomus mosseae* es un hongo muy extendido, se ha encontrado diversos lugares (Schenck y Pérez, 1988). Produce gran cantidad de micelio externo y probablemente la frecuencia de su aislamiento es debida en parte a su agresividad.

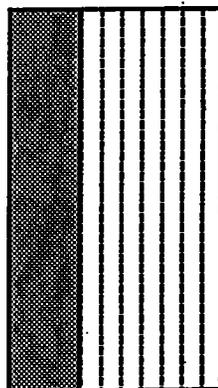
*G. mosseae* se ha encontrado en lugares muy distintos, ello implica una gran versatilidad y la adaptación de la especie a muchos ecosistemas distintos. No se ha determinado, todavía, si esta adaptación se ha desarrollado de tal forma que de lugar, a la selección de cepas, razas o ecotipos distintas o bien si el hongo posee, en sí, potencial genético suficiente para que esta adaptación no se haga a través de selección y no dé, por lo tanto, lugar más que a aislados, pero no a cepas fisiológicamente distintas.

*Figura 2: Espora tipo 1. Glomus mosseae*

a) Esporas en PVLG



b) Murograma



*G. mosseae*

### *Tipo 2 (Fig. 3)*

Procede del aislamiento mediante planta trampa efectuado en el suelo de segunda línea de dunas con conductividad 2.1-3.2 dSm<sup>-1</sup>.

Esporas globosas, libres, de color amarillo muy claro, con vacuolas pequeñas y regulares. Tamaño homogéneo de 100 µm hasta 130 µm. El contenido celular está ocluido por un poro. La pared de la espora está formada por una pared externa unitaria evanescente, una pared laminada y una pared interna membranosa.

Identificación: *Glomus claroideum* Schenk & Smith

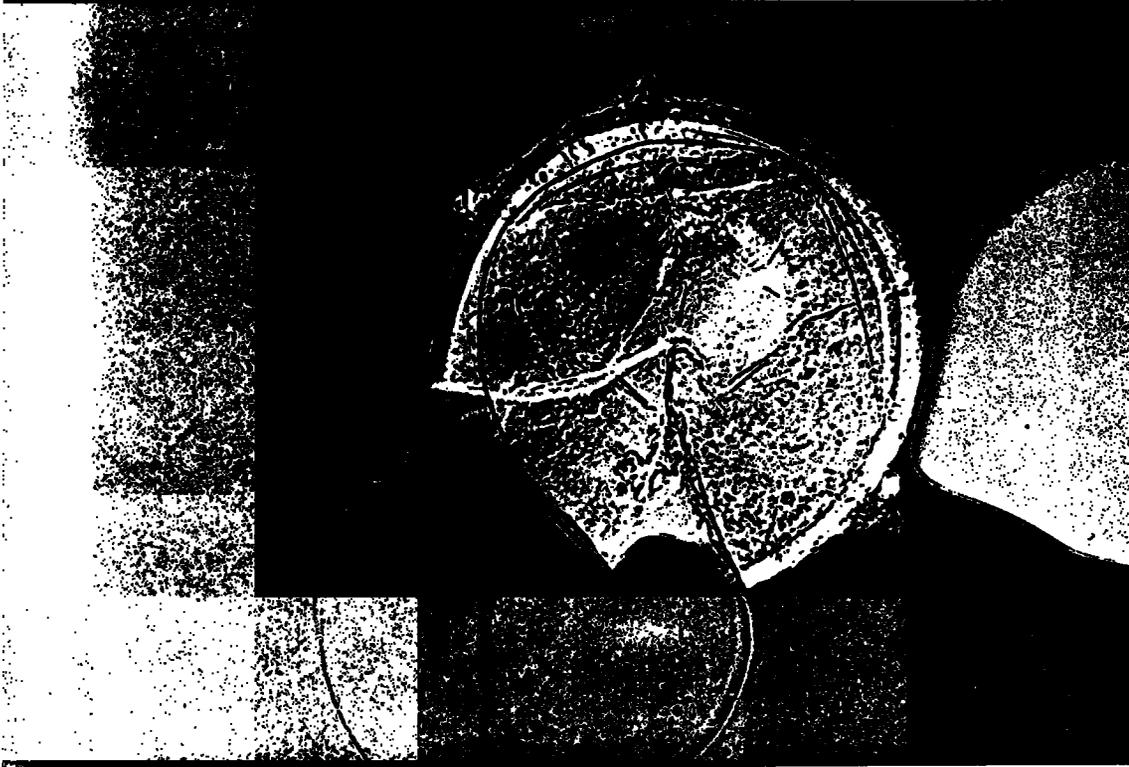
La pared membranosa no aparece en la descripción de Schenk y Smith (1982) pero sí en la revisión de Morton (1989).

La identificación ha sido confirmada por Morton.

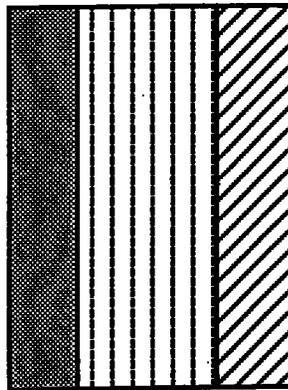
*Glomus claroideum* es una especie poco frecuente ya que, hasta el momento (Schenck y Pérez, 1988), tan solo se ha descrito en dos lugares de EEUU, asociado con *Glycine maxima*, en el Centro de Investigación y Educación Agrícola de Sanford, (Florida) y como contaminante en un cultivo de H.D. Skipper en Carolina del Sur. Esta es, por lo tanto, la primera vez que se describe el hongo en Europa.

*Figura 3: Espora tipo 2 Glomus claroideum*

a) Espora en PVLG



b) Murograma .



*G. claroideum*

*Tipo 3 (Fig. 4)*

Procede del aislamiento con *Plantago* como planta propagadora de la zona de la orilla del canal.

Todas las esporas se obtuvieron del interior de las raíces de la planta. Esporas globosas, de tamaño homogéneo de 70  $\mu\text{m}$  hasta 100  $\mu\text{m}$ . Color marrón claro hasta oscuro con tintes rojizos. La estructura de la pared de la espora consiste en una membrana evanescente que no reacciona con el reactivo de Metzler y dos paredes laminadas que se distinguen porque cada una de ellas tiene continuidad con dos membranas diferentes del pedúnculo.

Identificación: *Glomus intraradices* Schenck & Smith

La descripción no coincide con la de Schenck & Smith (1982) pero sí con la revisada por Morton (1989)

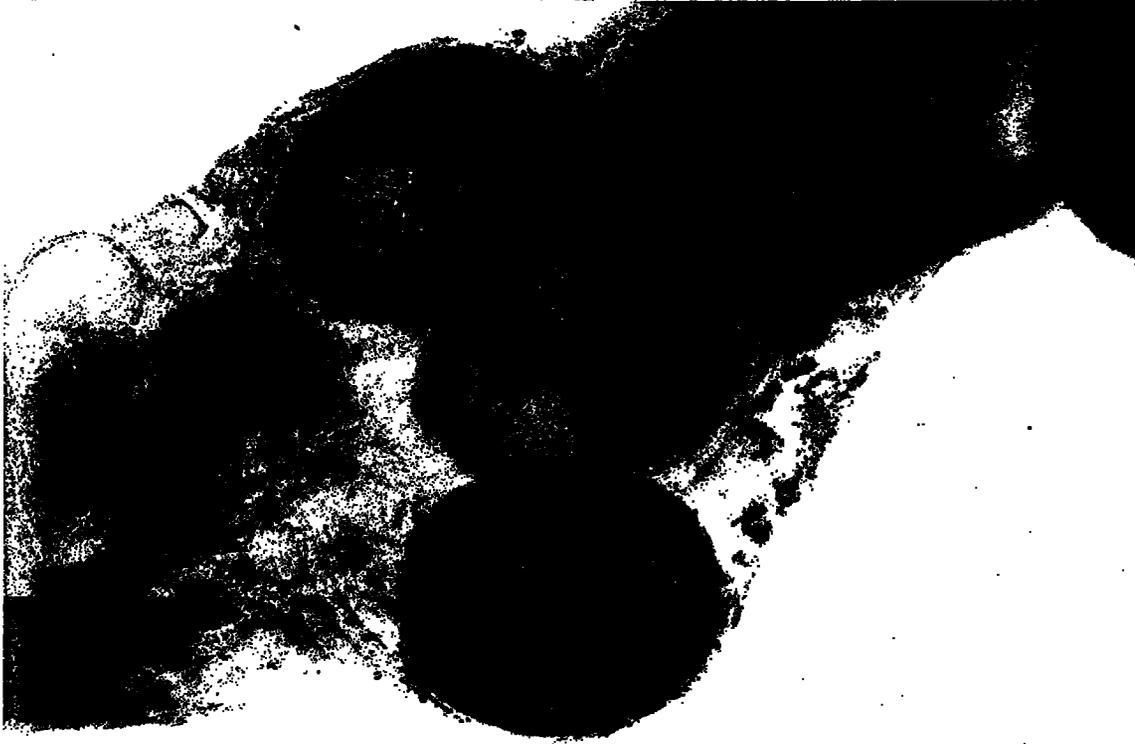
Algunos aislados de esta especie presentan una pared evanescente que reacciona positivamente a Metzler, pero este aislado, en particular, no reacciona.

La identificación ha sido confirmada por Morton.

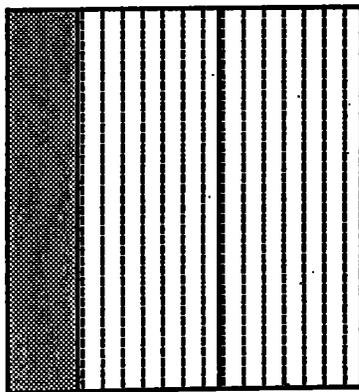
*Glomus intraradices* es un hongo extendido con un hábito de producción de esporas casi exclusivamente intraradical. Esta característica determina que no se encuentre normalmente en muestreos realizados en el suelo y que fuera aislado a partir de planta propagadora.

*Figura 4: Espora tipo 3 Glomus intraradices*

a) Esporas dentro de la raíz



b) Murograma



*G. intraradices*

*Pistacia sp. y micorrizas vesículo-arbusculares*

## 2.1. Introducción

El pistachero es un cultivo en expansión en el área mediterránea, se trata de un género adaptado a suelos áridos, de floración tardía y con necesidades hídricas muy limitadas. Aunque no es un género halófilo es halotolerante (Spiegel-Roy *et al.*, 1977) (Behboudian *et al.*, 1986), con lo cual se constituye en un excelente modelo para plantas agrícolas en las que se haya seleccionado la tolerancia a la salinidad como característica.

El cultivo del pistachero en nuestro país se hace sobre pie franco de *Pistacia vera*, *P. atlantica* o *P. terebinthus* que posteriormente se injerta en vivero con la variedad adecuada de *P. vera* para luego trasplantarse a campo a raíz desnuda.

Stahl en 1900 describe al género *Pistacia* como formador de micorrizas y Mejstrick y Cudlin (1983) incluyen *P. lentiscus* en una lista de plantas endomicorrícicas de Algeria. Sin embargo hasta el momento no se ha llevado a cabo ningún estudio extensivo sobre el estado micorrícico de los diversos patrones de *Pistacia* sp.

En este trabajo se han realizado muestreos de distintas especies de *Pistacia* sp utilizadas como patrones en comunidades naturales y en plantaciones comerciales y experimentales. Se han aislado e identificado los hongos formadores de micorrizas VA presentes en los suelos muestreados y se ha sintetizado y evaluado el efecto de la simbiosis VA en *P. vera*, *P. terebinthus* y *P. atlantica*

Esta evaluación puede permitir optimizar los sistemas de cultivo para mejorar el establecimiento de nuevas plantaciones.

## 2.2. Materiales y métodos

### *Metodología de muestreo*

Se muestrearon dos plantaciones y dos ecosistemas naturales localizados en el sudoeste de Cataluña.

Plantación A: Plantación experimental con varios patrones (*P. vera*, *P. terebinthus*, *P. palestina* y *P. atlantica*). Para asegurar que se recogían ejemplares de todos los patrones se muestrearon 4 parcelas. Las parcelas 1 y 2 corresponden a viveros de 1 y 2 años respectivamente, la parcela 3 a una plantación recién establecida (1 año) y la 4 a una plantación de 4 años.

Situación geográfica: en los alrededores de Reus, a 10 km. de la costa y 103 m sobre el nivel del mar.

Plantación B: Plantación comercial con *P. atlantica* como único patrón.

Situación geográfica: En la comarca de 'les Garrigues' de Lérida, en el término municipal de Maials, a 55 km de la costa y a 381 m sobre el nivel del mar.

Comunidad Natural N<sup>o</sup> 1: Encinar Mediterráneo típico con *P. lentiscus* como principal especie secundaria.

Situación geográfica: Sur de la comarca del Barcelonés, a 15 km. de la costa y a 77 m sobre el nivel del mar.

Comunidad Natural N<sup>o</sup>2: Matorral de encinar degenerado con restos de cultivos tales como olivo, vid, profusión de *P. terebinthus* y algunos ejemplares de *P. lentiscus*.

Situación geográfica: Término municipal de Maials, en los alrededores de la plantación B.

Se tomaron muestras de los árboles en tres zonas distintas, alrededor del tronco, que se mezclaron para formar una muestra compuesta.

En la plantación A, se tomaron muestras de cada especie patrón presente: *P. vera*, *P. terebinthus*, *P. atlantica* y *P. palestina* .

En la plantación B, se tomaron muestras en dos parcelas de *P. atlantica* injertado con *P. vera*.

En la comunidad Natural N°1, se tomaron muestras de *P. lentiscus*, especie de *Pistacia* , muy común en la zona mediterránea española, pero que no se utiliza como patrón por la dificultad de compatibilizar un patrón perenne con un injerto de hoja caduca.

En la comunidad Natural N°2, se tomaron muestras de *P. terebinthus*.

Las malas hierbas y plantas acompañantes se muestrearon, cuando ello fue posible, arrancando todo el sistema radical para su examen posterior.

Tanto el suelo como las raíces recolectadas se guardaron en bolsas de plástico a 4°C en la oscuridad hasta su procesado.

## *Procesado del suelo*

### *Determinación de las características físico-químicas*

El fósforo asimilable se determinó mediante el método de Olsen-Watanabe. El nitrógeno total se analizó mediante digestión ácida de Kjeldahl seguida por destilación. Potasio, Calcio y Magnesio se determinaron utilizando espectrofotometría de absorción atómica después de una extracción con acetato amónico 1N. El pH se determinó en una dilución 1:2.5 con agua desmineralizada y la conductividad eléctrica en una dilución 1:5

### *Extracción, aislamiento e identificación de esporas de hongos formadores de micorrizas VA.*

Una cantidad conocida de suelo rizosférico se tamizó para separarlo de las raíces y posteriormente se procesó mediante el método de centrifugación con sacarosa.

El suelo rizosférico restante se utilizó para aislar los posibles hongos formadores de micorrizas VA mediante el método de la planta trampa. Los hongos aislados y reproducidos mediante este bioensayo se identificaron, según los criterios de Schenck y Pérez, modificados por Morton (1989).

### *Determinación del número más probable de propágulos en el suelo*

Se determinó el número más probable de propágulos de hongos formadores de micorrizas VA en la plantación experimental (vivero, parcela 1, plantación A). Para ello se partió de suelo rizosférico tamizado (tamiz de 1 cm de diámetro) que se diluyó hasta 5 veces por factores de 10 (suelo original y diluciones de:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ ). Las diluciones se hicieron con suelo arenoso autoclavado (2 veces en 2 días alternos,  $120^{\circ}\text{C}$ ) ya que el suelo original era muy arcilloso y tendía a compactarse excesivamente.

Se escogieron contenedores de 3 cm de diámetro en los que se pusieron 100 g de suelo y una plántula de trébol. A las seis semanas, se cortaron las plantas y se examinó la totalidad del sistema radical, para determinar la presencia o ausencia de colonización VA. Se determinó el número más probable de propágulos utilizando la tabla VIII<sub>2</sub> del libro de Fisher y Yates (1963).

### *Tinción de raíces*

Las raíces de las plantas acompañantes se tñieron utilizando el método ya mencionado (pg.75 de esta Tesis). Para teñir las raíces de *Pistacia* sp. se precisó de una serie de modificaciones del método, debido a la gran cantidad de taninos presentes.

Método de tinción de raíces adaptado para *Pistacia* sp.

1. Se lavan abundantemente las raíces con agua corriente.
2. Se sumergen las raíces en KOH 10% durante 1 h a 60°C.
3. Se aclaran abundantemente con agua corriente.
4. Se vuelven a sumergir las raíces en KOH al 10% durante 5 h a temperatura ambiente.
5. Se aclaran abundantemente con agua corriente.
6. Se sumergen las raíces en agua oxigenada 10 vol. durante 5 h.
7. Se aclaran abundantemente con agua corriente.
8. Se sumergen las raíces en ácido clorhídrico al 3% durante 1 h.
9. Se vierte el ácido y, sin lavar, teñir con azul trypan en ácido láctico al 0.5% 24 h a temperatura ambiente.
10. Se destiñe en ácido láctico.

Se determinó la presencia o ausencia de colonización VA en los ejemplares de *Pistacia* sp. muestreados y el porcentaje de colonización del sistema radical de las plantas acompañantes, recolectadas utilizando el método de la placa cuadrículada (Giovanetti y Mosse, 1980).

## *Síntesis de la simbiosis MVA y curva al fósforo de P. vera , P. atlantica y P. terebinthus*

La observación de los efectos de la simbiosis ha de hacerse en condiciones controladas, por lo que se procedió a intentar la síntesis de la simbiosis con los distintos patrones: *P. vera*, *P. atlantica* y *P. terebinthus*, y se realizó la curva al fósforo para evaluar la dependencia de los distintos patrones.

### *Germinación de semillas*

Las tres especies ensayadas tienen características distintas en cuanto a su morfología que han requerido la elaboración de protocolos específicos para cada una de ellas.

#### *P. terebinthus*

El terebinto es un árbol espontáneo en toda la región mediterránea, incluyendo a España, por lo que las semillas utilizadas fueron recolectadas de árboles no cultivados en la zona de Prades. En el momento de la recolección, en un mismo racimo de frutos, hay semillas fecundadas que aparecen de color azul y semillas no fecundadas de color rojo. La separación manual de ambos tipos de semillas es tediosa, sobre todo si ha transcurrido un cierto tiempo desde la recolección, porque los colores se van desvaneciendo. Las semillas se separaron por densidad en el agua, las semillas vacías flotaban, mientras que las fecundadas caían al fondo. Para permitir la imbibición inicial de las semillas hubo que escarificarlas, por lo que tras distintas pruebas se elaboró el siguiente protocolo:

1. Se lava y raspa superficialmente el pericarpio.
2. Se secan las semillas.
3. Se sumergen en  $H_2SO_4$  concentrado durante 30 min.
4. Se lava y raspa la parte oxidada (negruzca).
5. Se secan las semillas.
6. Se sumergen de nuevo en  $H_2SO_4$  concentrado durante 30 min.
7. Se lava y raspa la parte oxidada.

Para favorecer la germinación sincronizada de las semillas se realizó un tratamiento con giberelinas (200 ppm de GA<sub>3</sub>). Las semillas se dejaron en la solución acuosa de GA<sub>3</sub> durante 24 h.

Las semillas se dispusieron en bandejas de suelo arenoso autoclavado (120°C, 1h, 2 días alternativos) que se situaron en invernadero con temperatura controlada de 25°C.

#### *P. atlantica*

Las semillas de *P. atlantica* se obtuvieron de la Dra María Herrero del servicio de Investigación Agraria de la Comunidad Autónoma de Aragón. Estas semillas son muy parecidas a las de *P. terebinthus*. Tenían el pericarpio ya eliminado por lo que se obviaron los pasos 1 y 2, y al tener la pared del endocarpio más fina, se redujo la escarificación a un solo tratamiento de 30 min con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Los semilleros se dispusieron igual que para *P. terebinthus*.

#### *P. vera*

Las semillas de *P. vera* fueron suministradas por el Sr. Francisco Vargas de la Unidad de Fruticultura Mediterránea del Centro de Mas Bové (IRTA). Estas semillas son extraordinariamente distintas de las de *P. atlantica* y *P. terebinthus*. Al tener la cáscara abierta no precisan de escarificación previa por lo que se lavaron y se sometieron al mismo proceso de imbibición, ya citado, con una solución acuosa de 200 ppm de GA<sub>3</sub>. Seguidamente para evitar problemas fúngicos en el proceso de germinación se trataron con una solución acuosa de 32 gl<sup>-1</sup> de oxiclورو de cobre antes de disponerlas en semilleros de 'porexpan' de 20 cm de profundidad en un sustrato de perlita: vermiculita (1:1) que también se mantuvo en invernadero a 25°C.

#### *Inoculación*

Una vez obtenidas las plántulas de cada una de las especies, éstas se inocularon con *Glomus mosseae* (cepa procedente de Rothamsted), mediante el uso de un inóculo consistente en una mezcla homogenizada de suelo y raíces de varias plantas procedentes de la colección que se mantiene

en IRTA. El NMP de este inóculo compuesto se había valorado con anterioridad, y era equivalente a 2.96 propágulos por gramo. Se utilizaron 5 g de inóculo que se dispusieron en capa debajo de las raíces de cada una de las plántulas. El sustrato utilizado fue suelo arenoso autoclavado y el tamaño del contenedor 1l de capacidad. A las plantas no inoculadas se les agregó un filtrado del inóculo. Este filtrado se realizó dejando en agitación durante una hora 10 g del inóculo utilizado en un litro de agua y filtrando luego esta solución a través de papel Whatman nº41. A las plántulas de *P. vera* se les separaron sus cotiledones en el momento de la inoculación, para restringir la utilización de material de reserva que podía interferir con el efecto de las MVA. Las plántulas de todas las especies se seleccionaron lo más homogéneas posible.

### *Síntesis de la simbiosis*

Para *P. vera* se utilizaron 18 plantas por tratamiento (inoculado/no inoculado) y 10 por tratamiento en las otras dos especies. Las plantas se dispusieron, al azar, en dos banquetas de un invernadero, sin calefacción ni luz artificial y se recolectaron a los 4 meses (Marzo-Junio). Se determinaron el peso seco de la parte aérea, el peso seco de la raíz y su colonización interna para cada una de las plantas cosechadas.

## *Curvas al fósforo*

La germinación de semillas se llevó a cabo mediante los protocolos descritos anteriormente. El sustrato utilizado fue suelo arenoso autoclavado con una baja concentración de fósforo (5 ppm), al que se le adicionó la cantidad de fósforo adecuada, en forma de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en las concentraciones siguientes: 100, 200 y 400 ppm. Una vez adicionada la sal, se dejó estabilizar el suelo cerrado en una bolsa de plástico en el invernadero. El inóculo utilizado fue el mismo que en el ensayo anterior, inoculándose las plantas en el momento del trasplante. Las plantas se recolectaron a los ocho meses, (Marzo-Octubre) determinándose: peso seco de la parte aérea, peso seco de la raíz y colonización interna.

## *2.3. Resultados y discusión*

### *Muestreo*

Las características químicas de los suelos muestreados se resumen en la Tabla 1. En ninguno de los suelos se encontraron esporas maduras de hongos formadores de micorrizas VA, aunque se observaron agregados de micelio y pequeñas esporas translúcidas de difícil clasificación.

El porcentaje de colonización interna de las plantas acompañantes no se presenta, ya que la mayoría de esas plantas acompañantes recolectadas de las distintas plantaciones muestreadas no presentaban la simbiosis. Las parcelas 1,2 y 3 de la plantación A, que corresponden a zonas de vivero, tienen el porcentaje más bajo de plantas acompañantes micorrizadas. El porcentaje de árboles micorrizados que presentan la simbiosis aumenta con la edad del vivero/plantación desde 30%, en el vivero recién establecido, hasta un 75%, en la plantación de 4 años (Tabla 2).

En la plantación B y en los sistemas naturales examinados todos los árboles muestreados presentaban la simbiosis. Aunque los niveles de fósforo son bajos en todos los lugares muestreados, las prácticas de cultivo empleadas en la plantación experimental, con tratamiento de herbicidas regulares, perjudica el establecimiento de la micorrización. Corroborando estos resultados, la determinación del NMP de la parcela de vivero recién establecido dio niveles bajos (0.02 propágulos por g de suelo) que explican el bajo número de árboles micorrizados.

En la Tabla 3 se recoge el porcentaje de árboles micorrizados de cada especie. Los árboles nativos son los que presentan un mayor porcentaje de micorrización, hecho que puede ser debido a una baja infectividad de los campos cultivados, pero no se puede descartar una menor receptividad a la colonización VA de las especies introducidas.

Características determinadas	Plantación A vivero 1 año	Plantación A vivero 2 años	Plantación A recién establecida	Plantación A 4 años	Plantación B	Comunidad natural 1	Comunidad natural 2
pH (1:2.5)	7.8	7.9	7.7	8.0	8.4	7.8	8.0
C.E. (1:5) dS/m	0.24	0.17	0.36	0.19	0.19	-	0.15
mat. org. oxidable (%)	2.14	2.27	1.67	1.02	1.87	-	3.8
N Kjeldahl (%)	0.114	0.148	0.145	0.097	0.116	-	0.166
relación C/N (%)	10.91	8.92	6.70	6.11	9.37	-	13.31
106 carbonatos totales (%)	7.67	34.47	15.38	24.54	41.62	-	41.12
caliza activa (%)	1.48	5.71	3.41	3.39	8.36	-	6.39
fósforo Olsen (ppm)	2	5	3	3	4	-	3
potasio (ppm)	164	380	373	202	504	-	405
magnesio (meq/100g)	2.71	1.29	3	1.97	6.76	-	6.59
calcio (meq/100g)	44.12	46.12	47.95	45.11	49.95	-	42.13

*Tabla 1* : Características químicas de los suelos muestreados

*Tabla 2* : Patrones de Pistachero y plantas acompañantes con colonización MVA en relación con la localidad muestreada

Localidades muestreadas	Nº árboles muestreados	% árboles con MVA	Plantas acompañantes muestreadas	Plantas acompañantes con MVA
Plantación A:				
vivero 1 año	4	50	6	1
vivero 2 años	6	50	4	1
plantación recién establecida	7	30	8	1
plantación 4 años	8	75	4	3
Plantación B	6	100	5	4
Comunidades naturales 1&2	6	100	5	5

*Tabla 3* : Colonización VA en los distintos patrones de pistachero muestreados

Patrón	Nº árboles muestreados	% árboles con MVA	Localidades muestreadas
<i>P. atlantica</i>	14	64	1, 3, 4, 5
<i>P. palestina</i>	7	43	2, 3, 4
<i>P. vera</i>	6	50	2, 3, 4
<i>P. terebinthus</i>	7	86	3, 4, 7
<i>P. lentiscus</i>	3	100	6, 7

## *Aislamiento de hongos*

El aislamiento de hongos realizado y la posterior purificación y multiplicación han dado como resultado la identificación de 6 aislados.

### *Aislado 1 (Fig. 1)*

Recuperado de la plantación A, de la parcela de plantación de 4 años, asociado a *P. vera*.

Esporas pedunculadas pertenecientes al género *Glomus*. Tamaño de 100-180  $\mu\text{m}$ . Color amarillo claro. Forma globosa a ovalada. Forman agregados y se encuentran únicamente en el interior de raíces.

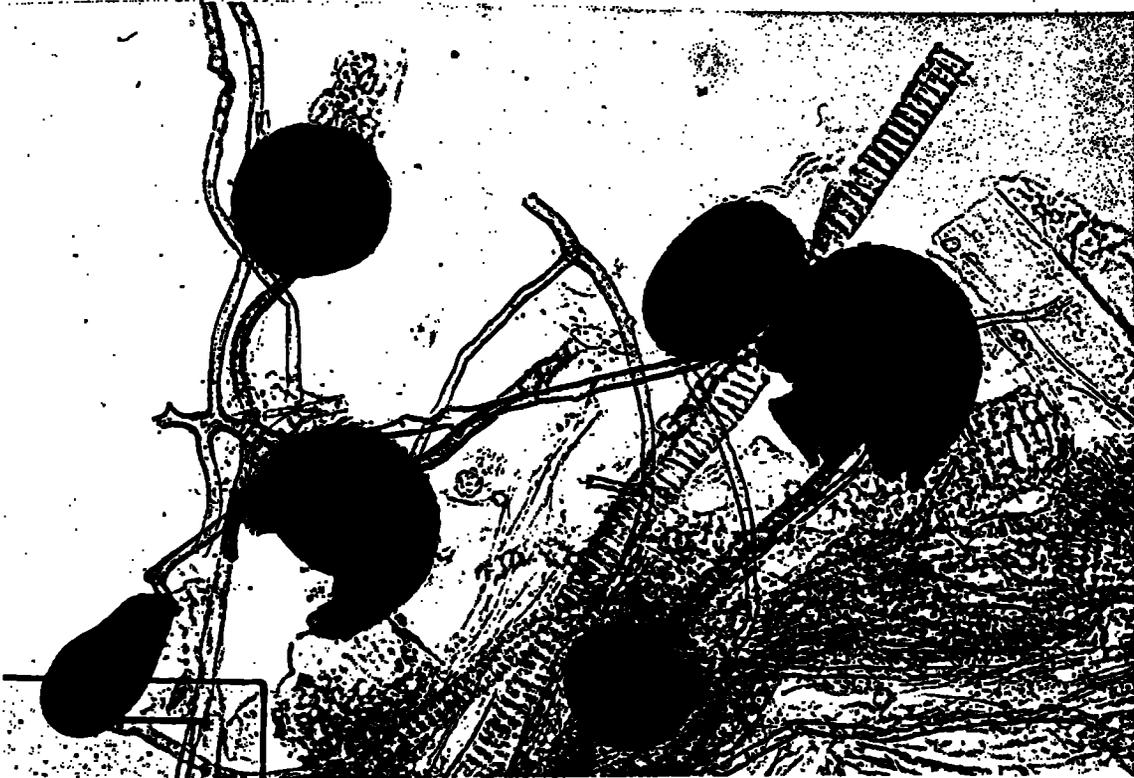
Presentan una membrana hialina evanescente externa en la que existe una capa mucilaginosa que reacciona, tomando una coloración rojiza, con el reactivo de Metzler y dos capas laminadas de color amarillo, la interior más oscura que la exterior. Las tres paredes forman parte de un mismo grupo ya que quedan unidas al romper la espora. Pedúnculo tubiforme característico.

Identificación: *Glomus intraradices* Schenck & Smith

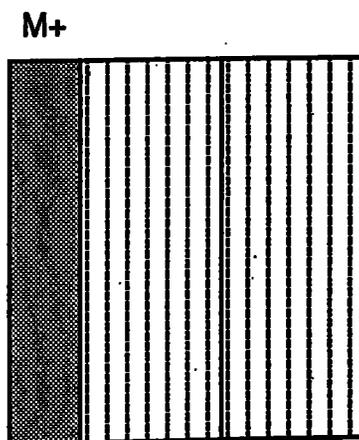
Esta especie también se ha aislado de la zona del Delta del Ebro, lo cual concuerda con su amplia distribución ya señalada por Schenck y Smith (1982).

*Figura 1: Espora tipo 1 Glomus intraradices*

a) Esporas en Metzler



b) Murograma



*Glomus intraradices*

*Aislado 2 (Fig. 2)*

Recuperado en la plantación A de la parcela de vivero de 2 años. Esporas globosas de tamaño característicamente distribuido de forma bimodal (60-100  $\mu\text{m}$ ) y (200-300  $\mu\text{m}$ ). Color amarillo claro, muy vacuoladas con vacuolas irregulares. Solas, formando agregados miceliares o esporocarpos. Pedúnculo característico en forma de embudo.

La estructura de la pared consta de una membrana externa hialina evanescente que, en las esporas jóvenes, aparece como una membrana unitaria y de una pared laminada de color amarillo.

Identificación *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerdemann & Trappe.

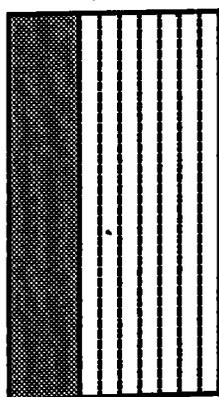
Especie de amplia distribución también aislada de la zona del Delta.

*Figura 2: Espora tipo 2 Glomus mosseae*

a) Espora en PVLG



b) Murograma



*G. mosseae*

*Aislado 3 (Fig. 3)*

Recuperado en la plantación A de la parcela de plantación establecida de 4 años.

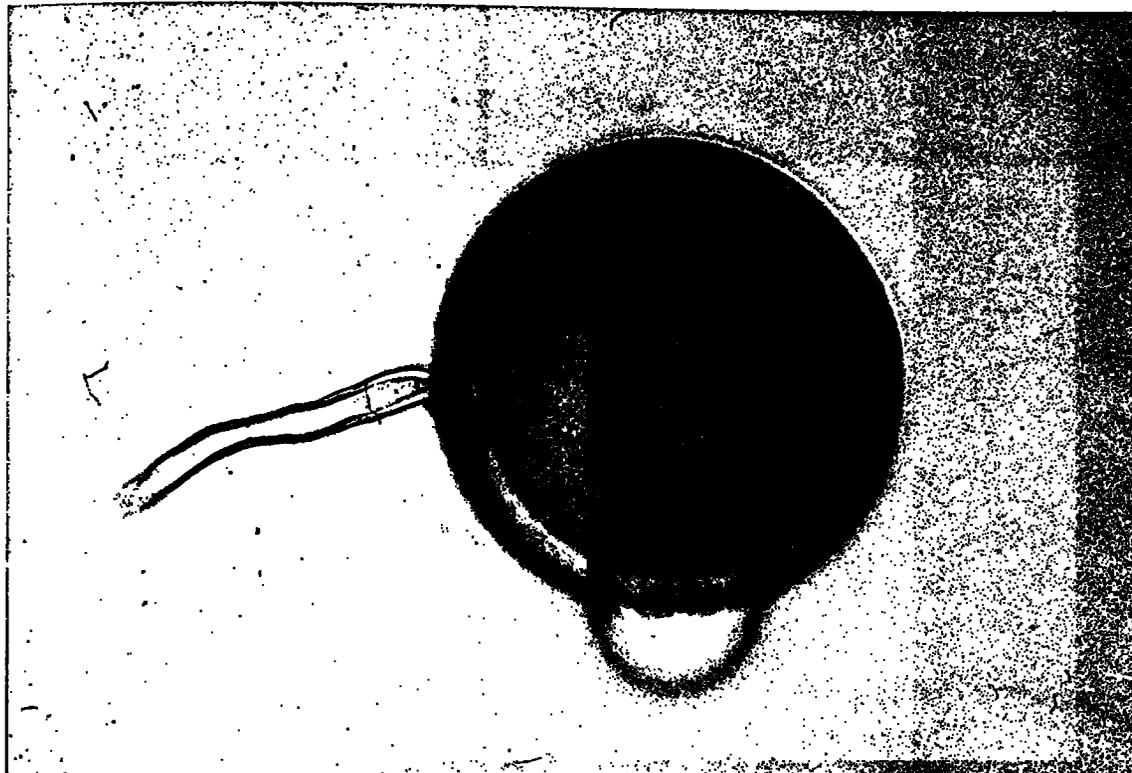
Esporas pedunculadas, pertenecientes al género *Glomus*, no forma esporocarpos ni agregados miceliares, tamaño medio 100  $\mu\text{m}$ , color marrón rojizo brillante, forma de globosa a ovalada, pedúnculo característico con ligera forma de embudo en el que se prolonga el engrosamiento de las paredes celulares de la espora. La estructura de la pared consta de una membrana externa evanescente, una pared laminada y una pared membranosa.

Identificación: *Glomus geosporum* (Nicol. & Gerd.) Walker

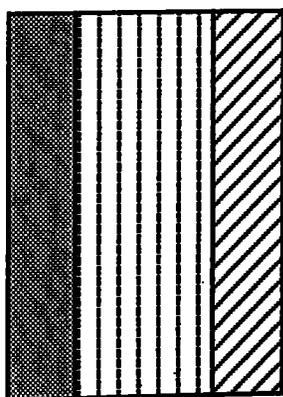
Esta especie se ha formado por escisión de *Glomus macrocarpum* cuya variedad *geosporum* se consideró lo suficientemente distinta para convertirse en una nueva especie (Walker, 1982)

*Figura 3: Espora tipo 3 Glomus geosporum*

a) Espora en agua



b) Murograma



*G. geosporum*

#### *Aislado 4*

Recuperado en la plantación B. Prácticamente idéntico al aislado 2. Se considera como otro edafotipo (Bethlenfalvay *et al.*, 1989) de *Glomus mosseae*: (Nicol. & Gerd.) Gerdemann & Trappe.

#### *Aislado 5 (Fig. 4)*

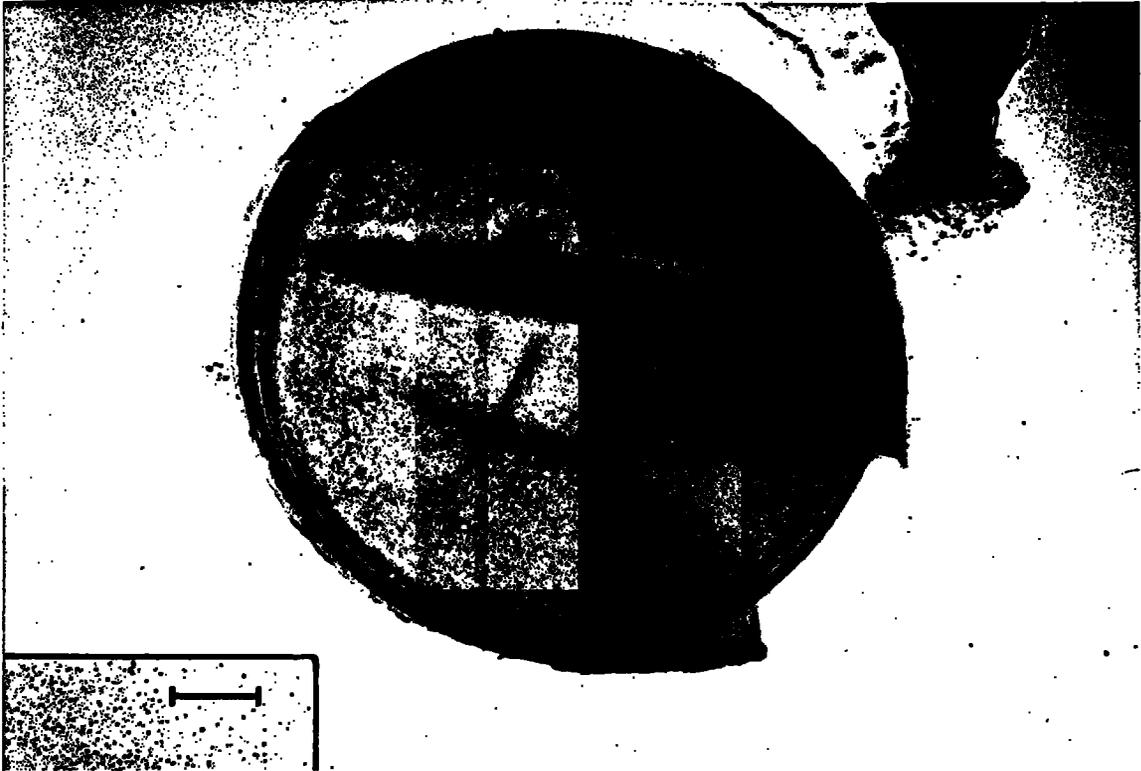
Recuperado en la plantación B. Esporas irregulares, de globosas a subglobosas y ovoides. Tamaño de 100 a 120  $\mu\text{m}$ . Color amarillo oscuro-marrón. Localizadas siempre en el interior de raíces. La estructura de la pared comporta una pared hialina evanescente, otra pared hialina evanescente que con una capa mucilaginosa que reacciona con el reactivo de Metzler, dando un color rojizo oscuro, más una o dos paredes laminadas, difícilmente separables.

Identificación presuntiva: *Glomus intraradices* Schenck & Smith

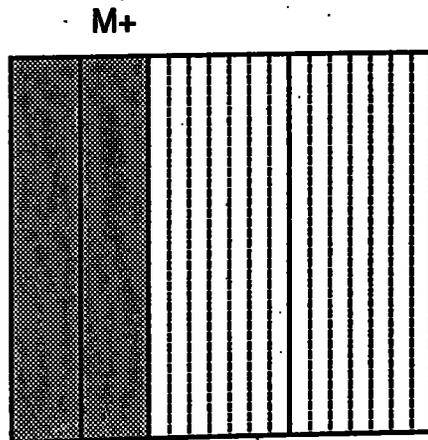
En este aislado no se logran distinguir claramente las dos paredes laminadas típicas de esta especie, sin embargo los otros hongos con una estructura de pared similar (*G. constrictum*, *G. etunicatum* y *G. mosseae*) no coinciden con las otras características descritas tales como el tamaño y la forma del pedúnculo.

*Figura 4: Espora tipo 5 Glomus intraradices*

a) Espora en Metzler



b) Murograma



*G. intraradices*

*Aislado 6 (Fig. 5)*

Recuperado de la comunidad natural nº 1, asociado a *P. lentiscus*. Las esporas son pedunculadas, del género *Glomus*, formando agregados miceliares no contenidos en peridio. Forma globosa, tamaño pequeño de 70 a 100 µm de diámetro. La estructura de la pared se caracteriza por una pared laminada, muy gruesa, que en el exterior está limitada por una membrana unitaria y en el interior por una pared membranosa. El contenido de la espora está ocluido por un poro que permanece abierto en las esporas jóvenes.

Identificación: *Glomus fasciculatum* (Thaxter) Gerdemann & Trappe *emend.* Walker & Koske.

*Glomus fasciculatum* es una especie cuyo holotipo y descripción inicial han generado muchas confusiones (Walker y Koske, 1987), observándose que el concepto de *Glomus fasciculatum sensu lato* en realidad incluía otras especies: *G. deserticola*, *G. aggregatum* y *G. hoi*.

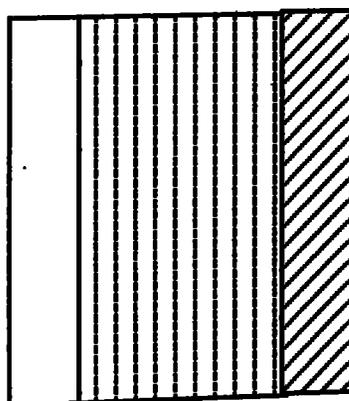
Walker y Koske han redescrito *Glomus fasciculatum sensu stricto* teniendo en cuenta las características de estructura de la pared, que son prioritarias en la taxonomía actual de estos hongos. Las características de nuestro aislado coinciden, exactamente, con la descripción de Walker y Koske (1987).

*Figura 5: Espora tipo 6 Glomus fasciculatum*

a) Agregado de esporas en PVLG



b) Murograma



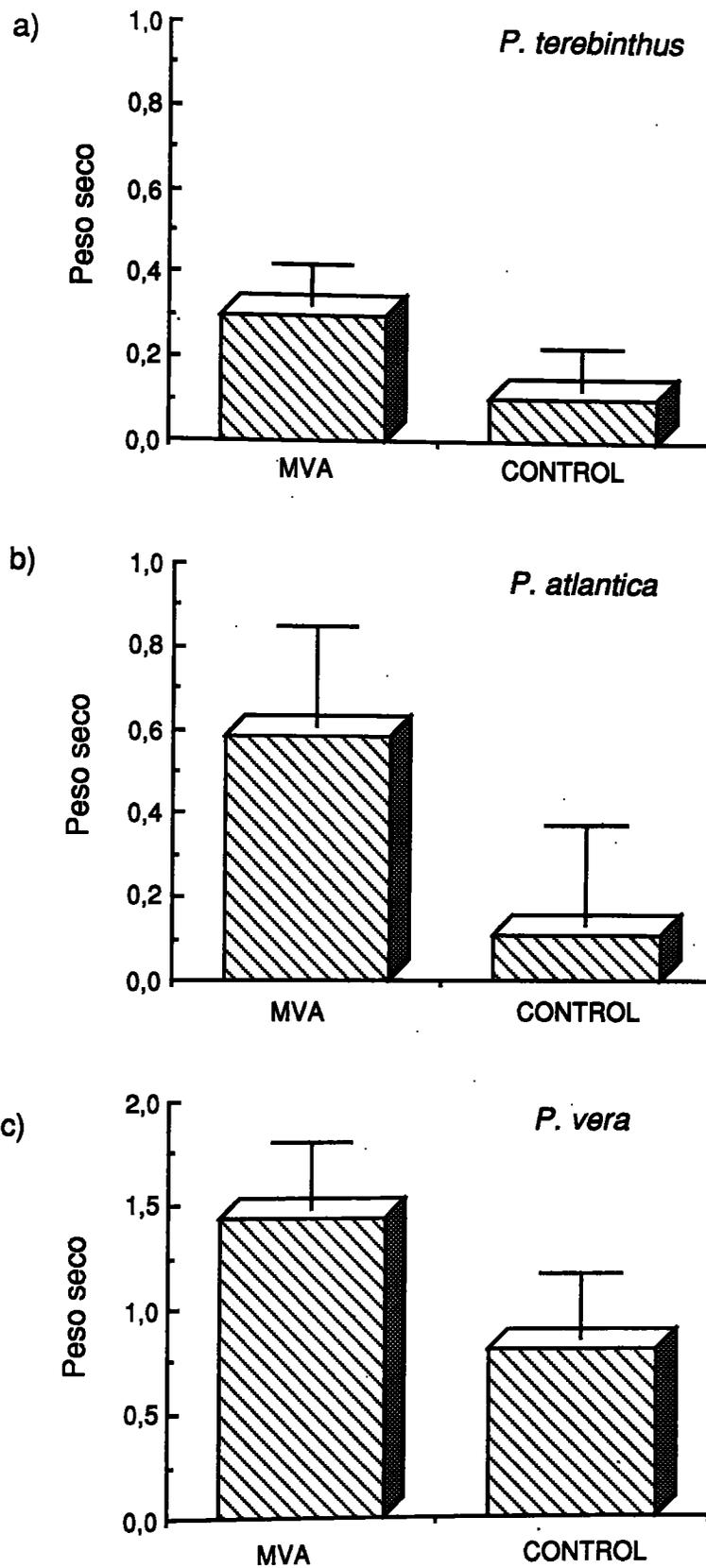
*G. fasciculatum*

## *Síntesis de la simbiosis*

Para determinar si las diferencias entre porcentajes de árboles micorrizados, de las distintas especies muestreadas, eran intrínsecas o extrínsecas, se llevaron a cabo los ensayos de síntesis de la simbiosis en invernadero, comparando una planta autóctona, *P. terebinthus*, con dos especies introducidas, *P. atlantica* y *P. vera*. Los resultados de peso seco de la parte aérea y de porcentaje de infección se recogen en la Fig. 6 y en la Tabla 4, respectivamente.

**Tabla 4** :Colonización VA en los distintos patrones de pistachero obtenida en la síntesis de la simbiosis con *Glomus mosseae* en invernadero

Patrón	Porcentaje de colonización
<i>P. vera</i>	53 ± 7
<i>P. atlantica</i>	39 ± 5
<i>P. terebinthus</i>	39 ± 10



**Figura 6** : Efecto de la inoculación de V.A en el crecimiento de a) *P. terebinthus* , b) *P. atlantica* y c) *P. vera*

## *Curvas al fósforo*

La determinación del efecto del fósforo en la simbiosis se recoge en la Fig. 7, 8 y 9 en la Tabla 5.

A los 8 meses ninguna planta del tratamiento sin P de *P. terebinthus* no inoculada había sobrevivido. En este tratamiento, las plantas de *P. vera* y *P. atlantica* inoculadas presentan un crecimiento muy superior a las no inoculadas.

A partir del primer nivel de fósforo ensayado (100 ppm), el crecimiento de los patrones no presenta diferencias significativas entre plantas inoculadas y no inoculadas, observándose que, al aumentar la concentración de P disminuye el número de plantas inoculadas que, efectivamente, desarrollan la simbiosis. Al nivel máximo de P ensayado (800 ppm), *P. terebinthus* y *P. atlantica* alcanzan un 100% de plantas inoculadas que no desarrollan la simbiosis y *P. vera* llega hasta un 63%.

De todo ello, podemos destacar que *P. terebinthus* es un patrón cuyo crecimiento está muy ligado a su nutrición en P, ya que, si ésta es deficiente necesita de la presencia obligada de la simbiosis para prosperar.

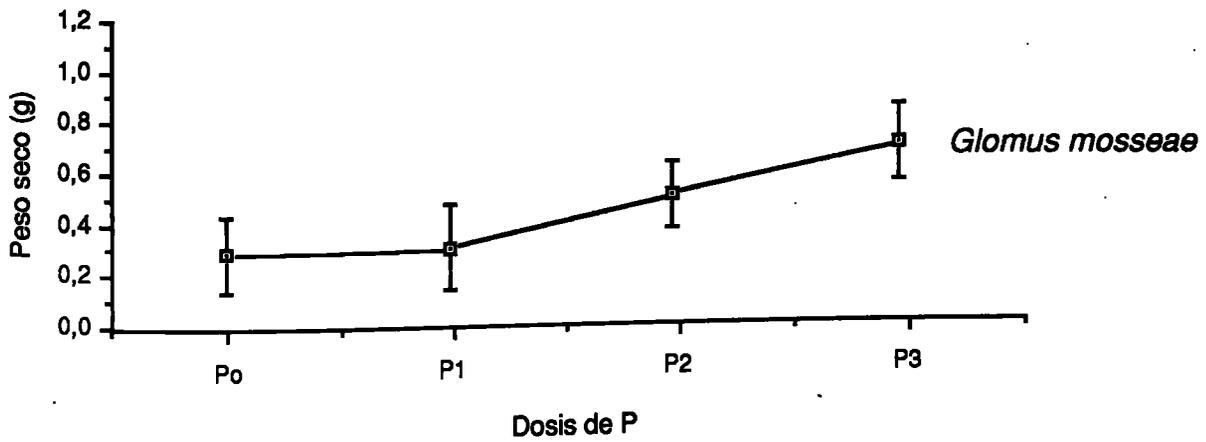
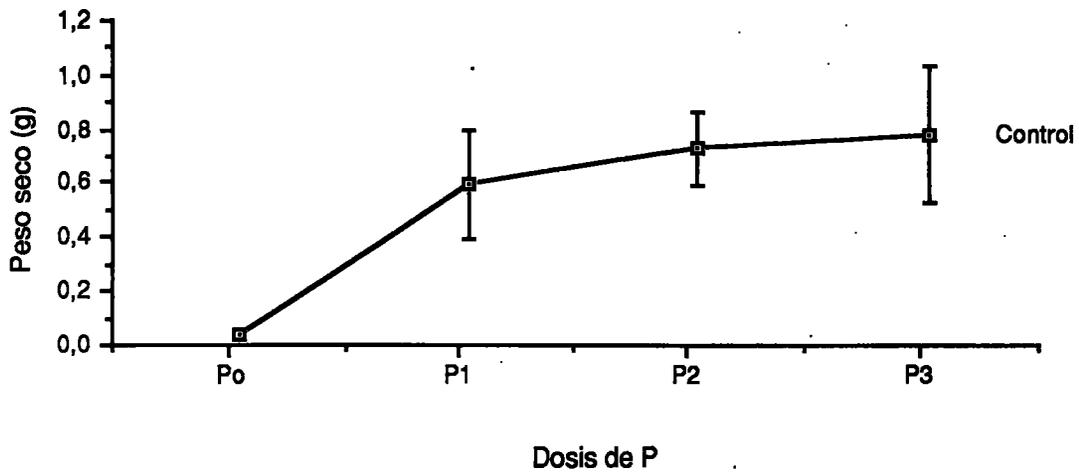
Un caso semejante ocurre con *P. atlantica* Fig. 8 (a y b), ambos patrones son extraordinariamente dependientes de las micorrizas a bajas concentraciones de P, sin embargo, al incrementarse estos niveles la planta no permite el establecimiento del hongo. Llegando a 400 ppm de P la colonización VA es, prácticamente nula, en estos dos patrones.

En el caso de *P. vera*, Fig. 9 (a y b) la dependencia micorrícica no es tan elevada a niveles bajos de P. Al aumentar los niveles del nutriente tampoco se observan diferencias significativas entre plantas inoculadas y no inoculadas pero, a diferencia de *P. terebinthus* y *P. atlantica*, la planta aún permite el establecimiento del hongo a niveles altos de P.

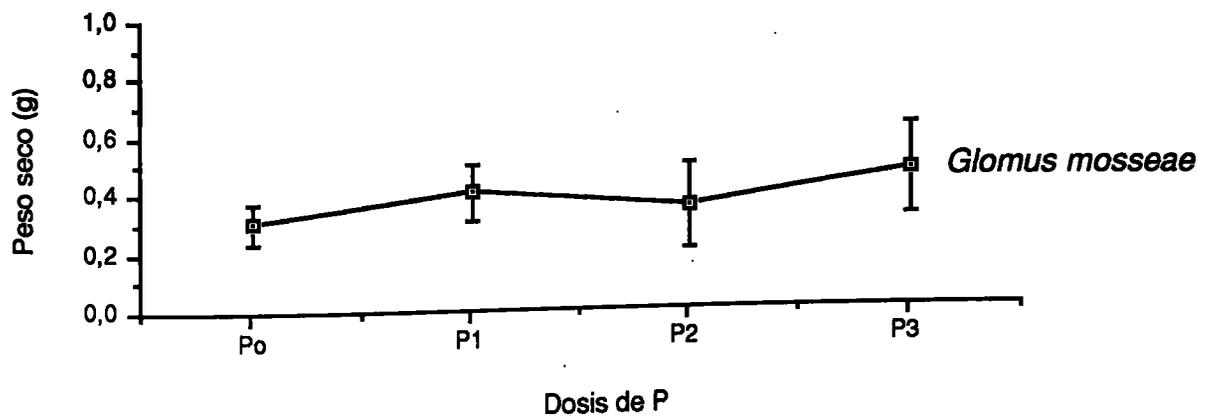
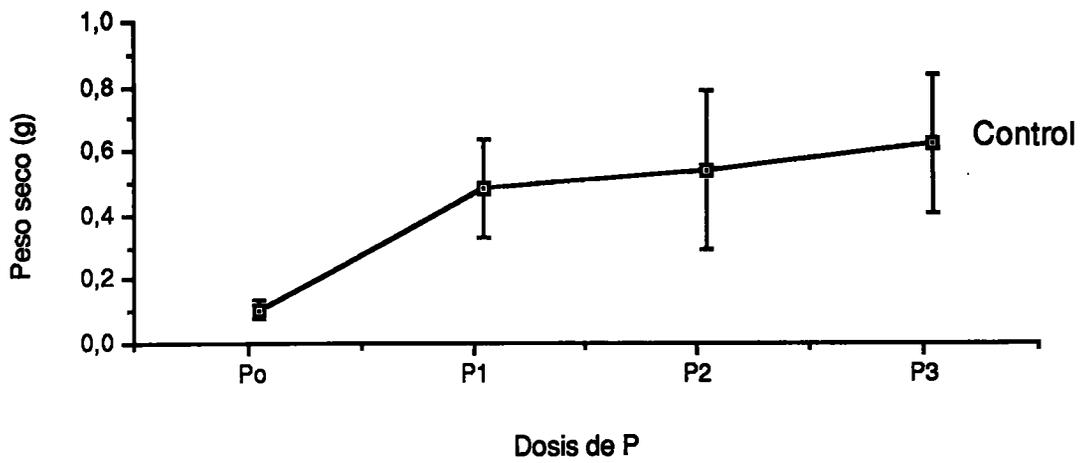
**Tabla 5** : Efecto del abonado en P en la colonización VA.  
 Porcentaje de plantas inoculadas que no presentan la simbiosis a los 8 meses de cultivo.

Dosis de P (ppm)	<i>P. terebinthus</i>	<i>P. vera</i>	<i>P. atlantica</i>
0	0	0	13
100	25	0	38
400	75	43	100
800	100	63	100

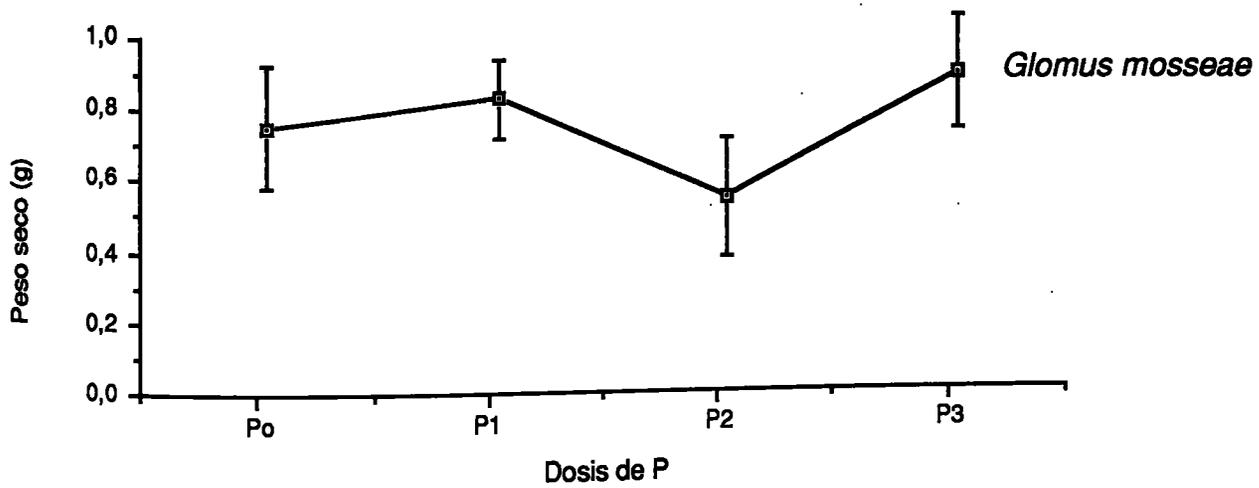
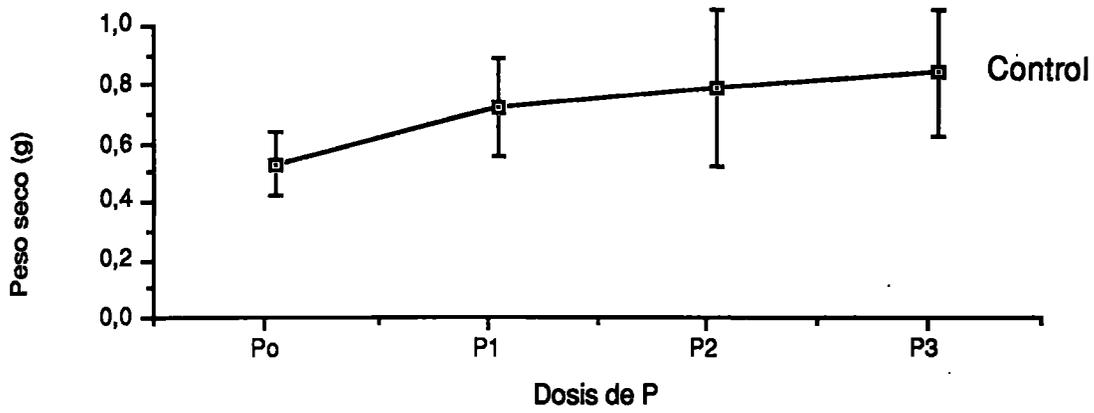
*Figura 7* : Efecto del abonado en P y de la colonización VA en el crecimiento de *P. terbinthus*



*Figura 8* : Efecto del abonado en P y de la colonización VA en el crecimiento de *P. atlantica*



*Figura 9* : Efecto del abonado en P y de la colonización VA en el crecimiento de *P. vera*



De las curvas de fósforo se puede establecer que, *P. atlantica* se asemeja, en su respuesta, a la gran mayoría de plantas cultivadas estudiadas, en que el efecto de la simbiosis se va diluyendo a medida que aumenta la concentración de P, y la planta es cada vez menos receptiva al hongo.

*P. terebinthus* tiene, sin embargo, una reacción peculiar ya que la simbiosis parece ser esencial en condiciones de precariedad de P, aunque a partir de la primera dosis de P se llega al nivel de saturación y la planta no permite el establecimiento del hongo. Esta reacción parece indicar que la utilización de *P. terebinthus* como patrón puede venir muy condicionada por la simbiosis y/o por un buen nivel de abonado.

*P. vera* tiene una curva tradicional para los árboles que no han sido inoculados, sin embargo para los no micorrizados, tiene un punto de inflexión en el nivel 2 de P (200 ppm) que corresponde a una disminución en el crecimiento respecto al alcanzado en el nivel anterior, este hecho indica un efecto negativo de la simbiosis en condiciones de elevada nutrición fosforada,. En el nivel 3 (400 ppm de P) tan solo 47% de las plantas inoculadas ha establecido la simbiosis y obviamente el crecimiento de plantas inoculadas y no inoculadas es muy similar, observándose una mayor desviación típica en la respuesta de las plantas inoculadas, debida a que la colonización no es homogénea.

Las diferencias de comportamiento entre los tres patrones ensayados indican que, en el momento de establecer una plantación, uno de los factores que ha de evaluarse es el contenido en P del suelo, para determinar el tipo de patrón y la conveniencia de la inoculación con hongos formadores de micorrizas. Como se observa en los resultados de los análisis de los suelos de las plantaciones de pistachero muestreadas (Tabla 1), las concentraciones de P son muy bajas, por lo que la conveniencia de la inoculación en estas condiciones es evidente, sin embargo, si el cultivo del pistachero se extendiera y se adoptara un modelo más intensivo, semejante al de árboles frutales, entonces la inoculación podría no ser necesaria.

## Capítulo 3

*Efecto de la presión osmótica en la fase de germinación y crecimiento inicial de micelio de dos aislados de *Glomus mosseae**

### 3.1 Introducción

Los pocos estudios realizados sobre la interacción micorrizas VA-salinidad en el desarrollo de las plantas en condiciones de salinidad, han generado resultados muy variables. Esta variación, se ha atribuido a un comportamiento diferencial entre las distintas cepas de hongos utilizados, habiéndose sugerido que los hongos aislados de zonas salinas en estas condiciones son más efectivos.

Uno de los primeros procesos que se han de analizar, para valorar la existencia de diferencias en el comportamiento de distintos hongos frente a la salinidad, es su germinación. La germinación de hongos VA ha sido extensamente estudiada (Hepper, 1979) (Azcón de Aguilar *et al.*, 1991) sin embargo, el efecto del NaCl ha sido poco estudiado, ya que los trabajos realizados tenían, como objetivo, la investigación de factores que favorecieran la germinación y crecimiento de micelio. Hirrel (1981) valoró los efectos de distintas sales sobre la germinación de *Gigaspora margarita*, diferenciando los efectos tóxicos de algunos iones del efecto de sus sales.

En el presente trabajo se propone el estudio en un primer tiempo del efecto del NaCl y de otro soluto no iónico (manitol) sobre la germinación de *G. mosseae*, para distinguir la existencia de un efecto tóxico de los iones del efecto puramente osmótico de la sal. Dado que se encontraron efectos diferenciales, en una segunda fase se valoran dichas respuestas diferentes a la sal (NaCl) y al soluto no iónico (manitol). Se utilizaron dos aislados de *G. mosseae*, uno de ellos corresponde al aislado tipo 1 del Delta del Ebro.

## *3.2. Materiales y métodos*

### *Cultivo de los hongos*

A fin de minimizar las posibles diferencias poblacionales, debidas al sustrato de cultivo, los dos aislados empleados en estos ensayos se multiplicaron de la misma forma. Se inocularon tréboles con esporas de cada uno de los aislados. Una vez comprobada la colonización, se utilizaron las raíces de estos tréboles para inocular plántulas de cebolla. A los seis meses se cuantificó el número de esporas y esporocarpos por planta. Para cada uno de los hongos se seleccionó una sola planta hospedadora como fuente de esporas. Esta planta se cortó y el suelo rizosférico se guardó en una bolsa de plástico a 4°C.

### *Obtención de esporas*

Las esporas se obtuvieron a partir de esporocarpos diseccionados bajo lupa binocular, procurando que su tamaño y aspecto fuera lo más homogéneo posible. Los esporocarpos se extrajeron mediante tamizado húmedo del suelo rizosférico seleccionado.

### *Preparación de las soluciones de NaCl y manitol*

Para valorar la existencia de diferencias entre las respuestas a NaCl y a Manitol en la germinación de esporas, las soluciones utilizadas de ambos compuestos tenían que tener una presión osmótica equivalente.

Se fijaron previamente las soluciones de NaCl que se iban a estudiar y que fueron: 1, 2, 4, 6 y 8 g de NaCl por litro de agua destilada. Para obtener la concentración equiparable de manitol se calculó el peso de este compuesto que produciría una variación equivalente de una propiedad coligativa (Casadio,1979), que resultó ser :

$$1\text{g NaCl} = 5.63\text{ g de manitol}$$

Este valor teórico se comprobó midiendo el potencial osmótico de las distintas soluciones mediante un osmómetro termoeléctrico Wescor 5100C. En la Tabla 1 se consignan las presiones osmóticas ( $\pi$ ) obtenidas para cada concentración de soluto utilizada así como la conductividad eléctrica a 25°C.

Concentración de NaCl (g/l)	Presión osmótica (MPa)	C.E (dS/m)	Concentración de Manitol (g/l)	Presión osmótica (MPa)	C.E. (dS/m)
0	-0.058	0.051			
1	-0.148	2.044	5.63	-0.138	0.0372
2	-0.221	3.775	11.26	-0.206	0.0316
4	-0.350	6.559	22.52	-0.362	0.0327
6	-0.522	9.689	33.78	-0.532	0.0326
8	-0.651	12.163	45.04	-0.639	0.0371

**Tabla 1:** Concentración, presión osmótica y conductividad eléctrica de las soluciones de NaCl y Manitol utilizadas en los ensayos de germinación de esporas.

## *Metodología general de los ensayos en condiciones axénicas*

Los ensayos se efectuaron *in vitro* en condiciones asépticas. Además de la germinación se estudiaron el crecimiento de micelio y la recuperación del potencial germinativo de las esporas de *G. mosseae* después de los tratamientos.

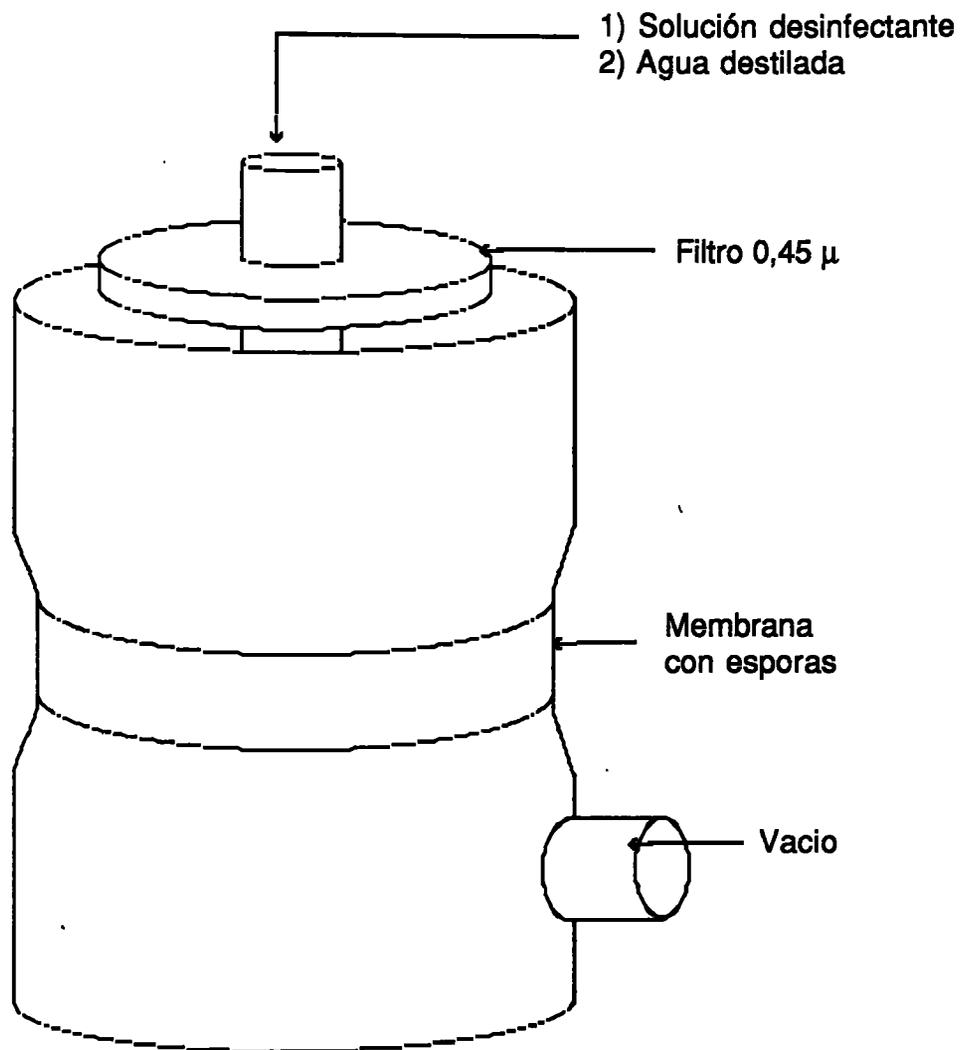
### *Desinfección de esporas (Fig. 1)*

Las esporas una vez limpias, se colocaron sobre un filtro de membrana Millipore de 8  $\mu\text{m}$  de poro. Este filtro se incluyó en una unidad Sterilet® de Millipore. La solución desinfectante se vertió sobre las esporas a través de un filtro de nitrocelulosa de Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  incluido en una unidad filtrante de acero inoxidable esterilizada (120°C, 20 min).

Solución desinfectante (adaptada de Mosse, 1962)

Cloramina T	2 g
Estreptomicina base	30 mg
H <sub>2</sub> O destilada estéril	100 ml

Las esporas se mantuvieron en esta solución durante periodo de 15 min, pasado el cual, se sometieron a un lavado continuo con agua destilada estéril durante 10 min más.



**Figura 1 :** Esquema del montaje para la desinfección de esporas

### *Preparación de los medios*

Se añadieron las cantidades necesarias para los distintos tratamientos, ya calculadas con anterioridad, (Tabla 1) a 100 ml de agua destilada. El pH de cada una de las botellas se ajustó  $7.0 \pm 0.1$  con NaOH 0.01N. Posteriormente se adicionó 1 g de Agar Difco® y luego se autoclavó (120°C, 15 min). Las placas se prepararon en cabina de flujo, utilizándose placas desechables de 9 cm de diámetro. Las placas se prepararon con dos días de antelación a la siembra de esporas, para permitir un buen asentamiento y controlar posibles contaminaciones ambientales.

Las esporas, una vez desinfectadas, se transfirieron a las placas, mediante pinzas de relojero y/o pipeta Pasteur, a razón de 6 esporas por placa. Se utilizaron 3 placas por tratamiento. El experimento completo se repitió 5 veces.

### *Incubación y toma de resultados*

Las placas de agar con esporas se incubaron a 25 °C en la oscuridad. A los 3, 6, 14 y 21 días se observaron bajo lupa binocular anotándose el nº de esporas germinadas.

### *Análisis estadístico*

Debido a las características no paramétricas de los datos, se utilizaron tablas de contingencia para el análisis de los resultados. En primer lugar, se comprobó la homogeneidad de los datos obtenidos en los distintos lotes. Una vez comprobada, el número de esporas totales era suficiente para suponer una aproximación a una distribución normal mediante las correcciones adecuadas. La corrección utilizada en este caso fue el arcoseno del porcentaje de germinación. Se utilizó un ANOVA con  $p = 0.05$  y el test de comparaciones múltiples de Tuckey para valorar diferencias entre tratamientos. Además, se combinó la regresión lineal con el test ANOVA, para determinar si la germinación estaba influida de igual forma por la presión osmótica debida a los distintos solutos empleados.

*Experimento nº 1: Efecto del NaCl y del manitol sobre la germinación de G. mosseae en condiciones axénicas*

La evaluación de la existencia de diferencias entre los efectos de NaCl (solute iónico) y de Manitol (solute no iónico), se realizó utilizando esporas de *G. mosseae* procedentes de Rothamsted (Inglaterra).

*Experimento nº 2: Efecto del NaCl y del manitol en el crecimiento inicial de G. mosseae en condiciones axénicas*

Al finalizar el ensayo de germinación en placa (experimento nº 1), las placas se tiñeron con azul tripán al 0.05% en ácido láctico y se evaluó, con la ayuda de una cuadrícula de 50 µm x 50 µm, el crecimiento del micelio, a partir del tubo germinativo, clasificándose las esporas en 4 categorías:

- crecimiento prácticamente nulo
- crecimiento escaso
- crecimiento moderado
- crecimiento extenso

*Experimento n° 3: Efecto de dosis máxima de NaCl y manitol en la recuperación del potencial germinativo de las esporas de G. mosseae en condiciones axénicas*

Un lote de esporas de *G. mosseae*, aislado N (Rothamsted) recién extraídas de una planta 'stock', se desinfectaron y se distribuyeron entre cuatro tratamientos a razón de 60 esporas por tratamiento.

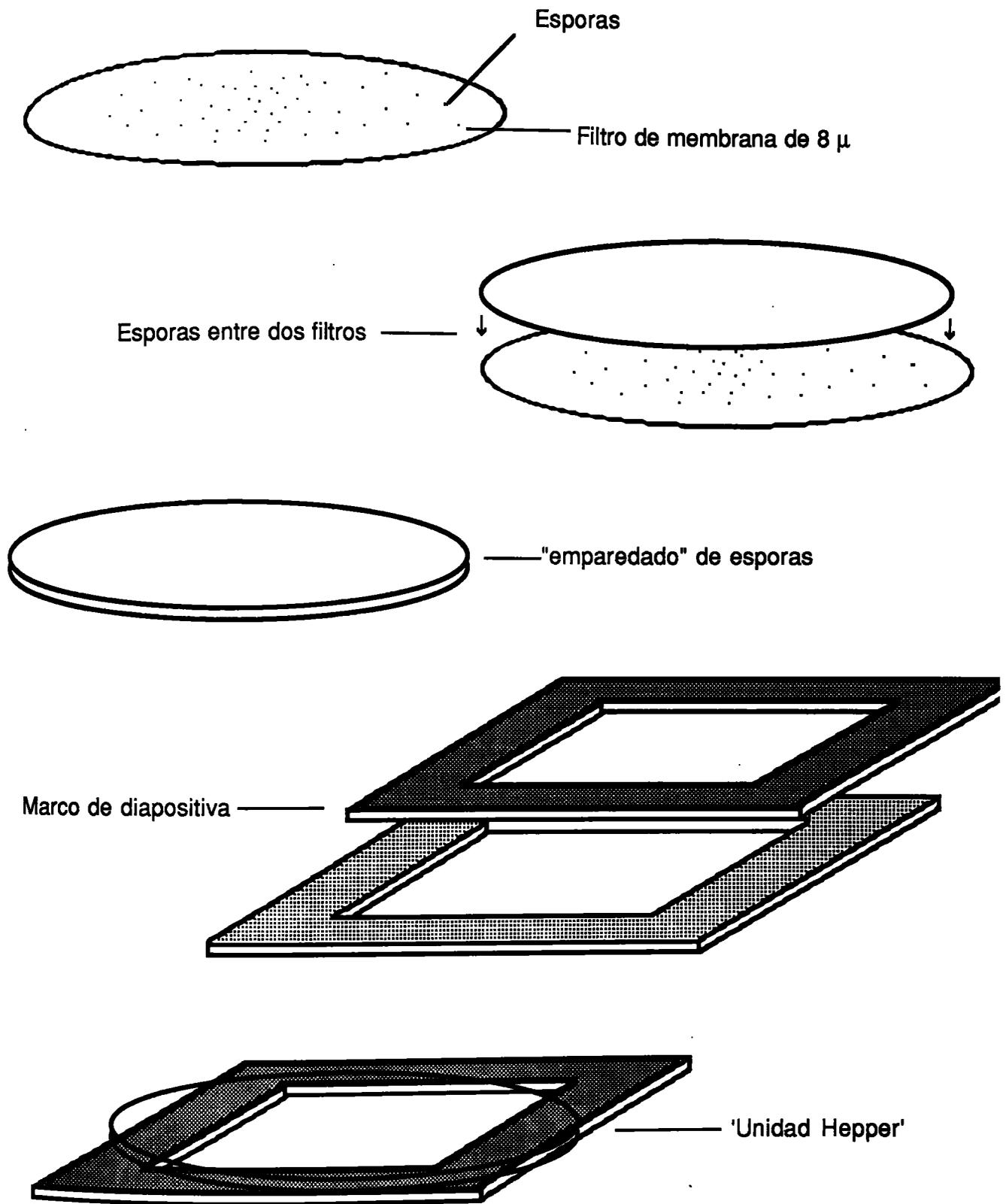
Los tratamientos fueron:

- a. Incubación inmediata en agar-agua al 1%
- b. Incubación retardada en agar-agua al 1%, después de la permanencia de las placas a 4°C en nevera durante una semana.
- c. Transferencia e incubación de las esporas en agar-agua al 1% después de su incubación en agar-NaCl al 8% durante una semana.
- d. Transferencia e incubación de las esporas en agar-agua al 1% después de su incubación en agar-manitol al 45% durante una semana.

## *Metodología general de los ensayos de germinación de esporas en medio no estéril*

Para determinar el efecto de NaCl y del manitol en la germinación de dos aislados de *G. mosseae* se utilizó un método que no requiere la esterilización del medio y que por lo tanto puede extrapolarse más fácilmente a lo que sucedería en condiciones de campo. El método utilizado es una adaptación de la metodología de Hepper (1979) y van Nuffelen y Schenck (1984).

Una vez obtenidas de 25 a 30 esporas, éstas se depositan entre dos filtros de nitrocelulosa de 8  $\mu\text{m}$  de poro Millipore® que se mantiene fijos entre marcos de diapositiva (Fig. 2). Estas unidades, que se denominarán 'Unidades Hepper', se incubaron en una placa de petri, llena de vermiculita humedecida con las distintas soluciones de NaCl y de manitol empleadas en cada experimento. La cabida de cada caja se calculó previamente y resultó ser de 7 g de vermiculita (grado 3) seca + 30 ml de solución. Las placas, una vez selladas con parafilm, se mantuvieron a 25°C en ausencia de luz durante el tiempo preestablecida en cada experimento. Una vez concluido este tiempo las 'Unidades Hepper' se extrajeron de la vermiculita y tñieron con azul tripán 0.05% en ácido láctico durante 15 min. Seguidamente se abrieron las unidades y se cuantificó a la lupa binocular el número de esporas germinadas y el número de 'esporas secundarias' producidas por espora germinada.



**Figura 2 :** Montaje de las 'Unidades Hepper'

*Experimento n° 4: Comparación entre la germinación de esporas de G. mosseae en medio axénico y en 'Unidades Hepper'.*

Se obtuvieron 200 esporas de *G. mosseae* (aislado N, Rothamsted), a partir de esporocarpos recogidos de una misma planta hospedadora y mantenidos a 4°C durante 6 meses. Se distribuyeron 100 esporas desinfectadas en 10 placas de agar-agua al 1%, otras 100 esporas se distribuyeron en 4 'Unidades Hepper' que se incubaron en placas petri, llenas de vermiculita humedecida con agua destilada. Los porcentajes de germinación, obtenidos en ambos sistemas, a los 21 días de incubación a 25°C, en ausencia de luz, se compararon mediante una tabla de contingencia.

*Experimento n° 5: Efecto del NaCl y del manitol en la germinación de dos aislados de G. mosseae*

Este experimento se diseñó para estudiar la existencia de respuestas diferentes, tanto a la sal (NaCl), como al soluto no iónico, por parte de dos aislados, de una misma especie de hongo, formador de micorrizas de amplia distribución: *G. mosseae*.

Los dos aislados procedían de ambientes muy distintos. El aislado N, un hongo de colección que procede de Rothamsted, de un suelo de pH = 6.8 y una climatología húmeda con temperaturas moderadas. El aislado S, procede de uno de los aislamientos efectuados en el Delta del Ebro, a partir de un suelo de pH algo más elevado (7.2), con condiciones ambientales de salinidad y elevadas temperaturas.

Tal y como se ha especificado en la descripción de la metodología general, afín de minimizar las diferencias poblacionales entre ambos hongos, éstos se cultivaron durante, al menos, un ciclo entero en las mismas condiciones ambientales.

Los tratamientos efectuados son los consignados en la Tabla 1. Cada tratamiento contó con 3 'Unidades Hepper' que se dejaron incubar 21 días a 25 °C selladas con 'parafilm' y en la oscuridad.

Los resultados obtenidos, previa comprobación de su homogeneidad mediante una tabla de contingencia, se aproximaron a una distribución normal, utilizando la corrección arcoseno y se analizaron mediante test ANOVA, con comparaciones múltiples de Tuckey y un análisis de regresión combinado con el test ANOVA.

*Experimento n° 6: 'Efecto del NaCl y del manitol en el crecimiento de micelio de dos aislados de G. mosseae'*

Los aislados utilizados son los mismos que en el experimento anterior: aislado N y aislado S.

En un primer tiempo se prepararon 36 'Unidades Hepper' cada una con 25 a 30 esporas, para cada uno de los aislados.

Esta unidades se dejaron incubar, durante una semana, a 25°C en vermiculita humedecida con agua destilada. Pasado este tiempo, 3 'Unidades Hepper' por aislado, se extrajeron y tiñeron para medir el porcentaje de germinación y el número de 'esporas secundarias' por espora germinada. A este tratamiento se le designó como control 1.

El resto de las 'Unidades Hepper', se extrajeron de la vermiculita humedecida con agua destilada y se distribuyeron entre los mismos tratamientos del experimento n° 5 a razón de tres 'Unidades Hepper' por tratamiento.

Las unidades se incubaron 2 semanas más, se extrajeron, tiñeron y se cuantificó el porcentaje de germinación y el número de 'esporas secundarias' por espora germinada. Este se comparó con el obtenido en el control 1 y en el control 2, infiriéndose el efecto de los tratamientos sobre la producción de esporas secundarias por esporas pregerminadas. El análisis estadístico fue idéntico al utilizado en el experimento n° 5.

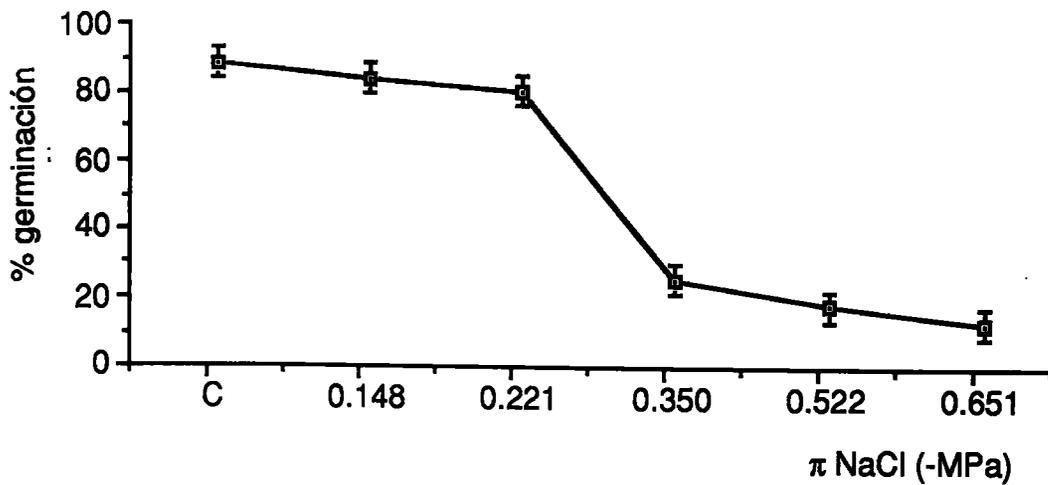
### 3.3. Resultados

#### *Ensayos en condiciones axénicas*

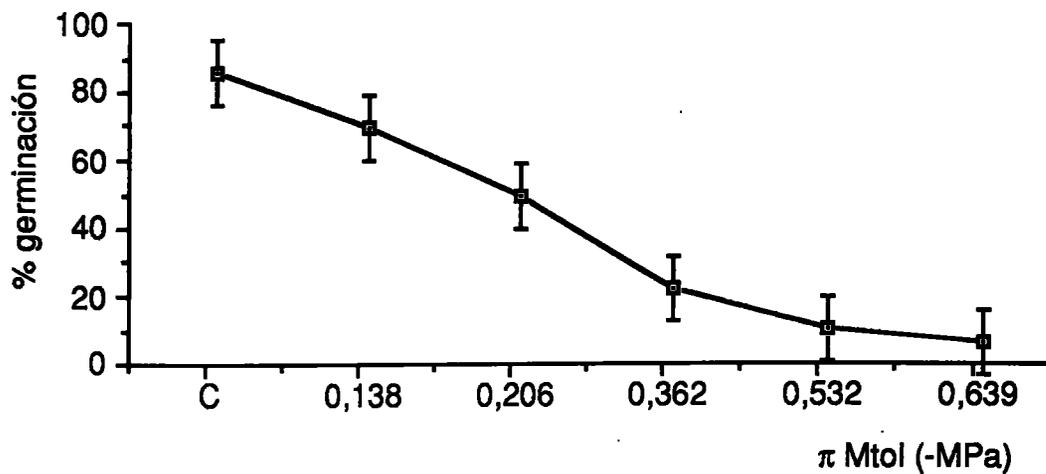
*Experimento n°1: Efecto de NaCl y de manitol sobre la germinación de G. mosseae en condiciones axénicas (Fig. 3 y 4)*

El porcentaje de germinación entre los distintos lotes no difería significativamente mediante la prueba  $\chi^2$ , de forma que se agruparon los resultados para cada tratamiento.

En los ensayos con sal (NaCl) se observó la existencia de una meseta, en la cual no habían diferencias significativas con el control (Fig.3). Esta meseta llega hasta el valor de -0.350 MPa, en el que el porcentaje de germinación disminuye drásticamente a menos de un 40% de su valor inicial y sigue disminuyendo linealmente para valores sucesivos. En los ensayos con manitol (Fig.4), por el contrario, el porcentaje de germinación sigue una función polinómica de grado 2, respecto al potencial osmótico en MPa con  $R=1.00$ , aunque no se observen diferencias significativas hasta el valor -0.206 MPa. Estas diferencias indican que, a valores bajos y medios, existe un mayor efecto del potencial osmótico causado por un soluto no iónico, como el manitol, frente a valores equivalentes debidos a una sal iónica como el NaCl.



**Figura 3 :** Efecto de concentraciones crecientes de NaCl en la germinación de *Glomus mosseae* (aislado N) en condiciones axénicas.



**Figura 4 :** Efecto de concentraciones crecientes de manitol en la germinación de *Glomus mosseae* (aislado N) en condiciones axénicas.

*Experimento n° 2: Efecto del NaCl y del manitol sobre el crecimiento inicial de G. mosseae en condiciones axénicas (Tabla 2)*

El crecimiento del micelio inicial, a partir del tubo germinativo, estuvo más afectado que la germinación de esporas por la presión osmótica. Los tratamientos de -0.148 (1 g/l NaCl) y -0.138 MPa (5.63 g/l manitol) redujeron significativamente el porcentaje de esporas con crecimiento extenso de micelio mientras que estos tratamientos no afectaron a la germinación. A partir del segundo nivel de presiones osmóticas ensayadas, el número de esporas en las categorías con mayor crecimiento, está más reducido en los tratamientos con manitol, que en aquellos con presiones osmóticas equivalentes debidas a NaCl.

Tratamiento	$\pi$ (MPa)	% de esporas con crecimiento nulo	% de esporas con crecimiento escaso	% de esporas con crecimiento moderado	% de esporas con crecimiento extenso
Control	-0.036	4	19	33	4
1g NaCl/l	-0.116	23	51	19	3
5.63g Mtol/l	-0.129	20	59	16	7
2g Nacl/l	-0.202	33	41	14	5
11.26g Mtol/l	-0.211	54	37	10	12
4g NaCl/l	-0.347	71	17	8	0
22.52g Mtol/l	-0.364	94	6	0	4
6g NaCl/l	-0.510	73	27	0	0
33.78g Mtol/l	-0.518	75	25	0	0

**Tabla 2 :** Efecto de NaCl y de Manitol en el crecimiento de micelio inicial a partir del tubo germinativo en condiciones axénicas.

*Experimento n° 3: Efecto de dosis máxima de NaCl y manitol en la recuperación del potencial germinativo de las esporas de G. mosseae en condiciones axénicas (Fig. 5)*

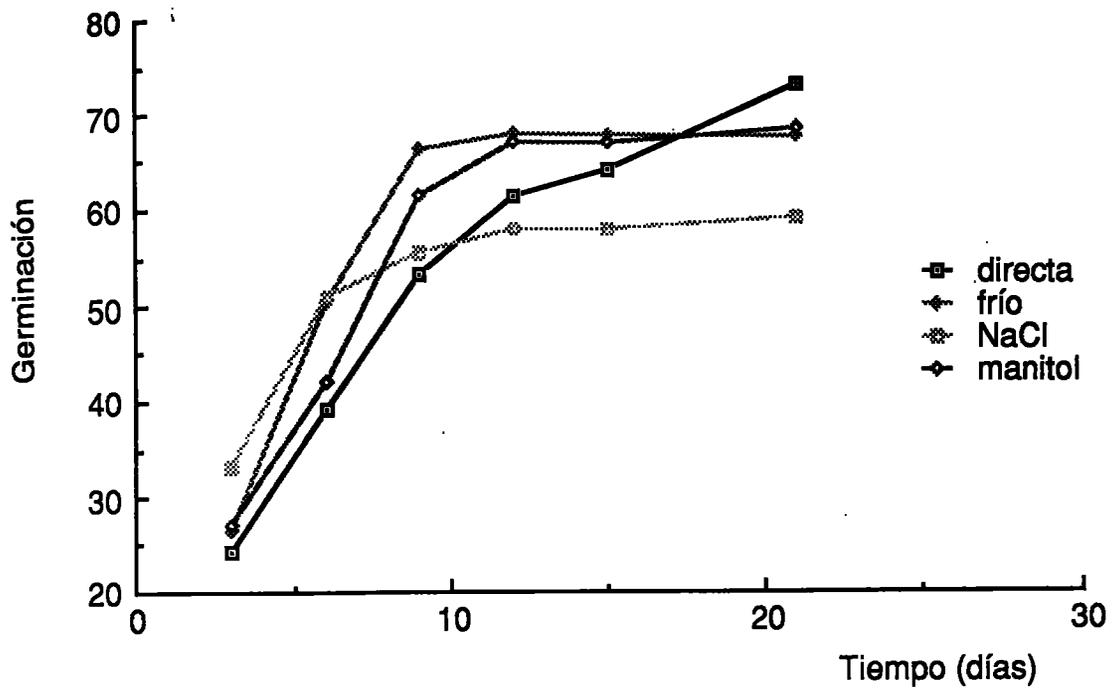
Ni en el tratamiento de frío, ni en el de choque osmótico extremo, iónico y no iónico, se observó germinación de las esporas. En el momento en que se eliminó el factor inhibidor (frío, manitol, NaCl) las esporas iniciaron su germinación.

En el caso del frío y del manitol, estos tratamientos no dejaron secuelas en la germinación posterior. Sin embargo, las esporas tratadas con NaCl no recuperaron su nivel de germinación inicial.

Las esporas que no sufrieron tratamiento alguno, alcanzaron a los 21 días porcentajes de germinación, ligeramente superiores, a los de los tratamientos con frío y manitol.

Al analizar la curva de germinación se observa que las esporas no tratadas, siguen una evolución lineal con el tiempo, mientras que las esporas que han sufrido un tratamiento de choque, tienden a una evolución de tipo exponencial que llega a un máximo entre los diez y doce días.

Los tratamientos de choque aunque, tienden a disminuir el porcentaje de germinación, tienen un efecto sincronizador de la misma ya que, por ejemplo, a los 7 días de iniciarse los tratamientos, el porcentaje de esporas germinadas provenientes del tratamiento con sal, era superior al de las no tratadas, aunque al final del ensayo la relación era a la inversa.



**Figura 5 :** Efecto de dosis máxima de NaCl, manitol y tratamiento en frío en la recuperación del potencial germinativo de esporas de *Glomus mosseae* . (Aislado N).

*Experimento n° 4: Comparación entre la germinación de esporas de G. mosseae en medio axénico y en unidades Hepper*

La germinación en medio axénico fue de un 87% y en medio no estéril, en 'Unidades Hepper' de un 84%. No hay, por lo tanto, diferencias significativas entre ambos tratamientos. Distintos autores (Calvet,1989), han observado un incremento de la germinación de las esporas de especies de *Glomus* en presencia de microorganismos contaminantes, mientras que otros, han determinado una disminución de la germinación debida a fenómenos de fungistásis e hiperparasitismo (Calvet,1989) (Sylvia y Schenck,1983). En éste caso, la germinación es muy elevada y permanece inalterada en condiciones no axénicas.

## *Ensayos de germinación de esporas en medio no estéril*

### *Experimento n° 5: 'Efecto del NaCl y del manitol sobre la germinación de dos aislados de G. mosseae*

La germinación del aislado N ( Rothamsted) se ve afectada por cantidades crecientes de NaCl de forma lineal, en relación con la disminución de la presión osmótica de la solución (Fig. 6). La ecuación que describe esta relación es:

$$y (\%germinación) = 90.9 - 18.28 \pi (-MPa) \quad R = 0.98$$

El porcentaje de germinación varía de forma directamente proporcional con la presión osmótica, expresada en MPa: a menor presión osmótica (más negativa), menor porcentaje de germinación.

El estudio del efecto del NaCl en la germinación del aislado S (Delta del Ebro), no sigue una función lineal (Fig. 7). El porcentaje de germinación se mantiene, sin cambios apreciables, hasta -0.530 MPa, valor que corresponde a una concentración de 6 g NaCl /l. La germinación observada para -0.697 MPa (8 g NaCl/l) registra una disminución importante, ya que no es significativamente distinta a la observada para el aislado N.

El NaCl tiene, por consiguiente, un efecto distinto sobre los dos aislados ensayados. El aislado N, de zona no salina, ve disminuido su porcentaje de germinación de forma proporcional a la salinidad del medio mientras que el aislado S, de zona salina, mantiene su germinación hasta valores de  $\pi$  considerablemente bajos, aunque al llegar a un punto determinado, la germinación experimenta una disminución drástica. Esto parece indicar que las respuestas pueden estar condicionadas por los niveles de adaptación a una situación de estrés (Mosse *et al.*, 1981).

El efecto del manitol en el aislado N (Fig. 8), es paralelo al efecto del NaCl, también observamos una función lineal de ecuación:

$$y = (\% \text{ germinación}) = 93.85 - 13.07 \pi \text{ (-MPa)} \quad R = 0.98$$

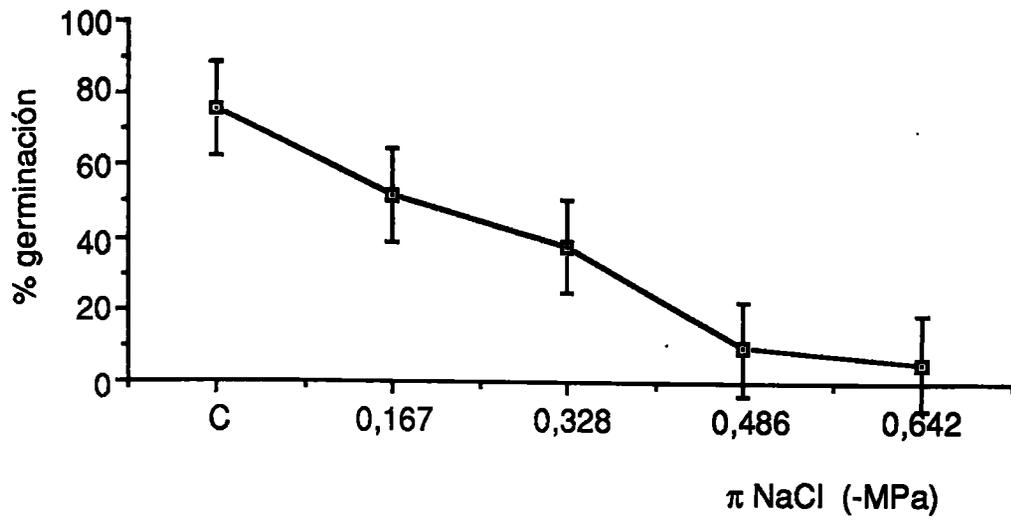
en la que la germinación disminuye, proporcionalmente a la disminución de la presión osmótica, de la solución debida al manitol.

En el caso del aislado S, la disminución la germinación de las esporas, por efecto del manitol, empieza a ser patente a presiones osmóticas superiores a las observadas para la sal (Fig. 9). Se observa que existe una disminución significativa del porcentaje de germinación a  $-0.482 \text{ MPa}$ , presión osmótica causada por una concentración de manitol, equivalente a  $6 \text{ g NaCl/l}$ . El efecto del manitol, en este caso, puede describirse con una función polinómica de segundo grado con ecuación:

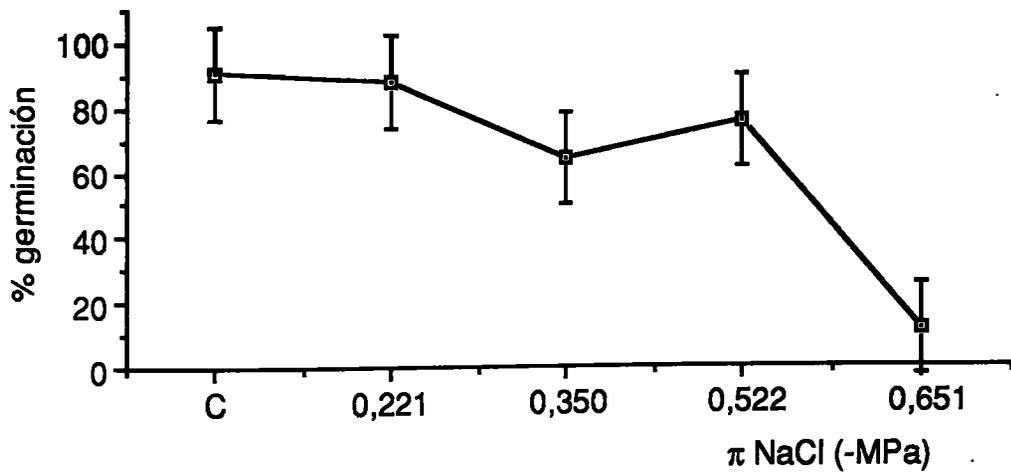
$$y = \% \text{ germinación} = 78 + 13.5 \pi \text{ (-MPa)} - 4\pi^2 \text{ (-MPa)} \quad R = 0.99$$

Al ser los dos primeros términos variables de la ecuación de signo opuesto, se neutralizan entre sí, y por lo tanto, tal como se observa en la Fig. 9, los cuatro primeros niveles de  $\pi$  no repercuten en la germinación del aislado S.

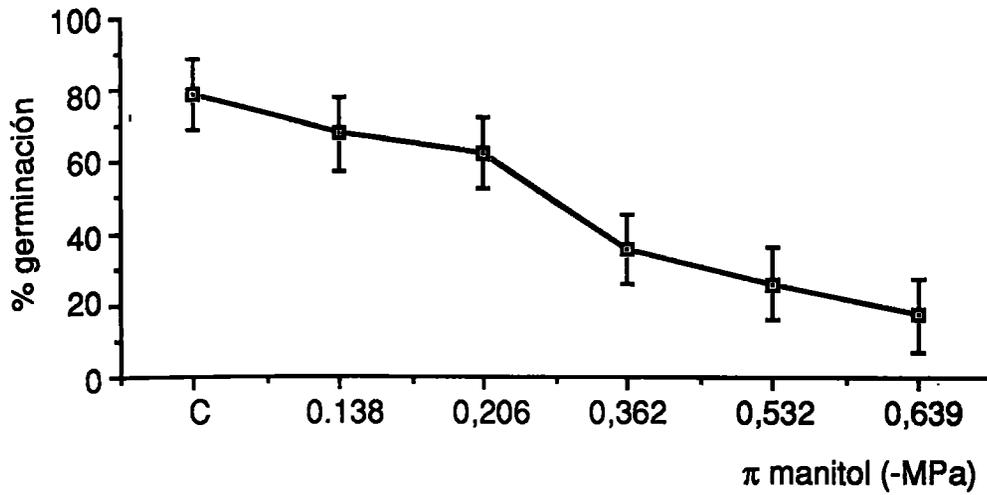
El aislado N, reacciona de igual forma frente a una disminución de la presión osmótica, ya sea esta causada por una sal, como por un soluto no iónico. Sin embargo, el aislado S, originario de una zona con características salinas, mantiene su porcentaje de germinación en una meseta, hasta un determinado valor, en que este disminuye notablemente. Este valor límite de presión osmótica es mayor (menos negativo) si esta presión es debida al manitol, soluto no iónico, lo cual indica una mayor adaptación a un ambiente con presiones osmóticas bajas, causadas por un componente salino como NaCl.



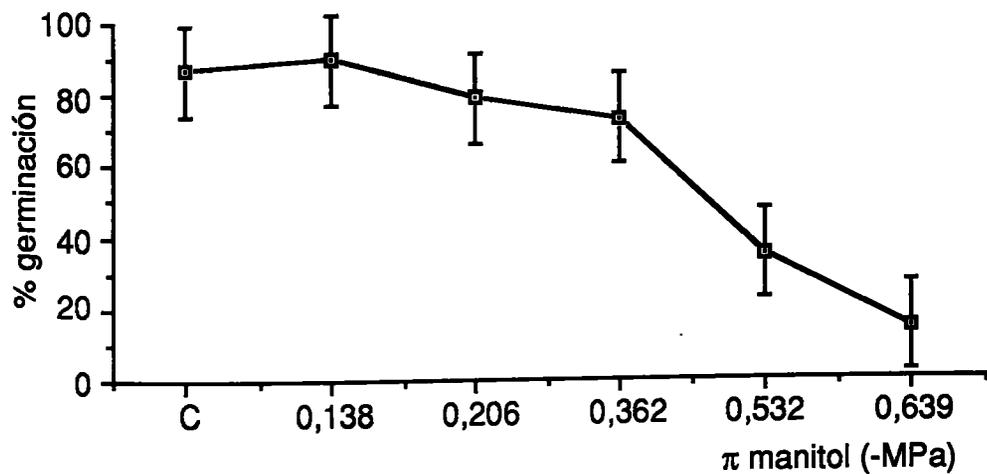
**Figura 6 :** Efecto de concentraciones crecientes de NaCl en la germinación de *Glomus mosseae* (aislado N) en unidades Hepper.



**Figura 7 :** Efecto de concentraciones crecientes de NaCl en la germinación de *Glomus mosseae* (aislado S) en unidades Hepper.



**Figura 8 :** Efecto de concentraciones crecientes de manitol en la germinación de *Glomus mosseae* en unidades Hepper. Aislado N.



**Figura 9 :** Efecto de concentraciones crecientes de manitol en la germinación de *Glomus mosseae* en unidades Hepper. Aislado S.

*Experimento nº 6: Efecto del NaCl y del manitol sobre el crecimiento de micelio de dos aislados de G. mosseae*

En este ensayo se ha estudiado el efecto de la presión osmótica causada bien sea por NaCl bien por manitol, en la producción de 'esporas secundarias' en esporas pregerminadas.

En el aislado N se observa una disminución de la producción de esporas secundarias respecto al control en el tiempo 2 (C2), en todos los tratamientos con NaCl (Fig. 10). En el tratamiento con 6 g /l de NaCl, las diferencias con el control en el tiempo 1 (C1), no son significativas, no ha habido, por lo tanto, crecimiento efectivo del micelio en este tratamiento.

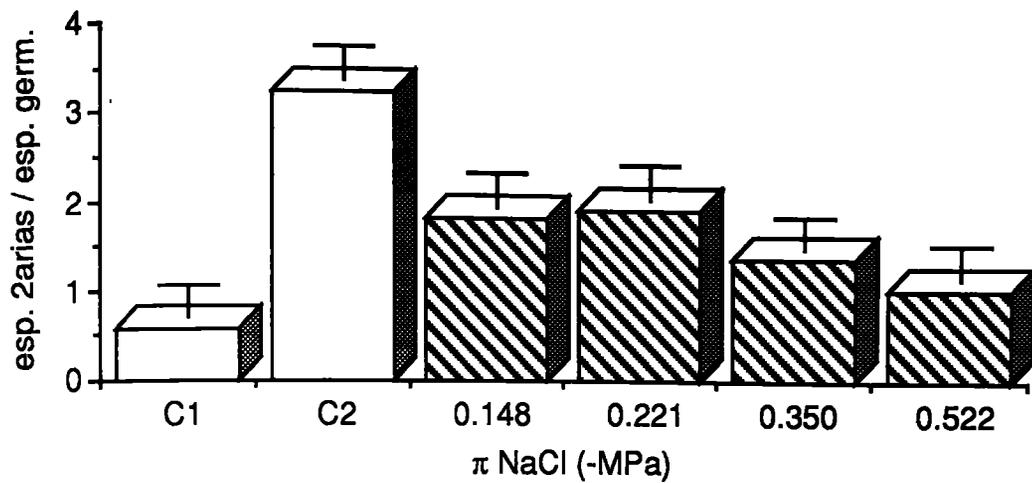
En el caso del aislado S (Fig. 11), el control al tiempo 1 (C1), no presenta esporas secundarias. Todos los niveles de NaCl ensayados experimentan crecimiento, aunque sea muy bajo, como en el caso de 8 g NaCl/l. Los ensayos que corresponden a los tratamientos con 2 y 4 g NaCl/l, no se diferencian del control en el tiempo 2 (C2), llegando incluso a experimentar un mayor crecimiento, aunque éste no es estadísticamente significativo.

La producción de esporas secundarias, en el aislado N, está más afectada por el NaCl que en el caso del aislado S. El aislado N, en ningún caso consigue el mismo ritmo de crecimiento en presencia que en ausencia de NaCl, aunque se puede observar la existencia de un determinado grado de tolerancia, a niveles bajos y moderados de salinidad. En cambio el aislado S, mantiene el mismo crecimiento que el observado en el control en el tiempo 2, a niveles bajos y moderados de salinidad.

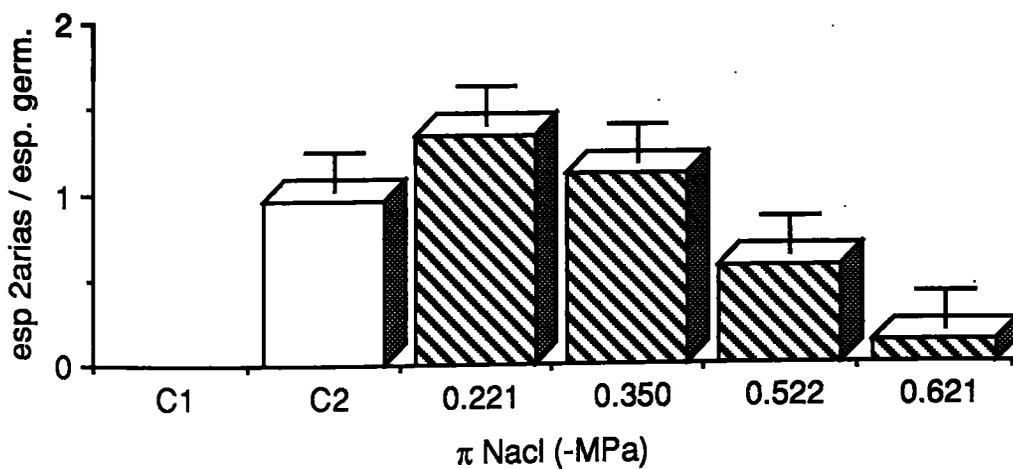
En los tratamientos con manitol (Figs. 12 y 13) se ha representado en ordenadas los tratamientos equivalentes en g de NaCl/ para facilitar su comparación.

En el aislado N, se observa una disminución de la producción de 'esporas secundarias', respecto al control en el tiempo 2 en todos los tratamientos. En el tratamiento equivalente a 6 g NaCl /l (33,78 g de manitol /l) se observa que, como en los tratamientos con NaCl, no hay crecimiento significativo del micelio.

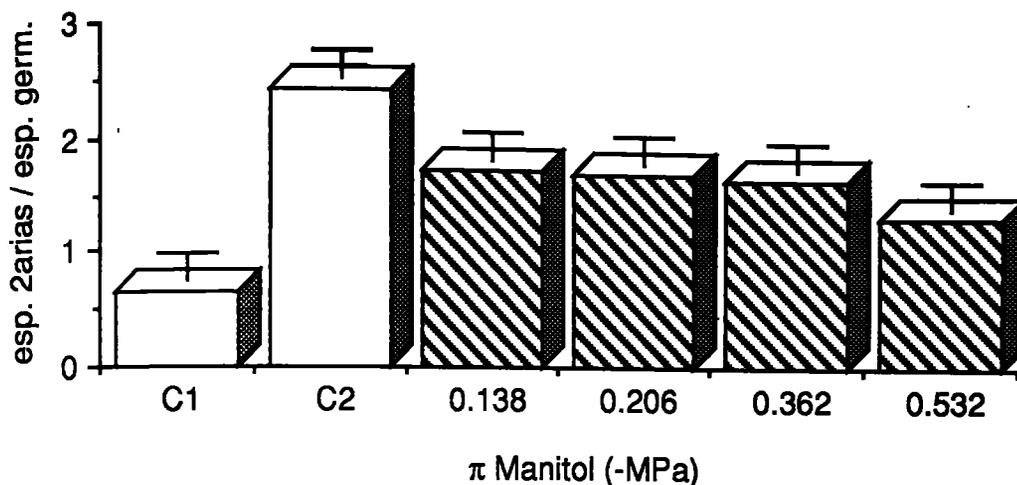
Sin embargo, el comportamiento del aislado S difiere, esencialmente, en su respuesta al NaCl. Se observa una disminución de la producción de 'esporas secundarias', para todos los tratamientos. A partir del tratamiento equivalente a 4 g NaCl/l, no hay diferencias significativas con el control en el tiempo 1, es decir que no ha habido crecimiento efectivo del micelio.



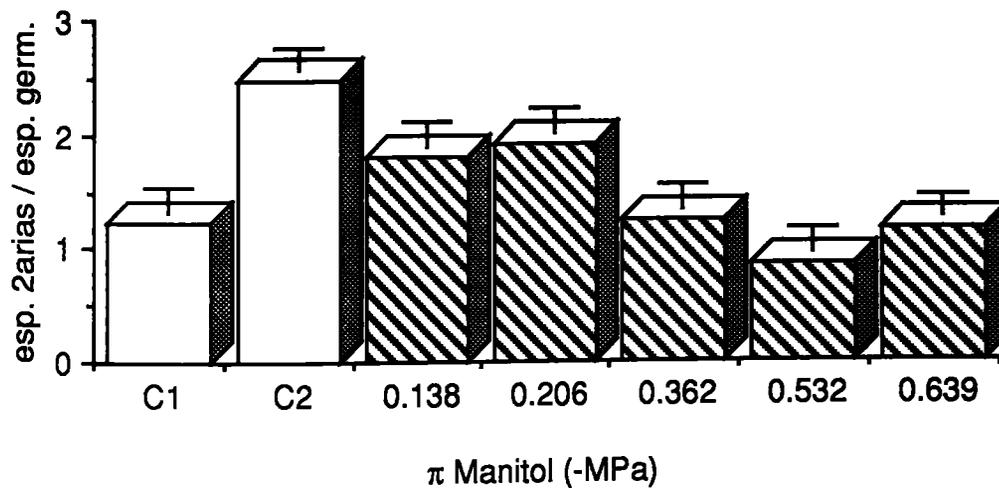
**Figura 10 :** Efecto de cantidades crecientes de NaCl en la producción de esporas secundarias por esporas de *Glomus mosseae* pregerminadas en unidades Hepper. Aislado N.



**Figura 11 :** Efecto de concentraciones crecientes de NaCl en la producción de esporas secundarias por esporas de *Glomus mosseae* pregerminadas en unidades Hepper. Aislado S.



**Figura 12 :** Efecto de concentraciones crecientes de manitol en la producción de esporas secundarias por esporas de *Glomus mosseae* pregerminadas en unidades Hepper. Aislado N.



**Figura 13 :** Efecto de concentraciones crecientes de manitol en la producción de esporas secundarias por esporas de *Glomus mosseae* pregerminadas en unidades Hepper. Aislado S.

### 3.4. *Discusión*

Los niveles de germinación de *G. mosseae in vitro* y en 'Unidades Hepper' incubadas en vermiculita humedecida con agua son equiparables.

Hepper (1979) y Koske (1981) observaron resultados similares con *Glomus caledonium* y *Gigaspora margarita*, respectivamente. Sin embargo, Sylvia y Schenck (1983) observaron una disminución de la germinación de las esporas no desinfectadas, que atribuyeron a un efecto negativo de los hongos del suelo y Calvet (1989) demostró, la existencia de un efecto inhibitor, causado por dos hongos saprófitos: *Penicillium* spp y *Aspergillum* spp en la germinación de *G. mosseae*.

Los tratamientos previos, con soluciones de baja presión osmótica, tienen un efecto similar al del tratamiento en frío, ya que favorecen la simultaneidad de la germinación. No se han observado variaciones en el porcentaje final de germinación de las esporas, sometidas previamente al tratamiento frío, lo cual concuerda con los resultados de Koske (1981) en *Gigaspora gigantea* y de Camprubí *et al.* (1991) en *G. mosseae*. El tratamiento previo con manitol, tampoco afectó al porcentaje final de germinación, pero el tratamiento con NaCl, aunque la presión osmótica era equivalente a la obtenida con manitol, disminuyó sensiblemente el porcentaje final de germinación. Elevadas dosis de NaCl, dejan un efecto residual, que disminuye el porcentaje de germinación de las esporas. Este efecto residual ha de ir ligado a un efecto tóxico de la sal, independiente de su efecto osmótico.

Al introducir un componente osmótico en condiciones axénicas, la germinación disminuye en forma directamente proporcional a la disminución del potencial osmótico del medio. Estas diferencias en la respuesta a los dos tipos de soluto pueden atribuirse a una permeabilidad diferencial de la espóra a una y otra molécula. Si la pared de la espóra se comporta como una membrana semipermeable dejará pasar el NaCl pero no al manitol, ya que éste tiene un mayor volumen molecular (Hasegawa *et al.*, 1984) (Hasegawa *et al.*, 1986). La entrada de NaCl arrastrará consigo una entrada de agua que además de permitir la hidratación de una serie de estructuras celulares necesarias para la germinación, altera la presión osmótica real a la que se

someten las esporas.

En condiciones no axénicas, la germinación del aislado N de *G. mosseae* se ve afectada, de forma similar, por manitol y por NaCl. Esta diferencia entre los resultados obtenidos en condiciones axénicas y no axénicas, sobre todo en lo que hace referencia al NaCl, parece indicar que, en este hongo, la desinfección ayudaría a que el NaCl atravesara la pared de la espora. Como consecuencia se mantendría la germinación por la entrada de agua, ligada a la de NaCl, y, también, como resultado aparecería un efecto residual en tratamientos drásticos, traducido en una disminución de la germinación esperada, una vez que las esporas se vuelven a sembrar en un medio agar-agua normalizado.

La germinación del aislado S de *G. mosseae*, en condiciones no axénicas, es mucho menos sensible a la disminución de potencial osmótico, ya sea debida a NaCl o a manitol. Por otro lado, este aislado es más resistente a la disminución de potencial osmótico, debida a NaCl, que a la misma disminución debida a manitol.

En general, se puede concluir que la germinación de *G. mosseae* se ve más afectada por solutos del tipo manitol, que por solutos iónicos como NaCl. Es importante resaltar que el aislado S, mantiene su tasa de germinación para potenciales osmóticos inferiores a los observados para el aislado N. Esta capacidad de germinación del aislado S a potenciales osmóticos bajos, se ve incrementada si el causante de la disminución del potencial es el NaCl. Estos resultados permiten suponer la existencia de una adaptación del hongo a su entorno salino que ha persistido, después de un ciclo de vida completo, en las mismas condiciones que el aislado N.

La germinación de las esporas de hongos VA requiere de un proceso de imbibición y activación de reacciones catabólicas. Para que el crecimiento continúe han de activarse un mayor número de reacciones, además de la síntesis de compuestos a partir de las reservas lipídicas de las esporas. Tommerup (1984) mostró que el crecimiento del micelio de *Acaulospora laevis* y de *Glomus caledonium* resultaba más afectado que la germinación por la disminución del potencial hídrico del medio. En el caso de *G. mosseae* el

aislado N se comporta de manera similar, cualquiera que sea la solución osmótica empleada, aunque el efecto (disminución del crecimiento de micelio) es más marcado con NaCl, que con manitol. Esto parece indicar que la sal tiene un efecto tóxico en el crecimiento de micelio.

El aislado S, se comporta de forma esencialmente distinta, según la solución osmótica empleada. A concentraciones bajas y moderadas de sal el crecimiento del micelio es igual o superior al obtenido por el control. Si, por el contrario, la solución empleada es manitol, el aislado S se comporta de forma semejante al aislado N, disminuyendo su crecimiento.

Estas diferencias, en la respuesta de dos aislados de un mismo hongo, al efecto de dos componentes osmóticos en su germinación y crecimiento inicial, indican la posible existencia de ecotipos fisiológicamente adaptados a distintas condiciones del suelo, como se ha descrito para otras situaciones de estrés (Barea, 1991).

*Interacción de la salinidad y de la colonización  
VA en el crecimiento y las relaciones hídricas de  
P. vera*

## 4.1 Introducción

El pistachero es un cultivo en extensión en áreas semi áridas, muchas de las cuales tienen problemas de salinidad. Spiegel *et al.*, (1977) ya observaron la elevada resistencia del pistachero a la sequía y Sepaskhah *et al.*, (1985) sugirieron que la tolerancia a la salinidad del pistachero era semejante a la de la palmera datilera, aunque esta tolerancia disminuía si la planta era sometida a condiciones de estrés prolongadas. Walker *et al.*, (1987) demuestran un comportamiento diferencial de las distintas especies de *Pistacia*, en relación con el transporte de  $\text{Na}^+$  desde la raíces a la parte aérea. Parece ser, que el mecanismo utilizado por estas especies para sobrevivir en condiciones de estrés salino, es similar al empleado por *Poncirus trifoliata*. El cual se basa en la retención del  $\text{Na}^+$  en las raíces y en la parte basal del tallo, restringiendo su transporte a la parte aérea. En este sentido, *P. vera* muestra una mayor tolerancia al NaCl que *P. terebinthus*. Por ello, *P. vera* es la especie que mejor excluye el NaCl y *P. terebinthus* es el peor (Sepaskhah *et al.*, 1985).

En este sentido, *P. vera* muestra una mayor tolerancia al NaCl que *P. terebinthus*. Por ello ha sido escogida para este trabajo como modelo, para evaluar los efectos de la salinidad en la simbiosis VA y las interacciones entre estos dos factores, en las relaciones hídricas y en el crecimiento de la planta.

## 4.2 Materiales y métodos

### *Germinación de las semillas y condiciones de cultivo*

Las semillas de *P. verase* hicieron germinar en vermiculita: perlita (1:1) según el proceso ya descrito. Una vez germinadas, se escogieron plántulas lo más homogéneas posible y, cuando el experimento lo requería se procedió a su inoculación. El inóculo utilizado fue *Glomus mosseae*, aislado N, con una densidad de 10.5 propágulos /g de suelo y *Glomus mosseae*, aislado S, con 6.3 propágulos /g de suelo.

Ambos hongos, se cultivaron en cebolla y se dosificó el inóculo obtenido, a fin de llegar a una media de 20 propágulos por planta, cantidad suficiente para obtener una buena micorrización. El inóculo, que constaba de raíces y suelo rizosférico, se dispuso en una capa 1 cm por debajo de las raíces del pistacho, trasplantado en una maceta de 1l de capacidad con suelo arenoso estéril. Las plantas trasplantadas se dejaron, en condiciones de invernadero, durante 6 semanas. A las 6 semanas de la inoculación, se comprobó la colonización, rechazándose aquellas plantas de que aún no habían formado la simbiosis. Las plantas inoculadas y/o las de control, según el ensayo, se trasplantan a macetas de 17 cm de diámetro, que se mantienen en condiciones de invernadero. A las dos semanas del trasplante, se inició el riego con agua salina incrementándose, cada dos días, en 0.5 g NaCl/l la concentración hasta llegar, en cada experimento, a la concentración requerida. Una vez terminado el periodo de tiempo, prefijado para cada experimento, las plantas se recolectaron determinándose, según los experimentos, los siguientes parámetros : potencial hídrico ( $\Psi_x$ ) y potencial osmótico ( $\Psi_\pi$ ), peso seco, relación raíz/parte aérea (R/A), contenido en prolina de las plantas, conductividad eléctrica final y el número de esporas por 100g de suelo de cada uno de los contenedores.

## *Estudio de las relaciones hídricas*

### *Medida del potencial hídrico*

El potencial hídrico, es una de las formas más adecuadas de describir el estado del agua, dentro de las plantas, desde el punto de vista de su utilización. En este trabajo, se ha utilizado la técnica de la bomba de presión para medir este parámetro.

#### Bomba de presión

Descrita por Scholander *et al.*, (1965), se basa en la aplicación de una presión externa creciente a una hoja o tallo, encerrados en una cámara hermética, dejando el extremo del tallo, el peciolo o el extremo de la hoja fuera. En el momento en que la presión externa aplicada, se iguale a la existente en el interior de los vasos, se empezará a observar, en la sección de la muestra, la aparición de una gota de savia. La lectura del manómetro, nos dará la presión de equilibrio, que corresponde a la presión de la savia en los vasos.

Esta técnica, supone que las células próximas a los vasos del xilema, están en equilibrio con la savia bruta y que ésta, tiene un potencial osmótico elevado, cercano a cero, de forma que, el potencial medido, puede interpretarse como el potencial hídrico total de la muestra.

El tiempo necesario para una medida, oscilará según el grado de hidratación de la muestra y el flujo de entrada de aire comprimido en la cámara. Este último valor ha de variar, según los autores, entre 0.1 y 1 bar/seg de incremento (Slavik, 1974). En este caso, se ha regularizado la tasa de incremento en 0.7 bar /seg, este valor permite, por una parte, una buena velocidad de medida y, por otra, minimiza los errores que pueden darse en lecturas muy rápidas.

### *Medida del potencial osmótico*

La medida del potencial osmótico, uno de los componentes del potencial hídrico se determinó mediante un psicrómetro de termopar.

#### Psicrómetro de termopar

Un psicrómetro, es un aparato que tiene un sensor capaz de medir magnitudes absolutas y/o diferenciales, entre la temperatura ambiente y la de una superficie húmeda, que evapore libremente, calculando la presión de vapor de la muestra.

El psicrómetro utilizado en este trabajo, Wescor HR-33T, con cámara de muestras C-52, es del tipo denominado de punto de rocío (Newman y Thurtell, 1972). Este tipo de aparato mide, el potencial resultante del enfriamiento obtenido en el extremo del termopar, el cual produce una condensación en este punto. La condensación será, función de la humedad de la muestra. Esta condensación originará una respuesta diferencial, en un microvoltímetro la cual y de acuerdo con la ecuación de calibrado del aparato, dará el potencial en bares. Este calibrado, se ha realizado en una cámara en condiciones definidas de temperatura ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ), midiéndose la respuesta, en  $\mu\text{voltios}$ , frente a soluciones de NaCl de potencial osmótico conocido.

Las ventajas de este método son la necesidad de poca muestra y su precisión (2%), operando entre 0 y 60 bares. Este método es muy rápido para medidas de potencial osmótico en las que el equilibrio que ha de establecerse entre muestra y cámara se consigue en pocos minutos.

### *Manipulación de las plantas*

Las plantas se seccionaron a nivel de cuello y se puso el tallo invertido en la cámara de la bomba de presión determinándose la presión hídrica. Una vez determinado este valor, el tallo y las hojas se congelaron a  $-40^{\circ}\text{C}$  posponiendo la determinación de los valores de presión osmótica.

La determinación de la presión osmótica se hizo descongelando las muestras y recongelándolas en  $\text{N}_2$  líquido para así romper las membranas celulares y facilitar la extracción del jugo celular mediante una prensa. El jugo celular extraído se utiliza para empapar unos discos de papel de 7 mm de diámetro que se introducen en la cámara del psicrómetro (C-52) que, una vez equilibrado nos dará el valor del potencial osmótico. Para determinar la reproducibilidad y el margen de error, cada 6 muestras se repitió 3 veces la medida de una de las muestras, comprobándose que las medidas eran reproducibles y que el error no sobrepasaba en ningún caso el 2% establecido *a priori*. Este método tiene la ventaja respecto de otros de ser muy rápido (Savé y Serrano, 1986), pero tiene el inconveniente de que el agua simplástica es diluida por la apoplástica (Weker, 1980) (Pearcy *et al.*, 1989).

### *Medida del Potencial de turgencia*

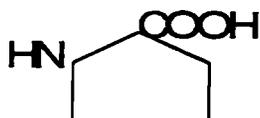
El potencial de turgencia ( $\Psi_p$ ) se determinó como la diferencia entre el potencial osmótico y el potencial hídrico.

## *Determinación de la prolina*

La hidrólisis de proteínas y la acumulación de aminoácidos es una de las respuestas, a una situación de estrés hídrico, como la debida a la sequía osmótica. Uno de estos aminoácidos, la prolina, se sintetiza de forma acelerada durante esta situación de estrés hídrico, mientras que su oxidación está inhibida, resultando una acumulación de este aminoácido en los tejidos sometidos a estrés. La función de la prolina no está clara ya que, por una parte puede beneficiar a la planta contribuyendo a mantener la turgencia del citoplasma mientras que, por otra, puede ser causa de toxicidad celular. Su presencia, en elevadas cantidades, va siempre asociada a situaciones de estrés hídrico.

La determinación de prolina se hizo siguiendo los métodos oficiales de análisis de la Association of Official Analytical Chemists (1980).

La prolina, tiene una estructura cíclica y es una amina secundaria con el grupo amino en posición alfa.



L-prolina

### Fundamento químico del proceso de determinación

La prolina reacciona con ninhidrina (hidrato de tricetihidrina) en presencia de ácido fórmico, formando un derivado coloreado que se valora mediante espectrofotometría a 517 nm.

La ninhidrina reacciona con los alfa-aminoácidos, dando lugar a la formación de  $\text{NH}_3$  y  $\text{CO}_2$  en presencia de ácido fórmico, reduciéndose la ninhidrina a hidrindantina. La hidrindantina reacciona, seguidamente con el amoniac y con el exceso de ninhidrina, para dar un compuesto doble de adición, de intenso color salmón: complejo de Ruheman.

La determinación del contenido en prolina, se hace en base a una curva patrón. Una vez construida la curva patrón, se dispone de un instrumento para obtener concentraciones de prolina, a partir de las lecturas de absorbancia.

### Operativa

#### A. Reactivos:

Solución de ninhidrina al 3% (p/v) en éter monometílico de etilenglicol.

Solución de isopropanol-agua (1:1) (v/v)

Acido fórmico

Tolueno

Solución patrón de prolina en agua destilada (0.5 mg/ml)

La curva patrón, se tiene que obtener cada vez que se cambia, alguno de los reactivos o la sustancia orgánica problema.

#### B. Construcción de la curva patrón:

1. Se preparan, por dilución de la solución patrón de prolina, disoluciones que contengan concentraciones de 5, 10, 20 y 40  $\mu\text{g}$  de prolina /ml de disolución.
2. De cada una de las soluciones precedentes, se cogen 0.5 ml que se colocan en tubos de ensayo, respectivos, provistos de tapones de teflón.
3. Se añaden 0.25 ml de ácido fórmico.
4. Se añade a continuación, 1 ml de la disolución de ninhidrina.
5. Se homogeneizan perfectamente las soluciones.
6. Se prepara un blanco con agua destilada.
7. Se agitan los tubos de ensayo bien cerrados.
8. Se deja desarrollar el color a 100°C durante 10 min
9. Al finalizar este periodo de tiempo, se sacan los tubos del baño anterior, se colocan en otro baño a 20°C y se extraen con tolueno, para estabilizar el color.

10. Se calibra el espectrofotómetro con el blanco y la curva patrón, determinándose, previamente, el punto de máxima absorbancia, mediante un barrido en las longitudes de onda del espectro de luz visible.

#### C. Extracción y determinación de la prolina contenida en hojas

1. Sobre la muestra analítica pesada de hoja fresca (en el caso de *Pistacia* sp. basta con cantidades del orden de 0.2 g), se añaden 50 ml de agua destilada y se tritura .

2. Se agita, enérgicamente, la solución durante 60 min con la ayuda de un agitador magnético.

3. Se filtra la solución en un matraz de 100 ml, completando con agua destilada procedente de los enjuagues del frasco y del filtro.

4. Se homogeneiza la solución.

5. Se toman 5 ml de esta solución, para introducirlos en un matraz de 50ml.

6. Se completa el volumen con agua destilada.

7. Se cogen 0.5 ml de esta solución y se introducen en un tubo de ensayo de 10 ml con tapón de teflón.

8. Se repiten los puntos 3 al 9 del apartado anterior 'B'.

9. Se mide la absorbancia de la muestra, en el punto de máxima absorbancia determinado y se calcula la concentración, mediante la recta patrón.

### *Determinación de la conductividad eléctrica*

La presión osmótica de la solución del suelo, es función del contenido en sales solubles de éste. A medida que aumenta la presión osmótica, la succión que deben ejercer las raíces para obtener agua, va siendo cada vez mayor, hasta llegar un momento en que la planta no es capaz de extraer agua del suelo, produciéndose la denominada sequía osmótica. Las medidas de presión osmótica, son difíciles de llevar a cabo, por lo que no se han generalizado. Richards *et al.*, (1954), puso de manifiesto la existencia de una correlación entre presión osmótica, y conductividad eléctrica de la solución del suelo. A partir de este momento se han estudiado los problemas debidos al exceso de sales, mediante la conductividad eléctrica. La conductividad eléctrica da una medida de la cantidad de sales disueltas en un suelo.

La determinación de la conductividad eléctrica de los suelos, antes y después de los ensayos, se hizo con un conductímetro CRISON, modelo 522. La dilución fue de 1:5 y el método seguido fue el método oficial de análisis (Ministerio de Agricultura, 1975).

## *Estudio de los parámetros de crecimiento de la planta y el hongo*

Para cuantificar el efecto de la salinidad en la planta, se ha medido el peso seco de la parte aérea y de la raíz. Una parte de las hojas se ha utilizado, en fresco, para los análisis de prolina, el peso seco de esta porción se ha extrapolado, utilizando un coeficiente de conversión, determinado previamente de la siguiente forma:

Se pesa una determinada cantidad de hojas frescas, éstas se secan en una estufa de aire forzado, se pesa de nuevo y se calcula el coeficiente C: peso seco/peso fresco

Al valor extrapolado del peso seco de las hojas, utilizadas en el análisis de prolina, se añade el valor obtenido, en la determinación del peso seco de la parte aérea, para obtener el peso seco total.

Para el cálculo del peso seco de la raíz, se procede de igual modo, extrapolando el peso de la raíz utilizada, para la observación de la colonización interna.

El estudio del efecto de la salinidad, en la fase simbiótica del hongo, se hizo determinando el porcentaje de colonización radical según el método ya descrito (Giovannetti y Mosse, 1980), y el número de esporas por 100 g de suelo. Esta última determinación se realizó, mediante el método del tamizado húmedo, ya que era el más adecuado para el tipo de suelo, arenoso, empleado.

A las seis semanas, se observó la colonización y se escogieron 120 plántulas, que presentaban colonización interna, para trasplantarlas a macetas de 17 cm de diámetro, con suelo arenosos estéril. Una semana después de este último transplante, se dividieron las plantas en 6 lotes, de 20 plantas, cada uno. Uno de los lotes se cortó y se midieron los parámetros hídricos y de crecimiento, tal como en el experimento 1, además de la colonización interna. Los demás lotes, se trataron igual que en el experimento 1. A las 8 semanas, se cortaron la mitad de las plantas de cada lote y a las 12 semanas, el resto, midiéndose en todos los casos los parámetros ya citados. Los resultados se analizaron, igual que los del experimento 1, teniendo en cuenta la corrección del porcentaje de colonización, mediante una transformación arcoseno, antes de aplicar las pruebas estadísticas.

*Experimento 3: Efecto del abonado y de la inoculación, con hongos formadores de MVA, en las relaciones hídricas de P. vera en condiciones de estrés salino*

Se seleccionaron 40 plántulas de *P. vera* de tamaño semejante. La mitad de estas plántulas, se inocularon con *G. mosseae*, aislado N, en el momento de su transplante a macetas de 17 cm de diámetro. A la mitad de las plantas inoculadas y a la mitad de las no inoculadas se les añadió un abonado de fondo, de 5 g de Osmocote®, por maceta. A las seis semanas del transplante, se inició el riego con agua salina, de todas las plantas del ensayo. La solución de riego utilizada contenía 4 g /l de NaCl. Las plantas se regaron con 50 ml de esta solución, en días alternos, durante 12 semanas, al término de las cuales las plantas se cosecharon, midiéndose los mismos parámetros hídricos y de crecimiento que en los experimentos 1 y 2.

*Experimento 4: Respuesta de P. vera, inoculado con dos aislados distintos de Glomus mosseae, a tres niveles de salinidad*

Se seleccionaron 220 plántulas, de tamaño semejante, de las cuales 70, se inocularon con *G. mosseae*, aislado N, y 70 con *G. mosseae*, aislado S, en macetas de 1l de capacidad, con suelo arenoso estéril. El resto de las plántulas seleccionadas, se trasplantaron también, en el mismo tipo de macetas, pero no se inocularon. A las seis semanas, se observó la colonización y se escogieron 60 plantas de cada uno de los tratamientos inoculados con hongos

## *Diseño experimental*

### *Experimento 1: Respuesta de *P. vera* no inoculado a concentraciones crecientes de sal*

Se seleccionaron 60 plántulas de tamaño semejante y se transplantaron a macetas de 1 l de capacidad, con suelo arenoso estéril. A las seis semanas, se volvieron a transplantar en macetas de 17 cm de diámetro. Una semana después del último transplante, se dividieron en 6 lotes, de 10 plantas cada uno.

Uno de los lotes se cosecho y se evaluaron en el tiempo 0, los parámetros referentes a las relaciones hídricas y al crecimiento. Los otros 5 lotes se regaron, en días alternos con 50 ml de una solución salina.

Las cinco soluciones salinas empleadas fueron:

- solución 1: Control. Agua destilada
- solución 2: 1 g NaCl / l en agua destilada
- solución 3: 2 g NaCl / l en agua destilada
- solución 4: 4 g NaCl / l en agua destilada
- solución 5: 6 g NaCl / l en agua destilada

El riego se mantuvo durante 12 semanas, al término de las cuales, las plantas se recolectaron y se determinó su potencial hídrico, potencial osmótico y peso seco de la parte aérea. Los resultados, obtenidos se analizaron mediante una regresión lineal, obteniendo así la curva de respuesta a la salinidad para *P. vera* no micorrizado.

### *Experimento 2: Respuesta de *P. vera* inoculado con hongos formadores de MVA a concentraciones crecientes de NaCl*

Se seleccionaron 130 plántulas, de tamaño semejante, que se inocularon en el momento del transplante a macetas de 1 l de capacidad. El inóculo utilizado fué *G. mosseae*, aislado N (Rothamsted U.K.), que se dispuso en forma de capa fina debajo de las raíces de las plántulas.

VA y 60 plantas control, que se transplantaron a macetas de 17 cm de diámetro a las que se había añadido 5 g/maceta de Osmocote®. El resto de las plantas no transplantadas, 10 por tratamiento, se utilizó para medir los parámetros hídricos y de crecimiento, mencionados en el experimento nº 3.

Cada uno de los lotes, con distinto tratamiento de inoculación se subdividió en tres grupos, cada uno con un nivel de riego diferente. Los niveles de riego empleados fueron:

Nivel 1: agua destilada

Nivel 2: 2 g NaCl/l en agua destilada

Nivel 3: 4 g NaCl/l en agua destilada

El régimen de riego se estableció paulatinamente durante 2 semanas, a razón de un incremento de 0.5 g NaCl/l, en cada riego. Los riegos se realizaron en días alternos, con 100 ml de solución por planta. A las ocho semanas del establecimiento del riego, se cosecharon 10 plantas de cada uno de los 9 tratamientos, midiéndose los parámetros hídricos y de crecimiento habituales. A las doce semanas, se cosecharon y procesaron el resto de las plantas. Los resultados se analizaron, mediante un análisis de varianza con el test de comparaciones múltiples de Tuckey.

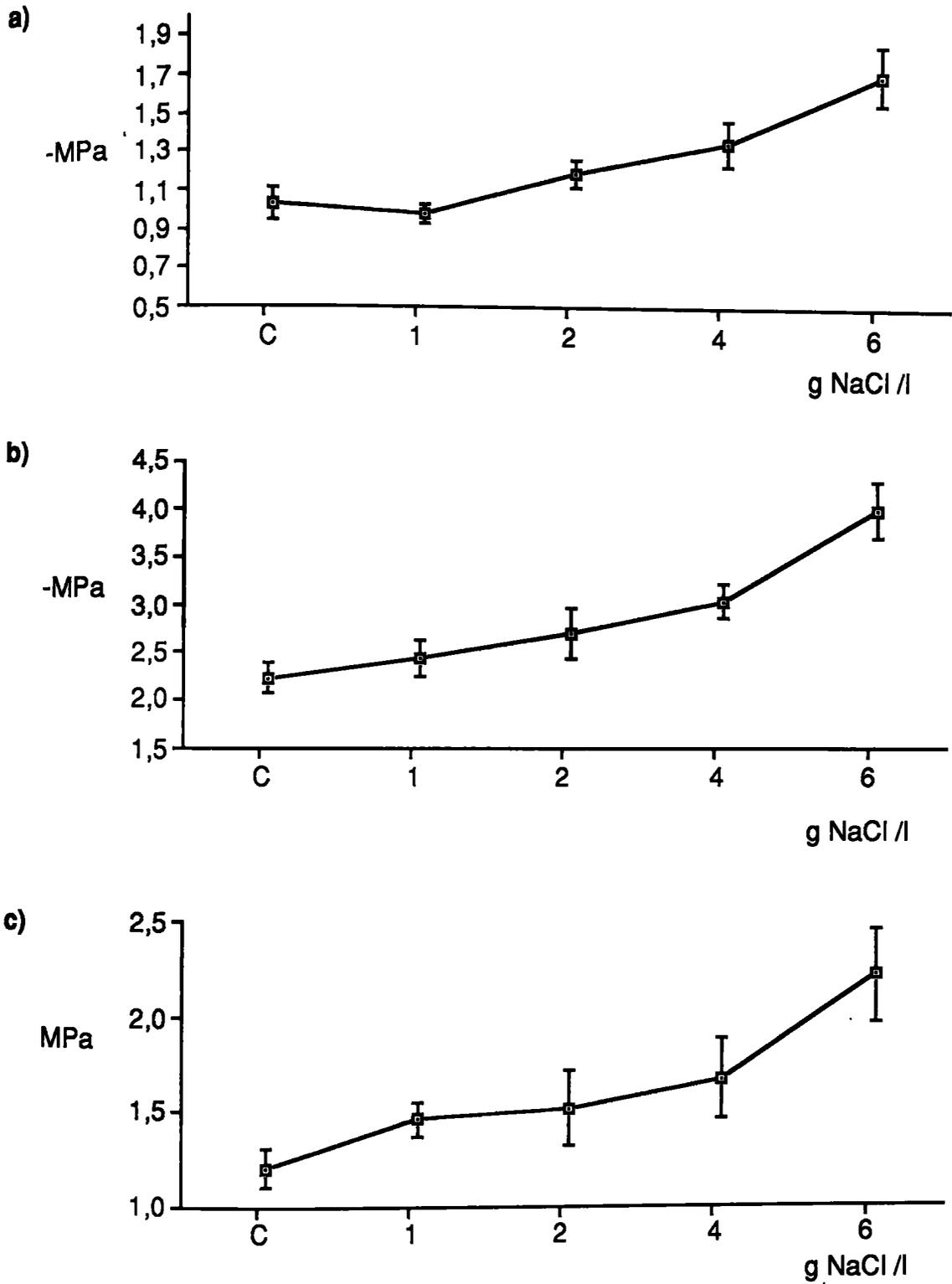
### 4.3 Resultados

#### *Experimento 1: Respuesta de *P. vera* no inoculado a concentraciones crecientes de sal*

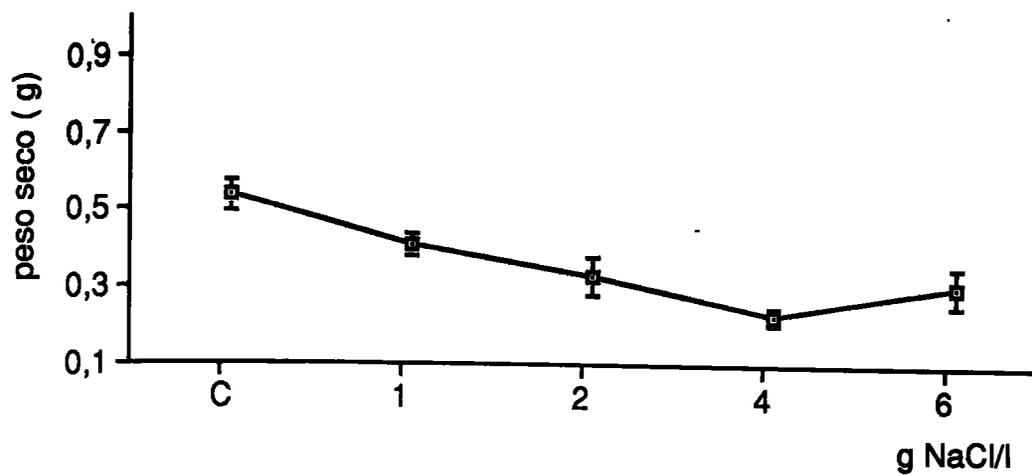
Tanto el potencial hídrico del xilema como el potencial osmótico disminuyen, es decir son más negativos, al aumentar la concentración de sal en las soluciones de riego (Fig 1a y 1b). A partir del tratamiento con una solución de riego de 2 g NaCl / l las diferencias, en ambos parámetros, son significativas respecto al control.

El potencial de turgencia (Fig. 1c) se mantiene hasta llegar al tratamiento con 4 g NaCl/l en la solución de riego, en que alcanza valores significativamente distintos al control, aunque no se diferencia de los valores obtenidos por los tratamientos con 1 y 2 g NaCl / l. El tratamiento con 6 g de NaCl / l en la solución de riego, alcanza valores superiores a 2 MPa, estadísticamente distintos de los obtenidos en los demás tratamientos ensayados.

El crecimiento de *P. vera*, medido como peso seco de su parte aérea (Fig. 2), disminuye paralelamente a la concentración salina del agua de riego, siendo esta disminución significativa, respecto al valor del control, para los tratamientos con 4 g NaCl / l y 6 g NaCl / l.



**Figura 1 :** Efecto de cantidades crecientes de NaCl en la relaciones hídricas de *P. vera* no micorrizado a) potencial hídrico, b) potencial osmótico y c) turgencia



**Figura 2 :** Efecto de cantidades crecientes de NaCl en el crecimiento de *P. vera* no micorrizado

*Experimento 2: Respuesta de P. vera, inoculado con G. mosseae, aislado N<sub>1</sub> a concentraciones crecientes de NaCl*

En el primer tiempo se observa una disminución, tanto del potencial hídrico del xilema como del potencial osmótico, proporcional al incremento de la salinidad en la solución de riego (Fig 3a y 3b). A partir del tratamiento con 2 g NaCl/l, los valores obtenidos en cada tratamiento son significativamente distintos respecto al control.

El potencial de turgencia se mantiene alrededor de 1.5 MPa, sin que se observen variaciones significativas entre tratamientos (Fig.3c).

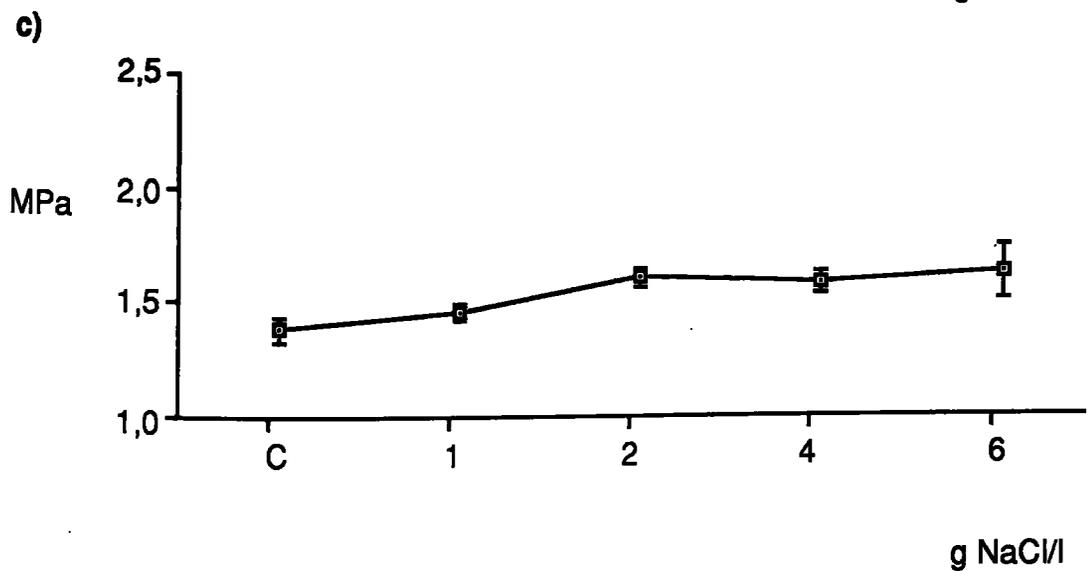
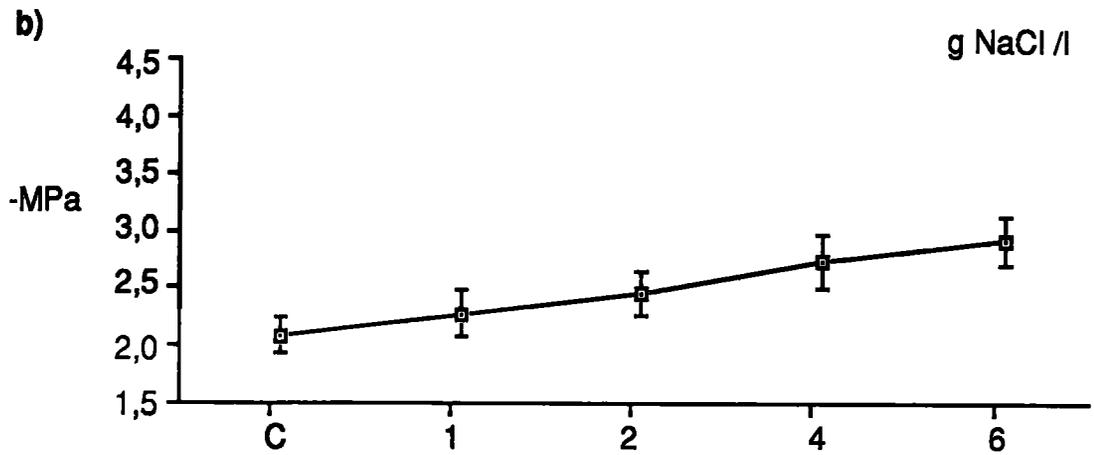
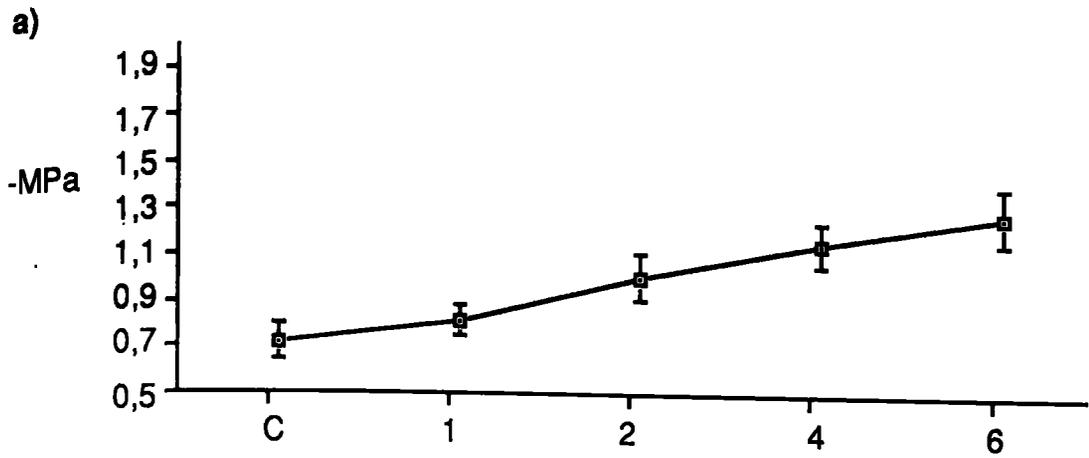
El crecimiento de *P. vera* tampoco varía, de forma significativa, con la solución de riego empleada (Fig.5a).

En la segunda cosecha del experimento, a las doce semanas del inicio de los tratamientos, el potencial hídrico del xilema (Fig. 4a) disminuye proporcionalmente a la concentración de sal en el medio. Los valores obtenidos, en los tratamientos con 4 y 6 g de NaCl/l son, significativamente, más negativos que el control. El potencial osmótico (Fig. 4b) experimenta una primera disminución significativa para el tratamiento con 1 g NaCl/l, este valor se mantiene para el tratamiento con 2 g NaCl/l para luego experimentar, otra disminución significativa, para el tratamiento con 4 g NaCl/l, manteniéndose el mismo valor para 6 g NaCl/l sin variaciones significativas.

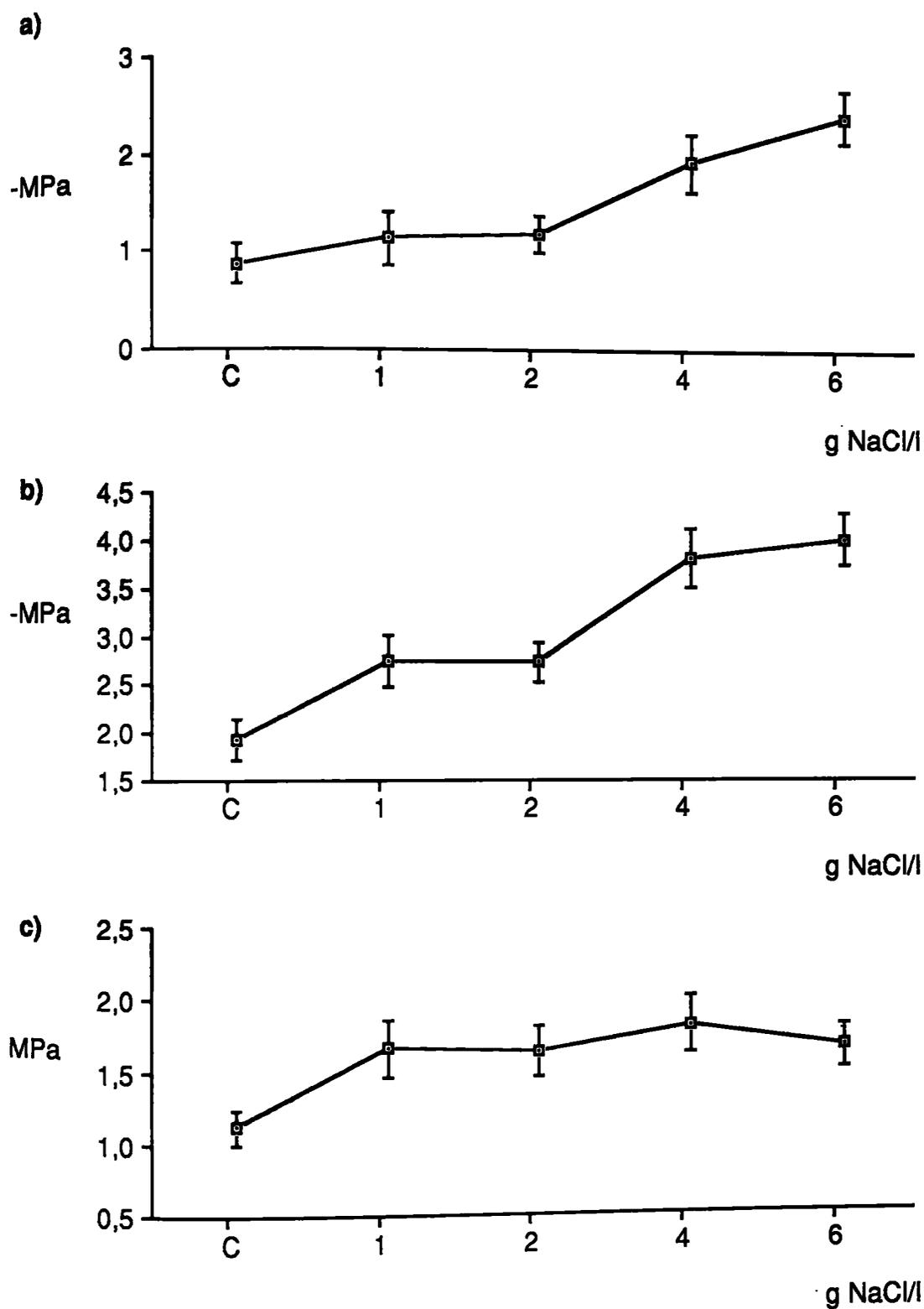
El potencial de turgencia (Fig. 4c) aumenta significativamente desde el tratamiento control, regado con agua destilada, hasta el tratamiento con 1 g NaCl/l de solución de riego. A partir de este valor, posteriores incrementos en la salinidad de la solución de riego, no producen una variación significativa de la turgencia.

El crecimiento, expresado como peso seco de la parte aérea (Fig 5b), tiende a disminuir con el aumento de la salinidad de la solución de riego, pero esta disminución no es significativa para ninguno de los tratamientos.

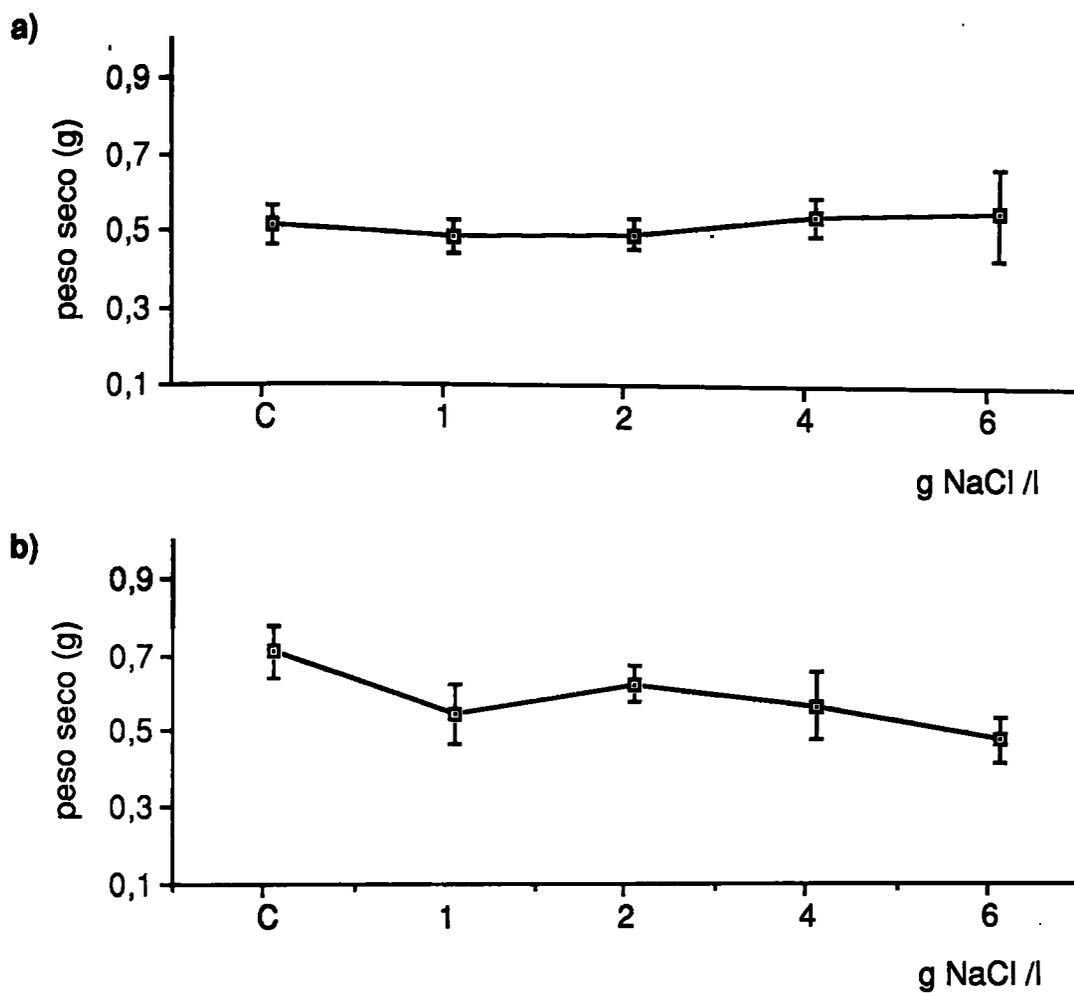
La colonización interna de las raíces por *G. mosseae* tiende a disminuir con el incremento en la salinidad de la solución de riego, esta disminución no es, sin embargo, significativa (Fig. 6 a y b).



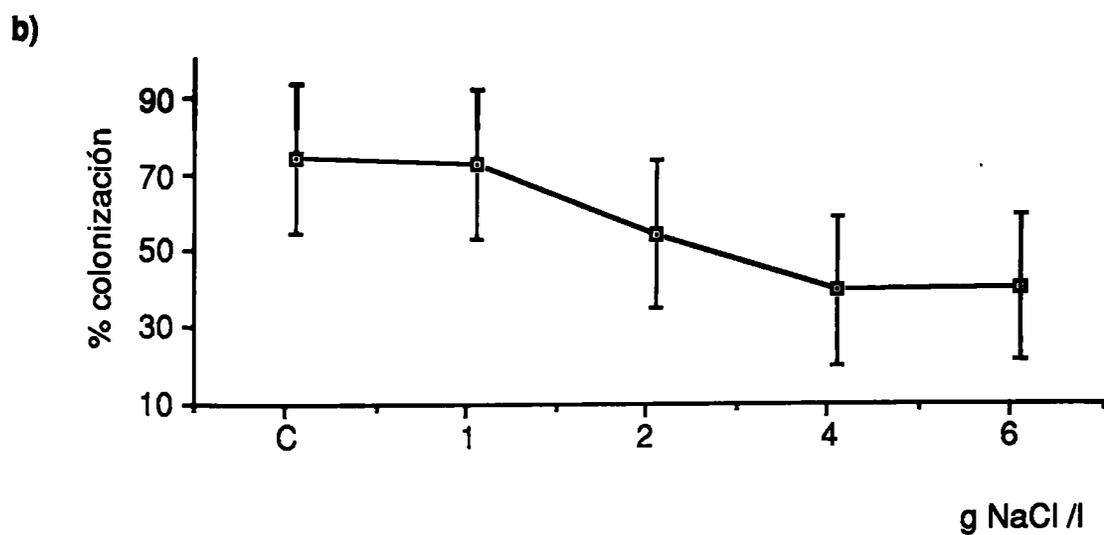
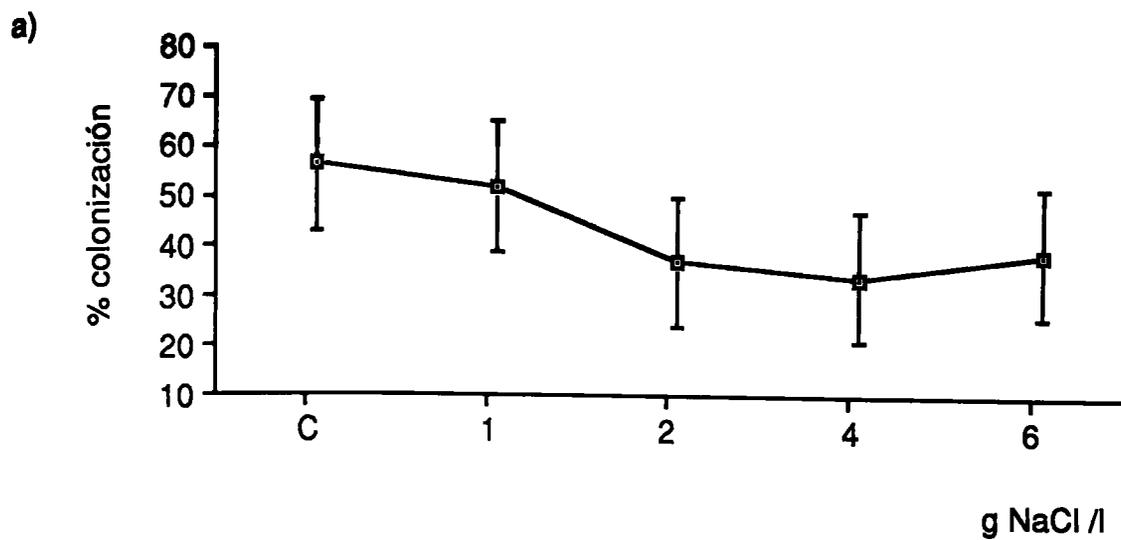
**Figura 3 :** Efecto de cantidades crecientes de NaCl en las relaciones hídricas de *P. vera* micorrizado a) potencial hídrico, b) potencial osmótico y turgencia en el tiempo 1



**Figura 4 :** Efecto de cantidades crecientes de NaCl en las relaciones hídricas de *P. vera* micorrizado a) potencial hídrico, b) potencial osmótico y turgencia en el tiempo 2



**Figure 5 :** Efecto de cantidades crecientes de NaCl en el crecimiento de *P. vera* micorrizado a) tiempo 1 y b) tiempo 2



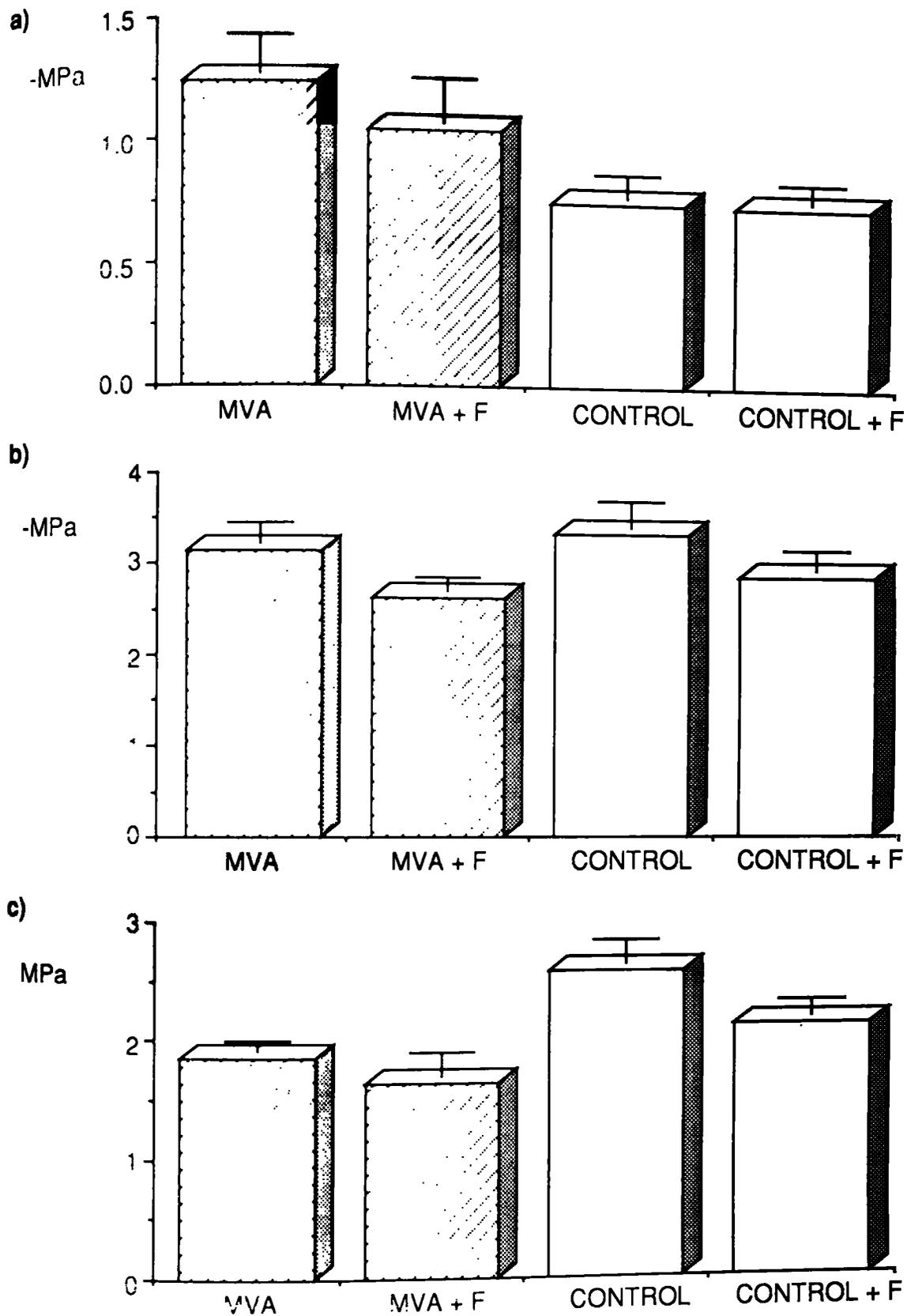
**Figura 6 :** Efecto de cantidades crecientes de NaCl en la colonización interna de *P. vera* inoculado con *Glomus mosseae* aislado N a) tiempo 1 y b) tiempo 2

*Experimento 3: Efecto del abonado y de la inoculación con hongos formadores de MVA, en las relaciones hídricas de P. vera en condiciones de estrés salino*

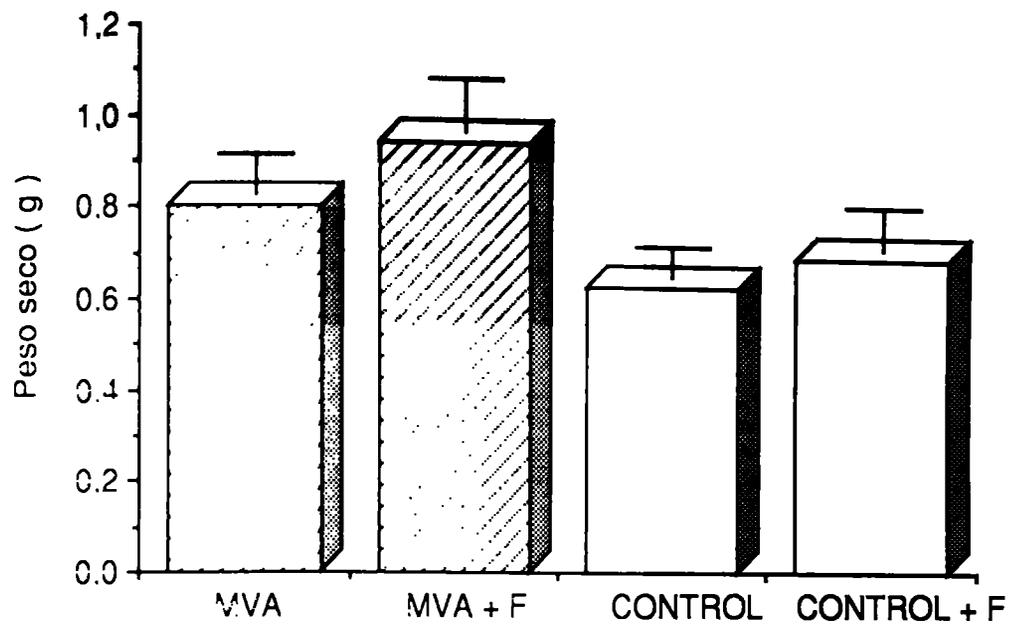
En este ensayo el potencial hídrico del xilema se mantiene en todos los tratamientos alrededor de - 1.5 MPa, valores no excesivamente altos, aunque los dos tratamientos con micorrizas tienen un potencial hídrico significativamente menor (más negativo) que los tratamientos no inoculados (Fig. 7a). El potencial osmótico del tratamiento con micorriza y fertilizante es significativamente mayor (menos negativo) que el observado en los tratamientos sin fertilizante (Fig 7b). En el tratamiento control más fertilizante, aunque los valores de presión osmótica son inferiores a los de los tratamientos sin fertilizante, las diferencias observadas no son significativas.

El potencial de turgencia del tratamiento control (Fig 7c), es significativamente mayor que el observado en el resto de los tratamientos. Tanto la adición de fertilizante, como la inoculación con hongos VA, disminuyen el potencial de turgencia respecto al control, aunque la micorrización produce una disminución más importante.

El crecimiento de *P. vera* micorrizado, es superior al del control, con o sin fertilizante (Fig. 8). En las plantas no inoculadas, se observa un aumento del crecimiento no significativo con la adición de fertilizante, sin embargo, es en las plantas con micorrizas, donde se observa un efecto positivo de la fertilización, que estimula el crecimiento, respecto al tratamiento con micorrizas sin fertilizante.



**Figura 7 :** Efecto de la micorrización y de la fertilización en las relaciones hidricas de *P. vera* sometido a condiciones de estrés salino a) potencial hidrico. b) potencial osmótico y c) turgencia



**Figura 8 :** Efecto de la micorrización y de la fertilización en el peso seco de *P. vera* sometido a condiciones de estrés salino

*Experimento 4: Respuesta de P. vera, inoculado con dos aislados distintos de G. mosseae, a tres niveles de salinidad*

En el tiempo 1, a las ocho semanas del inicio de los tratamientos de riego, el potencial hídrico del xilema disminuye, proporcionalmente al incremento de la salinidad del agua de riego, en todos los tratamientos (Fig 9 a,b y c), aunque la disminución es más marcada en los tratamientos con micorrizas. Más concretamente la variación del potencial hídrico en las plantas inoculadas con los aislados N y S de *G. mosseae*, sigue rectas lineales:

$$\text{para el aislado N: potencial hídrico } (\Psi_p) = 0.48 + 0.26 \times (\text{NaCl}) \text{ g/l}$$

$$\text{para el aislado S: potencial hídrico } (\Psi_p) = 0.45 + 0.26 \times (\text{NaCl}) \text{ g/l}$$

Ambas ecuaciones son prácticamente idénticas. Los valores de la variación del potencial hídrico de las plantas control no inoculadas, siguen también una ecuación lineal:

$$\text{potencial hídrico } (\Psi_p) = 0.50 + 0.125 \times (\text{NaCl}) \text{ g/l}$$

En esta ecuación, el factor que afecta a la concentración de NaCl, es la mitad del calculado en el caso de las plantas micorrizadas.

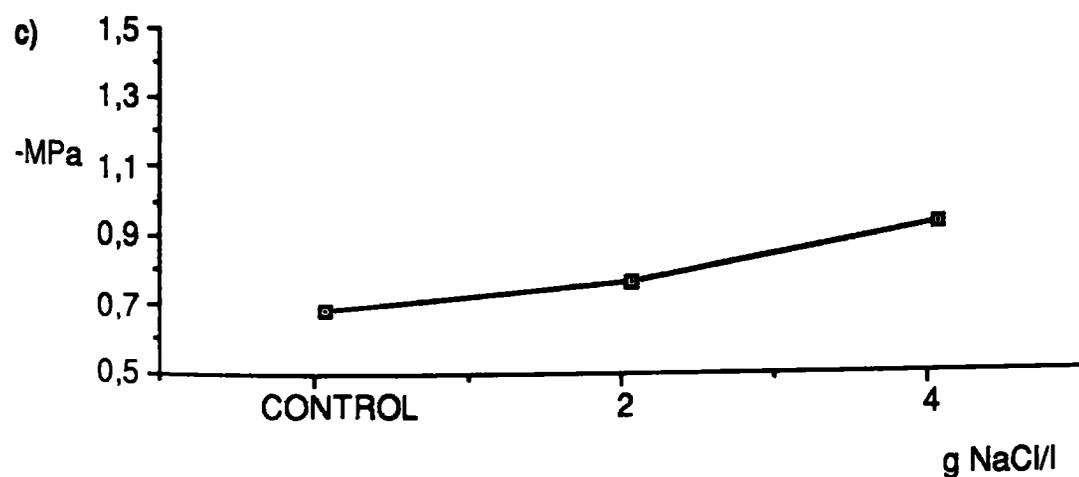
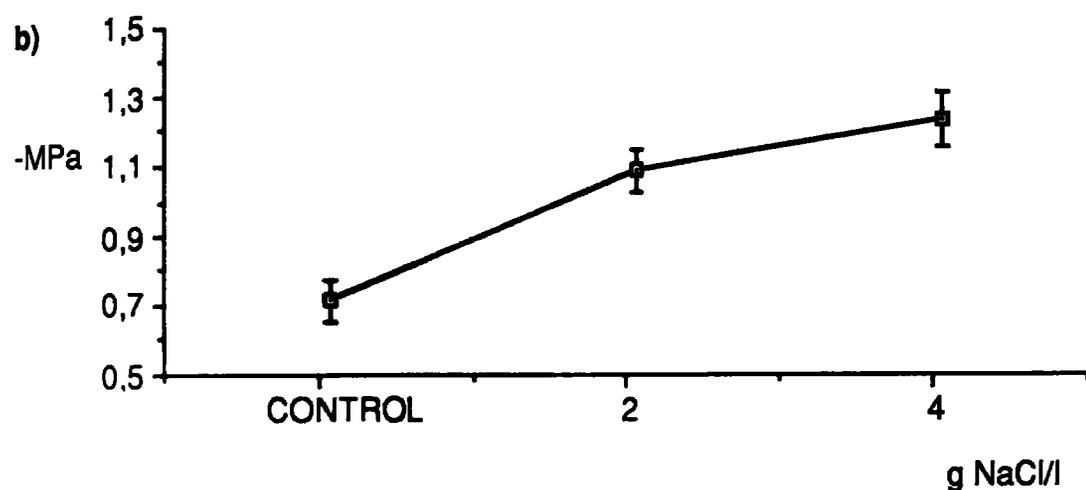
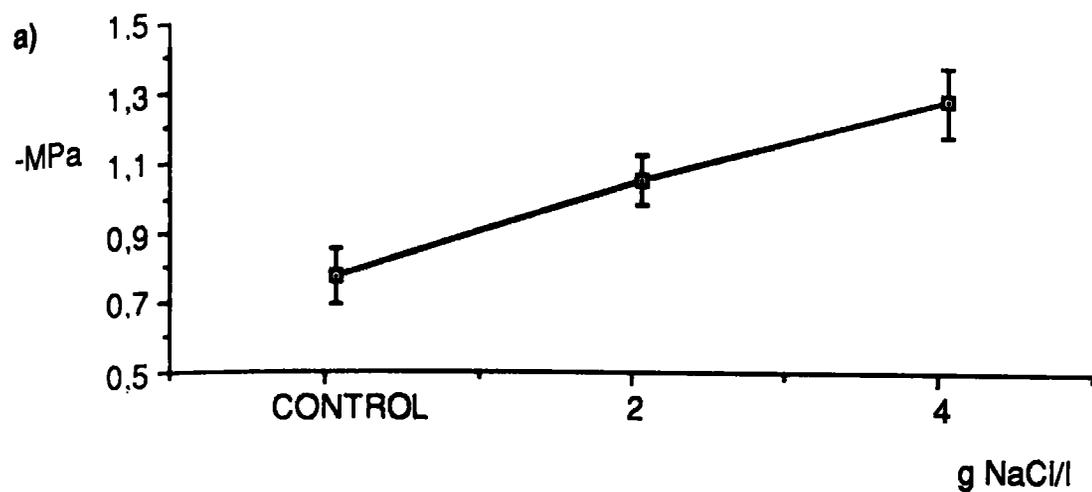
Las medidas del potencial osmótico (Fig. 10 a, b y c) siguen dos modelos distintos, según el tratamiento de inoculación respectivo. Las plantas inoculadas con *G. mosseae*, aislado N o S, no experimentan variaciones significativas con el incremento de la salinidad en la solución de riego. Las plantas control no inoculadas, experimentan una disminución de su potencial osmótico (más negativo) ya en la primera solución salina ensayada, para luego estabilizarse. Hay que considerar, que los tres tratamientos de inoculación, mantienen un rango semejante de potenciales osmóticos entre, - 3.3 y -2.7 MPa y que las variaciones señaladas, aunque son estadísticamente significativas, pueden no serlo fisiológicamente.

El potencial de turgencia (Fig. 11a, b y c) disminuye con el incremento de la salinidad en el agua de riego, cualquiera que sea el tratamiento de inoculación. Las plantas inoculadas con *G. mosseae*, aislado S, experimentan

una disminución del potencial de turgencia, directamente proporcional a la concentración salina en el agua de riego. Las plantas inoculadas con *G. mosseae*, aislado N, y las control no inoculadas experimentan una disminución, significativa en el primer nivel de salinidad ensayado, para luego estabilizarse, caso de las plantas control, o incluso aumentar en las plantas inoculadas con el aislado N.

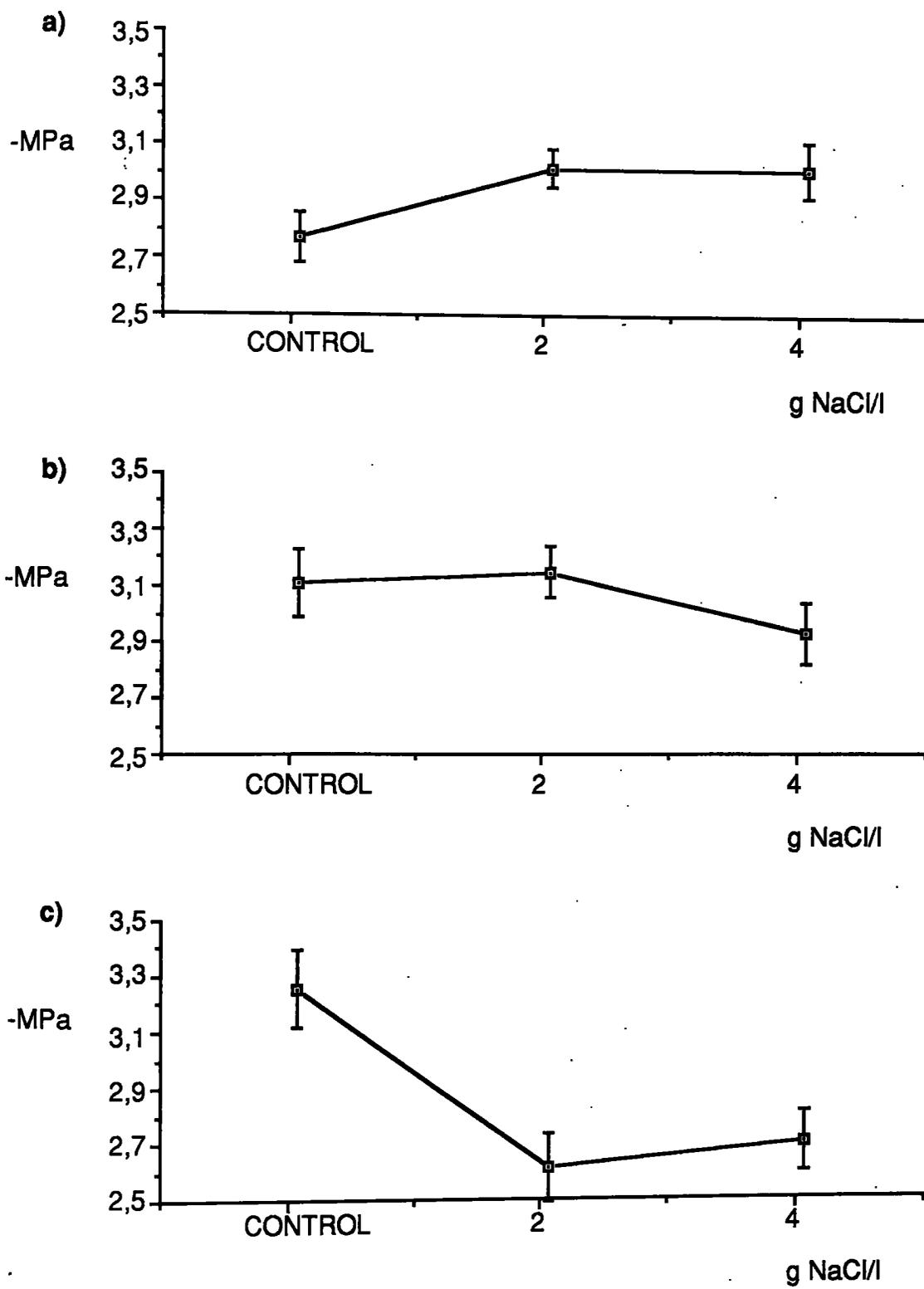
El crecimiento de *P. vera*, da valores semejantes para los tres tratamientos de inoculación y no experimenta variaciones, debidas al incremento de salinidad en el agua de riego (Fig. 12 a, b y c).

El aislado N de *G. mosseae* experimenta, una disminución en el porcentaje de raíz colonizada, al aumentar hasta 4 g NaCl /l la salinidad de la solución de riego, en cambio el aislado S, mantiene su porcentaje de colonización sin variaciones (Fig.13 a y b).

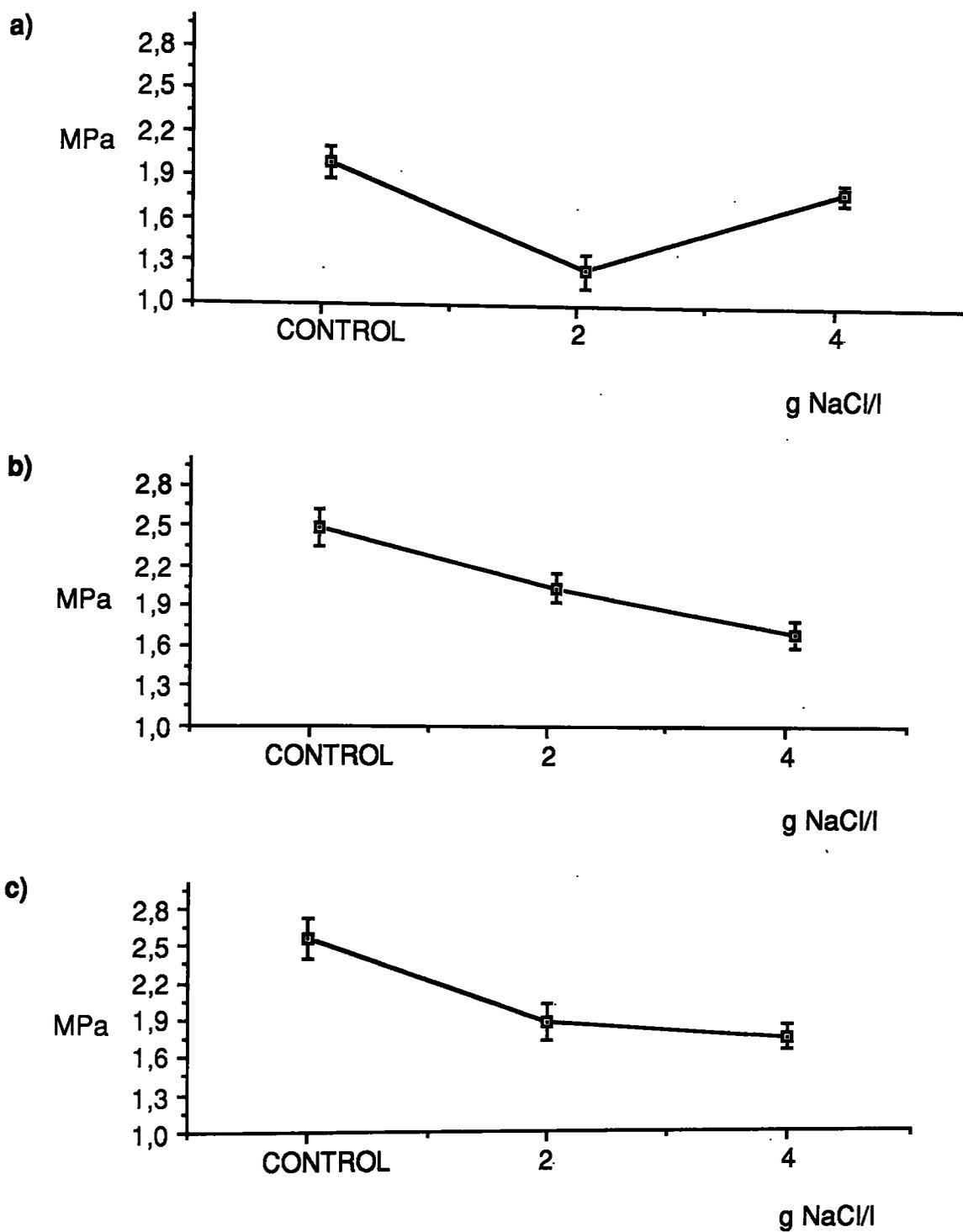


**Figura 9 :** Efecto de 3 niveles de salinidad en el potencial hídrico del xilema de *P. vera* , tiempo 1.

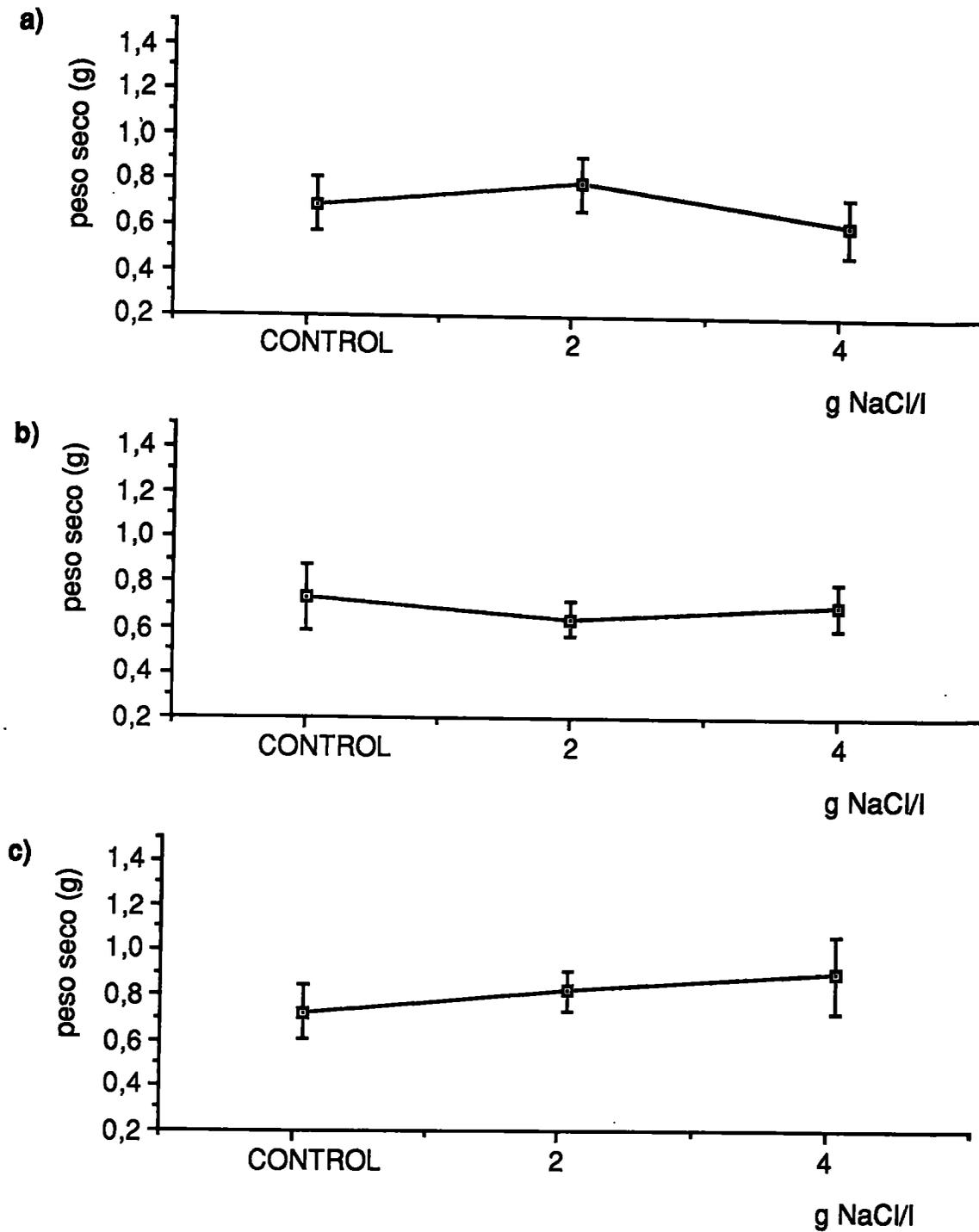
- a) inoculado con *Glomus mosseae* aislado N
- b) inoculado con *Glomus mosseae* aislado S
- c) control no inoculado



**Figura 10 :** Efecto de 3 niveles de salinidad en el potencial osmótico de *P. vera*, tiempo 1.  
 a) inoculado con *Glomus mosseae* aislado N  
 b) inoculado con *Glomus mosseae* aislado S  
 c) control no inoculado



**Figura 11 :** Efecto de 3 niveles de salinidad en la turgencia de *P. vera* , tiempo 1.  
 a) inoculado con *Glomus mosseae* aislado N  
 b) inoculado con *Glomus mosseae* aislado S.  
 c) control no inoculado

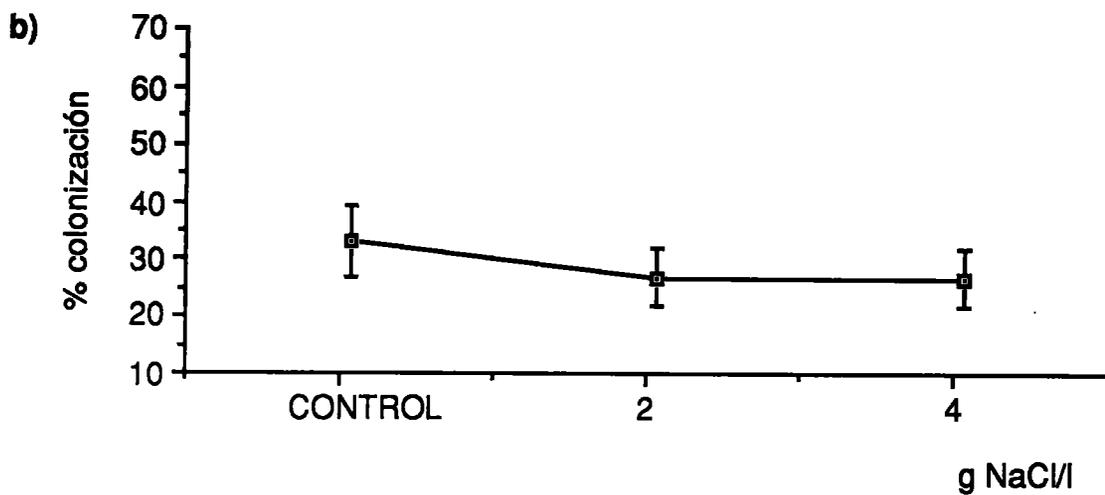
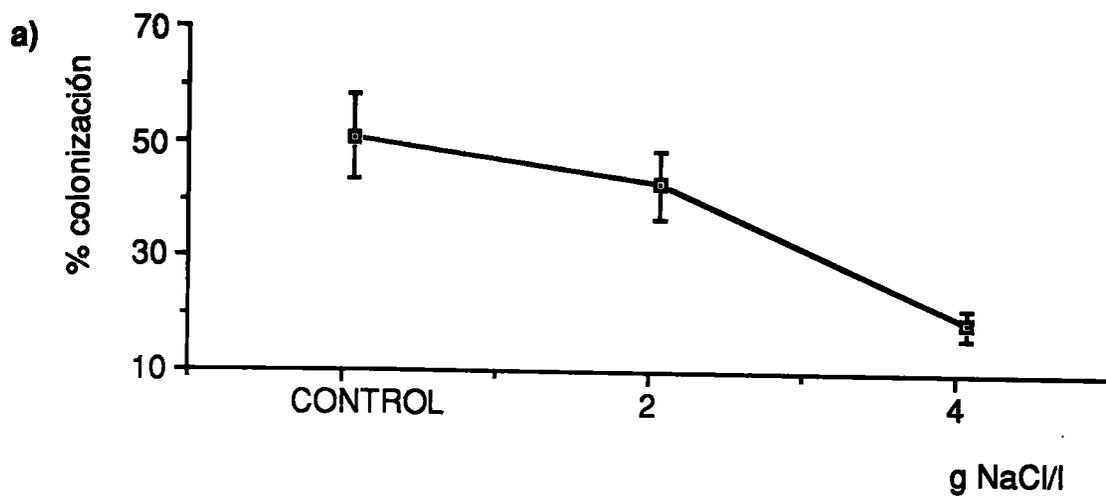


**Figura 12** : Efecto de 3 niveles de salinidad en el peso seco de la parte aérea de *P. vera* , tiempo 1.

a) inoculado con *Glomus mosseae* aislado N

b) inoculado con *Glomus mosseae* aislado S

c) control no inoculado



**Figura 13** : Efecto de 3 niveles de salinidad en la colonización interna V. A. de *P. vera* , tiempo 1.  
 a) inoculado con *Glomus mosseae* aislado N  
 b) inoculado con *Glomus mosseae* aislado S

En el tiempo 2, a las 12 semanas del inicio del tratamiento de riego, el potencial hídrico del xilema disminuye con el incremento de la salinidad, hasta niveles semejantes en los tres tratamientos de inoculación. Se observa que, en el primer tipo de riego (sin NaCl), el potencial hídrico de las plantas micorrizadas, es siempre inferior a el de las plantas control, independientemente del hongo simbionte. La disminución del potencial hídrico, para las plantas control, es más marcada que la de las plantas micorrizadas (Fig. 14 a, b y c).

Las medidas del potencial osmótico, siguen una misma pauta en todos los casos. Tanto las plantas micorrizadas como las control, aumentan su potencial osmótico de forma lineal con el incremento en la salinidad de la solución de riego (Fig. 15 a, b y c).

El potencial de turgencia aumenta con la salinidad del tratamiento de riego, tanto para las plantas micorrizadas, como para las plantas control, aunque en el caso de las plantas inoculadas con el aislado S, el incremento no es significativo (Fig. 16 a, b y c).

La concentración de prolina aumenta para las plantas inoculadas con el aislado S de *G. mosseae*, desde 0.69 mg/g (peso fresco) en el tratamiento con agua destilada, hasta 1 mg/g en el tratamiento con 2 g NaCl/l de solución de riego, manteniéndose, sin variaciones significativas, en el tratamiento con 4 g NaCl/l de solución. Para las plantas inoculadas con el aislado N, también se observa un incremento en la concentración de prolina paralelo al descrito para el aislado S. En el caso de las plantas no inoculadas, la concentración de prolina se mantiene sin variaciones significativas, alrededor de 0.5 mg/g, para todas las soluciones de riego empleadas (Fig. 17 a, b y c).

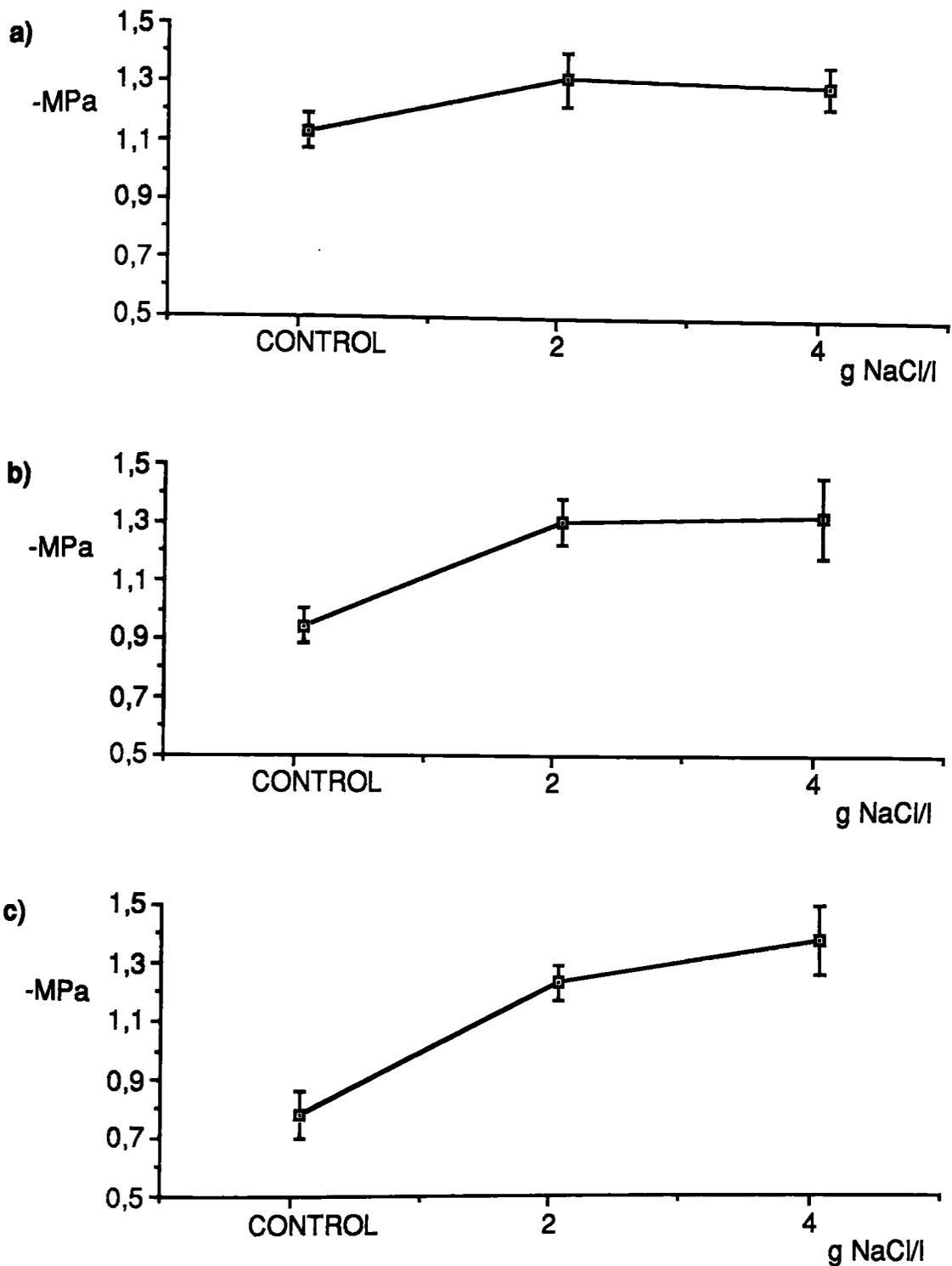
El crecimiento de *P. vera* (Fig. 18 a, b y c), sigue dos modelos distintos, según el tratamiento de inoculación. Las plantas micorrizadas, mantienen el peso seco de su parte aérea hasta que se riegan con 4 g NaCl/l, sin variaciones significativas entre ambos aislados. Las plantas no inoculadas, presentan un crecimiento ligeramente inferior al de las plantas inoculadas en el tratamiento de riego, con agua destilada, al aumentar la concentración de sal en el agua de riego el peso seco de las plantas no inoculadas, empieza a disminuir

rápidamente. En el tratamiento con 2 g NaCl/l en la solución de riego, la disminución experimentada es significativa, respecto a su propio control no inoculado y también respecto al valor obtenido, con el mismo tratamiento de riego, en las plantas micorrizadas. En el tratamiento con 4 g NaCl/l todas las plantas, micorrizadas o no, experimentan una disminución de su crecimiento respecto a su control regado con agua destilada. Los valores obtenidos por las plantas micorrizadas, regadas con 4 g /l NaCl/l oscilan alrededor de 0.90 g y no existen diferencias apreciables, en los resultados obtenidos, para los dos aislados de *G. mosseae* ensayados. Los valores obtenidos para las plantas control sí son, significativamente distintos de los de las plantas micorrizadas. Además de esta disminución en el crecimiento, y como se puede observar en la Fig. 20. las plantas no inoculadas sometidas al tratamiento con 4 g/l NaCl, muestran síntomas claros de toxicidad salina: defoliación prematura, aparición de áreas necrosadas y coloración rojiza en el borde de las hojas. Estos síntomas eran menos evidentes en las plantas micorrizadas. La relación R/A, se mantiene constante para todos los tratamientos de inoculación y riego.

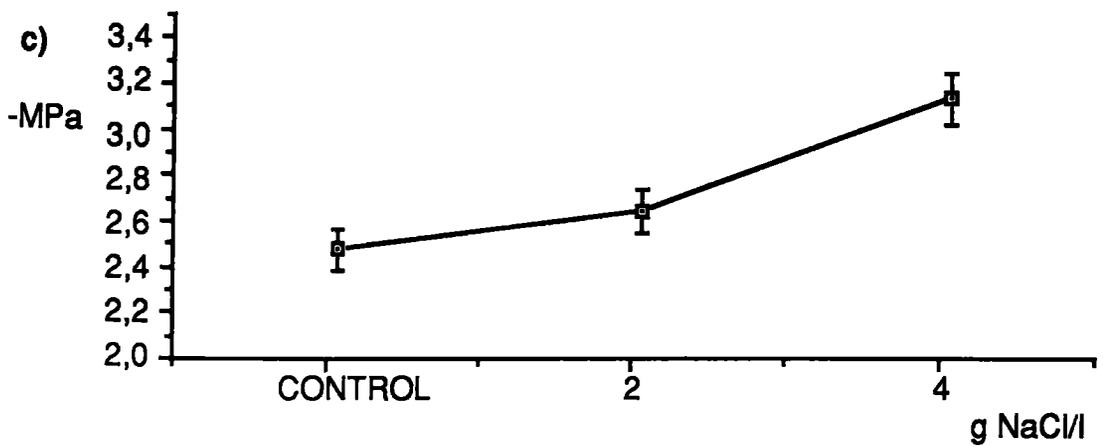
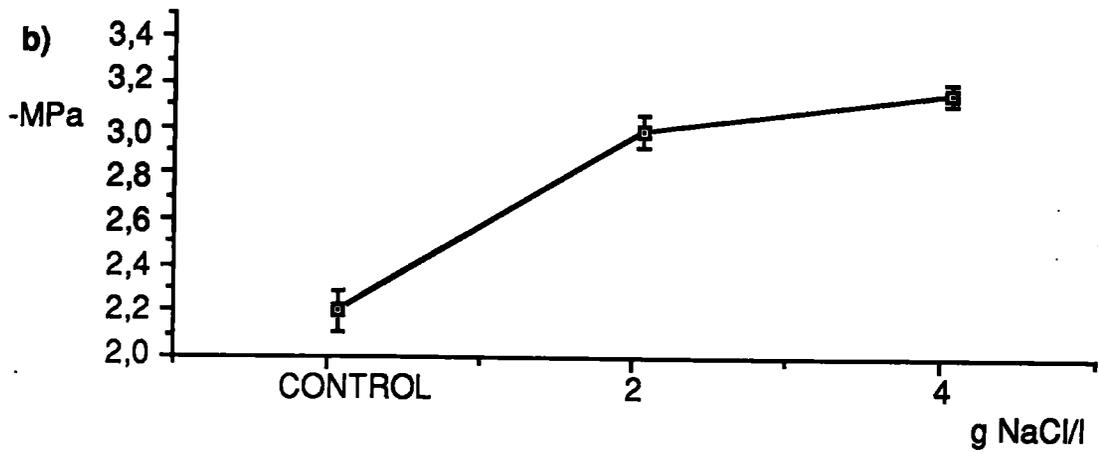
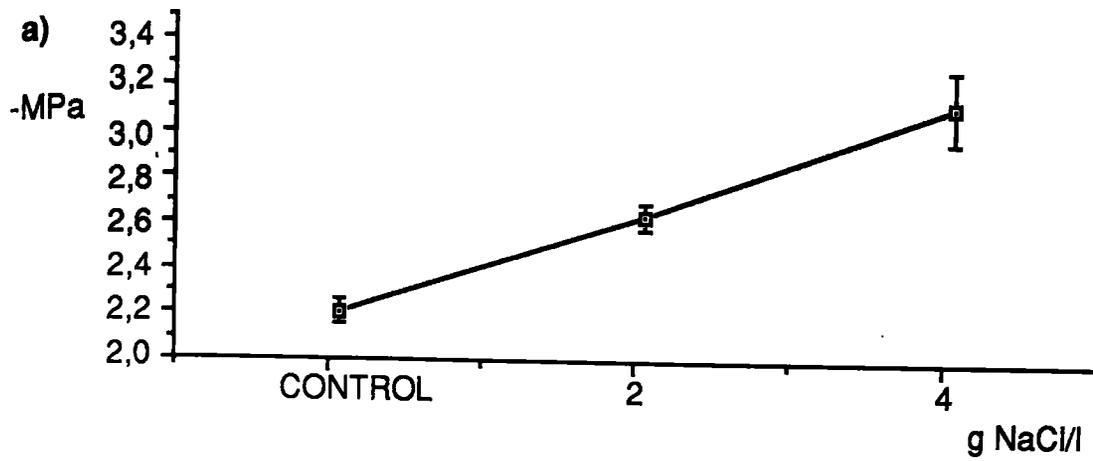
El aislado N, experimenta una disminución en su porcentaje de colonización interna, al introducir NaCl en la solución de riego. Para el aislado S, la adición de NaCl al agua de riego, no influye en el porcentaje de colonización, que se mantiene constante alrededor de 50% (Fig. 19 a y b).

El aislado S. no produce esporas en ninguno de los tratamientos mientras que, el aislado N, produce 11.25 esporas/100 g, en los tratamientos con agua destilada y 2 g de sal, bajando hasta 5.2 esporas/100 g de suelo, para el tratamiento con 4 g de sal, por litro de solución de riego.

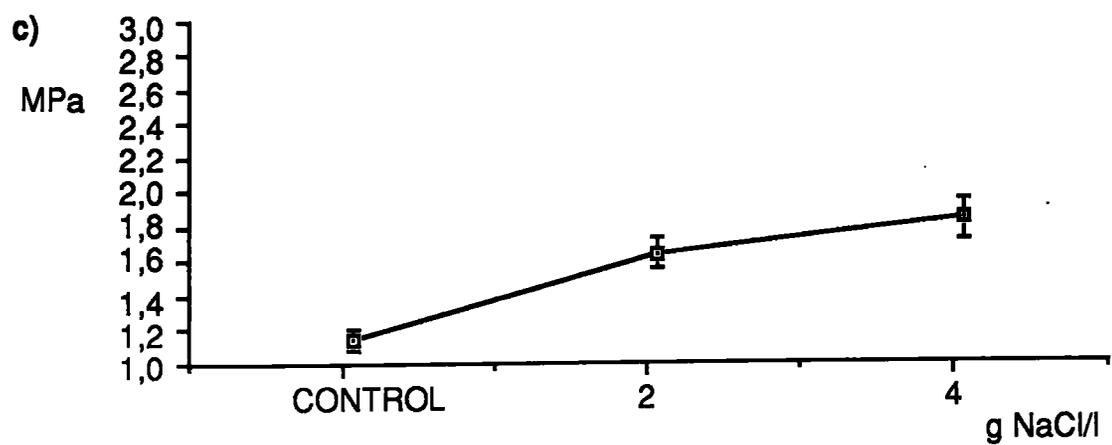
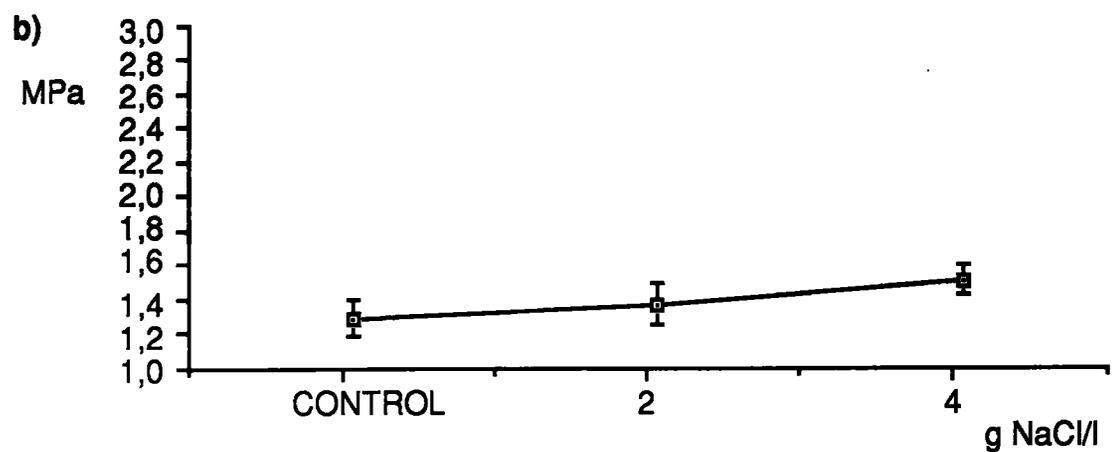
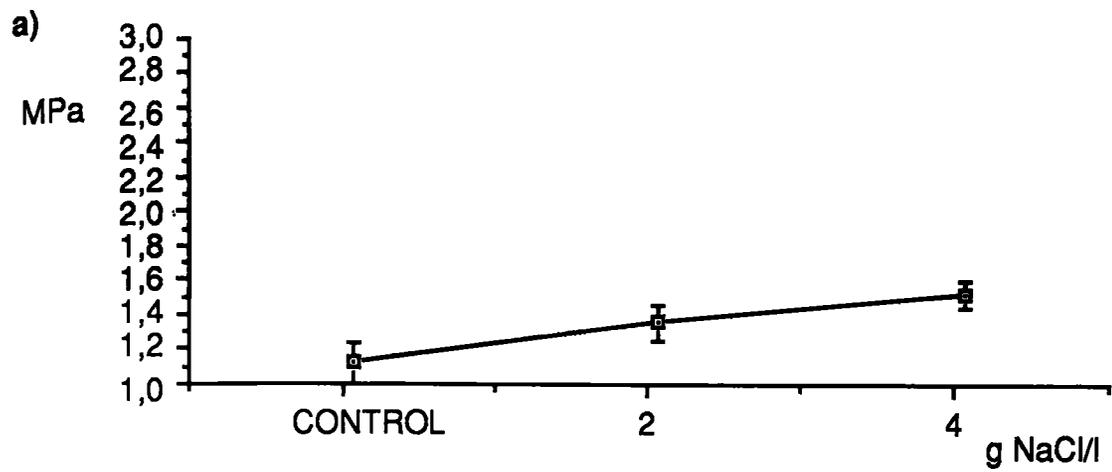
Los valores finales de conductividad eléctrica observados eran,  $0.245 \pm 0.06$   $\text{dSm}^{-1}$ ,  $0.463 \pm 0.04$   $\text{dSm}^{-1}$  y  $0.988 \pm 0.10$   $\text{dSm}^{-1}$  para los tratamientos con agua destilada y 2 y 4 g de sal por litro de solución de riego, respectivamente.



**Figura 14 :** Efecto de 3 niveles de salinidad en el potencial hídrico del xilema de *P. vera*, tiempo 2.  
 a) inoculado con *Glomus mosseae* aislado N  
 b) inoculado con *Glomus mosseae* aislado S  
 c) control no inoculado

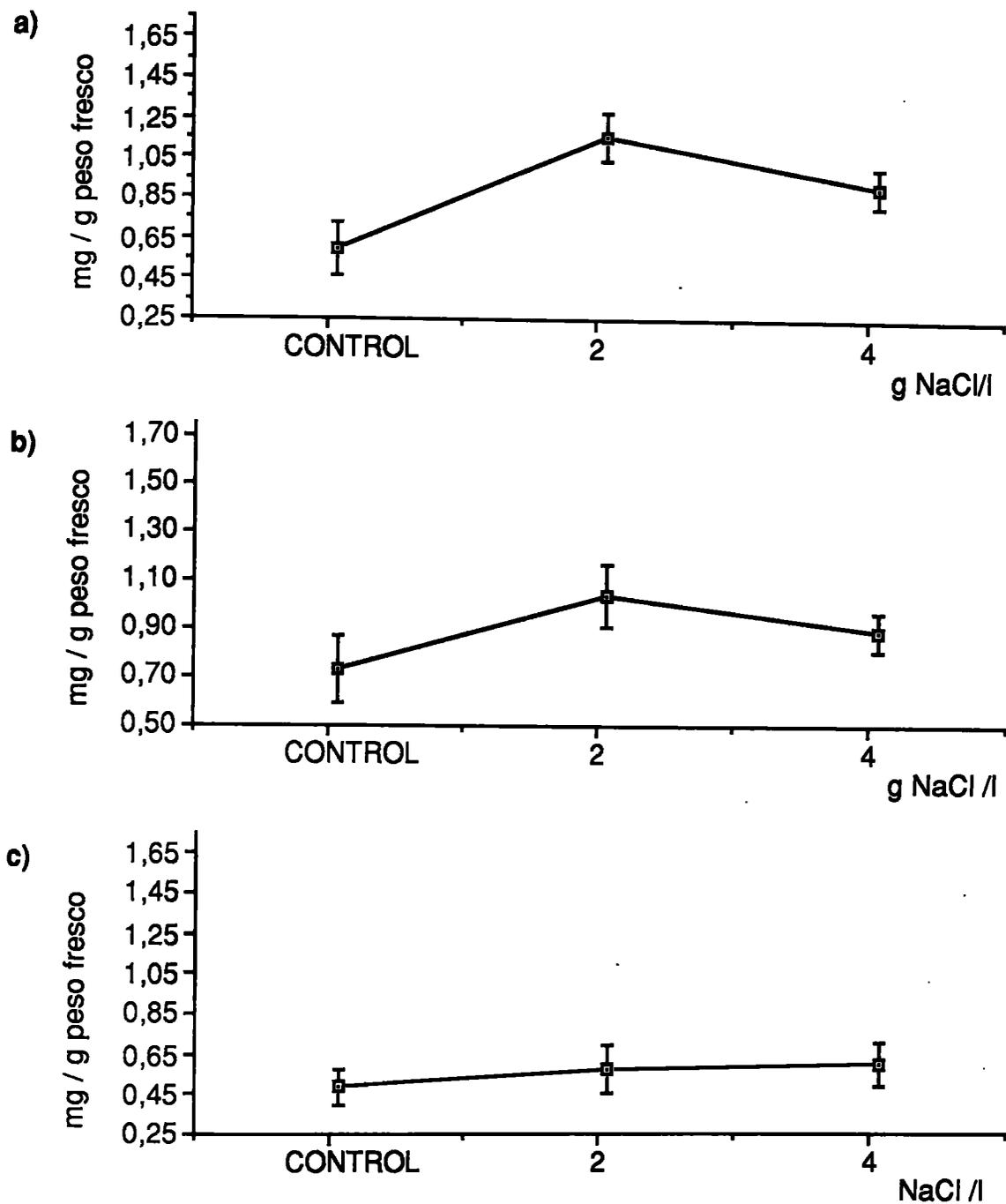


**Figura 15** : Efecto de 3 niveles de salinidad en el potencial osmótico de *P. vera*, tiempo 2.  
 a) inoculado con *Glomus mosseae* aislado N  
 b) inoculado con *Glomus mosseae* aislado S  
 c) control no inoculado



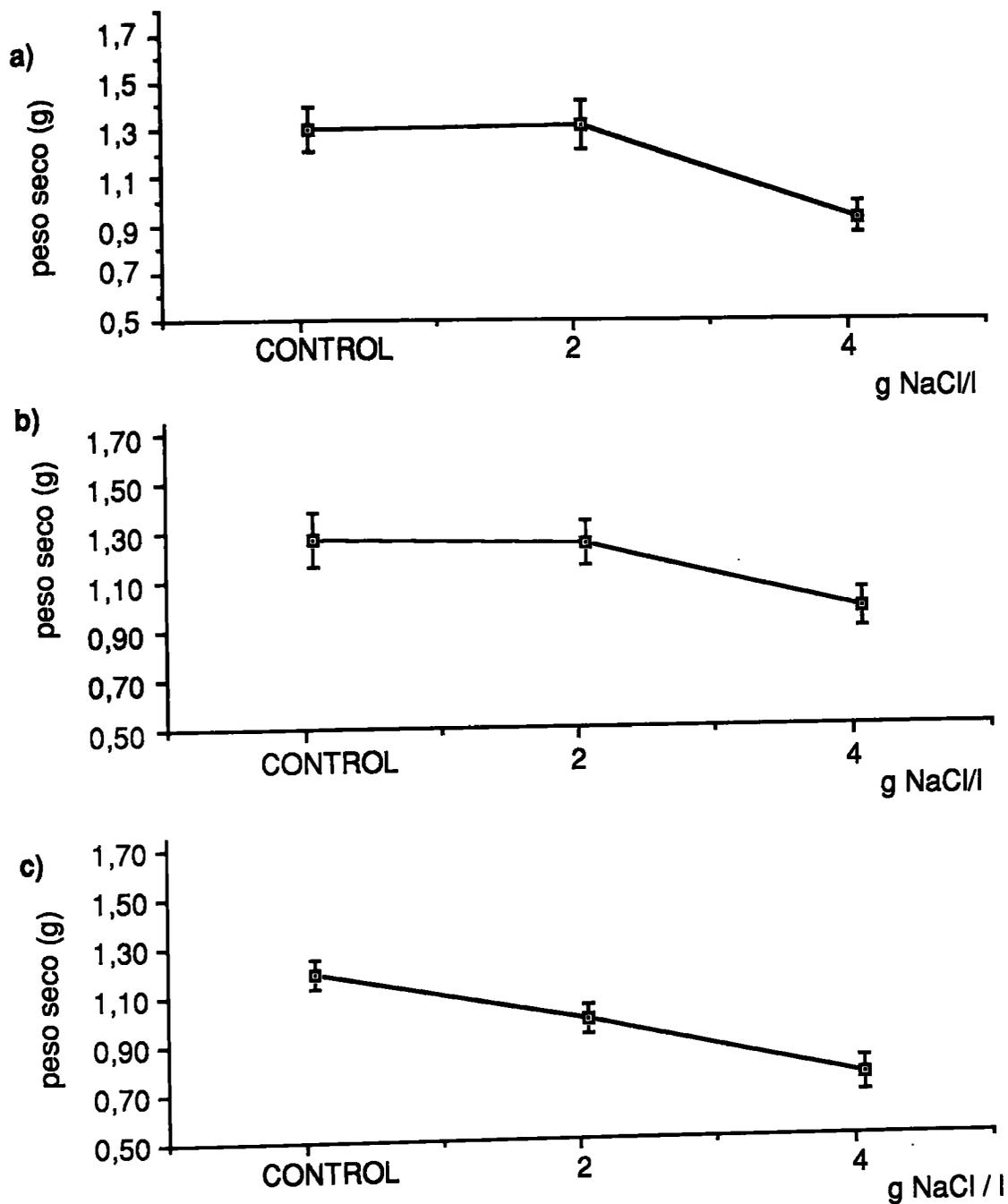
**Figura 16** :Efecto de 3 niveles de salinidad en la turgencia de *P. vera* , tiempo 2.

- a) inoculado con *Glomus mosseae* aislado N
- b) inoculado con *Glomus mosseae* aislado S
- c) control no inoculado

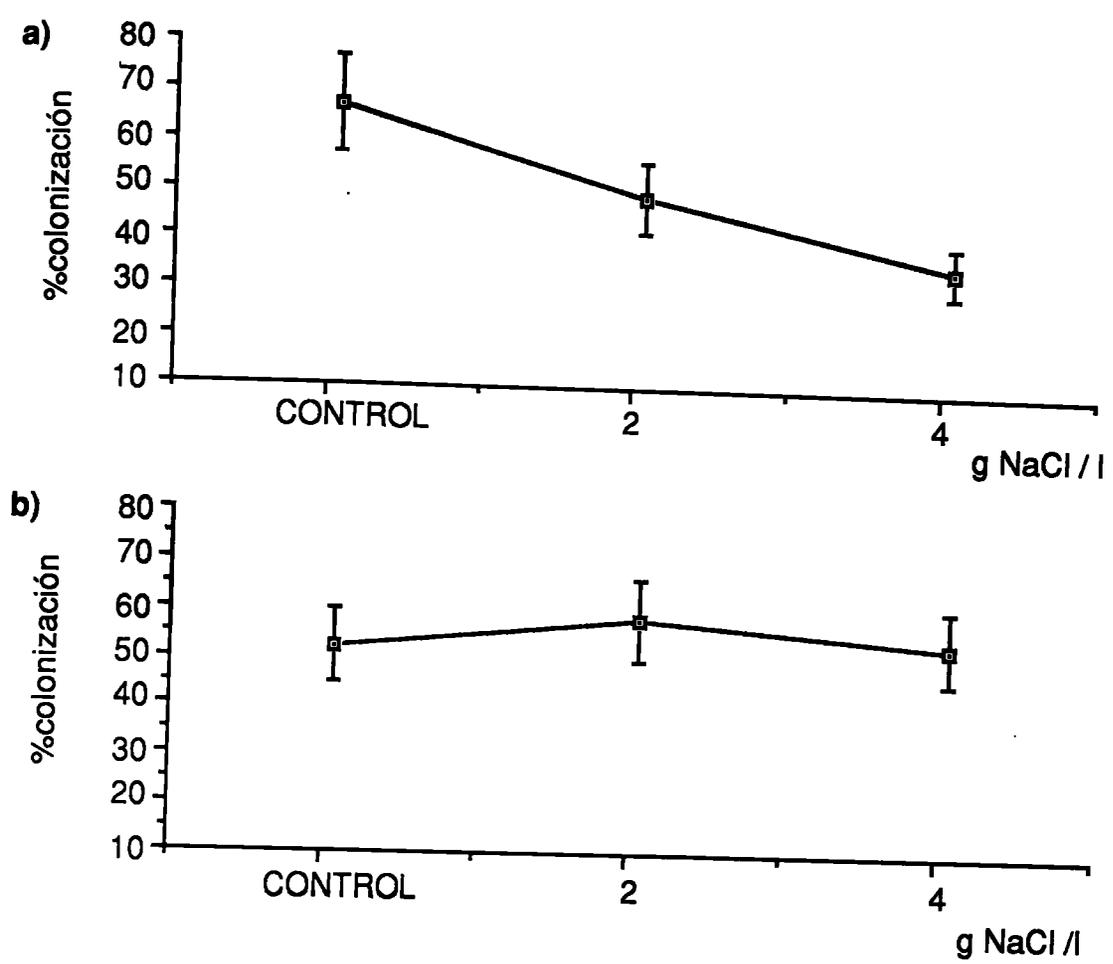


**Figura 17** :Efecto de 3 niveles de salinidad en la concentración de prolina de *P. vera* , tiempo 2.

- a) inoculado con *Glomus mosseae* aislado N
- b) inoculado con *Glomus mosseae* aislado S
- c) control no inoculado



**Figura 18** :Efecto de 3 niveles de salinidad en el peso seco de la parte aérea de *P. vera* , tiempo 2.  
a) inoculado con *Glomus mosseae* aislado N  
b) inoculado con *Glomus mosseae* aislado S  
c) control no inoculado



**Figura 19** : Efecto de 3 niveles de salinidad en la colonización V. A. de *P. vera* , tiempo 2.  
 a) inoculado con *Glomus mosseae* aislado N  
 b) inoculado con *Glomus mosseae* aislado S



**Figura 20 :** Efecto de la salinidad en *P. vera* micorrizado y no micorrizado (a las doce semanas de inicio del tratamiento).

#### 4.4 *Discusión*

El potencial hídrico del xilema de *P. vera* disminuye con el aumento de la salinidad del agua de riego, independientemente del tratamiento: control no inoculado, *G. mosseae* aislado N o aislado S. Estos resultados se mantienen en todos los ensayos efectuados. En condiciones de riego normales, los valores del potencial hídrico son inferiores en las plantas no inoculadas, resultado que coincide con los obtenidos por Allen (1982). El potencial osmótico disminuye con la salinidad de la solución de riego. Los valores obtenidos por las plantas inoculadas con *G. mosseae*, aislado S, sometidas a niveles moderados de salinidad son menores (más negativos), que los obtenidos por las plantas inoculadas con el aislado N y las de control no inoculadas. En condiciones de salinidad más pronunciada los valores obtenidos no son significativamente distintos.

Las medidas del potencial de turgencia muestran un incremento en los valores de las plantas control y de las inoculadas con el aislado N. Las plantas inoculadas con el aislado S, mantienen su potencial de turgencia sin cambios apreciables. A pesar del incremento en la turgencia de las plantas colonizadas por el aislado N, los valores alcanzados son siempre inferiores, a los obtenidos por las plantas no micorrizadas. El abonado con P, también disminuye el potencial de turgencia de las plantas no micorrizadas, respecto al control sin fertilizante, pero esta disminución es menor que la obtenida mediante la inoculación con *G. mosseae*, aislado N. La obtención de valores del potencial de turgencia inferiores respecto a los de las plantas control por las plantas micorrizadas podría considerarse como un efecto negativo de la micorrización sobre la capacidad osmoreguladora de la planta. Sin embargo Augé *et al.*, (1986) han demostrado un aumento de la capacidad osmoreguladora de *Rosa* sp. micorrizada, sometida a condiciones de estrés hídrico. Los resultados de crecimiento, obtenidos en este trabajo, indican un efecto positivo de la micorrización en condiciones de estrés salino. Los análisis de prolina en hoja demuestran que en las plantas no micorrizadas, no varían los niveles de este aminoácido con el estrés salino, mientras que en las plantas micorrizadas, se observa un aumento de la concentración de prolina, para niveles moderados de salinidad, que coincide con el mantenimiento del crecimiento.

*P. vera* puede considerarse como un glicófito altamente tolerante de la salinidad (Sepaskhah y Maftoun, 1988), que realiza ajuste osmótico acumulando sales en sus hojas y raíces (Walker *et al.*, 1987). Sepaskhah y Maftoun (1988) han observado el menor crecimiento de un cultivo de *P. vera* ligado a un menor ajuste osmótico y a una mayor acumulación iónica en las hojas, postulando que el ajuste osmótico, más efectivo, conseguido por otros cultivos, había de estar ligado a un incremento de solutos no iónicos. Peña *et al.*, (1988). también sugieren un incremento en la cantidad de aminoácidos libres, como factor de ajuste osmótico en leguminosas en condiciones de estrés hídrico, en las cuales la colonización MVA favorece la fijación de nitrógeno. El incremento en la concentración de prolina, observado en el experimento 4, tiempo 2, coincide con el mantenimiento del crecimiento de las plantas micorrizadas, que disminuye, al pasar la solución de riego de 2 a 4 g NaCl/l. Las plantas no micorrizadas, experimentan una disminución del crecimiento lineal y la aparición de síntomas característicos de toxicidad salina en las plantas regadas con 4 g NaCl/l.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede sugerir que, en este caso, las plantas micorrizadas consiguen mantener su potencial de turgencia incrementando la concentración de prolina libre, mientras que las no micorrizadas, lo mantienen mediante la acumulación de iones, descrita por Walker *et al.*. (1987). Este acúmulo de iones resulta con el tiempo perjudicial, disminuyendo el crecimiento y causando la aparición de síntomas de toxicidad salina.

## *Discusión General*

Las micorrizas VA representan un complemento del sistema radical de las plantas hospedadoras que modifica las propiedades de absorción de la raíz, a consecuencia de lo cual, se ha observado una mejora en la nutrición, sobretodo en la fosforada (Barea y Azcón-Aguilar, 1983). Este sistema radical, modificado por las MVA, puede representar un factor crítico, en situaciones de estrés, de deficiencias nutritivas o en situaciones de competitividad (Mosse *et al.*, 1981).

En condiciones de estrés hídrico los experimentos realizados indican que, las MVA mejoran las relaciones hídricas en muchas situaciones (Augé *et al.*, 1987) (Azcón *et al.*, 1988) (Peña *et al.*, 1988). En situaciones de aridez, además del estrés hídrico, hay que tener en cuenta, los excesos de sales solubles que, actualmente afectan a un 40% de las 4.10<sup>9</sup> ha de suelo potencialmente cultivable (Rains, 1979). A pesar de su probable importancia, el estudio de la simbiosis VA en condiciones salinas, se ha iniciado recientemente (Hirrel y Gerdemann, 1980).

Este trabajo ha pretendido aclarar algunos aspectos del efecto de la simbiosis en las plantas sometidas a estrés salino. Los efectos, hasta ahora observados en plantas en condiciones de estrés salino, han sido diversos (Buwalda *et al.*, 1983) (Pond *et al.*, 1984) (Pfeiffer y Bloss, 1988), ello puede atribuirse a que el hongo simbionte y la planta hospedadora son distintos en todos los casos estudiados.

En una primera parte de este trabajo, se ha aislado un hongo, procedente del muestreo de un entorno salino, para comparar sus características con un aislado de la misma especie, procedente de un hábitat méxico.

En el curso del muestreo, efectuado en el Delta del Ebro, se ha observado la presencia de la simbiosis VA en especies típicas de ecosistemas de dunas, incluyendo algunas plantas que pertenecen a familias normalmente no micorrízicas. Los hongos aislados de este ecosistema coinciden con los aislados de otros ecosistemas. La recuperación en cultivo puro, del mismo tipo de hongos, aunque en el muestreo se observen otros géneros y especies, puede ser consecuencia del sistema empleado. Las características de este sistema, favorecen el aislamiento de hongos agresivos, con períodos de

latencia y ciclos de vida cortos. Estas limitaciones, se habrán de tener en cuenta, si se quieren hacer estudios ecológicos de población en un determinado ecosistema.

De todos los hongos aislados, se seleccionó *Glomus mosseae*, para comparar su comportamiento frente a una cepa de colección del mismo hongo, procedente de Rothamsted (Inglaterra).

En la evaluación del efecto de la salinidad en la fase no simbiótica del hongo, se ha diferenciado el efecto osmótico, del efecto tóxico de la solución salina.

En condiciones axénicas, el efecto de los dos solutos empleados, iónico y no iónico, genera respuestas ligeramente distintas. Considerando el mismo rango de potenciales osmóticos, las esporas de *G. mosseae*, aislado N, mantienen su germinación a potenciales bajos y moderados, siempre que estos sean debidos a NaCl, pero no, si son debidos a manitol. El NaCl, a diferencia del manitol, es un soluto que puede atravesar membranas celulares (Hasegawa *et al.*, 1984) (Hasegawa *et al.*, 1986), lo cual puede generar toxicidad, pero también tiene un efecto equilibrador entre las presiones osmóticas interna y externa. En este caso, la presión osmótica de las esporas será relativamente baja, ya que son esporas de resistencia. La entrada de NaCl, comportaría una entrada de agua, que permitiría la hidratación de las estructuras celulares necesarias para que se inicie la germinación. El manitol, es un soluto que no puede atravesar las membranas celulares, por lo que, únicamente penetra agua a favor de gradiente, y debemos esperar, como así sucede, que por ello genere una respuesta lineal. Estos resultados, obtenidos para *G. mosseae* (aislado N), en condiciones axénicas, concuerdan con los obtenidos por Hirrel (1981) con *Gigaspora margarita* y distintas concentraciones de NaCl, en que la germinación se mantenía, para concentraciones bajas y moderadas de sal. Koske (1981), en su estudio sobre la germinación de una cepa de *Gigaspora gigantea*, aislada de un ecosistema de dunas marítimas, observó, como la adición de cantidades crecientes de polietilenglicol, un soluto no iónico, que no atraviesa membranas, inhibía de forma lineal, la germinación de las esporas en condiciones no axénicas.

En condiciones no axénicas, se ha observado que, la germinación del aislado N de *G. mosseae* responde de forma similar al NaCl y al manitol, resultado que contrasta con los obtenidos en condiciones axénicas. Estas diferencias, pueden atribuirse, a un efecto de la desinfección en las propiedades de permeabilidad de la pared de la espora, que resultaría, en un incremento en la tasa de germinación en los tratamientos con NaCl, pero también, en la aparición de efectos residuales del NaCl, a consecuencia de tratamientos drásticos. La germinación del aislado S, es mucho menos sensible a la disminución de potenciales osmóticos, que la del aislado N. Esta capacidad de germinación del aislado S, a potenciales osmóticos bajos, se ve incrementada, si el causante de la disminución del potencial es NaCl.

El crecimiento inicial del micelio, a partir del tubo germinativo, se ve más afectado, por la disminución del potencial hídrico que la germinación, como ya observó Tommerup (1984) en *Acaulospora laevis* y *Glomus caledonium*. El aislado N de *G. mosseae*, responde de forma similar, a la disminución de potencial osmótico, cualquiera que sea el soluto empleado. El aislado S, sin embargo, ve favorecido su crecimiento, por concentraciones moderadas de NaCl, mientras que, su comportamiento frente al manitol, es paralelo al observado para el aislado N.

Las diferencias observadas, en la respuesta de dos aislados de un mismo hongo, tanto en su tasa de germinación, como en el crecimiento inicial de micelio, indican, la posible existencia de ecotipos, fisiológicamente adaptados, a las distintas condiciones del suelo, como se ha descrito para otras situaciones de estrés (Barea, 1991).

Para valorar, los efectos de la salinidad, en la fase simbiote de los hongos VA, y también, el efecto de la micorrización en condiciones salinas, se ha escogido *Pistacia vera* como planta hospedadora. *P. vera*, es una planta glicófita, cuya resistencia a la salinidad ha sido ya estudiada (Sepaskhah, *et al.*, 1985). Se determinó mediante un muestreo que, *P. vera* es una planta micótrofa facultativa. En cultivo intensivo, puede crecer sin formar la simbiosis, aunque su colonización sea frecuente, sobretodo, en sistemas agrícolas con aportes de abonado y pesticidas reducidos. La síntesis de la simbiosis en invernadero, confirma los resultados del muestreo: la colonización interna disminuye con el

aporte de P. y las diferencias de crecimiento, entre plantas inoculadas y no inoculadas, disminuyen.

El riego de plantas de *P.vera*, no micorrizadas, con una solución salina de hasta 6 g NaCl/l, produce, disminución del crecimiento y aparición de síntomas de toxicidad salina. La micorrización, no produce variaciones importantes en los parámetros hídricos, pero sí, en el crecimiento, que se mantiene estable, y no se observan efectos de toxicidad salina.

Las plantas micorrizadas, incrementan los niveles de prolina, con el aumento de la salinidad en la solución de riego, mientras que, las concentraciones de este aminoácido, permanecen invariables, en las plantas no inoculadas. A pesar de la disminución de la presión hídrica en *P. vera*, micorrizado o no, la turgencia se mantiene. La prolina, puede ser el factor del mantenimiento de los niveles de turgencia en las plantas micorrizadas, mientras que, en las plantas no micorrizadas, podría deberse a un acúmulo de sales (Sepaskhah *et al.*, 1985) (Sepaskhah y Maftoun, 1988). De esta forma las micorrizas, tendrían un efecto directo sobre la osmoregulación de *P. vera*. Este efecto, no parece venir mediado por una mejora en la nutrición fosforada, tal como han demostrado Augé *et al.*, (1987) para *Rosa* sp. y Peña *et al.*, (1988) para *Trifolium*.

La colonización VA de las raíces de *P. vera*, alcanza una mayor extensión, en condiciones de riego con agua destilada, cuando el hongo inoculado es *G. mosseae* aislado N. A medida que va aumentando la salinidad, el porcentaje de colonización del aislado N disminuye, mientras que, el del aislado S, no experimenta variaciones significativas. La disminución de la colonización interna de *G. mosseae*, aislado N, con el aumento de salinidad y el mantenimiento del porcentaje de colonización del aislado S, parecen confirmar, los resultados observados, en los ensayos realizados en la fase no simbiótica de estos hongos. Sin embargo, las plantas de *P. vera*, crecen mejor si están micorrizadas, sea cual sea el hongo simbiote. La salinidad afecta al hongo en su fase extraradical, lo cual hace preveer un efecto en los fenómenos de dispersión y supervivencia; también lo afecta en su fase intraradical, pero sin consecuencias notables en el crecimiento de la planta hospedadora.

Así pues, los aislados N y S, podrían ser considerados, como edafotipos de *Glomus mosseae*, siguiendo la terminología sugerida por Benthlenfalway *et al.*, (1989). Este término, se ha acuñado para diferenciar una especie clonal de una especie biológica, tomando como base que, las especies asexuales no tienen fondo común genético y no pueden mantener su integridad genotípica, frente a un cambio microevolutivo. No se puede decir que, los aislados N y S, sean genotípicamente distintos, al menos, hasta no haberles mantenido en cultivo, en las mismas condiciones, durante más de un ciclo de vida, podemos decir, sin embargo, que sí, existen diferencias fenotípicas, que pueden ser debidas, a diferencias adquiridas por el clon, o bien, a una selección de población que puede entonces ser reversible.

A corto plazo, no se puede concluir que, un hongo aislado de una zona salina, sea más eficaz, en promover el crecimiento de las plantas hospedadoras, en condiciones de estrés salino, que un hongo aislado de un hábitat méxico. A medio y largo plazo, habrán de considerarse otros parámetros, como la diseminación y extensión posterior de la simbiosis, para poder valorar factores de supervivencia y efectividad relativos a ambos hongos y determinar si, efectivamente, los dos aislados son edafotipos distintos.

## *Conclusiones*

1. Se confirmó, la presencia de micorrizas VA en ecosistemas pioneros, como son dunas en proceso de asentamiento. Se observó, la presencia de la simbiosis en la planta dominante de uno de los sistemas muestreados: *Limonastrum* sp., y la colonización de especies pertenecientes a familias mayoritariamente no micorrícicas e.g. *Salicornia europaea*.
2. Se identificaron y se aislaron 4 especies de hongos formadores de micorrizas VA pertenecientes al género *Glomus* . De entre ellas merece especial mención *G. claroideum*, especie hasta ahora no descrita en Europa.
3. Se determinó que, tres especies de *Pistacia* : *P. vera* , *P. terebinthus* y *P. atlantica*, son plantas micótrofas facultativas.
4. Se confirmó, la elevada resistencia de *P. vera* a condiciones salinas.
5. Se determinó, la existencia de un efecto positivo de la simbiosis micorrícica sobre *P. vera*, en condiciones de estrés salino. Las plantas micorrizadas, mantienen su crecimiento y no muestran síntomas de toxicidad salina. Parte de este efecto positivo, puede venir mediado, por la síntesis y acumulación de prolina, en los tejidos de las plantas micorrizadas.
6. Se observó, la existencia de diferencias de comportamiento en la fase no simbiótica, de dos aislados de *G. mosseae*. El aislado S, procedente de un entorno salino, tiene una mayor resistencia a potenciales osmóticos más negativos que el aislado N, que es originario de un ecosistema no salino.
7. Se observaron, diferencias en el efecto de la salinidad, sobre la colonización interna de *G. mosseae*, aislados S y N, en *P. vera*. El aislado S, de un entorno salino, mantiene sus niveles de colonización, independientemente de los niveles de salinidad en el agua del riego, sin embargo, la capacidad de colonización del aislado N, procedente de un entorno no salino, disminuye en función de la salinidad del agua de riego.
8. Se puede decir, sin embargo, que sí existen diferencias fenotípicas entre los aislados N y S de *G. mosseae*, posiblemente debidas, a diferencias adquiridas por el clon, o bien, a una selección de población, que puede entonces ser reversible.

## *Bibliografía*

- Abbott, L.K. y Robson, A.D.** (1982). The role of vesicular arbuscular fungi in agriculture and the selection of fungi for inoculation. *Australian Journal of Agricultural Research*, **33**: 389-408.
- Abbott, L.K. y Robson, A.D.** (1984). The effect of VA mycorrhizae on plant growth. Pp. 113-130. En: *VA Mycorrhizae*. C.L.I. Powell y D.J. Bagyaraj (Eds.). CRC Press. Boca Raton, FL.
- Abbott, L.K. y Robson, A.D.** (1985). The effect of soil pH on the formation of VA mycorrhizas by two species of *Glomus*. *Australian Journal of Soil Research*. **22**: 253.
- Abbott, L.K. y Robson, A.D.** (1985). Formation of external hyphae in soil by four species of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, **99**: 245.
- Ahmad, I. y Wainwright, S.J.** (1976). Ecotype differences in leaf surface properties of *Agrostis stolonifera* from salt marshes, spray zone and inland habitats. *New Phytologist*, **76**: 361-366.
- Allen, M.F.** (1982). Influence of vesicular arbuscular mycorrhizas on water movement through *Bouteloua gracilis*. *New Phytologist*, **91**: 191.
- Allen, M.F. y Boosalis, M. G.** (1983). Influence of two species of VA mycorrhizal fungi on drought tolerance of winter wheat. *New Phytologist*, **93**: 67.
- Allen, M.F. y Cunningham, G. L.** (1983). Effects of vesicular arbuscular mycorrhizae on *Distichlis spicata* under three salinity level. *New Phytologist*, **93**: 227-236.
- Allen, E.B. y Allen, M.F.** (1986). Water relations of xeric grasses in the field: interactions of mycorrhizas and competition. *New Phytologist*, **104**: 559-571.

- Ames, R.N. y Schneider, R.W.** (1979). *Entrophospora*, a new genus in the endogonaceae. *Mycotaxon*, **8**: 347-352.
- Aragües, R., Alberto, F. y Cuchi, J.A.** (1979). Calidad de agua para el riego. I. Criterios generales. *ITEA*, **37**: 3-17.
- Augé, R.M., Schekel, K.A. y Wample, R.L.** (1986). Greater leaf conductance of well watered V.A. Mycorrhizal rose plants is not related to phosphorus nutrition. *New Phytologist*, **103**: 107-109.
- Augé, R.M., Schekel, K.A. y Wample, R.L.** (1986). Osmotic adjustment in leaves of VA mycorrhizal and nonmycorrhizal rose plants in response to drought stress. *Plant Physiology*, **82**: 765-770.
- Augé, R.M., Schekel, K.A. y Wample, R.L.** (1986). Leaf water and carbohydrate status of VA mycorrhizal rose exposed to drought stress. *Plant and Soil*, **99**: 291-302.
- Augé, R.M., Stodola, A.J.W., Brown, M.S. y Bethlenfalway, G.J.** (1990). Using osmotica to test for mycorrhizal effects on host plants exposed to low soil water potential. En: *8<sup>th</sup> NACOM abstracts*. M.F. Allen y S.E. Williams (Eds.).
- Azcón, R. y Ocampo, J.A.** (1981). Factors affecting the vesicular-arbuscular infection and mycorrhizal dependency of thirteen wheat cultivars, *New Phytologist*, **87**: 677.
- Azcón, R., El-Atrach, F. y Barea, J.M.** (1988). Influence of mycorrhiza vs. soluble phosphate on growth nodulation and N<sub>2</sub> fixation (<sup>15</sup>N) in alfalfa under different levels of water potential. *Biology and Fertility of Soils*, **7**: 28-31.
- Azcón-Aguilar, C., Díaz-Rodríguez, R.M. y Barea, J.M.** (1987). Effect of soil microorganisms on spore germination and growth of the vesicular-arbuscular fungus *Glomus mosseae*. *Transactions of the British Mycological Society*, **86**: 337-340.

**Barea, J.M.** (1988). Las micorrizas y sus implicaciones en ecología vegetal. En: *Biología ambiental. Actas del congreso de biología ambiental. II Congreso Mundial Vasco*, 1: 57-70.

**Barea, J.M.** (1991). Vesicular-Arbuscular mycorrhizae as modifiers of soil fertility. *Advances in Soil Science*, 15: 1-40.

**Barea, J.M. y Azcón-Aguilar, C.** (1983). Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants. En: *Advances in Agronomy*. N.C. Brady (Ed.). Academic Press.NY.

**Baylis, G.T.S.** (1975). The magnoloid mycorrhiza and mycotrophy in root systems derived from it. En: *Endomicorrhizas*, F.E. Sanders, B. Mosse y B. Tinker (Eds.) Academic press.

**Behboudian, M.H., Walker, R.R. y Torokfalvy, E.** (1986). Effects of water stress and salinity on photosynthesis of pistachio. *Scientia Horticulturae*, 29: 251-261.

**Beilby, J.P. y Kidby, D.K.** (1980). Sterol composition of ungerminated and germinated spores of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus caledonium*. *Canadian Journal of Microbiology*, 28: 623-628.

**Benjamin, R.K.** (1979). Zygomycete and their spores. pp. 573-622 En: *The Whole Fungus*. Vol.II, B. Kendrick(Ed.). National Museums of Canada. Ottawa. Canada.

**Betlentalvay, G.J., Franson, R.L., Brown, M.S. y Mihara, K.L.** (1989). *Glycine-Glomus-Bradyrhizobium* symbiosis. IX. Nutritional, morphological, and physiological responses of nodulated soybean to geographic isolates of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Physiologia Plantarum*, 76: 226-232.

**Berta, G., Fusconi, A., Trotta, A. y Scannerini, S.** (1990). Morphogenetic modifications induced by the mycorrhizal fungus *Glomus* strain E<sub>3</sub> in the root system of *Allium porrum* L.. *New Phytologist*, 114: 207-215.

**Black, C.R.** (1979). The relationship between transpiration rate, water potencial and resistances to water movement in sunflower (*Helianthus annus* L.). *Journal of Experimental Botany*, **30**: 235-243.

**Bonfante-Fasolo, P.** (1984). Anatomy and morphology of VA Mycorrhizae. pp.5-33. En: *VA Mycorrhizae*. C.LI. Powell y D.J. Bagyaraj (Eds.). CRC Press. Boca Raton, FL.

**Bonfante-Fasolo, P. y Vian, B.** (1989). Cell wall architecture in mycorrhizal roots of *Allium porrum* L.. *Annales des Sciences Naturelles, Botanique*. 13<sup>ème</sup> séries, tome 10, pp.97-109. Paris.

**Brouwer, R.** (1965). Water mouvement accross the root. *Symposia of the Society of Experimental Biology*, **19**: 131-149.

**Buwalda, J.G., Stribley, D.P. y Tinker, P.B.** (1983). Increased uptake of Bromide and Chloride by plants infected with vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytologist*, **93**: 217-225.

**Buwalda, J.G., Stribley, D.P. y Tinker, P.B.** (1984). The development of endomycorrhizal root systems. V. The detailed pattern of development of infection and the control of infection level by host in young leek plants. *New Phytologist*, **96**: 411.

**Calvet, M.C.** (1989). Micorrizas vesículo-arbusculares en cultivos intensivos sobre sustratos orgánicos: interacciones con hongos saprófitos y patógenos de la rizosfera. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 224 pp.

**Camarasa, J.M., Folch-Guillen, R., Masalles, R.M. y Velasco-Batlle, E.** (1977). El paisatge vegetal del Delta de l'Ebre. En: *Sistemes naturals del Delta de l'Ebre, Treballs del Institut Catalá de História Natural*, 8: 47-67.

**Camprubí, A., Calvet, M.C. y Estaún, V.** (1990). Efecto del almacenamiento en frío de un inóculo de *Glomus mosseae* sobre su infectividad y la germinación *In vitro* de las esporas de resistencia. *Investigación Agraria: Producción y protección vegetales*, 5 (2): 337-343.

**Casadio, S.** (1979). L' isotonia , En: Tecnología Farmacéutica, Vol.II. Ed. Cisalpino-Goliardica.

**Cress, W.A., Throneberry, G.O. y Lindsey, D.L.** (1979). Kinetics of phosphorus absorption by mycorrhizal and non-mycorrhizal tomato roots. *Plant Physiology*, 64: 484-487.

**Daniels, B.A. y Skipper, H.D.** (1982). Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. En: *Methods and principles of mycorrhizal research*. American Phytopathological Society. St. Paul Minnesota.

**Daniels, B.A. y Trappe, J.M.** (1980). Factors affecting spore germination of the VAM fungus, *Glomus epigaeus*. *Mycologia*, **72**: 457-471.

**Daft, M.J. y Nicolson, T.H.** (1968). Effect of *Endogone* mycorrhiza on plant growth and infection in tomato. *New Phytologist*, **69**: 953-956.

**Dixon, H.H.** (1914). Transpiration and the ascent of sap in plants. MacMillan. London.

**Duke, E.R., Johnson, C.R. y Koch, K.E.** (1986). Accumulation of phosphorus, dry matter and betaine during NaCl stress of split root citrus seedlings colonized with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on zero, one or two halves. *New Phytologist*, **104**: 583-590.

**El-Atrach, F., Azcón, R. y Barea, J.M.** (1989). Effects of vesicular-arbuscular infection on plant growth and nitrogen fixation as estimated by  $^{15}\text{N}$  isotope dilution of alfalfa plants under saline conditions. *Abstracts of the International Conference on the Mechanisms of the Relationship between Soil-Plant-Microorganism in the Rhizosphere*. J.C. Cleyet-Marel (Ed.). Montpellier.

**Ehrler, W.** (1960). Some effects of salinity on rice. *Botanical Gazette (Chicago)*, **122**: 102-104.

**Esau, K.** (1960). Anatomy of seed plants. John Wiley and Sons. NY.

**Estaún, V., Calvet, C. y Hayman, D.S.** (1987). Influence of plant genotype on mycorrhizal infection: Response of three pea cultivars. *Plant and Soil*, **103** (2): 295-298.

**Faiz, S.M.A., Weatherley, P.E.** (1978). Further investigation into the location and magnitude of the hydraulic resistances in the soil: plant system. *New Phytologist*, **81**: 19-28.

**Fiscus, E.L.** (1975). The interaction between osmotic and pressure-induced water flow in plant roots. *Plant Physiology*, **55**: 917-922.

**Fisher, R.A. y Yates, F.** (1963). Statistical tables for biological, agricultural and medicinal research. Oliver and Boyd. Edinburgh.

**Fitter, A.H.** (1985). Functioning of vesicular-arbuscular mycorrhizas under field conditions. *New Phytologist*, **99**: 257.

**Fitter, A.H.** (1988). Water relations of red clover *Trifolium pratense* L. as affected by VAM infection and phosphorus supply before and during drought. *Journal of Experimental Botany*, **39**: 202.

**Foster, S.M. y Nicolson, T.H.** (1981). Aggregation of sand from a maritime embryo sand dune by microorganisms and higher plants. *Soil Biology and Biochemistry*, **13**: 199-203.

**Foster, S.M. y Nicolson, T.H.** (1981). Microbial aggregation of sand in a maritime sand dune succession, *Soil Biology and Biochemistry*, **13**: 205-208.

**Frank, A.B.** (1885). Über die auf Wurzel symbiose beruhende Ernährung gewisser Baume durch unterirdische Pilze. *Ber. Deutsch. Bot. Gesell.*, **3**: 128-145.

**Frank, A.B.** (1887). Ueber neue Mykorrhiza-formen. *Ber. Deutsch. Bot. Gesell.*, **5**: 395-412.

**Furlan, V. y Fortin, J.A.** (1977). Effects of light intensity on the formation of vesicular-arbuscular endomycorrhizas on *Allium cepa* by *Gigaspora calospora*. *New Phytologist*, **79**: 335-337.

- Gerdemann, J.W. y Trappe, J.M.** (1974). Endogonaceae in the Pacific Northwest. *Mycologia Mem.*, **5**: 1-76.
- Gerdemann, J.W. y Trappe, J.M.** (1975). Taxonomy of the Endogonaceae. En: *Endomycorrhizas*, F.E. Sanders, B. Mosse y B. Tinker (Eds.) Academic Press. London.
- Gibson, J.L., Kimbrough, J.K. y Benny, G.L.** (1986). Ultrastructural observations on Endogonaceae (Zygomycetes): *Endogone pisiformis*. *Mycologia*, **78**: 543-553.
- Gibson, J.L., Kimbrough, J.K. y Benny, G.L.** (1986). Ultrastructural observations on Endogonaceae (Zygomycetes). II. *Glaziellales ord. nov.* and *Glaziellaceae fam. nov.* : New taxa based upon light and electron microscopic observations of *Glaziella aurantiaca*. *Mycologia*, **78**: 941-954.
- Gilmore, A.E.** (1971). The influence of endotrophic mycorrhizae on the growth of peach seedlings. *Journal of the American society for Horticultural Sciences*, **96**: 35-38.
- Giovannetti, M. y Nicolson, T.H.** (1983). Vesicular-arbuscular mycorrhizas in Italian sand dunes. *Transactions of the British Mycological Society*, **80**: 552-557.
- Giovannetti, M. y Mosse, B.** (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in roots. *New Phytologist* , **84**: 489-500.
- Gould, A.B. y Liberta, A.E.** (1981). Effect of topsoil storage during surface mining on the viability of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Mycologia*, **73**: 914-916.

- Graham, J.H., Leonard, R.T. y Menge, J.A.** (1981). Membrane-mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhizae formation. *Plant Physiology*, **68**: 548-552.
- Graham, J.H., Leonard, R.T. y Menge, J.A.** (1982). Development of external hyphae by different isolates of mycorrhizal *Glomus* spp. in relation to root colonization and growth of *Troyer citrange*. *New Phytologist*, **91**: 183-189.
- Graham, J.H. y Syvertsen, J.P.** (1984). Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection on the hydraulic conductivity of roots of two citrus rootstocks. *New Phytologist*, **97**: 227-234
- Graham, J.H., Syvertsen, J.P. y Smith, M.L.Jr.** (1987). Water relations of mycorrhizal and phosphorus-fertilized non-mycorrhizal *Citrus* under drought stress. *New Phytologist*, **105**: 411-419.
- Guttay, A.J.R.** (1976). Impact of deicing salts upon the endomycorrhizae of road side sugar maples. *Soil Science Society of America Journal*, **40** (6): 952-954.

**Hall, I.R. y Fish, B.J.** (1979). A key to the Endogonaceae. *Transactions of the British Mycological Society*, **73**: 261-270.

**Hall, I.R. y Kelson, A.** (1981). An improved technique for the production of endo mycorrhizal infested soil pellets. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, **24**: 221-224.

**Hardie, K.** (1985). The effect of removal of extraradical hyphae on water uptake by vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *New Phytologist*, **101**: 677-684.

**Hardie, K. y Leyton, L.** (1981). The influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on growth and water relations of red clover. *New Phytologist*, **89**: 599-608.

**Harley, J.L.** (1959). The biology of mycorrhiza. Plant Science Monographs, 1vol., Leonard Hill, London.

**Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Handa, S. y Handa, A.K.** (1984). Cellular mechanisms of tolerance to water stress. *HortScience*, **19**: 371-381.

**Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. y Handa, A.K.** (1986). Cellular mechanisms of salinity tolerance. *HortScience*, **21**: 1317-1324.

**Hayman, D.S.** (1975). Phosphorus cycling by soil-microorganisms and plant roots. En: *Soil Microbiology* N.D. Walker (Ed.) Butterworths. London.

**Hayman, D.S.** (1983). The physiology of vesicular-arbuscular endomycorrhizal symbiosis. *Canadian Journal of Botany*, **61**: 944-963.

**Hekelrath, W.N., Miller, E.E. y Gardner, W.R.** (1977). Water uptake by plants. *Soil Science Society of America Journal*, **41**: 1033-1043.

**Hepper, C.M.** (1978). Requirements for germination and growth of VA mycorrhizal spores. *Rothamsted Experimental Station Annual Report* part 1: 223-234.

**Hepper, C.M.** (1979). Germination and growth of *Glomus caledonium* spores: the effects of inhibitors and nutrients, *Soil Biology and Biochemistry*, **14**: 269-277.

**Hepper, C.M.** (1983). Effect of phosphate on germination and growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, **80**: 487-490.

**Hepper, C.M.** (1984). Regulation of spore germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora laevis* by soil pH. *Transactions of the British Mycological Society*, **83**: 154-156.

**Hetrick, B.A., Kitt, D.G. y Wilson, G.T.** (1987). Effects of drought stress on growth response in corn, sudan grass and big bluestem to *Glomus etunicatum*. *New Phytologist*, **105**: 403-410.

**Hirrel, M.C.** (1981). The effect of Sodium and Chloride salts on the germination and growth of *Gigaspora margarita*. *Mycologia*, **73**: 610-617.

**Hirrel, M.C. y Gerdemann, J.W.** (1980). Improved growth of onion and bell pepper in saline soils by two VA mycorrhizal fungi. *Soil Science Society of America Journal*, **44**: 654-655.

**Johnson, C.R., Menge, J.A., Schwab, S. y Ting, I.P. (1982).**  
Interaction of photoperiod and vesicular-arbuscular mycorrhizae on growth  
and metabolism of sweet orange. *New Phytologist*, **90**: 665-668.

**Khan, A.G.** (1974). The occurrence of mycorrhizas in halophytes, hydrophytes and xerophytes, and of Endogone spores in adjacent soil. *Journal of General Microbiology*, **81**: 7-14.

**Koide, R.** (1985). The nature of growth depressions in sunflower caused by vesicular-arbuscular mycorrhizal infection. *New Phytologist*, **99**: 449-462.

**Koide, R.** (1985). The effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection on sunflower hydraulic and stomatal properties. *Journal of Experimental Botany*, **36**: 1087-1098.

**Koske, R.E.** (1981). A preliminary study of interactions between species of vesicular-arbuscular fungi in a sand dune. *Transactions of the British Mycological Society*, **76**: 411-416.

**Koske, R.E.** (1981). *Gigaspora gigantea* observations on spore germination of a VA-mycorrhizal fungus. *Mycologia*, **73**: 288-300.

**Koske, R.E. y Halvorson, W.L.** (1981). Ecological studies of vesicular-arbuscular mycorrhizae in a barrier sand dune. *Canadian Journal of Botany*, **59**: 1413-1422.

**Kramer, P.J. y Kozlowski, T.T.** (1979). Physiology of woody plants. Academic Press. NY.

**Kreeb, K.** (1963). Hydrature and plant production. En: *The Water Relations of Plants*, F.W. Whitehead y A.J. Rutter (Eds.) Blackwell. Oxford.

**Lambert, D.H., Cole, H.Jr. y Baker, D.E. (1980).** Variation in the response of alfalfa clones and cultivars to mycorrhizae and phosphorus. *Crop Science*, **20**: 615-618.

**Lambert, D.H., Cole, H.Jr. y Baker, D.E. (1980).** Adaptation of vesicular-arbuscular mycorrhizae to edaphic factors. *New Phytologist*, **85**: 510-513.

**Lewitt, J. (1980)** . Water, radiation, salt and other stresses. En: *Responses of Plants to Environmental Stresses*. Academic Press. NY.

**Levy, Y. y Krikun, J. (1980).** Effects of vesicular-arbuscular mycorrhiza on *Citrus jambhiri* water relations. *New Phytologist*, **85**: 25.

**Lopushinky, W. 1964.** Effect of water movement on ion movement into the xylem of tomato plants, *Plant Physiology*, **39**: 494-501.

- Marx, D.H., Ruehle, J.L., Kenney, D.S., Cordell, C.E., Riffle, J.W., Molina, R.J., Pawuk, W.H., Navratil, S., Tinus, R.W. y Goodwin, O.C. (1982).** Commercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques for development of ectomycorrhizae on container-grown tree seedlings. *Forest Science*, **28**: 373-400.
- McIlven, W.D. y Cole, H.Jr. (1976).** Spore dispersal of Endogonaceae by worms, ants, wasps and birds. *Canadian journal of Botany*, **54**:1486.
- Mejstrick, V.K. y Cudlin, P. (1983).** Mycorrhizae in some plant species in Algeria. *Plant and Soil*, **71**: 363-366.
- Menge, J., Steirle, D.J., Johnson, E.L.V. y Leonard, R.T. (1978).** Phosphorus concentrations in plants responsible for inhibition of mycorrhizal infection. *New Phytologist*, **80**: 575-580.
- Meyer, F.H. (1973).** Distribution of ectomycorrhizae in native and man-made forests. En: *Ectomycorrhizae* G.C.Marx y T.T. Kozlowski (Eds.). Academic Press. New York.
- Michel, B.E. (1977).** A model relating root permeability to flux and potentials. Application to existing data from soybean and other plants. *Plant Physiology*, **60**: 259-264.
- Morley, C.D. y Mosse, B. (1976).** Abnormal vesicular-arbuscular infections in white clover induced by lupin. *Transactions of the British Mycological Society*, **67**: 510-516.
- Moreau, F. (1953).** Les champignons. Tome II Systematique. *Encyclopédie de Mycologie*, **23**: 941-2120. Paul Chevalier, Paris.
- Morton, J.B. (1988).** Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: classification, nomenclature, and identification. *Mycotaxon*, **32**: 267-324.

**Morton, J.B.** (1989). *Mycorrhizal Fungi Slide Set: Morphological Characters Important in Identifying Endomycorrhizal Fungi in the Zygomycetes*. Audio-Visual-Electronic Publication 2. Agriculture and Forestry Experimental Station West Virginia University, Morgantown.

**Morton, J.B.** (1990). Evolutionary relationships among arbuscular mycorrhizal fungi in the endogonaceae. *Mycologia*, **82**: 192-207.

**Morton, J.B.** (1990). Species and clones of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes): their role in macro and microevolutionary process. *Mycotaxon*, **37**: 493-515.

**Morton, J.B. y Benny, G.L.** (1990). Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): A new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Gloamaceae. *Mycotaxon*, **37**: 471-491.

**Mosse, B.** (1957). Growth and chemical composition of mycorrhizal and non-mycorrhizal apple. *Nature*, **179**: 922-924.

**Mosse, B., Stribley, D.P. y LeTacon, F.E.** (1981). Ecology of mycorrhizae and mycorrhizal fungi. En: *Advances in Microbial Ecology* Vol.5 M. Alexander (Ed.) Plenum Press, New York.

**Nelsen, C.E. y Maiti, T.C.** (1983). The effects of drought stress, mycorrhizal inoculation and soil nutrition on wheat yield. *Phytopathology*, **73**: 841.

**Nelsen, C.E. y Safir, G.R.** (1982). Increased drought tolerance of mycorrhizal onion plants caused by improved phosphorus nutritio. *Planta*, **154**: 407.

**Neumann, H.H., Thurtell, G.W. y Stevenson, K.R.** (1974). In situ measurements of leaf water potential and resistance to water flow. *Canadian Journal of Plant Science*, **54**: 175-184.

**Nicolson, T.H.** (1960). Mycorrhiza in the gramineae. II. Development in different habitats, particularly sand dunes. *Transactions of the British Mycological Society*, **43**: 132-145.

**Nye, P.H. y Tinker, P.B.** (1977). *Solute Movement in the Soil-Root System*, Blackwell Scientific, Oxford.

**Ocampo, J.A.** (1980). Effect of crop rotations involving host and non host plants on vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of host plant. *Plant and Soil*, **56**: 283.

**Ocampo, J.A., Martin, J. y Hayman, D.S.** (1980). Influence of plant interactions on vesicular-arbuscular mycorrhizal infections.I. Host and non-host plants grown together. *New Phytologist*, **84**: 27.

**Passioura, J.B.** (1980). The meaning of matric potential. *Journal of Experimental Botany*, **31**: 1161-1169.

**Passioura, J.B.** (1982). Water in the soil-plant-atmosphere continuum. En: *Physiological Plant Ecology II*. Springer Verlag. Berlin.

**Pearcy, R.W., Ehleringer, J., Mooney, H.A. y Rundel, P.W.** (1989) *Field methods and instrumentation*. Chapman & Hall.

**Peña, J.I., Sanchez-Díaz, M., Aguirreola, J. y Becana, M.** (1988). Increased stress tolerance of nodule activity in the *Medicago-Rhizobium - Glomus* symbiosis under drought. *Journal of Plant Physiology*, **133**: 79-83.

**Pfeiffer, C.M. y Bloss, H.E.** (1988). Growth and nutrition of guayule (*Parthenium argentatum*) in a saline soil as influenced by vesicular-arbuscular mycorrhizae and phosphorus fertilization. *New Phytologist*, **108**: 315-321.

**Phillips, J.M. y Hayman, D.S.** (1970). Improved techniques for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, **55**: 158-161.

**Plenchette, C. y Perrin, R.** (1991). VA mycorrhizal development as influenced by fungicide applications: Effect of foliar spray on leek and wheat. *Ecologia Plantarum*, (en prensa).

**Pond, E.C., Menge, J.A. y Jarrel, W.M.** (1984). Improved growth of tomato in salinized soil by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi collected from saline soils. *Mycologia*, **76**: 74-84.

**Pons, F. y Gianinazzi-Pearson, V.** (1984). Influence du phosphore, du potassium, de l'azote et du pH sur le comportement de champignons endomycorrhizogènes à vésicules et arbuscules. *Cryptogamie et Mycologie*, **5**: 87-100.

**Porta, J.** (1986). Técnicas y Experimentos en Edafología. Col·legi Oficial d'Enginyers Agrònoms de Catalunya. Barcelona.

**Poss, J.A., Pond, E.C., Menge, J.A. y Jarrel, W.M.** (1985). Effect of salinity on mycorrhizal onion and tomato in soil with and without additional phosphate. *Plant and Soil*, **88**: 307-319.

**Puppi, G. y Riess, S.** (1987). Role and ecology of VA mycorrhizae in sand dunes. *Angew. Botanik.*, **61**: 115-126.

**Pyrozinsky, K.A. y Dalpé, Y.** (1989). Geological history of the Glomaceae, with particular reference to mycorrhizal symbiosis. *Symbiosis*, **7**: 1-36.

**Rains, D.W.** (1979). Salt tolerance of plants: Strategies of biological systems. En: *The Biosaline Concept* . A. Hollaender, J.C. Aller, E. Epstein, A. San Pietro y O.R. Zaborsky (Eds.) Plenum Press. NY.

**Rhodes, L.H. y Gerdemann, J.W.** (1975). Hyphal translocation and uptake of sulphur by vesicular-arbuscular mycorrhizae of onion. *Soil Biology and Biochemistry*, **10**: 355.

- Sabanin, D.A.** (1925). On the root system as an osmotic apparatus. *Bulletin de l'Institut de Recherces Biologiques de l'Université Permanente*, **4** (2): 129-136.
- Safir, G.R. y Nelsen, C.E.** (1985). VA mycorrhizas: plant and fungal water relations. En: *Proceedings of the 6<sup>th</sup> NACOM* . R. Molina (Ed.)
- Safir, G.R., Boyer, J.S. y Gerdemann, J.W.** (1971). Mycorrhizal enhancement of water transport in soybean. *Science*, **172**: 581.
- Safir, G.R., Boyer, J.S. y Gerdemann, J.W.** (1972). Nutrient status and mycorrhizal enhancement of water transport in soybean. *Plant Physiology*, **49**: 700.
- Sánchez-Díaz, M., Pardo, M., Antolín, M., Peña, J. y Aguirreolea, J.** (1990). Effect of water stress on photosynthetic activity in the *Medicago-Rhizobium-Glomus* symbiosis. *Plant Science*, **71**:215-221.
- Sanders, F.E. y Tinker, P.B.** (1973). Phosphate flow into mycorrhizal roots. *Pesticide Science*, **4**: 385.
- Satyanarayana, K. y Rao, C.C.** (1963). Physiological basis of alkali tolerance. I. Absorption of Na, K and Ca. *Soil and Cultures*, **29**: 410-411.
- Savé, R. y Serrano, L.** (1986). Some Physiological and growth responses of kiwifruit (*Actinidia chinensis* ) to flooding. *Physiologia Plantarum*, **66**: 75-78.
- Schenck, N.C., Graham, S.O. y Green, N.E.** (1975). Temperature and light effect on contamination and spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia*, **67**: 1189-1192.
- Schenck, N.C. y Kinloch, R.A.** (1980). Incidence of mycorrhizal fungi on six field crops in monoculture on a newly cleared woodland site. *Mycologia*, **72**: 445-455.

**Schenck, N.C. y Pérez, Y. (1988).** *Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi.* Synergistic Publ. Gainesville. Florida.

**Scholander, P.F., Hammel, H.T., Bradstreet, E.D. y Hemmingsen, E.A. (1965).** Sap pressure in vascular plants. *Science*, **148**: 339-346

**Schultz, R.C., Kormanik, P.P., Bryan, W.C. y Brister, G.H. (1979).** Vesicular-arbuscular mycorrhiza influence growth but no mineral concentrations in seedlings of eight sweetgum families. *Canadian Journal of Forestry Research*, **9**: 218.

**Sepaskhah, A.R., Maftoun, M. y Karimian, N. (1985).** Growth and chemical composition of pistachio as affected by salinity levels of irrigation water. *Journal of Horticultural Sciences*, **57**: 469-476.

**Sepaskhah, A.R. y Maftoun, M. (1988).** Relative salt tolerance of pistachio cultivars. *Journal of Horticultural Sciences*, **63**: 157-162.

**Sieverding, E. y Toro, S. (1988).** Influence of soil water regimes on mycorrhiza. V. Performance of different VAM fungal species with cassava. *Journal of Agronomy and Crop Science*, **161**: 322-332.

**Siqueira, J.O., Sylvia, D.M., Gibson, J. y Hubbell, D.H. (1985).** Spores, germination and germ tubes of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, **31**: 965-972.

**Siqueira, J.O., Hubbell, D.H. y Schenck, N.C. (1982).** Spore germination and germ tube growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *in vitro*. *Mycologia*, **74**: 952-959.

**Slatyer, R.O. y Taylor, S.A. (1960).** Terminology in plant-soil-water realtions. *Nature*, **187**: 922-924.

**Slavick, B.** (1974). *Methods of Studying Plant Water Relations*. Springer-Verlag. Berlín.

**Smith, S.E. y Gianinazzi-Pearson, V.** (1988). Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **39**: 221-224.

**Solov'ev, V.A.** (1967). Ways of regulating a surplus of absorbed ions in plant tissues (Na ions used as examples). *Fiziol. Rast.*, **14**: 1093-1103.

**Spiegel-Roy, P., Mazigh, D. y Evenari, M.** (1977). Response of pistachio to low soil moisture conditions. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **102**: 470-473.

**Strasburger, E.** (1891). Über den Bau und die Verrichtungen der Leitungsbahnen in den Pflanzen. En *Histologische Beiträge*. Gustav Fisher.

**Sutton, J.C. y Sheppard, B.R.** (1976). Aggregation of sand dune soil by endomycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Botany*, **54**: 326-333.

**Sylvia, D.M. y Schenck, N.C.** (1983). Germination of chlamidospores of three *Glomus* species as affected by soil matric potential and fungal contamination. *Mycologia*, **75**: 30-35.

- Taylor, S.A. y Slatyer, R.O.** (1961). Water-soil-plant relations terminology. *Proceedings of the International Congress of Soil Science*, **1**: 394-403.
- Thomas, R.S., Dakessian, S., Ames, R.N., Brown, M.S. y Bethlenfalvay, G.J.** (1986). Aggregation of a silty clay loam soil by mycorrhizal onion roots. *Soil Science Society of America Journal*, **50**: 1494-1499.
- Tinker, P.B. y Gildon, A.** (1983). Mycorrhizal fungi and ion uptake. En: *Metals and Micronutrients*. D.A. Robb y W.S. Pierpoint (Eds.). London.
- Tommerup, I.C.** (1983). Spore dormancy in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, **81**: 37-45.
- Tommerup, I.C.** (1984). Development of infection by a vesicular-arbuscular fungus in *Brassica napus* L. and *Trifolium subterraneum* L. *New Phytologist*, **98**: 487-495.
- Tommerup, I.C.** (1984). Effect of soil water potential on spore germination and hyphal growth of vesicular-arbuscular fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, **83**: 193-195.
- Tommerup, I.C. y Abbott, L.K.** (1981). Prolonged survival and viability of VA mycorrhizal hyphae after root death. *Soil Biology and Biochemistry*, **13**: 431-433.
- Toth, R. y Miller, R.M.** 1984. Dynamics of arbuscule development and degeneration in a *Zea mays* mycorrhiza. *American Journal of Botany*, **71**: 449-460.
- Trappe, J.M.** (1962). Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. *Botanical Review*, **28**: 538-605.

**Trappe, J.M.** (1982). Synoptic of the genera and species of Zygomycetous mycorrhizal fungi. *Phytopathology*, **72**: 1102-1108.

**Trappe, J.M.** (1987). Phylogenetic and ecological aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint. En: *Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants*. G. Safir (Ed.) CRC Press. Boca Raton, FL.

**Trappe, J.M. y Maser, C.** (1976). Germiantion of spores of *Glomus macrocarpus* (*Endogonaceae* ) after passage through a rodent digestive track. *Mycologia*, **68**: 433-437.

**Trappe, J.M. y Schenck, N.C.** (1984). Taxonomy of the fungi forming endomycorrhizae. A.Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (Endogonales). En: *Methods and principles of mycorrhizal reseaech*. N.C. Schenck (Ed.). American Phytopathological Society. St Paul, MN.

**Trinick, M.J. y Mosse, B.** (1975). En: *Rotahmsted Experimental Station Annual Report* , **1**: 253-255.

**Turner, N.C.** (1979). Drought resistance and adaptation to water deficits in crop plants. En: *Stress Physiology in Crop Plants*. H. Mussell y R.C. Staples (Eds.). Wiley and Son. NY.

**Tyree, M.T. y Karamanos, A.J.** (1980). Water stress as an ecological factor. En: *Plants and their Atmospheric Envirorment*. J. Grace, E.D. Ford y P.G. Jarvis (Eds.). Blackwell. Oxford.

**Tyree, M.T. y Jarvis, P.G.** (1982). Water in tissues and cells En: *Encyclopedia of Plant Physiology* New serie; vol.12B. O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond y H. Ziegler (Eds.) Springer Verlag. Berlin.

**Tyree, M.T. y Sperry, J.S.** (1989). Vulnerability of xylem to cavitation and embolism. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, **40**: 19-38

**van Nuffelen, M. y Schenck, N.C.** (1984). Spore germination, penetration and root colonization of six species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on soyabean. *Canadian Journal of Botany*, **62**: 624-628.

**Walker, C.** (1982). Species in the Endogonaceae: a new species (*Glomus occultum*). *Mycotaxon*, **15**: 49-61.

**Walker, C.** (1983). Taxonomic concepts in the Endogonaceae: spore wall characteristics in species descriptions. *Mycotaxon*, **18**: 443-455.

**Walker, C. y Sanders, F.E.** (1986). Taxonomic concepts in the Endogonaceae III: The separation of *Scutellospora* gen.nov. from *Gigaspora* Gerd. & Trappe. *Mycotaxon*, **27**: 169-182.

**Walker, C. y Koske, R.E.** (1987). Taxonomic concepts in the Endogonaceae IV: *Glomus fasciculatum* redescribed. *Mycotaxon*, **30**: 253-262.

**Walker, R.R. y Douglas, T.J.** (1983). Effect of salinity level on uptake and distribution of chloride, sodium and potassium ions in citrus plants. *Australian Journal of Agricultural Research*, **34**: 145-153.

**Walker, R.R., Törökfalvy, E. y Behboudian, M.H.** (1987). Uptake and distribution of chloride, sodium and potassium ions and growth of salt treated pistachio plants. *Australian Journal of Agricultural Research*, **38**: 383-394.

**Wallace, A. y Kleinkopf, G.E.** (1974). Contribution of salts to the water potential of woody plants. *Plant Science Letters*, **3**: 251-257.

**Walter, H.** (1955). Water economy and the Hydrature of plants. *Annual Review of Plant Physiology*, **6**: 239-252.

**Wenkert, W.** (1980). Measurement of tissue osmotic pressure. *Plant Physiology*, **65**: 614-617.

**Wilson, J.M.** (1984). Comparative development of infection by three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, **97**: 413.

**Wyn Jones, R.G.** (1981). Salt tolerance. En: *Physiological Processes Limiting Plant Productivity*. C.B. Johnson (Ed.). Butterworth. London.

**Zajicek, J.M., Daniels Hetrick, B.A. y Albrecht M.L. (1987).**  
Influence of drought stress and mycorrhizae on growth of two native forbs.  
*Journal of the American Society of Horticultural Sciences*, **112**: 454-459.