

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL**



**TESIS DOCTORAL**

**Estudio de Mecanismos Fisiológicos y Bioquímicos Implicados en la  
Tolerancia de las Plantas Micorrizadas ante Situaciones de Estrés**

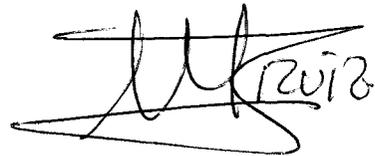
**Juan Manuel Ruiz Lozano**

**Granada, 1995**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

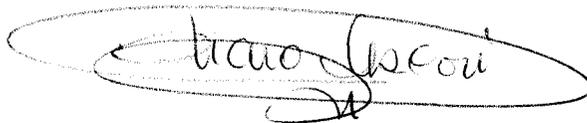
**Estudio de Mecanismos Fisiológicos y Bioquímicos Implicados en la  
Tolerancia de las Plantas Micorrizadas ante Situaciones de Estrés.**

**Memoria presentada para  
optar al grado de Doctor.  
Granada, Noviembre de 1995.**



**Fdo. Juan Manuel Ruiz Lozano  
Ldo. en Ciencias Biológicas.**

**Director de Tesis**



**Fdo. D<sup>a</sup>. Rosario Azcón González de Aguilar  
Investigador Científico del CSIC**

**Este trabajo fué llevado a cabo en el Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), en Granada, durante un periodo comprendido entre Enero de 1992 y Noviembre de 1995. Ha sido posible gracias a una beca de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia.**

Resulta difícil tratar de resumir en pocas palabras la ayuda recibida durante estos cuatro años de trabajo en la presente Tesis. En realidad, son muchas las personas que, de una manera o de otra, han contribuido a su realización, unas veces con ayuda material y otras con comentarios, consejos o, simplemente, con la convivencia en el laboratorio.

En primer lugar quiero agradecer a la Directora de esta Tesis, la Dra. Rosario Azcón, el esfuerzo que ha dedicado en transformar mi forma de entender la Investigación, haciendo que ahora pueda abordar el tema desde un punto de vista mucho más científico. Ella ha sabido animarme cuando las dudas en torno a las investigaciones realizadas empezaron a surgir, permitiéndome perseverar hasta conseguir los objetivos. Sin su entusiasmo y persistencia esto no habría sido posible. Por ello tengo que expresar mi más sincera admiración por su gran valía personal y científica.

En segundo lugar, el Jefe del grupo de Micorrizas, el Dr. Jose Miguel Barea, de quien siempre he recibido "energía positiva" en forma de ánimo, comentarios constructivos y paciencia ante mis muchas cuestiones.

También me gustaría agradecer a la Dra. Conchi Azcón su apoyo y disponibilidad para resolver todos los problemas que le he planteado.

El Dr. Juan Antonio Ocampo, por haber tratado, en todo momento, de que no me desanimara e intentara profundizar siempre más en los problemas que las investigaciones realizadas han ido planteando, así como por el trato tan "llano" y "de tú a tú" que me ha sabido dispensar.

Al Dr. Manuel Gómez, por todas las horas que me ha dedicado con las medidas de fotosíntesis y estadística de los datos y, en general, por su buena disposición para permitirme realizar todo lo que le he pedido.

Al Dr. José Manuel Palma, por su contribución al aprendizaje de las técnicas para determinación de la actividad superóxido dismutasa.

A los compañeros "del otro lado del pasillo", los de *Rhizobium*, por su ayuda siempre que he necesitado alguna cosa y por sus animosas palabras en momentos menos fáciles. En especial a Jose y Pedro.

Y por último a mis compañeros de Micorrizas por su paciencia y capacidad para ofrecerme desde consejo hasta ayuda real. Quiero hacer mención especial a Julia, con quién mejoré la técnica de la SOD, Enriqueta por las muchas horas compartidas en el invernadero, a Natalia, con quién inicié este trabajo y con la que he compartido problemas y alegrías comunes y, en general, a todos los compañeros, Marcia, Mariam, Paqui, Maite, Berta, Isidro, Javier, Karim, M<sup>a</sup> José, Coral, Pepe, Ikram, Gal, Inma, Toñi, pues todos han contribuido de alguna manera en la difícil tarea de realizar una Tesis Doctoral.

Finalmente, quiero dedicar este trabajo a mis padres y a M<sup>a</sup> Carmen, por haberme apoyado en todo momento y por que sé que esta tesis es para ellos casi más importante que para mí mismo.

## INDICE

	Pág.
I. INTERES DEL TRABAJO Y OBJETIVOS.....	1
II. INTRODUCCION.....	5
2.1. El estrés hídrico por sequía.....	5
2.1.1. Generalidades.....	5
2.1.2. Tipos de sequía.....	5
2.1.3. Captación del agua por la planta.....	6
2.1.4. La falta de agua en la planta.....	6
2.1.4.1. Efectos fisiológicos y metabólicos de la falta de agua en la planta.....	7
2.1.5. Mecanismos vegetales de resistencia a la sequía.....	8
2.1.5.1. Tolerancia a la sequía.....	8
2.1.5.2. Eficiencia en el Uso del Agua.....	10
2.2. Estrés provocado por exceso de salinidad en el medio.....	11
2.2.1. Generalidades.....	11
2.2.2. Componentes del estrés por salinidad.....	12
2.2.3. Mecanismos vegetales de resistencia a la salinidad.....	13
2.2.3.1. Evitacion del estres primario.....	13
2.2.3.2. Tolerancia del estrés primario.....	14
2.2.3.3. Resistencia al estrés secundario de deshidratación.....	14
2.3. Las micorrizas.....	15
2.3.1. Generalidades.....	15
2.3.2. Las micorrizas arbusculares.....	16
2.3.2.1. Formación de las micorrizas arbusculares.....	17
2.3.2.2. Morfología de la simbiosis.....	22
2.3.2.3. Formación de interfases hongo-planta.....	24
2.3.2.4. Fisiología de las micorrizas arbusculares.....	24
2.3.2.4.1. Fisiología de la adquisición de fosfato.....	25
2.3.2.4.2. Fisiología del carbono en MA.....	27
2.3.2.4.3. Fisiología del agua en MA.....	28

	Pág.
2.4. Cambios en las relaciones hídras en plantas micorrizadas.....	28
2.4.1. Generalidades.....	28
2.4.2. Modificación de las relaciones hídras en plantas micorrizadas.....	30
2.4.2.1. Efectos nutricionales.....	30
2.4.2.2. Las hifas del hongo actuan como vias de baja resistencia para el transporte de agua .....	31
2.4.2.3. Modificación de la morfología y extensión del sistema radical.....	31
2.4.2.4. Alteracion del balance hormonal.....	31
2.4.3. Resistencia a la sequía en plantas micorrizadas.....	32
2.4.3.1. Ajuste osmótico.....	34
2.4.3.2. Estimulación de procesos fotosintéticos.....	35
2.4.3.3. Captación directa de agua por las hifas externas del hongo.....	36
2.4.3.4. Alteración de actividades enzimáticas específicas.....	37
 III. MATERIALES Y METODOS.....	 41
3.1. Suelo utilizado.....	41
3.2. Planta utilizada.....	41
3.3. Fertilización de las plantas.....	41
3.4. Determinaciones generales.....	42
3.5. Evaluación del grado de compatibilidad funcional y efectividad de siete hongos MA en el mantenimiento de las relaciones hídras de plantas de lechuga sometidas a periodos sucesivos de estrés hídrico.....	43
3.5.1. Diseño experimental.....	43
3.5.2. Suelo y material biológico.....	43
3.5.3. Condiciones de cultivo.....	44
3.5.4. Determinaciones.....	44
3.6. Estudio del efecto del estrés salino sobre el crecimiento, ajuste osmótico y procesos fotosintéticos en plantas de lechuga.....	45
3.6.1. Diseño experimental.....	45
3.6.2. Suelo y material biológico.....	46
3.6.3. Condiciones de cultivo.....	46
3.6.4. Determinaciones.....	46

	Pág.
3.7. Determinación del efecto del estrés salino sobre la capacidad infectiva y efectividad simbiótica de un hongo de colección comparado con un aislado autóctono adaptado a zonas salinas.....	47
3.7.1. Diseño experimental.....	47
3.7.2. Suelo y material biológico.....	47
3.7.3. Condiciones de cultivo.....	48
3.7.4. Determinaciones.....	48
3.8. Estudio de la contribución de las hifas fúngicas a la captación de agua por plantas micorrizadas.....	49
3.8.1. Diseño experimental.....	49
3.8.2. Suelo y material biológico.....	49
3.8.3. Condiciones de cultivo.....	49
3.8.4. Determinaciones.....	50
3.9. Evaluación del efecto de la aplicación de ácido N-morfolino etano sulfónico (MES) sobre el desarrollo micelial y la captación de agua por las hifas.....	52
3.9.1. Diseño experimental.....	52
3.9.2. Suelo y material biológico.....	52
3.9.3. Condiciones de cultivo.....	52
3.9.4. Determinaciones.....	53
3.10. Estudio de la viabilidad de esporas de tres hongos formadores de micorrizas arbusculares despues de un periodo de almacenamiento en suelo con diferentes potenciales hídricos.....	53
3.10.1. Diseño experimental.....	53
3.10.2. Suelo y material biológico.....	53
3.10.3. Condiciones de cultivo.....	54
3.10.4. Determinaciones.....	54
3.11. Determinación del efecto del Ca en la resistencia al estrés osmótico (hídrico) originado mediante aplicación de polietilenglicol (PEG) al medio de cultivo.....	54
3.11.1. Diseño experimental.....	54
3.11.2. Suelo y material biológico.....	54
3.11.3. Condiciones de cultivo.....	54
3.11.4. Determinaciones.....	55
3.12. Determinación del efecto del K en la resistencia al estrés osmótico (hídrico) originado mediante aplicación de polietilenglicol (PEG) al medio de cultivo.....	56

	Pág.
3.12.1. Diseño experimental.....	56
3.12.2. Suelo y material biológico.....	56
3.12.3. Condiciones de cultivo.....	56
3.12.4 Determinaciones.....	57
3.13. Evaluación de la actividad superóxido dismutasa (SOD) en plantas de lechuga micorrizadas o no y sometidas a estrés hídrico.....	57
3.13.1. Diseño experimental.....	57
3.13.2. Suelo y material biológico.....	58
3.13.3. Condiciones de cultivo.....	58
3.13.4. Determinaciones.....	58
3.14. Estudio de la actividad nitrato reductasa (NR) en plantas de lechuga micorrizadas o no y sometidas a estrés hídrico.....	61
3.14.1. Diseño experimental.....	61
3.14.2. Suelo y material biológico.....	61
3.14.3. Condiciones de cultivo.....	61
3.14.4. Determinaciones.....	62
 IV. RESULTADOS.....	 64
4.1. Evaluación del grado de compatibilidad funcional y efectividad de siete hongos MA en el mantenimiento de las relaciones hídricas de plantas de lechuga sometidas a periodos sucesivos de estrés hídrico.....	64
4.2. Estudio del efecto del estrés salino sobre el crecimiento, ajuste osmótico y procesos fotosintéticos en plantas de lechuga.....	67
4.3. Determinación del efecto del estrés salino sobre la capacidad infectiva y efectividad simbiótica de un hongo de colección comparado con un aislado autóctono adaptado a zonas salinas.....	70
4.4. Estudio de la contribución de las hifas fúngicas a la captación de agua por plantas micorrizadas.....	72
4.5. Evaluación del efecto de la aplicación de ácido N-morfolino etano sulfónico (MES) sobre el desarrollo micelial y la captación de agua por las hifas.....	74
4.6. Estudio de la viabilidad de esporas de tres hongos formadores de micorizas arbusculares despues de un periodo de almacenamiento en suelo con diferentes potenciales hídricos.....	77
4.7. Estudio del efecto del Ca en la resistencia al estrés osmótico (hídrico) originado mediante aplicación de polietilenglicol (PEG) al medio de cultivo.....	78

	Pág.
4.8. Estudio del efecto del K en la resistencia al estrés osmótico (hídrico) originado mediante aplicación de polietilenglicol (PEG) al medio de cultivo.....	80
4.9. Evaluación de la actividad superóxido dismutasa (SOD) en plantas de lechuga micorrizadas o no y sometidas a estrés hídrico.....	82
4.10. Estudio de la actividad nitrato reductasa (NR) en plantas de lechuga micorrizadas o no y sometidas a estrés hídrico.....	85
 V. DISCUSION.....	 87
 VI. CONCLUSIONES.....	 108
 VII. BIBLIOGRAFIA.....	 110

## I. INTERES DEL TRABAJO Y OBJETIVOS

Las micorrizas son asociaciones simbióticas mutualistas que se desarrollan entre las raíces de la mayoría de las especies vegetales superiores y ciertos hongos del suelo. Se trata de una simbiosis "casi universal", no sólo por el número de plantas susceptibles, sino también por su ubicuidad en la inmensa mayoría de los hábitats naturales. Los hongos formadores de la micorriza colonizan la corteza de las raíces y, en perfecto equilibrio biológico, establecen con la planta una serie de interrelaciones biotróficas. La planta suministra substratos energéticos y funcionales al hongo y éste, por medio de su red de hifas externas, capta nutrientes, principalmente fosfato, de la solución edáfica y transfiere estos iones a la planta hospedadora mediante mecanismos, inespecíficos unos y específicos otros, de gran eficacia. Los hongos formadores de micorrizas arbusculares (MA) se caracterizan, también, por facilitar el enraizamiento así como incrementar el crecimiento de la planta hospedadora bajo situaciones de estrés (infección por patógenos, sequía, salinidad, etc). En determinadas circunstancias, las alteraciones fisiológicas producidas por la colonización MA en el huésped parecen ser los principales mecanismos implicados en los efectos beneficiosos obtenidos.

Para establecer las bases ecofisiológicas y bioquímicas que regulan los procesos de superación del estrés se ha utilizado una planta modelo, de fácil manipulación, rápido crecimiento y caracterizada por una alta sensibilidad al estrés hídrico y salino así como por disponer de un sistema foliar adecuado para las determinaciones fisiológicas a realizar. La especie vegetal seleccionada ha sido la lechuga (*Lactuca sativa* L.).

En la presente investigación nos vamos a centrar en el estrés hídrico y en el componente osmótico del estrés salino, por considerarlos los dos procesos abióticos estresantes de mayor incidencia en los ecosistemas del entorno. Es por ello que se han seleccionado como modelos de estrés los producidos por limitación hídrica con incidencia directa en la concentración salina del medio.

El hecho de que los hongos formadores de micorrizas arbusculares estén presentes en todos los suelos donde las plantas crecen es una indicación de un elevado nivel de adaptación, incluso a condiciones ambientales limitantes conducentes a situaciones de estrés. Estos hongos pueden adaptarse tanto a bajos como a altos niveles de agua en el suelo. Algunos autores han sugerido que las micorrizas pueden ser más importantes para el crecimiento de las plantas bajo condiciones de sequía que bajo situación de adecuado aporte de agua. No obstante, los mecanismos a través de los cuales las micorrizas pueden incrementar la resistencia a la sequía y/o tolerancia a la sal de la planta hospedadora no han sido, aún, aclarados. Un tema de particular interés dentro de nuestros objetivos es distinguir

entre efectos indirectos, a través de una mejora generalizada en la nutrición de la planta, y efectos directos del hongo en la mejora de las relaciones hídricas y alteraciones fisiológicas de la planta.

Extrapolando el rango de actuación de los hongos formadores de micorrizas a situaciones comunes de estrés presentadas en los ecosistemas agronómicos y naturales de nuestro entorno, sabemos que las propiedades de los suelos salinos que inhiben o reducen el desarrollo y supervivencia de las plantas consisten en un pH desfavorable, desequilibrios nutricionales y alteraciones en la estructura del suelo que reducen la aereación y la capacidad de campo de dichos suelos. De acuerdo con ello, se han identificado dos efectos como causas probables de la toxicidad de la sal sobre varios tipos de plantas: el efecto iónico y el osmótico. El primero incluye interferencias en la planta con iones esenciales así como una disminución de la tasa fotosintética. El segundo está asociado con falta de extensión de la pared celular que llega a originar el cese del crecimiento.

Experimentos realizados en campo han evidenciado que la introducción de hongos formadores de micorrizas arbusculares en lugares afectados de salinidad, mejora rápidamente la tolerancia y crecimiento de la planta hospedadora. A pesar de que esta resistencia de las plantas micorrizadas al estrés salino ha sido atribuida a la mejora en la nutrición mineral, particularmente P, el efecto de los hongos arbusculares no debe limitarse exclusivamente a este mecanismo. De hecho, los hongos MA pueden influenciar la producción de fitohormonas, mejorar la captación de agua o el ajuste osmótico, para mantener el turgor foliar y un favorable balance hídrico, así como afectar a parámetros fisiológicos de la planta como tasa fotosintética, transpiración, conductancia o eficiencia en el uso del agua. La alteración de estos procesos fisiológicos vegetales por parte de los hongos MA puede ser un importante determinante de eficiencia simbiótica bajo condiciones de estrés.

Dentro de estas consideraciones, otro de los grandes problemas que afectan a la producción vegetal es la falta de agua para los cultivos. A pesar de que el agua es el compuesto más abundante en la tierra, la falta de agua es el mayor factor limitante, a escala global, de la productividad de las plantas terrestres. Las pérdidas mundiales en las cosechas debido al déficit de agua exceden, probablemente, de las pérdidas debidas a otras muchas causas combinadas.

Varios mecanismos han sido propuestos como posibles causas del incremento de la resistencia a la sequía por parte de las plantas micorrizadas. Así, se sabe que una mejora en la nutrición de la planta aumentará la resistencia a la sequía. El ajuste osmótico que origina mantenimiento del turgor foliar se ha asociado con el contenido en K y prolina de las células. Este elemento es un factor esencial que influencia la apertura y cierre de estomas,

conductancia estomática, transpiración y fotosíntesis. También ha sido apuntado que puede existir una captación directa de agua por las hifas fúngicas. Otros mecanismos a considerar son cambios en los niveles hormonales así como alteraciones anatómicas en las raíces infectadas, que se encuentran incrementadas en las plantas micorrizadas.

Un factor a tener en cuenta es que los hongos arbusculares difieren en su capacidad para adaptarse y funcionar en diferentes condiciones ambientales. En general, la tolerancia de distintas especies de hongos arbusculares es diferente y, probablemente, en ello influyen varias causas. La adecuada selección de endofitos es un hecho de indudable interés práctico. Las diferentes capacidades mostradas para resolver un problema de estrés se puede relacionar con diferentes mecanismos fisiológicos, hormonales y nutricionales resultantes de la compatibilidad de los simbioses con las condiciones ambientales.

Ante la problemática expuesta, en el presente estudio, nos propusimos los siguientes objetivos:

- 1) Determinar el grado de compatibilidad funcional de varios hongos MA disponibles en la colección de este Departamento y su efectividad en el mantenimiento de las relaciones hídricas en plantas de lechuga sometidas a periodos sucesivos de estrés hídrico.
- 2) Evaluar el efecto del estrés salino sobre el crecimiento, ajuste osmótico y procesos fotosintéticos en plantas micorrizadas, control y fertilizadas con P.
- 3) Determinar si el estrés salino (suelo previamente salinizado) afecta a la capacidad infectiva y a la eficacia simbiótica de un hongo de colección frente a uno autóctono adaptado a suelos salinos.
- 4) Evaluar la contribución de las hifas fúngicas a la captación de agua por plantas micorrizadas, en relación con el nivel de agua disponible en el medio.
- 5) Comprobar la viabilidad de esporas MA después de un periodo de almacenamiento en suelo con diferentes niveles de potencial hídrico.
- 6) Determinar el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la resistencia al estrés hídrico (osmótico) producido mediante la aplicación de PEG en plantas control y micorrizadas.
- 7) Determinar el papel de tres hongos MA en la adquisición de K por plantas de lechuga y sus efectos en la protección frente al estrés originado mediante PEG.

8) Estudiar el efecto del estrés hídrico sobre la actividad superóxido dismutasa (SOD) en plantas de lechuga micorrizadas o no.

9) Estudiar el efecto del estrés hídrico sobre la actividad nitrato reductasa (NR) en plantas de lechuga micorrizadas o no.

## II. INTRODUCCION.

### 2.1. El estrés hídrico por sequía.

#### 2.1.1. Generalidades.

A pesar de que el agua es el compuesto más abundante en la tierra, la falta de agua es el factor limitante de la producción vegetal más importante a escala global (Turner y Kramer, 1980). Probablemente, las pérdidas en producción de las cosechas debidas a déficit hídrico exceden a las pérdidas por muchas otras causas combinadas.

Se suele considerar zona árida a aquella en la que las precipitaciones son escasas o nulas y la humedad atmosférica muy baja. Sin embargo, factores ajenos a la precipitación limitan seriamente el aprovechamiento del agua. Entre estos factores destaca, como el más importante, la temperatura, que condiciona directamente la intensidad de evaporación.

Tanto desde el punto de vista meteorológico, como ambiental, se puede definir la sequía, como la falta o insuficiencia de precipitación durante un periodo largo de tiempo, que provoca un desequilibrio hidrológico considerable y, por lo tanto, restricción en el suministro de agua para las plantas. Se presenta cuando la evaporación y la transpiración exceden a la precipitación durante un periodo considerable de tiempo, y constituye el azar físico más grave que afecta a los cultivos.

#### 2.1.2. Tipos de sequía.

Según Sanchez-Diaz (1989), existen cuatro tipos básicos de sequía:

**-Sequía permanente.** Característica de los climas secos. La escasa vegetación está adaptada a la aridez y no es posible una agricultura de altos rendimientos sin riego continuo.

**-Sequía estacional.** Se presenta en aquellos climas que tienen estaciones anuales lluviosas y secas bien definidas.

**-Sequía impredecible.** Se refiere a un fallo anormal en la precipitación; se puede presentar prácticamente en cualquier lugar, pero es más característica de climas húmedos y subhúmedos.

**-Sequía no aparente.** Cuando por temperaturas altas y/o vientos fuertes se inducen tasas elevadas de evaporación y transpiración. En estas condiciones, incluso las lluvias frecuentes pueden resultar insuficientes para restaurar la cantidad de agua perdida, afectando también al rendimiento.

### **2.1.3. Captación del agua por la planta.**

El abastecimiento de agua es un factor esencial en la vida de la planta. La pérdida de agua por las hojas en la transpiración es un proceso inevitable pero necesario para la vida vegetal, ya que, entre otros, contribuye a constituir un sistema circulatoria 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 (Estaún, 1991). La magnitud que rige los movimientos del agua en la planta es el potencial hídrico ( $\Psi$ ). Dicho parámetro constituye la resultante de fuerzas de orígenes diversos (osmótica, capilar, de imbibición, turgente etc.) que liga al agua, al suelo o a los diferentes tejidos del vegetal, e indica la tendencia de las moléculas de agua para difundirse, evaporarse o ser absorbidas (Sánchez-Díaz, 1991). Normalmente, se expresa en términos de presión. Por convención, el  $\Psi$  del agua pura es cero y, puesto que el  $\Psi$  de la planta es inferior al del agua libre, ordinariamente, tiene un valor negativo. En este sentido el  $\Psi$  será menor, o más negativo, a medida que la concentración de solutos o el grado de déficit hídrico de la planta aumente. Los dos componentes esenciales del potencial hídrico son el potencial osmótico ( $\Pi$ ) y el potencial de turgencia (P). La relación que existe entre los dos componentes es:  $\Psi = \Pi + P$ .

El concepto de potencial hídrico ayuda a comprender la absorción, movimiento y pérdida de agua. El agua se mueve desde una región de mayor a otra de menor potencial hídrico. Por lo tanto, en el interior de una planta  $\Psi$  es más elevado en las raíces, haciéndose progresivamente menor en el tallo y encontrándose el valor más bajo en las hojas.

### **2.1.4. La falta de agua en la planta.**

Frecuentemente, en días calurosos y soleados, se presentan déficits hídricos al mediodía debido a que, temporalmente, la pérdida de agua excede a la absorción. Por el contrario, los déficits a largo plazo son provocados por una disminución de agua en el suelo. A medida que un suelo se seca y el potencial hídrico del mismo va tomando valores cada vez más negativos, las plantas han de disminuir su potencial hídrico con el fin de mantener el gradiente de potencial necesario para la absorción de agua. Teóricamente, esto puede ocurrir de dos maneras: disminuyendo el potencial osmótico (por acumulación de solutos), o reduciendo la turgencia (mediante simple deshidratación). En los suelos sometidos a sequía, el

mecanismo más importante es la disminución del potencial osmótico, bien mediante una estimulación de la acumulación de iones inorgánicos, o bien mediante un aumento en los niveles de solutos orgánicos. Tal ajuste osmótico u osmorregulación puede llegar a impedir la caída en la turgencia de la raíz (Morgan, 1984).

El potencial hídrico de la planta experimenta cambios más o menos cíclicos, con valores más elevados al amanecer y al anochecer, siendo menores al mediodía, cuando es máximo el desequilibrio entre transpiración y absorción. La amplitud de esta tendencia aumenta con el grado de sequía en el suelo. Existe, por lo tanto, durante el día un déficit hídrico provocado por alta transpiración y resistencia elevada en las raíces. Por la noche, cuando cesa la transpiración, los déficits hídricos diurnos se eliminan gradualmente y, con el tiempo, el potencial hídrico de la planta alcanza un cierto equilibrio con el del suelo.

Cuando las altas tasas de transpiración acentúan el gradiente de potencial hídrico en la planta, disminuye el potencial de la raíz y, finalmente, la turgencia. En esta situación se puede presentar encogimiento de la raíz, lo cual provoca no sólo una reducción en el crecimiento de la misma sino, también, la pérdida de contacto con las partículas de suelo. En estas condiciones, la absorción se hace cada vez más difícil debido, también, a un aumento en la resistencia hidráulica del suelo.

Cuando el potencial hídrico del suelo desciende por debajo de un nivel crítico, cesa la absorción y la planta muere. El efecto en las plantas de estos ciclos diarios de potenciales hídricos bajos depende del grado de recuperación del xilema así como de si se presenta o no osmorregulación en las hojas. Si ésta no tiene lugar, inevitablemente, la caída del potencial hídrico foliar provocará una disminución de la turgencia, que desencadenará el cierre estomático y reducción de la expansión celular.

#### **2.1.4.1. Efectos fisiológicos y metabólicos de la falta de agua en la planta.**

El efecto más importante de, incluso, un déficit hídrico ligero, es la reducción del crecimiento, siendo especialmente sensible la expansión celular. Durante estreses suaves puede continuar la síntesis de materiales de la pared celular, de tal modo que el retraso en el crecimiento se puede superar tras la recuperación. La división celular, aunque resulta afectada por el estrés hídrico, normalmente es menos sensible que la expansión celular. El déficit hídrico también modifica el desarrollo y morfología vegetal. Así, por ejemplo, la diferente sensibilidad a la sequía de las raíces y partes aéreas, conduce a aumentos en la relación raíz/parte aérea. El déficit hídrico también aumenta la caída de hojas y frutos, especialmente tras la desaparición del estrés. Así mismo, y como consecuencia de una disminución de la expansión y división celular, se reduce el tamaño de las hojas.

Igualmente, el déficit hídrico ocasiona cierre estomático y, por tanto, disminución de la tasa transpiratoria y de absorción de CO<sub>2</sub>. La fotosíntesis también se afecta como consecuencia de efectos directos sobre procesos enzimáticos, transporte electrónico y contenido en clorofila. Se puede afirmar que cada aspecto del metabolismo y estructura fina celular se ve afectado por el déficit hídrico (Hsiao, 1973). Entre dichos cambios merece destacar los siguientes: incremento de las reacciones degradativas en relación con las sintéticas, disminución de la síntesis de proteínas, aumento en la concentración de aminoácidos libres, especialmente prolina, glicina-betaína y azúcares; todo ello conlleva cambios importantes en las correspondientes actividades enzimáticas. Muchas de estas alteraciones se pueden considerar adaptativas pero, en realidad, es difícil distinguir entre cambios que son consecuencia de lesión celular o tisular, de los que representan auténtica adaptación. Por otra parte, la sequía puede inducir la transcripción de ARN mensajeros, codificando un gran número de proteínas ("shock proteins") que, en condiciones de óptima disponibilidad de agua, no son sintetizadas.

#### **2.1.5. Mecanismos vegetales de resistencia a la sequía.**

Cuando el potencial hídrico del suelo desciende considerablemente, se hace más difícil absorber agua y las plantas se exponen al peligro de desecación. En estas circunstancias, las plantas desarrollan características especiales que les permiten sobrevivir. En general, estos mecanismos van encaminados a posponer el cierre estomático (una de las respuestas más frecuentes al estrés hídrico) para que la planta siga asimilando el CO<sub>2</sub> el mayor tiempo posible.

##### **2.1.5.1. Tolerancia a la sequía.**

Las especies difieren entre sí en el grado y periodo de tiempo de tolerancia a la sequía. Los diferentes mecanismos de respuesta de la planta que permiten aumentar la tolerancia a la sequía, tales como comportamiento estomático, cambios morfológicos en la hoja, osmorregulación y alteraciones en la relación raíz/parte aérea ocasionan, al mismo tiempo, reducción en su capacidad de producción de biomasa vegetal.

Existen grandes diferencias en la capacidad que presentan las plantas para tolerar la sequía. Algunas de estas diferencias son consecuencia de adaptaciones a nivel de la planta entera, tales como sistemas radicales dispersos y profundos; otras tienen lugar a nivel de órgano, como por ejemplo, hojas muy cutinizadas y buen control estomático de la transpiración, mientras que otras, tales como el ajuste osmótico y la tolerancia a la desecación, actúan a nivel celular.

Los mecanismos que contribuyen a la tolerancia a la sequía se pueden clasificar en dos tipos importantes (Jones, 1992): 1) evitación del estrés; es decir, aquellos mecanismos que minimizan la presencia de déficits hídricos lesivos, 2) tolerancia al estrés; es decir aquellas adaptaciones fisiológicas que permiten que las plantas continúen funcionando, a pesar de la presencia de déficit hídrico en las mismas.

#### *Evitación del estrés.*

a) *Escape a la sequía.* Las plantas que poseen este mecanismo no son, por lo general, resistentes a la sequía. La supervivencia en los periodos secos sólo requiere la producción, debidamente programada, de semillas u órganos especialmente protegidos de la desecación.

b) *Conservación del agua.* La forma más corriente de regular el equilibrio hídrico y mantener la turgencia es reducir la pérdida de agua. Ello se consigue mediante: cierre estomático rápido y completo, cutícula gruesa y altamente impermeable, pérdida de hojas, reducción de la transpiración y almacenamiento de agua.

c) *Mantenimiento de la absorción de agua.* Muchas plantas que tienen éxito en hábitats secos, dependen del desarrollo de un sistema radical profundo y extenso que puede obtener agua a partir de un volumen considerable de suelo o bien de una capa freática profunda.

#### *Tolerancia al estrés.*

Existen varias formas mediante las cuales las plantas mantienen la actividad fisiológica a medida que disminuye el contenido o el potencial hídrico:

a) *Mantenimiento de la turgencia.*

Ajuste osmótico.

Cuando disminuye el potencial osmótico de los tejidos en respuesta al desarrollo de déficit hídrico interno, es importante distinguir el componente resultante de una concentración pasiva de solutos, debido a deshidratación del tejido, del originado por acumulación activa de los mismos. Es a este último caso de osmorregulación, al que se le denomina ajuste osmótico.

El ajuste osmótico posibilita así el mantenimiento, en condiciones de sequía, de la turgencia y de los procesos dependientes de la misma, tales como expansión y crecimiento

celular, apertura estomática, fotosíntesis, etc. Por otra parte, retrasa el enrollamiento foliar y mantiene el crecimiento de la raíz. Ordinariamente, el ajuste osmótico se presenta en plantas sometidas a un estrés lento. Los solutos que participan varían pero, por lo general, además de iones inorgánicos (especialmente  $K^+$  y  $Cl^-$ ) y solutos orgánicos cargados eléctricamente que se acumulan en la vacuola, se sintetizan y acumulan en el citoplasma moléculas orgánicas sin carga específica, que reciben el nombre de solutos compatibles, siendo los dos más frecuentes, la prolina y la betaína. Se ha observado que, en condiciones de sequía, también se acumulan otras sustancias, tales como azúcares reductores, sacarosa y pinitol (Antolín y Sanchez-Diaz, 1992).

*Módulo de elasticidad elevado.*

El desarrollo adicional de tejidos estructurales en muchas plantas xeromórficas, origina células inextensibles (módulo de elasticidad elevado). Esta característica permite a las células tolerar altas concentraciones osmóticas, con la capacidad consiguiente de mantener la turgencia hasta valores muy bajos de  $\Psi$ .

*b) Tolerancia a la desecación.*

La tolerancia a la desecación se refiere a la capacidad del protoplasma para soportar una gran pérdida de agua, siendo ésta característica adaptativa y típica de cada especie. El déficit hídrico provoca la pérdida progresiva de la turgencia protoplásmica y aumento en la concentración de solutos. El resultado final de estos dos efectos es la alteración en la función celular y la aparición de lesiones en las estructuras protoplásmicas.

Las plantas de cultivo y, en general, todas las plantas vasculares se marchitan rápidamente si su contenido en agua se desvía en torno a un 15-30% del valor máximo. Durante algunas etapas de su ciclo vital (semilla, rizomas o tallos sin hojas) el protoplasma puede soportar potenciales hídricos muy bajos pero durante la mayor parte del desarrollo vegetal no puede tolerar potenciales hídricos bajos sin sufrir lesiones.

Muchos de los solutos que surgen como consecuencia del ajuste osmótico son potencialmente eficaces protegiendo las proteínas citoplásmicas y membranas celulares de la desecación (Paleg et al., 1985).

#### **2.1.5.2. Eficiencia en el Uso del Agua.**

Cuando el suministro de agua es limitado, resulta importante considerar la Eficiencia en el Uso del Agua, (EUA) en términos de materia seca producida por unidad de agua utilizada en

la evapotranspiración, es decir, incluye el agua evaporada desde la superficie del suelo así como la transpirada por la planta (Fischer y Turner, 1978; Hsiao y Läuchli, 1986). La EUA hace referencia a un parámetro de producción, y un objetivo importante de la investigación en este área consiste en alcanzar una elevada EUA manteniendo, al mismo tiempo, una alta productividad. No obstante, en el caso de resistencia a la sequía, la capacidad para sobrevivir a déficits hídricos severos suele estar negativamente relacionada con la productividad. Algunos autores (Turner, 1986) han propuesto utilizar el término "eficiencia transpiratoria" para referirse a la producción de materia seca por unidad de transpiración, reservando el término eficiencia en el uso del agua para referirse a producción de materia seca por unidad de evapotranspiración, por lo que es más adecuado utilizarlo cuando se trata de plantas crecidas bajo condiciones de abundante humedad.

## **2.2. Estrés provocado por exceso de salinidad en el medio.**

### **2.2.1. Generalidades.**

Los suelos salinos ocupan más del 7% de la superficie terrestre, y la producción agronómica y forestal de estos sitios es considerablemente baja (Jain et al., 1989). La mayoría de los estreses provocados por salinidad en la Naturaleza son debidos a sales de Na, principalmente ClNa, aunque los ambientes salinos pueden contener una gran variedad de otras sales. Las plantas capaces de soportar sin daños aparentes altas concentraciones de electrolitos en el ambiente donde crecen son denominadas halófitas, en oposición a las que no pueden sobrevivir en tales condiciones o halófitas.

El límite de tolerancia a la salinidad viene indicado en primer lugar por un cese del crecimiento, seguido por la muerte de los tejidos. A continuación se sitúan aspectos tales como inhibición de yemas, pérdida de turgor, caída de las hojas y, finalmente, marchitez irreversible de la planta (Lewitt, 1952). Otro cambio típicamente inducido por la salinidad es la aparición de succulencia, mecanismo de dilución interna de sales por absorción de agua, lo que produce células con una elevada proporción volumen/superficie (Longstreth y Nobel, 1979).

A nivel subcelular parece que los orgánulos más afectados son los cloroplastos, ocurriendo una completa distorsión de su estructura, consistente en la desorganización del sistema lamelar, fenómeno que impide reconocer claramente los grana en comparación a cloroplastos normales. El núcleo sufre un hinchamiento de su doble membrana, mientras que en el aparato de Golgi y retículo endoplasmático se detecta una acumulación de vesículas con lípidos, posiblemente, destinados a la reparación de estructuras dañadas por la salinidad (Poljakoff-Mayber, 1975). La salinidad también induce adelgazamiento y menor ramificación en las raíces de plantas sensibles, aunque las características más llamativas ocurren en la

anchura de las bandas de Caspary a nivel de las paredes radicales de las células endodérmicas, así como en el número de capas celulares del córtex (Flowers, 1985).

### 2.2.2. Componentes del estrés por salinidad.

Los efectos de la salinidad sobre la fisiología de los vegetales han sido clasificados como osmóticos, nutritivos y de toxicidad. En términos utilizados por la moderna fisiología del estrés, los dos primeros son efectos secundarios inducidos por el estrés salino, mientras que el de toxicidad constituye un efecto primario debido a las sales.

*Componente osmótico.*- Si la salinidad disminuye el potencial hídrico externo por debajo del de la célula expone a la misma a un estrés hídrico secundario. Para distinguirlo del estrés por falta de agua en el suelo, ya que ambos conducen a una tensión de deshidratación osmótica, se le conoce como sequía fisiológica (Wyn Jones, 1981). La principal evidencia de este estrés hídrico es la depresión del crecimiento y de la producción.

*Componente nutritivo.*- Aún cuando se eliminase el efecto osmótico, una elevada concentración en sales repercute sobre los niveles de absorción de algunos elementos nutritivos principalmente porque disminuye la absorción de agua por las raíces debido a los fenómenos de antagonismo y sinergismo en la absorción y transporte de los iones (Wyn Jones, 1981). Altas concentraciones de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y otros iones encontrados en suelos salinos, como  $\text{Mg}^{2+}$  ó  $\text{SO}_4^{2-}$ , pueden inducir deficiencias de iones esenciales, especialmente K, fosfatos o nitratos.

*Componente tóxico.*- El daño inducido por el estrés primario o de toxicidad puede ser directo, de rápida aparición identificado con un daño a membranas; o indirecto, que requiere exposiciones más prolongadas al estrés (días o semanas) para que se desarrolle y que cursa con la alteración de diversos procesos metabólicos.

El efecto tóxico general de una gran variedad de sales es una disminución en la tasa de fotosíntesis neta por unidad de área foliar (Taleisnik, 1987). En algunas ocasiones, el principal responsable de esta disminución parece ser el cierre de estomas causado por la alteración en el balance hídrico (Taleisnik, 1987). En otras, sin embargo, la reducción parece debida a daños en las reacciones luminosas y bioquímicas de fijación del  $\text{CO}_2$ , aunque se conoce poco acerca de los mecanismos celulares implicados (Kaiser, 1987).

También ha sido señalado un metabolismo defectuoso del nitrógeno como posible causa del daño indirecto por estrés salino. En muchas especies, la sal deprime la síntesis de proteínas, mientras que aumenta la hidrólisis de las existentes. Como resultado se produce un

acúmulo de aminoácidos libres y también de sus derivados, algunos de los cuales pueden ser tóxicos como putrescina y cadaverina. Igualmente, ha sido señalado un aumento de la actividad peroxidásica en hojas dañadas por ClNa, lo que conduce a la formación de melaninas y melanoidinas por oxidación de tirosina en las áreas necróticas. Asimismo, en presencia de elevadas concentraciones de sal, se ha encontrado una ruptura de clorofilas y otros pigmentos tales como carotenos y antocianinas. Finalmente, el daño directo parece deberse primordialmente a una alteración de la permeabilidad diferencial de las membranas, causada por cambios en los lípidos y desnaturalización y agregación de sus proteínas (Kylin y Quatrano, 1975).

### **2.2.3. Mecanismos vegetales de resistencia a la salinidad.**

Es bien conocido que la resistencia de los vegetales a un estrés ambiental puede deberse a evitación (desarrollo de una barrera química o fisiológica que impida a las células sufrir una alteración en el equilibrio interno) o a tolerancia (la célula es capaz de soportar ese desequilibrio por largos periodos sin daños aparentes). Ambos tipos de resistencia pueden ser encontrados tanto en el estrés primario de toxicidad como en el secundario osmótico o nutritivo.

#### **2.2.3.1. Evitación del estrés primario.**

La planta puede utilizar alguno o varios de los métodos siguientes para evitar el estrés salino interno.

a) *Exclusión de sales*: Presumiblemente por disminución de la permeabilidad selectiva de la membrana a estos iones (Matoh et al., 1988).

b) *Expulsión activa de sales*: Existen numerosas evidencias electrofisiológicas de esta expulsión (Cheeseman, 1988). De los estudios cinéticos se desprende que existen dos sistemas diferentes de ATPasas activadas por Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en las células de plantas haloresistentes. Uno de óptima actividad a elevadas concentraciones de K<sup>+</sup> y que se localiza en el plasmalema celular y otro localizado en el tonoplasto y que requiere altas concentraciones de Na<sup>+</sup>. De esta forma existiría un sistema de transporte que toma Na<sup>+</sup> del citoplasma y lo vierte a la vacuola (Rea y Sanders, 1987). Por tanto, está bien documentado que las bombas de expulsión de iones, conocidas como ATPasas de membrana, desempeñan un papel muy importante para mantener las funciones celulares en las plantas haloresistentes, contribuyendo a que la concentración de Na<sup>+</sup> libre en el citoplasma sea lo más baja posible.

c) *Dilución de sales*: Dado que lo esencial del efecto de las sales no es su cantidad absoluta, sino su concentración, una absorción de agua en cantidad suficiente puede prevenir un incremento peligroso de sales en el líquido tisular. Así, en numerosas halófitas cuando la concentración de solutos alcanza un determinado valor, las células (especialmente las del parénquima) se alargan permitiendo un mayor contenido de agua que previene la concentración excesiva del líquido celular y conduce a la succulencia de la hoja (Munns et al., 1983).

### **2.2.3.2. Tolerancia del estrés primario.**

La tolerancia, parece ser un mecanismo de adaptación a los hábitats salinos superior que el de la evitación, puesto que posibilita a la planta para obtener agua a valores muy negativos de potencial hídrico en su ambiente e impide su deshidratación. Esa tolerancia se fundamenta tanto en un alto grado de compartimentación de los iones dentro de la célula como en un adecuado ajuste osmótico entre vacuola y citoplasma, adquirido por la acumulación de solutos orgánicos (osmorregulación) (Wyn Jones y Gorham, 1983).

Existen dos posibles mecanismos de tolerancia al daño producido por el estrés primario (Wyn Jones y Gorham, 1983). a) La planta puede amortiguar el cambio en el balance iónico, excretando la sal absorbida en la vacuola. b) La planta puede tolerar el cambio en el balance iónico. Este segundo mecanismo requiere estructuras protoplasmáticas y orgánulos capaces de mantener sus propiedades normales en presencia del cambio iónico provocado por la salinidad.

### **2.2.3.3. Resistencia al estrés secundario de deshidratación.**

Para que una planta pueda absorber agua e iones de un suelo altamente salino, el potencial hídrico de sus células deberá ser aún más negativo. Para conseguirlo, las células de las especies halófitas desarrollan una serie de mecanismos fisicoquímicos conocidos como osmorregulación (Yeo, 1983). Dado que el estrés osmótico es un tipo de déficit hídrico, cuando la planta está expuesta a una solución salina hipertónica existen dos mecanismos por los que puede retener su turgor: a) Absorbiendo la sal, el agente osmótico más asequible y barato termodinámicamente bajo condiciones salinas; b) Incrementando su concentración de solutos orgánicos, proceso que requiere gasto de energía metabólica. Ambos mecanismos operan simultáneamente en las células de las plantas halófitas (Wyn Jones, 1981).

Los iones absorbidos en gran cantidad se acumulan dentro de la vacuola mediante un proceso activo (Lerner, 1985) la cual ocupa aproximadamente el 95% del volumen de la célula madura en el caso de la hoja. Ese equilibrio osmótico vacuola/citoplasma puede lograrse

también por un acúmulo de iones o por otros mecanismos de ajuste. Actualmente se piensa (Gorham et al., 1985) que la acumulación de varios solutos orgánicos compatibles es el mecanismo preferencial de osmorregulación entre vacuola y citoplasma en las células de halófitas.

En plantas superiores se han señalado una serie de citosolutos compatibles, tales como prolina, sorbitol, glicinabetaína y otros. La acumulación de estos compuestos constituye una respuesta casi universal al estrés hídrico, por lo que se ha propuesto que probablemente la prolina actúe como agente protector de la hidratación de las proteínas, contribuyendo a fijar agua, más que como soluto osmótico compatible.

### **2.3. Las micorrizas.**

#### **2.3.1. Generalidades.**

El término "micorriza" (del griego "mikos", hongo, y "rriza", raíz) fué utilizado por vez primera por Frank a finales de siglo pasado (Frank, 1885) para hacer referencia a determinadas asociaciones existentes entre ciertos hongos del suelo y raíces de plantas. No obstante, fué en los años 50 cuando se comenzó a poner de manifiesto la importancia real y el significado de estas asociaciones, así como su presencia en la práctica totalidad de los sistemas suelo-planta (Bonfante-Fasolo, 1984; Barea y Jeffries, 1995). En la inmensa mayoría de los hábitats naturales (Barea y Azcón-Aguilar, 1983), incluso en las condiciones mas adversas (Mosse et al., 1981; Hayman. 1982a), están micorrizadas aproximadamente un 97% de las plantas superiores (Harley y Smith, 1983). Es decir, sus raíces establecen asociaciones simbióticas mutualísticas con hongos específicos del suelo en las que ambos organismos se encuentran integrados de tal manera que dan lugar a una nueva entidad. Según esto, en la mayoría de los casos, el órgano de captación de nutrientes de la planta es la "micorriza", y no la "raíz" propiamente dicha (Harley y Smith, 1983).

Hoy se sabe que las micorrizas son tan antiguas como las propias plantas como se deduce de la observación del primer registro fósil que se conoce (fósil Rhynie, datado en 370 millones de años). La existencia de tal coevolución ha dado lugar a diversas interdependencias planta-hongo formador de micorrizas, de manera que, en la actualidad, se puedan encontrar especies vegetales cuyo desarrollo apropiado, e incluso en algunos casos, supervivencia, están condicionados a la formación de micorrizas (Barea et al., 1984; Bethlenfalvay y Schüepp, 1994). Esta situación sin embargo, es aún mas crítica para los hongos implicados en la simbiosis, puesto que no se ha logrado evidenciar que éstos sean capaces de completar su ciclo de vida en ausencia de la planta hospedadora por lo que estos

hongos deben ser considerados actualmente simbioses obligados (Hepper 1984; Marx y Cordell, 1989; Azcon-Aguilar et al., 1991)

Atendiendo a las características morfológicas de la simbiosis, así como a los taxones a los que pertenecen las plantas y los hongos implicados, se pueden distinguir siete tipos de asociaciones micorrízica (Harley y Smith, 1983; Morton et al., 1995). No obstante, las micorrizas arbusculares (MA), encuadradas dentro de las endomicorrizas o micorrizas endotróficas, llamadas así por colonizar intracelularmente la raíz, son las mas ampliamente distribuidas en la naturaleza. Aproximadamente el 90% de las especies vegetales terrestres las forman (Kendrick y Berch, 1985; Trappe, 1986), las mayoría de ellas son de alto interés económico. El hecho de que la practica totalidad de las especies vegetales formen MA, contrasta con que sólo unas 150 especies de hongos las originan (Morton, 1988; Morton et al., 1995), todos ellos pertenecientes al grupo de los Zigomicetos. En estas asociaciones, la colonización de la raíz por las hifas del hongo es tanto inter- como intracelular, y se caracteriza porque en las células mas internas del córtex, las hifas del hongo, mediante divisiones dicotómicas sucesivas, dan lugar a unas formaciones caraterísticas denominadas arbúsculos, donde se produce el intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta.

### **2.3.2. Las Micorrizas Arbusculares.**

Las micorrizas arbusculares son el grupo mas importante dentro de las simbiosis micorrízicas, tanto a nivel cuantitativo, como cualitativo, ya que entre las plantas que las forman se encuentran la práctica totalidad de las especies de interés agronómico e industrial (Hayman, 1982b; Linderman, 1988). Solo algunas familias, entre ellas las Chenopodiaceae, Cruciferae, Fumariaceae, Urticaceae y Poligonaceae, poseen especies que habitualmente no forman este tipo de simbiosis (Trappe, 1986). Sin embargo, desde las primeras descripciones a principios de presente siglo (Gallaud, 1905), hasta que su estudio fué retomado por Mosse en los años 50, se extiende una etapa en la que fueron prácticamente olvidadas. Esto probablemente fué debido a distintas circunstancias. En primer lugar, la presencia de la simbiosis no origina cambios morfológicos notorios en la raíz a nivel macroscópico, como ocurre con las ectomicorrizas (Gerdemann, 1971; Bonfante-Fasolo y Bianciotto, 1995), por lo que normalmente pasan desapercibidas, salvo que se les apliquen técnicas específicas de tinción y posterior observación microscópica. En segundo lugar, el hecho de que los hongos responsables de su formación no crezcan en los medios de cultivo habituales, ha condicionado que durante mucho tiempo pasaran inadvertidos a los microbiólogos, a pesar de ser unos de los grupos microbianos más comunes de los suelos. En la actualidad, sin embargo, se ha acumulado una gran información acerca de esta simbiosis, especialmente en lo que se refiere a sus efectos sobre el crecimiento de la planta hospedadora. Los procesos

fisiológicos y bioquímicos responsables de tales efectos, son, en cambio, mucho menos conocidos.

### **2.3.2.1. Formación de las micorrizas arbusculares.**

En el suelo existen dos tipos de estructuras fúngicas que pueden iniciar la formación de una MA. Por un lado, las esporas de resistencia producidas por estos hongos, capaces de soportar condiciones muy adversas, por lo que son las principales responsables de la supervivencia de los hongos formadores de MA en el suelo (Hayman, 1982a; Daniels, 1984). Por otro lado, están las hifas procedentes de una raíz previamente micorrizada, ya se encuentre ésta formando parte de una planta viva, o bien se trate de fragmentos de raíces preexistentes (Hayman, 1982a; Daniels, 1984). Este último tipo de inóculo es más eficaz que las esporas en la colonización de un nuevo sistema radical, en el sentido de que la formación de la micorriza ocurre más rápidamente, aunque también puede resultar más "efímero", puesto que no tiene tanta protección y es menos resistente ante eventuales condiciones adversas. No obstante, se ha comprobado que las micorrizas, pueden mantener su capacidad infectiva después de permanecer en el suelo seco durante periodos de tiempo de hasta seis meses (Tommerup y Abbot, 1981).

No se tiene certeza de que otras estructuras fúngicas que permanecen en el suelo, como fragmentos de hifas o esporas secundarias, sean capaces de iniciar nuevas colonizaciones (Warner y Mosse, 1980; Hayman, 1982; St. John et al., 1983), aunque en algunos casos se ha puesto de manifiesto la capacidad del micelio, separado de la espora madre, de mantenerse vivo e infectivo (Vidal, 1991), siempre que el suelo y sus agregados permanezcan inalterados y no se rompa su estructura (Jasper et al., 1989a y b).

Las condiciones físicas del suelo, en especial humedad y temperatura, parecen ser los factores fundamentales que desencadenan la germinación de las esporas (Siqueira et al., 1985). Se sabe, en efecto, que éstas no requieren para germinar ningún tipo de nutriente, ni la presencia de una planta hospedadora, si bien se ha observado que el proceso de germinación puede, en ocasiones, ser estimulado por la presencia de exudados radicales y de determinados microorganismos del suelo (Azcón, 1987; Azcón-Aguilar et al., 1988), o inhibido por exudados radicales de plantas no hospedadoras (El-Atrach et al., 1989). Esto indica que las esporas cuentan con el material genético y bioquímico necesario para llevar a cabo la germinación (Bagyaraj, 1984; Siqueira, 1987). No se conocen bien los mecanismos intrínsecos que rigen la germinación de las esporas, aunque se ha sugerido que se podría desencadenar como consecuencia de los cambios biofísicos originados a nivel de la membrana de la espora tras la entrada de agua durante el proceso de imbibición (Siqueira, 1987). A partir de este momento, tendría lugar una serie de procesos de síntesis de ARNs y proteínas, así como la

activación de enzimas específicos (Hepper, 1979; Beilby y Kidby, 1982; Siqueira, 1987), que darían como resultado la aparición del tubo de germinación.

A partir del tubo de germinación, el hongo va a desarrollar un conjunto de hifas que colonizan el suelo de alrededor de la espora de manera radial (Sanders y Sheikh, 1983). Estas hifas cuentan con una cierta capacidad metabólica, y en ellas se ha puesto de manifiesto la existencia de determinados sistemas enzimáticos, como los implicados en la asimilación del nitrato (Ho y Trappe, 1975; Sundaresan et al., 1988), en el ciclo de Krebs (McDonald y Lewis, 1978), así como cierta capacidad ATPásica (Lei et al., 1991).

Las hifas procedentes de la espora, denominadas "exploradoras", se desarrollan en el suelo de forma errática, y no experimentan ningún tipo de atracción preferencial hacia las raíces de plantas hospedadoras. Cuando, de manera fortuita, alguna de ellas llega a la rizosfera de una planta susceptible de formar micorizas, sufre una estimulación que la induce a ramificarse de forma masiva (Barea, 1986; Bécard y Fortin, 1988)

Si las hifas "exploradoras" no consiguen acceder a la rizosfera de alguna planta susceptible de ser colonizada, al poco tiempo entran en una fase de degeneración: el citoplasma se retrae hacia la espora, y la hifa, al quedar vacía, se tabica y colapsa, entrando la espora, de nuevo, en fase de dormancia. No obstante, cuando las condiciones del medio sean favorables de nuevo, esa misma espora puede volver a germinar, y a emitir un nuevo micelio "explorador", y así sucesivamente hasta que encuentre una raíz que pueda colonizar con éxito, o degenerar definitivamente (Koske, 1981; Bago, 1990). Esta capacidad para germinar sucesivamente permite al hongo tener más opciones para establecer la simbiosis con una planta susceptible, y poder así completar su ciclo de vida (Burggraaf y Beringer, 1989).

Cuando las hifas "exploradoras" consiguen acceder a la rizosfera de una planta hospedadora, pasan a denominarse hifas "colonizadoras". Aquí su crecimiento se ve notablemente estimulado por los exudados radicales existentes en la zona (Barea, 1986; Bécard y Piché, 1989; Giovanetti et al., 1995) y, probablemente también, por la actividad de los microorganismos rizosféricos allí presentes (Barea, 1986; Azcón, 1987). Si las hifas provienen de una espora, se origina, mediante la ramificación sucesiva de la hifa colonizadora, una estructura de pre-infección en forma de abanico (Mosse y Hepper, 1975; Glenn et al., 1988). Esta estructura, sin embargo, no se forma cuando las hifas proceden de una raíz ya micorrizada (Powell, 1976). Se especula con que esto pueda deberse a la necesidad de las hifas procedentes de las esporas de una captación de nutrientes que active el micelio, y lo fortalezca para la posterior colonización de la planta. En el caso de las hifas procedentes de otra micorriza, ya tendrían estos nutrientes y no necesitarían captarlos, es decir, estarían "activadas" (Barea et al., 1991). En cualquier caso, la formación de esta estructura de pre-

colonización es el primer signo de reconocimiento de la planta hospedadora por parte del hongo arbuscular, aún en ausencia de contacto físico (Barea et al., 1991). El desarrollo de las hifas ya no es errático, sino que a partir de ese momento son atraídas hacia la rizoplanea debido, al menos parcialmente, a compuestos volátiles (Koske, 1982; Bécard et al., 1988; Glenn et al., 1988)

La siguiente etapa en la colonización del sistema radical consiste en el contacto de la hifa con la superficie de la raíz, y posterior penetración en su interior. En general, se acepta que los sitios más habituales de penetración coinciden con los lugares más activos de la raíz. Así, se ha observado que la mayor frecuencia de puntos de entrada se produce entre 0.5 y 1.5 cm del meristemo apical (Harley y Smith, 1983), donde es más rápido el crecimiento de la raíz (Bécard y Fortin, 1988). La hifa experimenta una mayor atracción hacia esas zonas, puesto que en ellas la exudación radical es más abundante. Sin embargo, se han descrito también inicios de colonización en otras zonas del sistema radical (Buwalda et al., 1984; Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988), aunque nunca en zonas dañadas o a través de heridas (Hayman, 1983), lo que indica que la raíz debe encontrarse en buenas condiciones fisiológicas para ser colonizada.

Los mecanismos de penetración del hongo en la raíz parecen ser una suma de procesos mecánicos, por la presión ejercida por la hifa (Harley y Smith, 1983), y enzimáticos, mediante la producción de enzimas pectinolíticas y celulolíticas por parte del hongo (Giovanetti et al., 1995). Estas enzimas se producen en pequeñas cantidades, por lo que no llegan a producir la degradación total de las paredes celulares de la raíz, pero sí la desorganización de sus componentes (García-Romera et al., 1990, 1991; García-Garrido et al., 1992). Por lo tanto, la hifa del hongo debilita primero la estructura de la pared vegetal al contactar con ella, para ejercer luego una presión mecánica que le permite introducirse en el interior de la célula. Se ha descrito también que esta presión favorece la exudación por parte del hospedador, lo que a su vez fortalecería al hongo (Harley y Smith, 1983). Durante su penetración a través de la pared, la hifa sufre un estrechamiento del que se recupera una vez dentro de la célula (Bonfante-Fasolo, 1984).

Una vez superada la barrera de la pared celular, la hifa se encuentra con el plasmalema de la célula hospedadora. En la formación de micorrizas es característico el hecho de que el hongo nunca penetra el plasmalema. La hifa de penetración induce la invaginación del plasmalema de la célula hospedadora, de manera que queda envuelta completamente por él, como si de un dedo en un guante se tratara. Entre la pared fúngica y el plasmalema de la célula vegetal se va a mantener siempre una matriz con material fibrilar (Bonfante-Fasolo, 1984; 1994), que se hace continua con la pared de la célula no afectada por el hongo (Gripiolo, 1981). Este material estaría formado por fibrillas de polisacáridos dispersas, que la

célula vegetal produce como precursores de la pared celular, pero cuya polimerización estaría impedida por el hongo (Dexheimer et al., 1986).

Cuando la hifa del hongo llega a las células mas externas del parénquima cortical, puede producir en el interior de esas células unas circunvoluciones no ramificadas, denominadas "ovillos" (Bonfante-Fasolo, 1984). A partir de aquí, la hifa de penetración continua avanzando hasta alcanzar la zona media del córtex, donde se va a producir la extensión rápida de la colonización, puesto que la hifa se ramifica y, a través de los espacios intercelulares, comienza a recorrer longitudinalmente la raíz, agrupada en paquetes de 2 a 4 (Barea et al., 1991).

Además de recorrer longitudinalmente la raíz en el córtex medio, las hifas penetran también en el córtex interno, y allí continúan desarrollándose longitudinalmente, aunque a la vez se ramifican lateralmente para penetrar en las células, donde se dividen profusa y dicotómicamente, dando lugar a la estructura mas característica y compleja de esta simbiosis: el arbúsculo.

El arbúsculo recibe ese nombre porque su estructura recuerda a la de un pequeño árbol con tronco y ramificaciones. Llega a ocupar hasta un 35% del volumen de la célula que lo alberga (Alexander et al., 1988). Todas las ramificaciones que presenta, incluso las más finas, se encuentran rodeadas por plasmalema de la célula hospedadora, lo que ha de suponer un incremento espectacular en la superficie de membrana de ambos simbioses a ese nivel. Se calcula que la relación área/volumen del protoplasto de una célula colonizada por un arbúsculo puede llegar a incrementarse en más de 10 veces (Alexander et al., 1988). Aunque a lo largo de toda la colonización de la raíz por el hongo se establecen interfases hongo-planta, las originadas a nivel del arbúsculo son mas especializadas, en el sentido de que en ellas las paredes celulares de ambos simbioses quedan reducidas a un mínimo (Bonfante-Fasolo, 1984; Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988; Smith y Smith, 1990). Es por todo esto por lo que el arbúsculo se considera como la máxima expresión de esta simbiosis (Bonfante-Fasolo, 1984), y el lugar más especializado para el intercambio de nutrientes entre la planta y el hongo (Marx et al., 1982).

Los arbúsculos presentan un ciclo de formación y degeneración continua en la raíz. Tienen una vida media de entre 4 y 10 días (Cox y Tinker, 1976). Cuando dejan de ser funcionales, el citoplasma del hongo se retrae y sus ramificaciones se colapsan, observándose al microscopio electrónico como estructuras desorganizadas (Bonfante-Fasolo, 1984).

Los restos del arbusculo degenerado acaban por desaparecer, y la célula que lo albergaba vuelve a su situación inicial, siendo susceptible de albergar otros nuevos (Harley y Smith, 1983). En un principio se sugirió que el aporte de los nutrientes captados por el hongo a la planta tendrían lugar mediante la degeneración del arbusculo y posterior asimilación de los nutrientes contenidos en su interior por las células (Strullu y Gourret, 1980). Hoy en día se sabe que los nutrientes transferidos por este mecanismo pueden justificar tan sólo un 1% del total de nutrientes aportados por el hongo a la planta (Smith, 1980; Scannerini y Bonfante-Fasolo, 1983; Bonfante-Fasolo, 1994), por lo que la transferencia de nutrientes del hongo a la planta debe de ocurrir a través de las membranas intactas del hongo, cuando éste permanece aún activo.

Además de los arbusculos, las hifas del hongo pueden originar en la colonización del córtex unas estructuras globosas, de alto contenido lipídico, y con función de almacenamiento o reserva, denominadas vesículas (Bonfante-Fasolo, 1984).

Las vesículas no son efímeras como los arbusculos, sino que desde que aparecen van madurando y parece ser que, en algunas ocasiones, pueden llegar a convertirse en esporas del hongo. La transformación de estas vesículas en esporas podría estar ligada a situaciones de estrés para la micorriza, o a la muerte inminente de la planta.

Tras el establecimiento de los primeros arbusculos, las hifas externas del hongo se fortalecen y ramifican intensamente, originando el denominado "micelio externo", que coloniza el suelo de alrededor del sistema radical. Este micelio presenta dos tipos de hifas. Las primeras son de pared gruesa y mas duraderas, y sobre ellas se van a originar unas vesículas externas que, al madurar, se transformarán en nuevas esporas de resistencia. A las segundas, de pared mas fina, y mucho mas efímeras que las anteriores, se les atribuye el papel de captar de nutrientes a partir del suelo (Barea et al., 1991). El micelio externo constituye, por lo tanto, una red tridimensional de hifas cuya extensión y distribución varía dependiendo de los organismos integrantes de la simbiosis (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988), pero que pueden llegar a colonizar zonas de suelo situadas entre 12 y 20 cm de distancia de la superficie de la raíz (Barea et al., 1991). Se ha calculado que una raíz bien micorrizada puede llegar a formar hasta 14 metros de hifas por centímetro de raíz, aunque lo mas frecuente es la formación de, aproximadamente 1 metro de hifas por centímetro cuadrado de raíz (Abbott y Robson, 1985a; Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988).

Algunas de las hifas del micelio externo recorren longitudinalmente la superficie de la raíz, originando a su paso nuevos puntos de entrada. Estos puntos de entrada secundarios pueden formarse a distintos niveles del sistema radical, incluso en zonas mas maduras del mismo. Consecuentemente, la presencia del hongo en la raíz se va generalizando, y a medida

que el sistema radical crece, se produce la colonización de las nuevas raíces producidas, mientras que el hongo va madurando en las zonas mas viejas, donde comienzan a predominar las vesículas con respecto a los arbusculos.

### **2.3.2.2. Morfología de la simbiosis.**

#### *Cambios en las células de la planta.*

El establecimiento de la simbiosis no origina en las raíces cambios apreciables a nivel macroscópico. Sin embargo, sí que se producen modificaciones a nivel microscópico o citológico, que van a depender del tipo de célula implicada (Bonfante-Fasolo, 1984; 1987; 1994).

Las células epidérmicas colonizadas, sufren modificaciones a nivel de su pared y membrana plasmática, pero no en su citoplasma u orgánulos. Como en todas las células penetradas por el hongo, la pared sufre una somera digestión y una desorganización parcial, sumamente localizada, lo que propicia la entrada de la hifa, que es rodeada por la membrana plasmática en todo su recorrido, aumentando, consecuentemente, la superficie de ésta, pero sin sufrir, al parecer, ningún otro tipo de alteración.

En el córtex medio no suele haber colonización intracelular, al ser ésta la zona de expansión de la unidad de colonización, en la que las hifas se extienden fundamentalmente de manera intercelular. Por lo tanto, son afectadas tan sólo en cuanto a la digestión parcial de sus láminas medias y en un incremento en los espacios intercelulares.

Las células radicales que sufren las modificaciones mas notorias son las del córtex interno, al ser colonizadas por arbusculos (Bonfante-Fasolo, 1984; 1987). Además de la disrupción parcial de la pared, en ellas el plasmalema incrementa su superficie de modo espectacular (entre 6 y 12 veces), así como el volumen citoplasmático (entre 3 y 20 veces) (Alexander et al., 1988). La vacuola se fragmenta en muchas vacuolas pequeñas, con lo que el tonoplasto incrementa su superficie más de 2.2 veces y los gránulos de almidón desaparecen (Nemec, 1981). Asimismo, el núcleo aumenta de tamaño, aunque esto no parece deberse a la endorreproducción del ADN (Berta et al., 1990), sino a un desenrollamiento de su estructura, lo que sugiere la existencia de una mayor tasa de transcripción (Bonfante-Fasolo y Perotto, 1992). Todos estos cambios, indican que estas células se encuentran metabólicamente activadas.

La colonización de la raíz por las hifas del hongo no continúa mas allá del parénquima cortical, es decir, nunca penetra la endodermis, y, consecuentemente, nunca alcanza el cilindro

vascular (Bonfante-Fasolo, 1984). Esto podría justificarse por la existencia de una barrera física, la banda de Caspary, a la que la baja producción de enzimas líticos por parte del hongo sería incapaz de afectar. Este es un hecho importante, puesto que marca una diferencia notable con respecto a hongos patógenos, y refleja el control estricto que la planta ejerce sobre la distribución del hongo dentro de la raíz.

### *Cambios en el hongo.*

Los cambios mas notables se producen a nivel de las paredes de las hifas, que varían según la zona de raíz en que se encuentren, aunque también se pueden observar ciertos cambios a nivel de los componentes citoplasmáticos.

Las ramificaciones mas finas del micelio externo presentan una pared muy delgada (2-7  $\mu\text{m}$ ), probablemente para favorecer la captación de nutrientes. Las hifas externas mas estables, sobre las que se forman las esporas, presentan un incremento en el grosor de la pared, que pasa a tener ahora unos 20 a 30  $\mu\text{m}$  de espesor. El componente fundamental de esta pared es la quitina, con organización fibrilar y estructura definida.

Ya en el interior de la raíz, las hifas intercelulares presentan una pared muy similar a la de las hifas mas permanentes del micelio externo. Se ha observado, sin embargo, que en estas hifas la pared se encuentra envuelta en un material de carácter glucídico, lo que podría ser un mecanismo de protección por parte del hongo, puesto que de esta manera ocultaría y preservaría la quitina del ataque de quitinasas producidas por la planta como respuesta a la penetración fúngica (Spanu *et al.*, 1989). Esto parece indicar que la estrategia que el hongo sigue, no consiste en inhibir los mecanismos defensivos de la planta, sino en evitar su disparo (Bonfante-Fasolo y Perotto, 1992). Asimismo, la presencia de este material impermeabiliza las hifas, impidiendo que el intercambio de nutrientes tenga lugar a un nivel que no pueda ser controlado por el hongo.

A nivel de los arbúsculos, la pared fúngica va disminuyendo en grosor y grado de organización, a medida que se avanza hacia sus ramificaciones mas finas: En éstas, llega a tener tan sólo de 30 a 50 nm de espesor y su organización ahora es amorfa, en lugar de fibrilar. No se detectan ya indicios de la matriz glucídica, ni tampoco de quitina, aunque sí la presencia de su precursor, la N-acetilglucosamina (Glenn *et al.*, 1988), lo que podría indicar que la planta está ejerciendo un control sobre su polimerización, facilitando así que el intercambio de nutrientes tenga lugar a ese nivel (Bonfante-Fasolo, 1987; Bonfante-Fasolo y Scannerini, 1992).

### **2.3.2.3. Formación de interfases hongo-planta.**

El hecho de que en ningún momento de la colonización de la raíz por el hongo se produzca la perforación de la membrana plasmática de las células vegetales, va a propiciar el desarrollo de una serie de interfases hongo-planta, que pueden ser consideradas como el máximo exponente de la asociación simbiótica (Bonfante-Fasolo y Scannerini, 1992).

Se puede considerar que se forman dos tipos de interfases de distintas características a lo largo de la colonización por MA: las no arbusculares y las arbusculares.

Las primeras se originan a nivel de la colonización intercelular e intracelular no arbuscular de las hifas. Se caracterizan porque las paredes celulares de ambos simbioses aún forman parte de ellas, en gran medida. Alrededor de las hifas del hongo, se deposita un material que se hace continuo con las paredes de las células colonizadas, y que parece provenir de su degradación parcial, así como de restos de las láminas medias que han sido atravesadas por las hifas (Bonfante-Fasolo y Perotto, 1992). Por su parte, las hifas del hongo conservan a estos niveles una gruesa pared (20-30 $\mu$ m).

Al contrario de lo que sucede en invasiones por patógenos las interfases intercelulares no presentan depósitos de callosa ni compuestos fenólicos, producidos por la planta como respuesta defensiva, lo que constituye una nueva prueba del reconocimiento entre los simbioses (Smith y Smith, 1990; Bonfante-Fasolo y Perotto, 1992).

En las interfases arbusculares, los vestigios de paredes celulares son mínimos. Por parte de la planta, aún aparece el material desorganizado de la pared, que ahora es mucho más fino y laxo que en las interfases no arbusculares (Bonfante-Fasolo y Scannerini, 1992). La pared del hongo por su parte, como ya se ha dicho, se reduce al máximo, por lo que las interfases arbusculares son en realidad unos sistemas "membrana-apoplasto-membrana" que funcionan como un todo, y que, por ello, se consideran las zonas mejor adaptadas para llevar a cabo la transferencia e intercambio de nutrientes (Bonfante-Fasolo y Scannerini, 1992).

### **2.3.2.4. Fisiología de las micorrizas arbusculares.**

Las MA son sistemas especializados en la captación y transferencia de nutrientes, mucho más eficaces que las raíces por sí mismas. Por lo tanto, el establecimiento de esta simbiosis en la que ambos organismos salen beneficiados, está enfocada hacia la consecución de un sistema fisiológico de eficacia óptima en la captación, translocación e intercambio de nutrientes. Este incremento en la eficacia de captación va a estar determinado

por las modificaciones fisiológicas que sufre la raíz cuando es colonizada por un hongo arbuscular.

Una de las modificaciones fisiológicas más relevantes en la micorriza es el cambio en la localización de las zonas implicadas en la captación de nutrientes con respecto a las raíces no micorrizadas (Jeffries y Barea, 1994). Mientras que las células epidérmicas son las únicas encargadas de la captación de nutrientes en una raíz, en la micorriza se pueden distinguir dos zonas de captación: la primera está constituida por las hifas más finas del micelio externo del hongo, que, junto con las células epidérmicas de la raíz constituyen la nueva, y amplificada, superficie captadora de la micorriza. La segunda zona se localiza en el córtex radical, y más concretamente en las interfases arbusculares hongo-planta.

En la zona de la interfase arbuscular, la "captación" vendría dada, en realidad, por un intercambio bidireccional de nutrientes: P, N y K entre otros, que son liberados por el hongo y captados por la planta, mientras que el C procedente de la fotosíntesis, es liberado por la planta y captado por el hongo.

#### **2.3.2.4.1. Fisiología de la adquisición de fosfato.**

A través de los estudios fisiológicos que se han llevado a cabo sobre las MA, se ha puesto siempre de manifiesto la actuación preferente de la micorriza sobre la captación y el aporte de P a la planta (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991; Jakobsen et al., 1994). El que este elemento sea esencial para los sistemas biológicos, y, sin embargo, habitualmente se encuentre en el suelo en concentraciones muy bajas (del orden de  $10^{-5}$  a  $10^{-6}$  M), justifica el interés por conocer los mecanismos que presenta la micorriza para ser más efectiva que las raíces no micorrizadas en su captación.

Los niveles de P en las plantas micorrizadas son, en general, muy superiores a los de las no micorrizadas (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988), lo que se explica por un mayor flujo de P hacia la planta, gracias al aumento en la superficie de captación, como consecuencia de la formación del micelio externo del hongo (Cooper y Tinker, 1978; Jakobsen et al., 1994; Jakobsen, 1995). Según Cress et al. (1979), a esto habría que añadir un incremento en la afinidad de las micorrizas por el P, puesto que en ellas se han descrito valores más bajos de la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) para la absorción de fosfato que los obtenidos en raíces sin micorrizar.

El transporte de nutrientes en la micorriza se suele dividir, para su estudio, en tres etapas: la captación del nutriente por el micelio externo del hongo; su translocación a lo largo

de las hifas hasta el córtex interno de la raíz; y por último, su liberación a la interfase arbuscular y transferencia a las células corticales.

La captación del P soluble por las hifas externas del hongo arbuscular se ha puesto de manifiesto en diversas ocasiones (Li et al., 1991a y b; Jakobsen et al., 1992). La diferencia de concentración de P entre el suelo y las hifas del hongo, del orden de 1 a 1000, apunta hacia la necesidad de que la captación se lleve a cabo mediante procesos activos. Puesto que la absorción activa de nutrientes es dependiente de la H<sup>+</sup>-ATPasa asociada a membrana (Serrano, 1989), es muy probable que este enzima se encuentre implicado en la captación activa de P por el micelio externo, y más aún cuando su presencia se ha detectado en las hifas de determinados hongos arbusculares cultivados *in vitro* (Lei et al., 1991). La tasa estimada de entrada de P por el micelio externo oscila entre 2 a 8 x 10<sup>-15</sup> mol cm<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (Li et al. 1991a y b).

Una vez que las hifas externas han captado el P del suelo, éste es translocado a lo largo del micelio del hongo, salvando en ocasiones distancias de más de 11cm (Li et al., 1991), para ser, finalmente, transferido a las células corticales de la raíz. El fosfato es un compuesto osmótico y eléctricamente activo, por lo que, si no fuese neutralizado en el citoplasma del hongo, podría ocasionarle graves trastornos metabólicos. Estudios a nivel ultraestructural indican que la mayor parte del P se transporta en forma de gránulos de poli P (osmóticamente inactivos), localizados fundamentalmente en el interior de las vacuolas fúngicas (Strullu et al., 1981), mientras que sólo una pequeña parte viajaría como Pi por el citoplasma. La presencia en las hifas de los enzimas implicados en la formación y degradación de estos gránulos de poli P (Capaccio y Callow, 1982), así como la de una fosfatasa alcalina asociada a vacuola garantizan la maquinaria bioquímica necesaria para la translocación del P.

El transporte de P integrado en gránulos de polifosfato parece producirse mediante corrientes citoplasmáticas rápidas (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991), canalizadas, tal vez, por algún tipo de citoesqueleto fúngico (Raudaskoski, 1992) que dan lugar a velocidades de flujo de P, a través de las hifas, relativamente elevadas (Cooper y Tinker, 1981; Jakobsen, 1995). La translocación se encuentra además favorecida por el gradiente de concentración de P existente a lo largo del micelio (Harley y Smith, 1983), debido al drenaje que la planta lleva a cabo a nivel de los arbusculos. El incremento de la transpiración en plantas micorizadas podría estar también implicada en este proceso.

Tras su llegada a las hifas arbusculares, los gránulos de poli P desaparecen de las vacuolas (Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1989), probablemente por su degradación mediante una polifosfatasa, cuya actividad sólo se localiza en el micelio interno del hongo, o bien mediante una polifosfato quinasa. El Pi es "liberado" a la interfase hongo/planta por un

mecanismo supuestamente pasivo. Sin embargo, se sospecha que la planta hospedadora induce algún tipo de modificación en las membranas arbusculares fúngicas, bien a nivel físico, incrementando su permeabilidad (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991) o bioquímico, mediante algún tipo de transporte facilitado. También se ha sugerido que la liberación de P podría estar acoplada, de alguna manera, a la captación de productos carbonados, liberados por la planta a la interfase (Harley y Smith, 1983). En cualquier caso, este proceso de transferencia de P desde el hongo hacia la planta es aún totalmente desconocido, y sólo se pueden aventurar hipótesis sobre él (Bonfante-Fasolo y Scannerini, 1992).

El P liberado por el hongo a la interfase arbuscular, es "recaptado" por las células corticales de la planta mediante un mecanismo activo, en el que muy probablemente estén implicadas  $H^+$ -ATPasas asociadas a la membrana periarbuscular, cuya presencia se ha puesto de manifiesto en diferentes estudios ultraestructurales (Marx et al., 1982; Gianinazzi-Pearson et al., 1991), aunque nunca bioquímicos o genéticos.

#### **2.3.2.4.2. Fisiología del carbono en MA.**

Como contrapartida a su efecto en la mejora del estado nutritivo de la planta, y según el carácter mutualístico de esta asociación, el hongo se beneficia del establecimiento de la simbiosis mediante la utilización de productos carbonados procedentes de la fotosíntesis (Cooper, 1984; Hampp y Schaeffer, 1995). Generalmente se ha considerado que la transferencia de los productos carbonados entre la planta y el hongo tendría lugar a nivel de las interfases arbusculares, estando acoplada, de alguna manera, a la transferencia de otros nutrientes en sentido contrario, es decir, desde el hongo a la planta (Harley y Smith, 1983). En estudios recientes, sin embargo, se han sugerido las interfases no arbusculares como los lugares exclusivos para intercambio de C (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1991).

El mecanismo por el que las células vegetales liberan productos carbonados a la interfase es supuestamente pasivo (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991), lo que, al igual que ocurría con la cesión de P por el hongo, resulta poco habitual para el comportamiento normal de una célula. Probablemente exista algún tipo de modificación en la permeabilidad de la membrana vegetal y/o la presencia de algún "portador" específico que justifique la liberación de estos compuestos tan esenciales.

Una vez en la interfase, los productos carbonados han de ser captados por el hongo. Se ha postulado que esta captación se llevaría a cabo mediante procesos activos, en los que probablemente se encontrarían implicadas ATPasas de membrana (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991). Ya en el citoplasma, los esqueletos carbonados son inmediatamente transformados en compuestos típicamente fúngicos, como glucógeno y lípidos (Cooper,

1984), que se transportan hasta las hifas mas externas del micelio. Esta translocación tiene lugar, probablemente, mediante corrientes citoplasmáticas, y está favorecida por un gradiente de concentración favorable entre el micelio interno, y el externo, que se desarrolla en el suelo. Tal vez se encuentre, asimismo, acoplada al flujo, en dirección opuesta, de nutrientes que finalmente el hongo cederá a la planta. Esta rápida translocación de los productos carbonados permite que se mantenga su gradiente de concentración a nivel de la interfase, favorable al hongo, lo que, probablemente, facilite la exudación de las células vegetales, así como la captación por parte de las hifas (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991).

#### **2.3.2.4.3. Fisiología del agua en MA.**

Con respecto a la fisiología del agua, se ha descrito en numerosas ocasiones una mayor resistencia de las plantas micorrizadas al estrés hídrico (Augé et al., 1987; Bethlenfalvai et al., 1988; Peña et al., 1988; Sánchez-Díaz et al., 1990; Sánchez-Díaz y Honrubia, 1994; Ruiz-Lozano et al., 1995a y b). Sin embargo, las razones de esta mayor resistencia son aún muy debatidas. Mientras que algunos datos indican que se debe a un efecto de carácter puramente nutricional (Cooper, 1984), la baja movilidad de los nutrientes lentos, se hace aún mas limitante en suelos con poca agua (Azcón et al., 1988), otros apuntan hacia una resistencia adicional, debida, exclusivamente, a la formación de la simbiosis (Hardie y Leyton, 1981), si bien se desconocen los mecanismos implicados. Aunque el micelio externo del hongo puede acceder a posibles micro-acuíferos, donde la raíz no es capaz de llegar por sí misma, los flujos del transporte de agua por las hifas hacia la raíz medidos hasta el momento, no justifican la mayor resistencia de la planta a la sequía (Safir, 1985; George et al., 1992), salvo en algunas excepciones (Faber et al., 1991). Tal vez el incremento en la resistencia al estrés hídrico se deba a cambios fisiológicos de la micorriza como la alteración del balance hormonal de la planta, pero, en cualquier caso, se necesitan mas datos para clarificar este aspecto fundamental de la fisiología de las plantas micorrizadas.

### **2.4. Cambios en las relaciones hídricas en plantas micorrizadas.**

#### **2.4.1. Generalidades.**

El estudio de las relaciones hídricas de la asociación micorrízica es un campo de conocimiento nuevo. La mayoría de la literatura sobre el tema es posterior a 1980. No obstante, Safir et al. (1971) fueron los primeros en describir cambios en las relaciones hídricas de las plantas debido a la formación de micorrizas. Ellos inocularon plantas de soja con el hongo MA *Glomus mosseae*. Después dejaron llegar a un estado de marchitez a estas plantas en estadíos diferentes del desarrollo de la simbiosis y midieron la captación de agua

tras su adición al suelo seco. Las plantas micorrizadas de 20 días no mostraron estimulación del crecimiento sobre el control ni diferencias en la captación de agua. Por el contrario, cuando las plantas tuvieron entre 30 y 40 días, se evidenciaron tanto diferencias en crecimiento como en captación de agua a favor de las micorrizadas. Las plantas de soja micorrizadas y con 30 días tuvieron valores de conductividad hidráulica aproximadamente 70% mayores que los controles no micorrizados. A partir de estos datos, numerosos estudios 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 (Safir et al., 1972; Hardie y Leyton, 1981). Los tres fenómenos están relacionados entre sí e indican que hay una menor resistencia al flujo del agua a través de la planta micorrizada. Estos últimos autores (Hardie y Leyton, 1981) investigaron el efecto de las MA en las relaciones hídricas de las plantas hospedadoras. Estudiaron los cambios en crecimiento, tasas transpiratorias, resistencia foliar y las tasas de recuperación del estrés hídrico de plantas de trébol micorrizadas y no cultivadas en suelos con bajo contenido en P pero fertilizados con tres niveles de este elemento. Además, intentaron definir los mecanismos por los cuales se producían estos cambios en las relaciones hídricas. Midieron también el flujo de agua por planta y por unidad de longitud de raíz. Basándose en sus resultados propusieron las siguientes observaciones:

1. La conductividad hidráulica de raíces de trébol fué mucho mayor en las plantas micorrizadas que en las no colonizadas. Atribuyeron parte de esta mayor conductividad a la, también, mayor longitud y diámetro de las raíces micorrizadas. Además, como esta diferencia de conductividad se seguía manteniendo si se consideraba por unidad de longitud de raíz, sugirieron también que el incremento de la conductividad podía deberse a la translocación de agua a través de las hifas fúngicas.
2. Cuando los contenidos hídricos del suelo eran adecuados, las tasas de transpiración de las plantas micorrizadas fueron mucho mayores que en las plantas control debido a una mayor conductividad radical y superficie foliar y menor resistencia foliar a la difusión del agua.
3. Cuando el aporte de agua es limitado, la resistencia foliar de las plantas micorrizadas incrementó hasta un valor similar al de las plantas no micorrizadas, y la tasa transpiratoria por unidad de superficie fué menor que en las plantas sin colonizar. Sin embargo, como la superficie foliar era mucho mayor, la cantidad de agua transpirada, al considerar la planta completa, fué aún mayor en las plantas micorrizadas.
4. Las plantas micorrizadas extrajeron agua de suelos con bajos potenciales hídricos, posiblemente, debido a la mayor conductividad radical junto con menor potencial hídrico en las hojas.

5. Cuando se aportó suficiente agua al suelo, las plantas micorrizadas y estresadas se recuperaron más rápidamente que las no micorrizadas debido, probablemente, de nuevo, a los mayores niveles de conductividad radical.

#### **2.4.2. Modificación de las relaciones hídricas en plantas micorrizadas.**

Se han postulado cuatro hipótesis mediante las cuales los hongos podrían afectar las relaciones hídricas de las plantas colonizadas.

##### **2.4.2.1. Efectos nutricionales.**

El mejor estado nutritivo de la planta permitiría una captación más eficaz del agua. Cooper (1984) sugiere que los efectos de la micorrización pueden deberse simplemente a la mejora de la nutrición inducida por las micorrizas. Hay que tener en cuenta que el descenso del nivel hídrico en el suelo dificulta aún más la movilidad del ion fosfato, por lo que la adquisición de éste y otros nutrientes, normalmente poco móviles, por las hifas de la MA reviste especial interés en condiciones de estrés hídrico y condiciona que la planta, al mejorar su nivel nutritivo, incremente su tolerancia a dicho estrés (Bethlenfalvay et al., 1988; Michelsen y Rosendahl, 1990). Estos últimos autores indican que distintas especies de plantas muestran distinta tolerancia al estrés hídrico pero que en todos los casos las plantas inoculadas tienen una razón raíz/parte aérea bastante menor que las plantas no micorrizadas, y que esa menor masa radical es sustituida funcionalmente por el micelio externo generado por el hongo MA, como indican, también, Bethlenfalvay et al., (1988). Este micelio externo es el que le permite a la planta micorrizada llegar más allá de la zona de deficiencia en nutrientes y agua. En cambio, otros autores sugieren que dichos cambios son independientes del estado nutritivo fosforado de la planta (Peña et al., 1988; Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988; Sanchez-Díaz et al., 1990; Davies et al., 1992). Los hay que destacan la importancia del K en la interacción entre las micorrizas arbusculares y los parámetros hídricos (Sieverding y Toro, 1988; Premachandra et al., 1992; Azcón et al., 1995). Estos elementos, el fósforo y el potasio, además de su efecto nutritivo pueden alterar la permeabilidad de la membrana celular que es la mayor barrera para el flujo de agua a través de las raíces. El K juega un papel clave para la planta ante el estrés hídrico pues es el soluto catiónico responsable del movimiento (apertura y cierre) de estomas en respuesta a cambios en el estado hídrico de las hojas (Eakes et al., 1991).

Robin et al. (1989) estudiaron el efecto del potasio en la tolerancia que presentaban plantas de trébol ante un estrés hídrico inducido mediante polietilenglicol (PEG). Los resultados obtenidos indicaban que el K era un factor importante que determina la resistencia al estrés hídrico en plantas de trébol. No obstante, estudios de este tipo en plantas micorrizadas

no han sido realizados hasta el momento, a pesar del gran interés que supone el conocer si el incremento de captación de nutrientes tales como el K influye positivamente en la mejora de las relaciones hídricas de las plantas micorrizadas.

#### **2.4.2.2. Las hifas del hongo actúan como vías de baja resistencia para el transporte de agua.**

Los resultados de Safir et al., (1972) no apoyan esta posibilidad mediante la utilización del fungicida Pentacloronitrobenzeno (PCNB). Se sabe que el PCNB impide la captación de nutrientes por las hifas y su posterior translocación a la planta micorrizada. Estos autores pensaron que si las hifas dentro de la raíz proporcionaban canales de baja resistencia al flujo del agua, tras la aplicación del PCNB, la conductividad hidráulica y la actividad del hongo en la raíz micorrizada debería haber disminuido hasta el mismo nivel que en las plantas no micorrizadas, cosa que no ocurrió. El tratamiento con PCNB no tuvo efecto sobre el transporte de agua ni en plantas micorrizadas ni en las controles, siendo, por tanto, un argumento en contra de que las hifas actúen como vías activas y de baja resistencia para el transporte de agua dentro de la raíz.

#### **2.4.2.3. Modificación de la morfología y extensión del sistema radical.**

La simbiosis MA produce cambios evidentes en la morfología y arquitectura radical (Berta et al., 1991). La importancia de esos cambios en las relaciones hídricas no se ha podido determinar 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 de dicha planta. Kothari et al. (1991) sugirieron que las mayores tasas de captación de agua en las plantas micorrizadas pueden ser el resultado de alteraciones anatómicas en raíces colonizadas; se detecta, por ejemplo, aumento de vasos metaxilemáticos diferenciados y cambios en la formación de exodermis radical. También se ha sugerido que los incrementos en la conductancia hidráulica de raíces de *Vicia faba* estaban asociadas con una reducción del grosor de la corteza radical (Tissera y Ayres, 1988).

#### **2.4.2.4. Alteración del balance hormonal.**

Varias investigaciones han estudiado el papel de las micorrizas en la alteración del balance hormonal (Beyrle, 1995). Así, Allen et al. (1980) examinaron el efecto de la colonización AM en *Bouteloua gracilis* crecido en cultivo axénico. Ellos determinaron que la actividad citoquinina fue 57 y 111% mayor en hojas y raíces respectivamente de plantas micorrizadas. En un posterior estudio, Allen et al. (1982) encontraron una mayor actividad

giberelina en hojas y algo menor en raíces debido a la infección. Además, hubo reducciones en los niveles de ácido abscísico (ABA) en las hojas con sólo pequeños cambios en las raíces. Levy y Krikun (1980) también sugirieron alteraciones en el balance hormonal. Dixon et al. (1988) demostraron que las plantas colonizadas con hongos MA tenían mayores concentraciones de citoquininas en exudados xilemáticos que las no colonizadas. Edriss et al. (1984) mostraron que tres hongos MA podían incrementar considerablemente los niveles de citoquininas en hojas de *Citrus aurantium* fertilizadas con niveles bajos y medios de P y que uno de ellos lo hizo también cuando el nivel de fertilización con P fué muy alto. En un estudio similar, Dixon et al. (1985) examinaron las concentraciones de citoquininas en hojas de *Citrus limon* inoculado con cinco endofitos, encontrando que todas las plantas micorrizadas presentaron mayores concentraciones que las control. Por último, Goicoechea et al. (1995) estudiaron los niveles de citoquininas en plantas de alfalfa micorrizadas o no y sometidas a estrés hídrico, encontrando mayores niveles de dichas hormonas en las plantas micorrizadas así como menor senescencia foliar.

Recientemente, Drüge y Schönbeck (1992) estudiaron el efecto de la colonización MA sobre la transpiración, fotosíntesis y crecimiento de *Linum usitatissimum* en relación con los niveles de citoquininas y encontraron que, al comienzo de la infección micorrízica, los niveles de zeatina fueron disminuidos temporalmente en raíces micorrizadas e incrementados en hojas. No obstante, cuando la simbiosis se había establecido, las raíces colonizadas poseían niveles de zeatina significativamente mayores que las no colonizadas. Los autores concluyen que el aumento interno de los niveles de citoquininas están relacionados con la mejora de la fotosíntesis y el crecimiento en esta planta.

A pesar de que el ABA es una hormona típica de estrés, Danneberg et al. (1992) encontraron que los niveles de ABA eran mayores en raíces de maíz colonizadas por hongos MA. El papel de las hormonas en las relaciones hídricas y en la fisiología de la simbiosis MA es interesante, a pesar de que es de esperar que los hongos formadores de micorrizas arbusculares puedan incrementar los niveles de sustancias reguladoras del crecimiento tanto en plantas como bacterias e incluso hongos patógenos (Ayres y West, 1993).

#### **2.4.3. Resistencia a la sequía en plantas micorrizadas.**

El efecto de la colonización MA sobre la tolerancia al estrés hídrico de una planta constituye una materia de estudio claramente diferenciada de lo que es el efecto de la micorriza sobre las relaciones hídricas de la planta hospedadora en situación de adecuada disponibilidad de agua. De hecho, las mejores relaciones hídricas de las plantas micorrizadas, en una situación de escasez de agua, podrían provocar un "agotamiento" más rápido del agua disponible con lo que la planta micorrizada sufriría un estrés mayor que la no colonizada. No

obstante, al hablar de resistencia a la sequía es necesario integrar todos los mecanismos de que la planta dispone para superar esa situación adversa y estudiar el resultado de todos ellos durante el tiempo que dure la exposición de la planta a la limitación de agua.

La colonización MA ayuda a la planta a recuperarse de un estrés hídrico puntual gracias al incremento de la conductividad hidráulica en sus raíces. Esto fué demostrado por Safir et al., (1972) y Hardie y Leyton (1981), quienes comprobaron que las hojas de las plantas micorrizadas se rehidrataban más rápidamente que las de las plantas no infectadas, recuperando el potencial hídrico y el vigor de las hojas a mayor velocidad.

Augé et al. (1987) sugieren que la micorriza ayuda a las plantas a aclimatarse a un déficit hídrico gracias a sus efectos sobre la elasticidad de los tejidos de las hojas. Las plantas colonizadas muestran una reducción en la elasticidad de sus hojas que facilita el mantenimiento de valores positivos de turgor, cuando el contenido en agua de la hoja es bajo. De modo semejante las raíces micorrizadas mantienen un turgor mayor a distintos valores de hidratación del tejido (tras una sequía prolongada) gracias a un incremento del agua del simplasto; este efecto encontrado por Augé y Stodola (1990) no fué debido, aparentemente ni a un ajuste osmótico ni a una alteración de la elasticidad. La teoría más generalizada es que la pérdida de agua que se produce durante la deshidratación de los tejidos, es mayoritariamente a partir del simplasto. El agua del apoplasto permanece constante dentro de un rango amplio de potenciales hídricos en este tejido.

Cuando las condiciones de sequía son prolongadas, las plantas micorrizadas se muestran más tolerantes que las no micorrizadas (Nelsen y Safir, 1982; Azcón et al., 1988). Allen y Boosalis (1983), Sieverding y Toro (1988) y Ruiz-Lozano et al. (1995a y b) describen efectos diferenciales frente al estrés hídrico debidos a la inoculación con distintos tipos de hongos. Aunque la relación entre los hongos MA y la planta hospedadora se considera, normalmente, no específica, esta relación está muy bien regulada tanto a nivel estructural como fisiológico. La variabilidad en el comportamiento de los endofitos y la existencia de diferentes estrategias simbióticas frente al estrés hídrico así como la compatibilidad con condiciones ambientales diversas sugieren que es posible una selección de especies fúngicas efectivas ante estas situaciones adversas.

Muchos autores han llegado a la conclusión de que la colonización MA puede ser incluso más importante, para determinadas plantas, en condiciones de sequía. Es el caso de las leguminosas, donde se ha comprobado que en situaciones de estrés hídrico la simbiosis tripartita (leguminosa-*Rhizobium*-*Glomus*) puede mantener una actividad fijadora de N<sub>2</sub>, actividad fotosintética y actividad nitrogenasa mayores que cuando la planta sólo esta

asociada a su *Rhizobium* específico (Azcón et al., 1988; Peña et al., 1988; Sanchez-Diaz et al., 1990).

En resumen, aunque se puede decir que las MA mejoran las relaciones hídricas en plantas, sigue siendo una incógnita si el hecho es atribuible a que incrementan los flujos de entrada de agua o si es una respuesta secundaria, consecuencia de la mejora de la nutrición o de algún cambio fisiológico en la planta hospedadora que indirectamente incrementa la resistencia a la sequía (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991).

#### **2.4.3.1. Ajuste osmótico.**

Es importante diferenciar la concentración pasiva de solutos debida a deshidratación del tejido de la originada por acumulación activa de los mismos. Es a este último caso al que se le denomina ajuste osmótico (Turner y Jones, 1980). El ajuste osmótico parece ser un mecanismo importante de resistencia a la sequía para mantener los procesos productivos en condiciones limitantes de agua. Se caracteriza porque posibilita el mantenimiento de la turgencia y de los procesos dependientes de la misma tales como expansión y crecimiento celular, apertura estomática, fotosíntesis etc.

Los solutos que participan en el ajuste osmótico son múltiples pero, por lo general, se trata de iones orgánicos, hidratos de carbono, ácidos inorgánicos y aminoácidos como prolina o betaína. En la mayoría de las plantas una consecuencia metabólica del estrés hídrico o salino es una acumulación rápida de prolina en forma libre, no combinada (Aspinall y Paleg, 1981). Las plantas micorrizadas tienen concentraciones de prolina menores, tanto en parte aérea como en raíz (Nemec y Meredith, 1981; Cooper, 1984), lo que es un indicador de ser más tolerantes a un estrés fisiológico. Las especies vegetales tolerantes a una determinada acción ambiental adversa se catalogan en base a su capacidad para acumular prolina. En condiciones de adecuada humedad se han encontrado niveles de prolina ligeramente inferiores en plantas micorrizadas. Augé et al. (1986 y 1989) indican que las micorrizas facilitan el ajuste osmótico lo que permite mantener el turgor en las hojas y la conductividad en las plantas colonizadas aún cuando el potencial hídrico de las hojas y del suelo sea bajo; en cambio, las plantas no micorrizadas muestran síntomas de estrés hídrico a esos mismos potenciales.

No se conocen las razones por las que estos solutos se acumula y las hipótesis son controvertidas, aunque algunos autores piensan que estas sustancias son agentes osmóticos que se acumulan en el citoplasma y que actúan disminuyendo el potencial hídrico y regulando el equilibrio osmótico en el tonoplasto (Treichel et al., 1984). Otros autores sugieren que los taninos poliflavonoides presentes en las paredes de las células juegan un papel vital en la tolerancia a la sequía. Esos taninos condensados, unidos tanto por enlaces secundarios a

proteínas ricas en prolina y/o por uniones a hemicilulosas pueden producir un incremento de la elasticidad de la pared y por tanto disminuir el colapso de las células. Paleg et al. (1984) y Pizzi y Cameron (1986) estudiaron la interacción entre la glutamina sintetasa y el PEG en plantas de cebada. Se sabe que el PEG precipita la GS y estos autores encuentran que la prolina disminuye la cantidad de enzima precipitada por el PEG, ejerciendo así un efecto protector frente a este agente capaz de precipitar proteínas. Así, propusieron que un sistema que contenga proteínas, en el que están presentes altas concentraciones de prolina y/o betaína, estará mejor protegido contra las consecuencias desfavorables producidas por la deshidratación. La prolina libre también actúa decreciendo la peroxidación de lípidos celulares responsables de la permeabilidad y estabilidad de la membrana.

#### **2.4.3.2. Estimulación de procesos fotosintéticos.**

En los últimos años ha habido un gran número de trabajos que indican que los hongos MA, independientemente de la nutrición fosforada de la planta huésped, pueden incrementar las tasas transpiratorias o la conductancia estomática (Augé et al., 1986; Augé, 1989) y mejorar la fotosíntesis (Johnson, 1984; Brown y Bethlenfalvay, 1987; Sánchez-Díaz et al., 1990). Considerando una posible limitación estomática de la fotosíntesis (Jones, 1985), esto apunta hacia una base fisiológica común, habiéndose sugerido también la participación de fitohormonas (Levy y Krikun, 1980; Allen, 1985; Dehne, 1986).

Drüge y Schönbeck (1992) encontraron incrementos en las tasas transpiratorias de plantas de lino micorrizadas, lo cual indica un aumento de la apertura estomática, que, primariamente, no era causada por una mejora del aporte de agua ya que estas plantas también mostraban los mismos o, incluso, menores niveles de potencial hídrico en hojas que las plantas no micorrizadas. Esta alteración en la regulación de los estomas debida a la colonización MA ha sido, también, descrita en otras plantas (Allen y Boosalis, 1983), y es muy improbable que sea debido a un efecto nutricional. Parece, más bien, que el cambio en el estado hídrico de la planta podía estar relacionado con los niveles de fitohormonas, particularmente citoquininas y ABA, en el apoplasto de las hojas, las cuales juegan un papel decisivo en la regulación de los estomas (Mansfield, 1987). Otros mecanismos que podrían explicar el efecto encontrado serían un aumento en el transporte de agua a través de las hifas extrarradicales (Hardie, 1985; Faber et al., 1991), menor resistencia al agua de las raíces (Safir et al., 1972) y mayor número de haces vasculares (Daft y Okusanya, 1973).

En cualquier caso, y, aunque la limitación estomática de la fotosíntesis puede haber sido sobreestimada durante mucho tiempo (Farquar y Sharkey, 1982), el hecho de encontrar mayor asimilación de CO<sub>2</sub> en las plantas micorrizadas coincidiendo con mayores tasas de

transpiración sugiere pensar que la mejora de la fotosíntesis está, al menos en parte, causada por el aumento de la apertura estomática.

No obstante, los incrementos de la fotosíntesis en las plantas micorrizadas en relación con la mayor tasa transpiratoria indican una mayor eficiencia en el uso del agua y apuntan, también, hacia la implicación de otros factores no relacionados con los estomas (Drüge y Schönbeck, 1992). En este sentido, también se ha encontrado un mayor contenido en clorofila en las hojas de plantas de lino micorrizadas en comparación con las no micorrizadas (Drüge, 1992).

#### **2.4.3.3. Captación directa de agua por las hifas externas del hongo.**

Hardie, (1985) comparó los flujos de transpiración en plantas micorrizadas intactas y plantas micorrizadas a las que dejó desprovistas de sus hifas extrarradicales, encontrando que estas hifas externas son importantes para la captación de agua, puesto que incrementan la superficie de absorción de la raíz. Este autor sugiere que la eliminación de las diferencias en la captación de agua, entre las plantas micorrizadas y no, que se produce al adicionar P, podría ser debida, al menos en parte, a reducciones en la cantidad de hifas extrarradicales que se producen cuando hay alta disponibilidad de P en el medio. No obstante, esta hipótesis ha sido considerada improbable por algunos autores (Fitter, 1985). Sin embargo, el hecho de que la colonización MA beneficie a las plantas en condiciones de estrés hídrico está totalmente probado (Allen y Allen, 1986) y ésta, junto con otras razones, deben justificarlo.

Sanders y Tinker (1973) en un intento de atribuir la captación extra de agua por las plantas micorrizadas a las hifas del hongo calcularon la velocidad de transporte del agua a través del micelio fúngico. El valor calculado, por punto de entrada, era, según ellos, "ridículamente alto" y sugirieron que aunque una parte del agua absorbida por el huésped fluyó a través de las hifas, la cantidad era muy pequeña como para afectar a la economía hídrica de la planta. Posteriormente, Allen (1982) también calculó el flujo de entrada de agua a las hifas, y el valor obtenido por punto de entrada fue  $2,8 \cdot 10^{-5} \text{ mg s}^{-1}$ , lo cual, junto al hecho de que la longitud total de hifas puede alcanzar los  $50 \text{ m.cm}^{-3}$  de suelo, parece suficiente para mantener relaciones hídricas adecuadas. Por último, Ruiz-Lozano y Azcón (1995) demostraron, también, la capacidad de las hifas fúngicas para captar agua desde compartimentos a los que las raíces no tenían acceso.

#### 2.4.3.4. Alteración de actividades enzimáticas específicas.

##### *Actividad Superóxido Dismutasa.*

La respuesta de la planta al estrés hídrico es un fenómeno complejo que parece implicar la síntesis de poliaminas y un nuevo grupo de proteínas cuya función es desconocida (Caplan et al., 1990). El ácido abscísico es muy importante en la respuesta a la sequía debido a que estimula el cierre de las células guarda de los estomas, reduciendo así la pérdida de agua. Este proceso también reduce la disponibilidad de CO<sub>2</sub> para la fotosíntesis, lo cual puede conducir a la formación de formas reactivas de oxígeno por el desvío de electrones en los fotosistemas, originando, a su vez, un estrés oxidativo en la planta. Por lo tanto, los mecanismos que reduzcan este estrés oxidativo deben jugar un destacado papel en la tolerancia a la sequía.

Las superóxido dismutasas (SOD) son un grupo de metaloenzimas que catalizan el paso de los radicales superóxido a oxígeno molecular y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fridovich, 1986). Estas enzimas constituyen una defensa primaria de las células contra el efecto tóxico derivado de los radicales O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Rabinowitch y Fridovich, 1983; Fridovich, 1986).

Existen tres formas moleculares de SOD que contienen Mn, Fe o Cu y Zn como grupo prostético (Fridovich, 1986), aunque también se han encontrado formas híbridas de SOD que contienen diferentes combinaciones de estos metales (Bannister et al., 1987; Barkley y Gregory, 1990).

En la última década, diferentes estudios de la superóxido dismutasa en nódulos de leguminosas han indicado la importancia de la SOD como sistema antioxidante en los procesos de fijación del N<sub>2</sub>, protegiendo al enzima nitrogenasa (Puppo et al., 1982; Becana et al., 1989). Por el contrario hay muy pocos estudios sobre la SOD en la simbiosis MA.

En un estudio reciente Palma et al. (1993) estudiaron la actividad SOD en plantas de trébol micorrizadas. Ellos encontraron dos isoenzimas nuevos en las raíces de trébol colonizado por *Glomus mosseae*, Mn-SOD II y mycCu,Zn-SOD. La primera de ellas se encontró también en nódulos de *Rhizobium* en trébol, mientras que la segunda (mycCu,Zn-SOD) resultó específica para la asociación *Glomus mosseae*-raíces de trébol. La síntesis de nuevas SODs en raíces micorrizadas y el incremento de la actividad de las ya existentes sugiere que en las raíces micorrizadas se produce un aumento de la producción de radicales libres superóxido. La función de las SODs inducidas podría explicar la protección de las células vegetales contra estos radicales.

El origen de esta sobreproducción de radicales superóxido es desconocido, aunque los autores piensan que podría estar relacionado con la desorganización de las paredes celulares durante la penetración del hongo debido a la mayor concentración de oxígeno en el medio. No obstante, en diferentes tipos de células se ha encontrado un aumento en la producción de radicales superóxido como resultado de la acumulación de oxígeno (Halliwell y Gutteridge, 1989), estrés por metales (del Río et al., 1991) senescencia (Halliwell y Gutteridge, 1989), procesos patógenos (Buonario et al., 1987) y estreses ambientales (Tsang et al., 1991). En todos estos casos los radicales libres parecen jugar un importante papel en el daño celular, y la inducción de diferentes SODs es un buen mecanismo de protección celular (del Río et al., 1991). En este sentido, Dhindsa y Matowe (1981) compararon las actividades SOD y catalasa en dos plantas, una tolerante a la sequía, *Tortula ruralis*, y otra sensible, *Cratoneuron filicinum*. Durante el estrés, la tolerante a la sequía mostró un aumento en los niveles de ambas enzimas, que se traducía en menor peroxidación de los lípidos, mientras que en la planta sensible ocurrió lo contrario.

Además de sus actividades normales en las plantas, las SODs están, también, asociadas a situaciones de estrés (Tsang et al., 1991). Así mismo, se sabe que el déficit hídrico tiende a desviar el potencial redox celular a un estado más oxidado, y a aumentar las concentraciones de radicales libres, cambios, ambos, lesionantes para la célula. No obstante, como acabamos de ver (Palma et al., 1993), las plantas micorrizadas poseen una serie de mecanismos antioxidantes que les protegen contra la producción de dichos radicales, y, aunque, hay evidencias que sugieren que las diferencias en tolerancia a la sequía pueden basarse en una expresión diferencial de los enzimas involucrados en estos procesos, se requiere más investigación antes de formular conclusiones y mecanismos claros.

#### *Actividad Nitrato Reductasa.*

La nitrato reductasa (NR) cataliza el primer paso de la reducción asimiladora del  $\text{NO}_3^-$  en las plantas superiores. En general, los enzimas aislados de plantas vasculares son dependientes del NADH como donador de los electrones, mientras que la actividad NR en los hongos suele requerir NADPH (Beevers y Hageman, 1980). La mayoría de las investigaciones sobre enzimas fúngicos se han llevado a cabo en *Aspergillus niger* y *Neurospora crassa* y hay evidencias de que existe una actividad NR dependiente del NADH en algunas levaduras.

En las plantas, la conversión del nitrato a amonio es un proceso con dos pasos enzimáticos: el primero consiste en una reducción del nitrato a nitrito por dos electrones, y está catalizado por la NR. En eucariotas, el donador fisiológico de electrones es el NADH o el

NADPH. El segundo paso es una reducción del nitrito a amonio mediante seis electrones, y está catalizado por la nitrito reductasa (Hoff et al., 1992)

El enzima NR tiene un peso molecular alto, que varía de 220 a 600 kDa dependiendo de los organismos en que se encuentre (Notton y Hewitt, 1978). Contiene varios grupos prostéticos como el FAD, citocromo  $b_{557}$  o molibdeno. El complejo NR consta de dos subunidades que participan secuencialmente en la transferencia de electrones desde el NAD(P)H al nitrato.

La actividad NR está presente en las células de parte aérea y también en las de raíz aunque, la mayor parte de la reducción del nitrato se da en las hojas. La contribución de la raíz a este proceso parece ser importante en los primeros estadios de desarrollo vegetal (Oaks, 1979). Además, la capacidad de la raíz para asimilar nitrato está relacionada con su contenido en carbohidratos (Minotti y Jackson, 1970), aunque el mecanismo por el que la energía reductora de éstos se transfiere a un reductor fisiológico es desconocido (Guerrero et al., 1981). La localización intracelular de la NR en los tejidos verdes aún no está clara porque, aunque frecuentemente nos referimos a ella como enzima citoplasmático, en algunos casos, se ha asociado, también, a los cloroplastos (Losada y Guerrero, 1979).

Ho y Trappe (1975) obtuvieron evidencia directa de la actividad NR en los hongos micorrízicos, *Glomus mosseae* y *G. macrocarpus*, puesto que encontraron que al incubar esporas esterilizadas en superficie de estos hongos en un medio con  $\text{NO}_3\text{K}$ , el nitrato era reducido progresivamente a nitrito. Carling et al. (1978) encontraron que tanto la colonización MA como una fertilización con fosfato producían una mayor actividad NR en las hojas y nódulos de plantas de soja. Posteriormente Oliver et al. (1983) llegan a la misma conclusión pero incluyendo ya el estudio de las raíces, que son los órganos colonizados por los hongos MA. El efecto directo (mediado por el fósforo) de la colonización sobre la actividad NR se explica por los altos requerimientos de fósforo que presenta este enzima (Beevers y Hageman, 1980).

Pese a que la actividad NR fué detectada (Ho y Trappe, 1975) en esporas de hongos MA, los efectos de la micorrización sobre la actividad NR en tejidos vegetales han sido escasamente descritos y parecen ser debidos, en algunos casos, al mejor estado fosforado de las plantas (Oliver et al., 1983). Hasta ahora, un efecto directo del hongo sobre la asimilación del nitrato, si es que existe, es muy pequeño y por lo tanto no hay evidencia de que la actividad NR del hongo sea significativa en la simbiosis (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988). No obstante, los incrementos de actividad en la plantas micorrizadas pueden llegar a ser importantes, aunque el hongo no actúe de forma directa. Ello se encuadra en el conjunto de

cambios fisiológicos y bioquímicos que operan tras el establecimiento de la simbiosis (Azcón et al., 1992).

En relación con el estrés hídrico, se sabe que la actividad nitrato reductasa disminuye en hojas de plantas de maíz expuestas a deshidratación (Shaner y Boyer, 1976). Si la deshidratación es suficientemente rápida, no se observa disminución durante, aproximadamente, 2 horas. Esto indica que ni los valores bajos de  $\Psi$  ni la reducción en el contenido hídrico en las hojas inhibe directamente la actividad. En realidad la actividad enzimática desciende cuando disminuye el flujo de nitrato desde las raíces hasta las hojas. Ello es debido a que, en hojas de maíz, la nitrato reductasa es un enzima de vida corta y ha de sintetizarse continuamente. El nitrato es el inductor de su síntesis y llega, fundamentalmente, a través de la corriente transpiratoria procedente de las raíces (Shaner y Boyer, 1976). Un comportamiento similar se ha encontrado en plantas de alfalfa sometidas a sequía (Aparicio Tejo y Sánchez-Díaz, 1982).

### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1. Suelo utilizado.**

##### *Características y procedencia.*

En todos los ensayos se utilizó suelo procedente de una parcela situada en la finca de la Estación experimental del Zaidín (Granada). Antes de su utilización fué tamizado a través de un tamiz de 2 mm. Es un suelo franco con un pH de 8.1. El contenido de nutrientes por kg es el siguiente: 6.2 mg de P disponible (P extraíble con NaHCO<sub>3</sub>), 1.8 mg de NO<sub>3</sub>- N, 0.8 mg de NH<sub>4</sub>- N, 132.0 mg de K y 1.8% de materia orgánica. En cuanto a su textura, contiene 35.8% de arena, 43.6% de limo y 20.5% de arcilla. Para ser utilizado en ensayos de invernadero se mezcló con arena de cuarzo libre de nutrientes en proporción 1/1 ó 1/9 v/v, dependiendo del ensayo.

##### *Eliminación de propágulos de hongos MA en el suelo.*

Para eliminar los propágulos de los hongos formadores de micorriza existentes en el suelo se procedió a esterilizar la mezcla suelo-arena en autoclave 1 h a 100 °C durante tres días consecutivos para, posteriormente, reintroducir los demás microorganismos nativos del suelo, se preparó un filtrado (< 25 µm) de suelo natural. Este filtrado se obtiene dejando en maceración varias horas, a temperatura ambiente, suelo y agua (en proporción 1/1 v/v), posteriormente se filtra a través de un papel Watman nº 1 y se adiciona al suelo previamente tinalizado, de esta manera se restituye el componente biológico exento de propágulos formadores de micorizas arbusculares.

#### **3.2. Planta utilizada.**

La planta seleccionada para este estudio fué la lechuga (*Lactuca sativa* L. cv. Romana). La razón de su elección radica en el hecho de ser una planta bastante sensible al estrés hídrico y poseer un sistema foliar adecuado para las determinaciones fisiológicas que se pretendían realizar.

#### **3.3. Fertilización de las plantas.**

Durante el periodo de cultivo, las plantas fueron fertilizadas con solución nutritiva (Hewitt, 1952), carente de fósforo a razón de 10 mL por 500 g de sustrato, cada semana, excepto en los estudios realizados con una mezcla de suelo/arena en proporción 1/9 v/v, en

que se utilizó la solución nutritiva descrita por Hepper y O'Shea (1984) modificada (Ruiz-Lozano y Azcón, 1995b). En aquellos tratamientos donde se aplicó P, éste fué aportado en forma de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (7 mg por maceta cada semana). Esta dosis fué establecida en un ensayo previo por igualar el crecimiento así como la concentración tisular de P de las plantas fertilizadas, con respecto a las micorrizadas.

### **3.4. Determinaciones generales.**

#### *Peso de las plantas y contenido en nutrientes.*

Al cosechar el ensayo, se procedió a separar el sistema radical de la parte aérea, determinándose el peso fresco y seco de las mismas. Trás el secado (36 h en estufa a 70°C), se determinó la concentración foliar de macronutrientes. Las determinaciones analíticas efectuadas fueron: N (método micro-Kjeldahl), P (método de Olsen, propuesto por Olsen y Dean (1965), K (por fotometría de llama), Ca y Mg (ambos por espectrometría de absorción atómica) utilizando un espectrofotometría Perkin-Elmer modelo 5000 (Lachica et al., 1973).

#### *Tinción de raíces micorrizadas y cuantificación de la infección.*

Para detectar y cuantificar el nivel de colonización MA se toma una alícuota del sistema radical mediante dos cortes en la zona central del mismo, que permiten una franja de raíces de 1 cm, aproximadamente. Dicha muestra se trata con KOH al 10% durante 1h a 90-100°C, se enjuaga varias veces con agua y se adiciona ClH 1N durante 2-3 minutos. Después, las raíces se tiñen con azul tripan al 0.05% en ácido láctico (Phillips y Hayman, 1970). Esta tinción permite visualizar claramente las estructuras fúngicas en la raíz, ya que muestran un color azul fácilmente distinguible. La cuantificación de la infección se realizó mediante la técnica de las intersecciones en placa de Giovannetti y Mosse (1980). Es un método basado en la utilización de una placa cuadrada de 10 cm de lado. Toda la superficie de la placa está distribuida en cuadrículas de 1.5 cm y sobre ella se extienden, al azar, los fragmentos de raíces teñidas. Mediante examen con microscopio binocular de disección (30 a 40 aumentos), se puede observar fácilmente si las raíces son portadoras o no del hongo MA. Para evaluar el porcentaje de raíces micorrizadas se determina el número de intersecciones de las raíces con las cuadrículas que presentan infección respecto al número total de intersecciones. Para obtener datos consistentes, el número de intersecciones no debe ser inferior a 200.

#### *Análisis estadístico de los datos.*

En todos los ensayos los datos se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías. Cuando los efectos fueron significativos ( $P < 0.05$ ) las diferencias entre las

medias se evaluaron siguiendo un diseño ortogonal mediante la técnica de la mínima diferencia significativa (MDS) utilizando el test de rango múltiple de Duncan (Duncan, 1955). Para los valores que se expresaban en porcentaje, se realizó una transformación Arc sen de los mismos antes del análisis estadístico.

### **3.5. Evaluación del grado de compatibilidad funcional y efectividad de siete hongos MA en el mantenimiento de las relaciones hídricas de plantas de lechuga sometidas a periodos sucesivos de estrés hídrico.**

#### **3.5.1. Diseño experimental.**

El ensayo constó de 9 tratamientos. En 7 de ellos se inocularon distintas especies de hongos MA pertenecientes al género *Glomus*, mientras que los otros 2 eran un control sin fertilizar y un control fertilizado con P. Cada tratamiento constó de 10 repeticiones (90 macetas en total). Para cada tratamiento, la mitad de las plantas se mantuvieron en suelo con un potencial hídrico de -0.04 MPa (capacidad de campo) hasta el final del experimento (11 semanas después de la siembra). La otra mitad de las plantas fueron sometidas a periodos sucesivos de estrés hídrico de una semana de duración cada uno, en los cuales el potencial hídrico del suelo pasó de -0.06 MPa (semana 7), -0.10 MPa (semana 8) hasta -0.17 MPa (semana 9). Después de estos periodos de estrés, las plantas fueron regadas de nuevo hasta un potencial hídrico en el suelo de -0.04 MPa y así se mantuvieron durante las últimas 2 semanas. El objetivo final era determinar, no sólo la tolerancia a los incrementos de estrés, según los endofitos inoculados, sino también, la capacidad de recuperación de los parámetros fotosintéticos después del progresivo estrés hídrico.

#### **3.5.2. Suelo y material biológico.**

El suelo utilizado fué diluido con arena de cuarzo libre de nutrientes en proporción 1/1 v/v y esterilizado según la metodología habitual. Cada maceta contenía 500 g de la mezcla de suelo y arena estéril. Las especies de hongos utilizadas fueron *Glomus etunicatum* (Becker y Gerd.), *Glomus fasciculatum* (Thax. y Gerd.) Gerd. y Trappe, *Glomus mosseae* (Nicol. y Gerd.) Gerd. y Trappe, *Glomus deserticola* (Trappe, Bloss y Menge), *Glomus caledonius* (Nicol. y Gerd.) Trappe y Gerd., *Glomus intraradices* (Schenck y Smith) y *Glomus occultum* (Walker). Todas ellas pertenecían a la Colección de la Estación Experimental del Zaidín. Los inóculos contenían suelo rizosférico con esporas, micelio y fragmentos de raíces micorrizadas obtenidas de un cultivo en maceta de *Allium cepa* L. Los 7 inóculos ensayados poseían similares características infectivas (una media de 30 esporas por g y 75% de raíces infectadas). En el momento de la siembra, se adicionaron 5 g del correspondiente inóculo por maceta, en contacto con las semillas de *Lactuca sativa* L. En los controles también se adicionó

la misma cantidad de inóculo, pero esterilizado. Con posterioridad, se adicionaron 5 mL de un filtrado del inóculo para asegurar la misma población microbiana en todos los tratamientos, exceptuando los propágulos MA. Se dejó una sola plántula por maceta (seleccionada de entre las procedentes de las 4 semillas sembradas).

### **3.5.3. Condiciones de cultivo.**

Las plantas crecieron en una cámara de cultivo con temperatura y humedad relativa de 25°C y 70%, respectivamente, durante el día y 15°C y 80% las nocturnas. El fotoperiodo fué de 14h y la intensidad luminosa de 500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Durante las 6 primeras semanas de crecimiento se aportaba agua diariamente para mantener los niveles de humedad del suelo en torno a la capacidad de campo (-0.04 MPa). En este estadio del crecimiento (una vez micorrizados los tratamientos inoculados) se iniciaron los periodos sucesivos de estrés hídrico en la mitad de las plantas de cada tratamiento. Para ello se redujo la aplicación de agua hasta mantener un potencial hídrico en el suelo de -0.06 MPa (séptima semana), -0.10 MPa (octava semana) y -0.17 MPa (cerca del punto de marchitamiento de la planta) (novena semana de cultivo). Después de estos tres periodos de estrés hídrico las plantas fueron regadas hasta que el potencial hídrico del suelo alcanzó -0.04 MPa (capacidad de campo) y así se mantuvieron durante las dos últimas semanas previas a la cosecha.

### **3.5.4. Determinaciones.**

A las once semanas de crecimiento las plantas fueron cosechadas, determinándose el peso seco de la parte aérea y del sistema radical. Una alícuota del sistema radical se utilizó para cuantificar la presencia de infección MA en las raíces.

Las medidas de actividad fotosintética, tasa transpiratoria, conductancia estomática y eficiencia en el uso del agua se realizaron, semanalmente, a partir de la sexta semana de cultivo hasta el final del experimento, dos horas después de que se iniciara el periodo de luz para las plantas. Para estas determinaciones se utilizó un analizador de CO<sub>2</sub> infrarrojo integrado y portátil (Modelo LCA-3, Analytical Development Company) y una lámpara halógena con una intensidad luminosa de 1180  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Long y Hällgren, 1987).

El contenido foliar de prolina se cuantificó por colorimetría (Bates et al., 1973). Para ello, se homogeneizó 1 g de material vegetal fresco en 20 mL de solución acuosa de ácido sulfosalicílico al 3% y el homogenado se filtra a través de papel Whatman n° 2. Alícuotas de 2 mL de filtrado se hicieron reaccionar con 2 mL de nihidrina ácida y 2 mL de ácido acético glacial durante 1 hora a 100 °C. La reacción se detuvo introduciendo los tubos en baño de hielo picado. La mezcla de reacción se extrae con 4 mL de tolueno, agitando fuertemente durante

15-20 segundos en un agitador mecánico, tras lo cual el cromóforo contenido, ahora, en el tolueno se deja a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 530 nm, utilizando tolueno como blanco. La concentración de prolina se determina a partir de una curva patrón de la misma. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{moles de prolina. g}^{-1}$  pf (peso fresco).

Reactivo de nihidrina ácida: Se prepara calentando 1.25 g de nihidrina en 30 mL de ácido acético glacial y 20 mL de ácido fosfórico 6 M. El reactivo se conserva a 4 °C durante no más de 24 h.

Las medidas del potencial hídrico en el suelo se realizaron siguiendo las directrices del Catálogo Americano de Métodos Utilizados para Colección de Muestras de Suelo y su Estudio en Laboratorio (U.S. Department of Agriculture, 1967). Para ello, se colocan las muestras de suelo en un plato poroso y se adiciona agua para humedecer las muestras desde abajo. Las muestras, así humedecidas, se cubren con plástico durante toda la noche. Al día siguiente, se elimina el exceso de agua en el plato y se someten a la presión deseada hasta que no se puede extraer más agua (alrededor de 2 días). El contenido en agua se calculó por pesada de las mismas antes y después de secar a 105°C durante 24 h. De esta manera se estableció la relación existente entre humedad del suelo y potencial hídrico del mismo en un rango comprendido entre 1/3 atmósfera y 15 atmósferas, resultando:

$$y = 2596 x (-4.4)$$

$$r = 0.99$$

Donde:

y = potencial hídrico del suelo en atmósferas.

x = humedad del suelo en %.

### **3.6. Estudio del efecto del estrés salino sobre el crecimiento, ajuste osmótico y procesos fotosintéticos en plantas de lechuga.**

#### **3.6.1. Diseño experimental.**

El ensayo consistió en un bloque factorial con dos factores: (1) inoculación (tres especies de hongos formadores de MA, un control no fertilizado y otro fertilizado con P) y (2) tres niveles de salinidad en el suelo (3, 4 ó 5 g ClNa por Kg de suelo). De cada tratamiento se prepararon cinco repeticiones, lo cual supone un total de 75 macetas.

### **3.6.2. Suelo y material biológico.**

El suelo utilizado en este experimento se preparó de la forma ya descrita. Antes de la siembra de las plantas se procedió a determinar su conductividad eléctrica (Rhoades, 1982), que resultó ser de 0.7 dS/m. Las macetas utilizadas contenían 500 g de la mezcla de suelo y arena (1/1 v/v) estéril. A partir de los datos del experimento anterior, se seleccionaron los tres hongos MA que mostraron el comportamiento más eficaz y, a la vez, diferencial frente al estrés hídrico. Los hongos seleccionados procedían del mismo lote del ensayo anterior, con similares características infectivas. Estos hongos fueron: *Glomus mosseae* (Nicol. y Gerd.) Gerd. y Trappe, *Glomus fasciculatum* (Thax. y Gerd.) Gerd y Trappe y *Glomus deserticola* (Trappe, Bloss y Menge). La inoculación se efectuó por el procedimiento ya descrito.

### **3.6.3. Condiciones de cultivo.**

Las plantas crecieron en cámara de cultivo bajo las condiciones de temperatura, humedad e iluminación descritas con anterioridad. Después de 4 semanas de crecimiento se inició la aplicación de la sal para conseguir tres niveles salinos. Para ello, se adicionaron diluciones apropiadas de una solución 2M de NaCl, en días alternativos, para evitar así un choque osmótico brusco (Grieve y Walker, 1983). Los niveles de sal aplicados fueron 3, 4 y 5 g NaCl por kg de suelo seco, los cuales indujeron conductividades eléctricas de 2.5, 3.2 y 4.0 dS/m respectivamente. Las plantas se mantuvieron durante 7 semanas más en estas condiciones.

### **3.6.4. Determinaciones.**

A las 11 semanas de crecimiento se determinó el peso seco de raíz y parte aérea. También se determinó el porcentaje de raíces micorrizadas. La concentración de prolina se determinó según el método de Bates et al., (1973).

La actividad fotosintética, tasa transpiratoria, conductancia estomática y eficiencia en el uso del agua se midieron según se describe en el ensayo anterior. La concentración de nutrientes en parte aérea se determinó tal como se indica en el apartado 3.4. de esta sección.

### **3.7. Determinación del efecto del estrés salino sobre la capacidad infectiva y efectividad simbiótica de un hongo de colección comparado con un aislado autóctono adaptado a zonas salinas.**

#### **3.7.1. Diseño experimental.**

*Primera Parte.* El ensayo constó de dos tratamientos microbianos: *G. deserticola*, (hongo de colección seleccionado por ser el más efectivo en la protección de la planta frente al estrés, tanto hídrico como salino); *Glomus* sp. (que había sido aislada de zonas salinas) y un control no micorrizado. Estos tres tratamientos se combinaron con tres niveles de ClNa en el medio (0.25, 0.5 ó 0.75 g de ClNa por kg de suelo). En este ensayo se empleó un sistema experimental (Figura A) consistente en tres compartimentos separados entre sí por mayas de 60  $\mu$ m de luz que permiten el paso del micelio fúngico pero evitan el de las raíces. El diseño empleado permite evaluar el efecto de la sal en los distintos estadios de la micorrización: germinación de las espores, infección y desarrollo extraradical. Los hongos MA fueron inoculados en a) el mismo compartimento donde crecían las plantas (Figura A, compartimento A), o bien, b) a 11 cm, en un compartimento distinto (Figura A, compartimento B), separado del anterior por una tela de nilón de 60  $\mu$ m de luz de maya, al que las raíces de las plantas no tenían acceso. De esta forma serían las hifas fúngicas las que tendrían que acceder al compartimento radical para infectar a la planta hospedadora, evaluándose, así, el posible efecto de la sal sobre la capacidad infectiva de los endofitos. Cada tratamiento constaba de 4 repeticiones, obteniéndose un total de 60 plantas.

*Segunda Parte.* Para evaluar si la capacidad infectiva del micelio generado por la micorrización había sido afectada por la salinidad del medio se procedió a sembrar semillas de *Lactuca sativa* L. en el compartimento C, que contenía 300 g de la mezcla de suelo y arena situada en el extremo opuesto al que contenía las plantas que crecían en la primera parte (Figura A, compartimento C).

#### **3.7.2. suelo y material biológico.**

El suelo usado para este experimento fue diluido con arena de cuarzo en la misma proporción hasta ahora descrita y esterilizado según la metodología habitual, ya expuesta. 1.2 Kg de la mezcla de suelo y arena estériles fue depositado en módulos rectangulares de 10 cm de profundidad, 21 cm de longitud y 5 cm de anchura (Figura A). En él se establecieron tres compartimentos, dos de ellos (A y C) contenían 300 g de sustrato y estaban limitados por bolsas de nilón de 60  $\mu$ m de luz de maya. En el compartimento A se sembraron las semillas y crecieron las plantas. El compartimento B (de 600 g de capacidad) ocupaba la parte central del dispositivo experimental. Previo a la siembra de las semillas todo el sustrato fue salinizado

con soluciones que aportaban 0.25 g ClNa por kg de suelo (1.1 dS/m), 0.5 g ClNa por kg de suelo (1.4 dS/m), ó 0.75 g ClNa por kg de suelo (1.7 dS/m). Estos 3 niveles de salinidad se habían seleccionado en un ensayo preliminar por no inhibir la germinación de las semillas de lechuga. El hongo de colección seleccionado por su alta eficacia frente al estrés fué *Glomus deserticola* (Trappe, Bloss y Menge). El inóculo tenía 47 esporas por gramo y fragmentos de raíces con un 85% de colonización, y procedía de un cultivo en maceta de *Lactuca sativa* L. Por su parte, el inóculo de *Glomus* sp. (aislado autóctono) había sido obtenido en las mismas condiciones que el anterior y contenía 30 esporas por gramo y raíces con un 80% de colonización. La inoculación con ambos hongos se realizó siguiendo el procedimiento habitual, o bien junto a las semillas (compartimento A) o a 11 cm de éstas, en el compartimento B. En los tratamientos control se procedió, de la manera descrita en el apartado 3.1., a restaurar la microbiota natural del suelo, exceptuando los propágulos MA.

### 3.7.3. Condiciones de cultivo.

Las plantas fueron cultivadas en invernadero con 16 h de fotoperiodo, 80% de humedad relativa y un rango de temperaturas medio de 28-32°C. La intensidad luminosa fué de 800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  según se determinó con un medidor de intensidad luminosa LICOR, modelo LI-188B. Las macetas fueron mantenidas diariamente a capacidad de campo (-0.04 MPa), evitando así la interferencia del estrés hídrico con el salino. Las plantas fueron cosechadas a las 12 semanas. El sistema radical fué mantenido en el compartimento A durante el tiempo que duró la segunda parte de este ensayo. En la segunda parte se sembraron semillas de lechuga en el compartimento C, situado al otro extremo del módulo que había contenido hasta ahora a las plantas. Estas plantas crecieron en las mismas condiciones de invernadero durante 5 semana.

### 3.7.4. Determinaciones.

*Primera Parte.* Después de un periodo de crecimiento de 12 semanas, se procedió a evaluar los parámetros de producción de biomasa (pesos frescos y secos de parte aérea y raíz), así como los contenidos de N y P de las plantas. Todo ello, siguiendo el procedimiento habitual, ya mencionado. Igualmente, se determinó si la capacidad infectiva de los hongos había sido afectada por la salinidad presente en el medio en función de la localización de la fuente de inóculo. Para ello se tomó una porción del sistema radical y se procedió a su tinción.

*Segunda Parte.* Trás 5 semanas de cultivo se evaluó la producción de biomasa por las plantas, así como el nivel de colonización de las raíces.

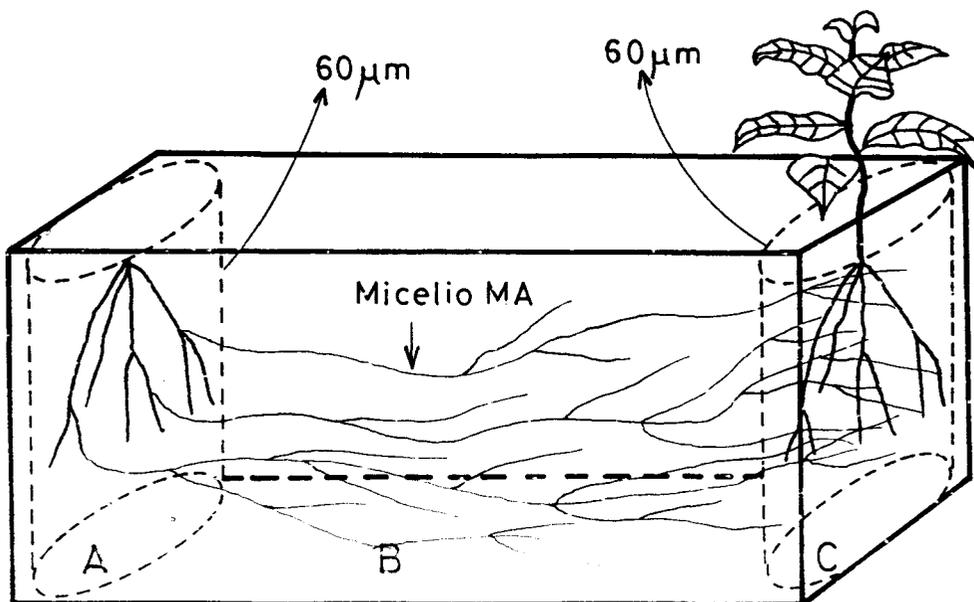
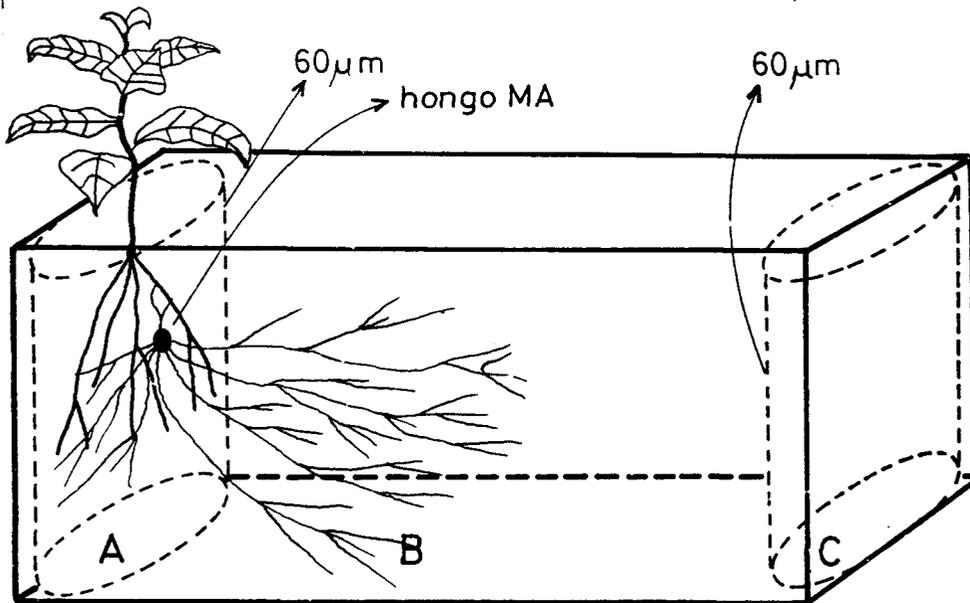
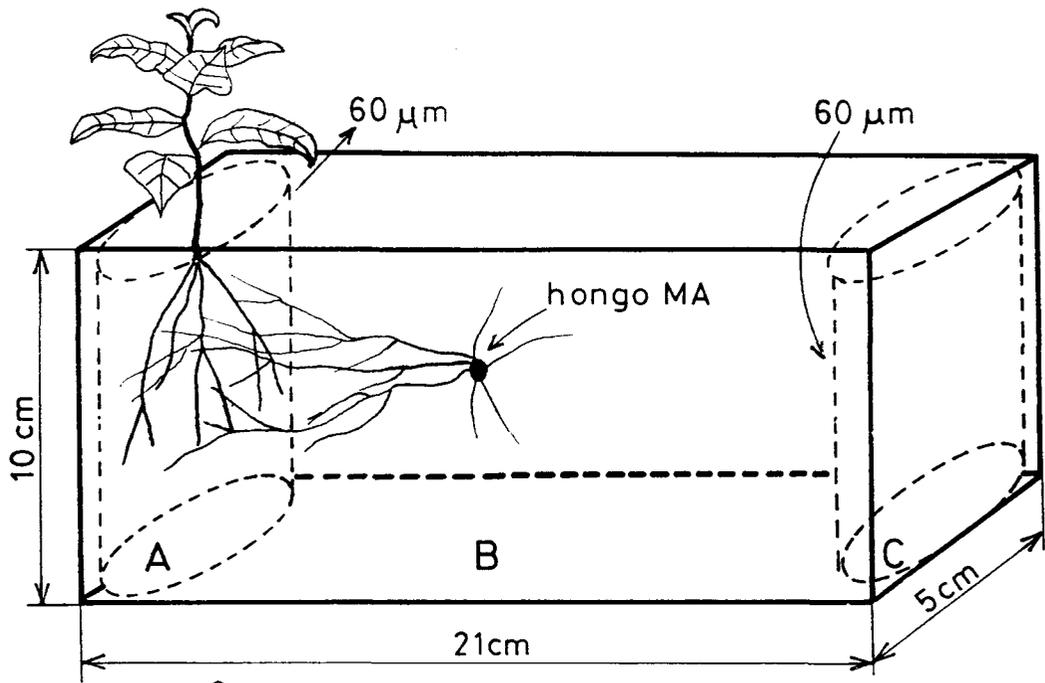


Figura A

### **3.8. Estudio de la contribución de las hifas fúngicas a la captación de agua por plantas micorrizadas.**

#### **3.8.1. Diseño experimental.**

Consistió en un bloque factorial con dos factores: 1) Tratamientos micorrizados con 2 especies fúngicas y un tratamiento control fertilizado con P y 2) Aplicación de tres niveles hídricos en un compartimento a 10 cm de la raíz, al que sólo tenían acceso las hifas fúngicas. Cada tratamiento presentaba 5 repeticiones, con lo que resultaban 45 unidades experimentales.

Las plantas crecieron en contenedores divididos en varios compartimentos, separados entre sí por una maya de nilón de 60  $\mu\text{m}$  de poro (Figura B). Los compartimentos eran: un compartimento donde se desarrollaban las raíces y estructuras micorrízicas adheridas (CR), separado por la maya de nilón, que permitía el paso de las hifas fúngicas pero no de las raíces (Tobar et al., 1994 a y b), de los dos compartimento donde se desarrollaban las hifas (CH-1 y CH-2), el central (CH-1), que contenía arena, y el inferior (CH-2), lleno de mezcla de suelo y arena en proporción 1/1 v/v.

#### **3.8.2. Suelo y material biológico.**

El suelo fué esterilizado según el procedimiento ya mencionado. Los contenedores se llenaron con 300 g de mezcla estéril de suelo y arena (1/1 v/v) en el CR y en el CH-2, mientras que el CH-1 contenía 400 g de la mezcla, pero en proporción 1/9 v/v. De esta manera la distancia existente entre el CR y el CH-2, dónde se inyectaba el agua, era de 10 cm.

Los hongos seleccionados para este experimento fueron *Glomus fasciculatum* (Thaxter y Gerd.) y *Glomus deserticola* (Trappe, Bloss y Menge). Como siempre, el inóculo de cada hongo constaba de suelo rizosférico, esporas, micelio y fragmentos de raíces micorrizadas y había sido obtenido de un cultivo de cada hongo con plantas de lechuga como hospedadoras. En el CR de cada contenedor se adicionaron 5 g de inóculo bajo las semillas de lechuga. A los tratamientos sin micorrizar se les añadió una población microbiana similar a los tratamientos micorrizados, exceptuando los hongos MA.

#### **3.8.3. Condiciones de cultivo.**

Las plantas de este experimento fueron cultivadas en cámara de cultivo bajo las condiciones controladas descritas en el apartado 3.5.3. de esta sección.

El agua fué aplicada diariamente para mantener constante la humedad del CR en torno a -0.1 MPa (80% de la capacidad de campo), con el fin de inducir un ligero déficit hídrico en este compartimento. Además, esto evitaba que el movimiento de nutrientes debido al flujo de agua desde el compartimento hifal hasta el radical. En el CH-1 no se aplicó agua, manteniéndose como compartimento de separación entre CR y CH-2. En éste último, el agua se aplicaba diariamente por inyección a una distancia de 10 cm de la maya de nilón hasta alcanzar un potencial hídrico de -0.05 MPa (90% de la capacidad de campo) ó -0.01 MPa (140% de la capacidad de campo). También se mantuvo un tratamiento control sin agua en dicho compartimento.

#### **3.8.4. Determinaciones.**

Antes de proceder a cosechar las plantas se midieron la actividad fotosintética, transpiración, conductancia estomática y eficiencia en uso del agua. Estas determinaciones así como las de los contenidos en nutrientes de las plantas se realizaron de acuerdo con lo descrito en los apartados 3.5.4. y 3.4. de esta sección respectivamente. Con los datos anteriores se procedió al cálculo de la eficiencia fotosintética en el uso del fósforo (EFUF), como la relación entre actividad fotosintética y la concentración foliar de P.

Al cosechar las plantas (9 semanas después de la siembra) se determinaron los pesos frescos y secos de la parte aérea y del sistema radical según la metodología usual. Con estos datos se calculó el contenido hídrico relativo (CHR) de la parte aérea según la fórmula:

$$\text{CHR} = 100 \times (\text{Pf} - \text{Ps})/\text{Pf}.$$

Donde:

Pf representa al peso fresco y Ps al peso seco.

Una porción de las raíces fué utilizada para visualizar y cuantificar la presencia de los hongos fMA (3.4.).

La presencia y actividad de las hifas fúngicas en el compartimento hifal donde se había estado inyectando el agua se puso de manifiesto en un subsiguiente bioensayo. Para ello se tomó una alícuota (100 g) del sustrato existente en el CH-2 de cada uno de las repeticiones de los distintos tratamientos de que constaba el ensayo. En ella se sembraron semillas de lechuga (una plántula por maceta) y se cultivaron en las condiciones de invernadero descritas en el apartado 3.7.3. de esta sección, durante un periodo de 4 semanas. Transcurrido este

tiempo, se procedió a extraer el sistema radical de las plantas para cuantificar la infección producida por los propágulos desarrollados en el mencionado compartimento (Ruiz-Lozano y Azcón, 1995a).

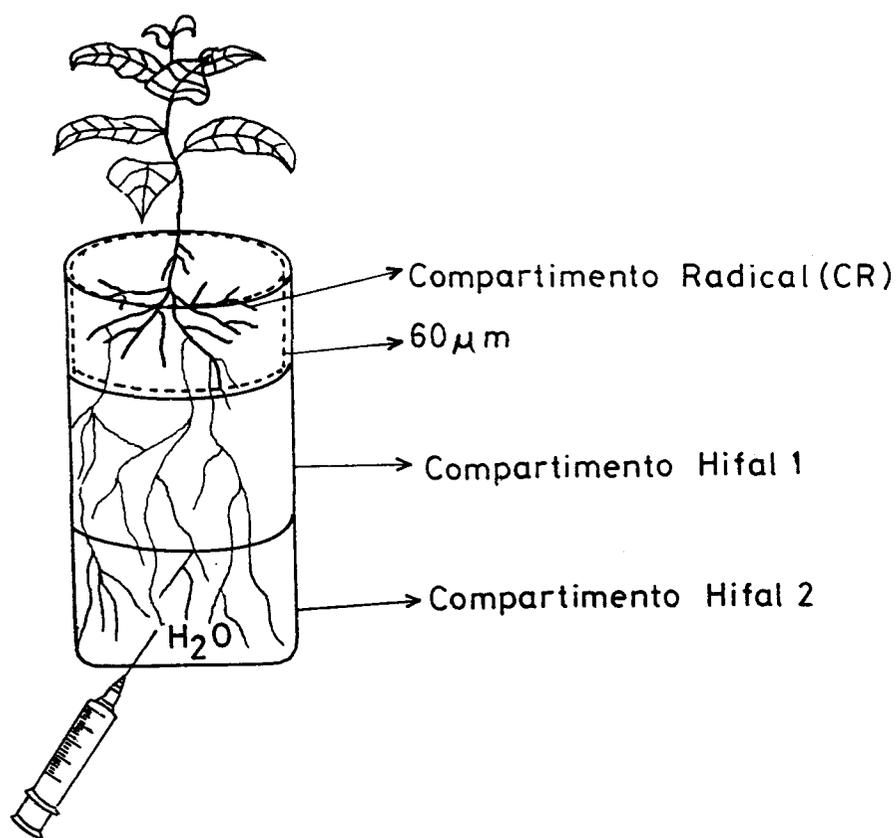


Figura B

### **3.9. Evaluación del efecto de la aplicación de ácido N-morfolino etano sulfónico (MES) sobre el desarrollo micelial y la captación de agua por las hifas.**

#### **3.9.1. Diseño experimental.**

Este ensayo fué realizado utilizando el diseño del anterior (3.8.1.) aunque con algunas variaciones. Se seleccionaron dos niveles de humedad en el compartimento hifal y se evaluó el efecto de la aplicación de una solución 51mM de ácido N-morfolino etano sulfónico (MES), descrito como fuerte estimulador del desarrollo micelial (Carr, 1991; Frey et al., 1994; Vilariño, comunicación personal). Cada tratamiento tenía 5 repeticiones, con lo que resultaron un total de 60 unidades experimentales. El tipo de contenedor utilizado era el mismo que se describe con anterioridad (Figura B).

#### **3.9.2. Suelo y material biológico.**

En este ensayo se utilizó el mismo tipo de suelo que en el anterior, el cual fué esterilizado según el procedimiento ya mencionado. El CR se llenó con 300 g de suelo y arena en proporción 1/1 v/v mientras que, en este caso, el compartimento hifal inferior (CH-2) contenía 400 g de una mezcla 1/9 v/v y el CH-1 constaba de 450 g de arena. De esta manera se trató de reducir al mínimo la captación de nutrientes por las hifas fúngicas, valorándose, exclusivamente, la captación de agua. Además, al aumentar la cantidad de sustrato existente en los dos compartimentos hifales, se incrementó la distancia que las hifas fúngicas debían de recorrer desde el CR hasta el punto donde se inyectaba el agua en el CH-2, la cual resultó ser de 15 cm.

Los hongos seleccionados para este experimentos fueron los mismos del anterior. Los tratamientos sin micorrizar fueron adicionados de una población microbiana similar a los tratamientos micorrizados, exceptuando los hongos MA.

#### **3.9.3. Condiciones de cultivo.**

Las plantas fueron cultivadas en cámara de cultivo bajo las condiciones controladas descritas en el apartado 3.5.3. de esta sección.

El agua fué aplicada diariamente para mantener constante la humedad del CR en torno a -0.1 MPa, con el fin de inducir un ligero déficit hídrico en este compartimento. En el CH-1 no se aplicó agua, manteniéndose como compartimento de separación entre CR y CH-2. En este último compartimento el agua se aplicaba diariamente por inyección a una distancia de 15 cm

de la maya de nilón hasta alcanzar un potencial hídrico de -0.01 MPa. También se mantuvo un tratamiento control sin agua en dicho compartimento.

#### **3.9.4. Determinaciones.**

Se procedió a realizar, exactamente, las mismas determinaciones que en el ensayo anterior.

### **3.10. Estudio de la viabilidad de esporas de tres hongos formadores de micorrizas arbusculares después de un periodo de almacenamiento en suelo con diferentes potenciales hídricos.**

#### **3.10.1. Diseño experimental.**

Se aislaron esporas de tres especies de hongos pertenecientes al género *Glomus* y se almacenaron durante 6 meses en suelo estéril con tres contenidos hídricos (seco, -0.8 MPa ó -0.04 MPa). Después de este tiempo se diluyeron con suelo estéril en las proporciones (1/4, 1/16 o 1/64) siguiendo el método descrito para cuantificar el número más probable de propágulos (NMP) (Porter, 1979). Para cada combinación hongo-contenido hídrico del suelo-dilución se prepararon 3 repeticiones, con lo cual se obtuvieron 81 unidades experimentales.

#### **3.10.2. Suelo y material biológico.**

Se colectaron 1500 esporas de cada uno de los siguientes hongos, *Glomus fasciculatum* (Thax. y Gerd.) Gerd. y Trappe, *Glomus mosseae* (Nicol. y Gerd.) Gerd. y Trappe, *Glomus deserticola* (Trappe, Bloss y Menge). Para ello se utilizó el método del wet-sieving (Gerdemann y Nicholson, 1963), tras lo cual se procedió a limpiarlas de residuos orgánicos y partículas de suelo mediante centrifugación en gradiente de sacarosa (Mertz et al., 1979). Con posterioridad, se dividieron en tres grupos de 500 esporas cada uno (para cada hongo), las cuales fueron depositadas en 100 g de mezcla estéril de suelo y arena en proporción 1/1 v/v. Esta mezcla de suelo y arena permaneció completamente seca o fué adicionada de agua hasta alcanzar un potencial hídrico de -0.04 MPa ó -0.8 MPa. Una vez adicionadas las esporas, este sustrato fué guardado en bolsas de plástico negras durante 6 meses en invernadero controlado (3.7.3.) fuera de la acción directa de la luz y rayos solares. Después de este tiempo de incubación, manteniendo los mencionados regímenes hídricos, se procedió a evaluar la viabilidad de las esporas (test de infectividad). Para ello, se prepararon diluciones de 1/4, 1/16 y 1/64 (125, 32 y 8 esporas por maceta respectivamente, según el método NMP) de manera que cada dilución con 100 g de suelo se depositó en pequeños macetas de 75 mL de capacidad. La planta 'trampa' utilizada fué *Lactuca sativa*.

### **3.10.3. Condiciones de cultivo.**

Las plantas se cultivaron en invernadero bajo las mismas condiciones de luz, temperatura y humedad descritas en el apartado 3.7.3. de esta sección. El periodo de crecimiento fué de 1 mes y durante este tiempo las macetas fueron regadas con regularidad a capacidad de campo.

### **3.10.4. Determinaciones.**

Trás cosechar las plantas se procedió a examinar la presencia de infección fúngica en las raíces. Para ello se utilizó la técnica de Phillips y Hayman (1970) seguida de cuantificación (Giovannetti y Mosse, 1980).

## **3.11. Determinación del efecto del Ca en la resistencia al estrés osmótico (hídrico) originado mediante aplicación de polietilénglicol (PEG) al medio de cultivo.**

### **3.11.1. Diseño experimental.**

El ensayo constó de dos tratamientos micorrizados y dos controles sin micorrizar, uno fertilizado con P y otro sin fertilizar. Se aplicaron secuencialmente 4 niveles crecientes de Ca en la solución nutritiva. Se prepararon 9 repeticiones para cada uno de los tratamientos resultantes, lo cual daba un total de 144 unidades experimentales con una planta cada una.

### **3.11.2. Suelo y material biológico.**

Se utilizó suelo mezclado con arena en proporción 1/9 v/v, el cual fué esterilizado antes de su utilización de la forma habitual. Se procedió a llenar cada maceta con 300 g de la mezcla estéril de suelo y arena. Las especies fúngicas utilizadas, como siempre, pertenecían a la Colección de la Estación Experimental del Zaidín y fueron: *Glomus fasciculatum* (Thax. y Gerd.) Gerd. y Trappe y *Glomus mosseae* (Nicol. y Gerd.) Gerd. y Trappe. En cada maceta se depositaron 5 gramos del inóculo correspondiente. Los controles recibieron la misma cantidad de inóculo estéril junto a 5 mL de un filtrado del inóculo para asegurar una microflora similar en todos los tratamientos exceptuando los propágulos de micorriza.

### **3.11.3. Condiciones de cultivo.**

Las plantas fueron cultivadas durante 10 semanas en cámara de cultivo bajo las condiciones descritas en el apartado 3.5.3. de esta sección.

Las plantas fueron cultivadas y fertilizadas con solución nutritiva descrita por Hepper y O'Shea (1984) modificada (Ruiz-Lozano y Azcón, 1995b) a la cual se adicionó Ca en 4 niveles crecientes (2 mM, 4 mM, 6 mM y 8 mM).

Antes de cosechar, se procedió a la cuidadosa extracción de las plantas de manera que el sistema radical se mantuviera intacto y sin daños. Cada planta fué introducida en matraces que contenían la misma solución nutritiva utilizada para su crecimiento, quedando las raíces sumergidas en ella. El estrés hídrico fué inducido por la adición de distintos niveles de polietilenglicol (PEG) a dicho medio. Se ensayaron dos niveles del agente osmótico, 10% y 20% p/v (PEG/solución), así como un control carente de tal compuesto. La aireación de la solución se realizó mediante bombas de pecera. A los matraces se les adicionaron 15 µL de antiemulgente (Dimetil polixiloxilano) con el fin de evitar la formación de espuma a consecuencia del PEG. El control sin PEG también recibió la misma cantidad de antiemulgente. En esta condiciones, las plantas fueron mantenidas en la misma cámara de cultivo durante las 22 h previas a su cosecha.

#### **3.11.4 Determinaciones.**

Las plantas se mantuvieron 22 h en solución nutritiva con o sin PEG. En alícuotas de 1 g de peso fresco se determinó el contenido en prolina. También se procedió a calcular el contenido relativo de agua (CRA) de dichas plantas por un método basado en el de Barrs y Weatherley (1962). Para ello se tomaron 5 discos de 1 cm de diámetro por hoja (5 hojas por planta) y se pesaron. A continuación se depositaron en placas de Petri que contenían agua destilada dónde permanecieron durante 2 h a 25 °C bajo luz fluorescente de 40 W, tras las cuales se volvió a determinar el peso de los discos de cada planta. Por último, los discos fueron secados en estufa a 60 °C durante 24 h y se determinó el peso seco de los mismos. Con estos datos se calculó el CRA a partir de la siguiente fórmula.

$$CRA = \frac{Pf - Ps}{Ph - Ps} \times 100$$

Dónde:

Pf es el peso fresco inicial.

Ph es el peso fresco después de la hidratación con agua destilada.

Ps es el peso después de secar en estufa.

Al cosechar las plantas (10 semanas después de la siembra de las semillas) se separó el sistema radical de la parte aérea y se procedió a determinar los pesos frescos y secos de ambas partes de la manera usual. Una porción de las raíces fué utilizada para la

detección (Phillips y Hayman, 1970) y cuantificación (Giovannetti y Mosse, 1980) de la presencia de los hongos formadores de micorrizas arbusculares.

También se procedió a determinar los contenidos en nutrientes (N, P y Ca ) de las plantas según el método descrito en el apartado 3.4. de esta sección.

### **3.12. Determinación del efecto del K en la resistencia al estrés osmótico (hídrico) originado mediante aplicación de polietilenglicol (PEG) al medio de cultivo.**

#### **3.12.1. Diseño experimental.**

Este ensayo constó de tres tratamientos micorrizados y dos controles sin micorrizar, uno fertilizado con P y otro sin fertilizar. Se ensayaron 3 niveles crecientes de K aplicados, secuencialmente, en la solución nutritiva. El número de repeticiones por tratamiento fué de 8, resultando, por tanto, un total de 120 unidades experimentales con una planta cada una.

#### **3.12.2. Suelo y material biológico.**

El suelo utilizado fué el mismo de todos los anteriores ensayos, el cual se mezcló con arena en proporción 1/9 v/v y fué esterilizado, antes de su utilización, de la forma habitual. Se procedió a llenar cada maceta con 300 g de la mezcla estéril de suelo y arena. Las especies fúngicas utilizadas fueron *Glomus fasciculatum* (Thax. y Gerd.) Gerd. y Trappe, *Glomus mosseae* (Nicol. y Gerd.) Gerd. y Trappe y *Glomus deserticola* (Trappe, Bloss y Menge). En cada maceta se depositaron 5 gramos del inóculo correspondiente. Los controles recibieron la misma cantidad de inóculo estéril junto a 5 mL de un filtrado del mismo.

#### **3.12.3. Condiciones de cultivo.**

Las plantas fueron cultivadas durante 11 semanas en cámara de cultivo bajo las condiciones descritas en el apartado 3.5.3. de esta sección.

Las plantas fueron cultivadas y fertilizadas con solución nutritiva descrita por Hepper y O'Shea (1984) modificada (Ruiz-Lozano y Azcón, 1995b) a la cual se adicionó K en 3 niveles crecientes (0.7 mM, 3.7 mM y 6.7 mM)

Antes de cosechar las plantas se procedió a su cuidadosa extracción de las macetas de manera que se mantuviera intacto el sistema radical, el cual fué introducido en matraces que contenían la misma solución nutritiva utilizada para su crecimiento. En este momento se inició el estrés hídrico inducido mediante la adición polietilenglicol (PEG). Para ello, se añadieron

cantidades adecuadas de PEG a los matraces de manera que se ensayó un único nivel del agente osmótico, 15% p/v, así como un control carente de tal compuesto. La aireación de la solución se realizó mediante bombas de pecera. A los matraces se les adicionaron 15  $\mu$ L de antiemulgente (Dimetil polixiloxilano) con el fin de evitar la formación de espuma a consecuencia del PEG. El control sin PEG también recibió la misma cantidad de antiemulgente. En estas condiciones, las plantas fueron mantenidas en la misma cámara de cultivo durante las 22 h previas a su cosecha.

#### **3.12.4 Determinaciones.**

Trás mantener las plantas en solución nutritiva con o sin PEG durante 22 h, se procedió a determinar la tasa de fijación de CO<sub>2</sub>, tasa de transpiración, conductancia estomática y la eficiencia en el uso del agua. Estas medidas se hicieron de acuerdo con lo expuesto en el apartado 3.5.4. de esta sección.

Al cosechar las plantas (10 semanas después de la siembra de las semillas) se separó el sistema radical de la parte aérea y se procedió a determinar los pesos frescos y secos de ambas partes de la manera usual. Una porción de las raíces fue utilizada para la detección y cuantificación de la presencia de los hongos MA.

También se determinaron los contenidos en nutrientes (N, P y K) de las plantas según el método descrito en el apartado 3.4. de esta sección.

### **3.13. Evaluación de la actividad superóxido dismutasa (SOD) en plantas de lechuga micorrizadas o no y sometidas a estrés hídrico.**

#### **3.13.1. Diseño experimental.**

El ensayo consistió en 3 tratamientos microbianos (Inoculación con *G. mosseae* o *G. deserticola* y control), 2 niveles de hidratación de las plantas y 2 cosechas a distinto tiempo (5 y 8 semanas). Cada tratamiento tenía 5 repeticiones, con lo cual resultaron 60 macetas con una planta cada una. Tres semanas antes de cada una de las cosechas se inició la inducción del estrés hídrico. Para ello, la mitad de las plantas fueron cultivadas con un régimen hídrico limitado (-0.17 MPa), mientras que la otra mitad permaneció a -0.04 MPa (capacidad de campo) durante todo el tiempo de cultivo.

### **3.13.2. Suelo y material biológico.**

Al igual que en ensayos anteriores, el suelo fué diluido con arena de cuarzo en proporción 1/1 v/v y esterilizado según la metodología habitual, ya expuesta. 0.5 kg de la mezcla de suelo y arena estériles fueron depositados en cada una de las macetas. En cada una de éstas se sembraron semillas de lechuga y posteriormente crecieron las plantas (una por maceta). Los hongo seleccionados para este ensayo fueron *Glomus deserticola* (Trappe, Bloss y Menge) y *Glomus mosseae* (Nicol. y Gerd.) Gerd. y Trappe. Ambos inóculos procedían de un cultivo en maceta de *Lactuca sativa* L. y el número de propágulos infectivos era similar. Las plantas control recibieron 5 mL de un filtrado del inóculo para asegurar una microbiota igual en todos los tratamientos exceptuando los propágulos MA.

### **3.13.3. Condiciones de cultivo.**

Las plantas fueron crecidas en cámara de cultivo bajo las condiciones descritas en el apartado 3.5.3. de esta sección.

Después de la siembra de las semillas y, hasta tres semanas antes de cada cosecha, la humedad del suelo se mantuvo en torno a la capacidad de campo (-0.04 MPa) mediante aplicación diaria de la cantidad adecuada de agua. Durante estas tres semanas precedentes a la cosecha, se sometió a la mitad de las plantas a un estrés por sequía consistente en reducir la humedad del suelo a -0.17 MPa.

### **3.13.4. Determinaciones.**

Al cosechar las plantas (5 u 8 semanas después de la siembra de las semillas) se separó el sistema radical de la parte aérea y se determinaron los pesos frescos y secos de ambas partes de la manera usual. Una porción de las raíces fué utilizada para la detección y cuantificación de la presencia de los hongos MA.

Trás la determinación del peso seco, se procedió al análisis mineral (N y P) de las muestras vegetales según lo descrito en el apartado 3.4. de esta sección.

#### *Extracción del enzima SOD.*

En el momento de la cosecha se tomaron muestras para la determinación de la actividad superóxido dismutasa. Las muestras de material vegetal se seleccionaron siguiendo un criterio de uniformidad en todos los casos. La extracción del enzima se realizó a partir de 1 g de material vegetal (raíz y hoja) fresco. Las muestras de raíz fueron lavadas abundantemente

con agua destilada, eliminándose siempre la raíz principal y las partes más viejas de las raíces secundarias. Se procedió a la preparación de un homogenado de este material con 10 mL de una mezcla de extracción compuesta por:

0.1 M tampón fosfato-K pH 7.8  
0.15 M ClNa  
3 mM ClK  
0.1 mM PMSF  
26 mM  $\beta$ -mercaptoetanol  
0.5 % Polivinilpirrolidona (PVPP)

El material vegetal se homogeniza durante 2 minutos en Sorvall a 10.000 rpm. El homogenado se filtra a través de una gasa doble y se centrifuga a 2500 g durante 5 minutos para eliminar las fibras y restos celulares. El sobrenadante se vuelve a centrifugar a 30.000 g durante 20 minutos, tomándose, de nuevo, el sobrenadante, que se congela en alícuotas de 1 mL a -70 °C durante un tiempo inferior a 1 mes. Todos estos procesos se realizaron en baño de hielo picado a una temperatura comprendida entre 0 y 3 °C.

#### *Cuantificación de la actividad SOD*

La medida de la actividad SOD se realizó de acuerdo con el método del ferrocitocromo *c* propuesto por McCord y Fridovich (1969). Este método se basa en la medida de la tasa de inhibición, por la SOD, de la reducción del citocromo *c* por los radicales libres  $O_2^-$  generados por el sistema enzimático xantina/xantina oxidasa. La reacción se lleva a cabo a 25 °C y la medida de la densidad óptica se efectúa a 550nm.

#### *Metódica.*

Primeramente se prepara el "coctel de reacción", compuesto por 23 mL de tampón fosfato-K 50 mM, pH 7.8 + EDTA-Na 0.1 mM, 0.35 mL de citocromo *c* 1 mM y 2.5 mL de xantina 1 mM. A continuación se comprueba el estado de este reactivo, para lo cual se pipetea 3 mL en una cubeta de espectrofotómetro y se ajusta el cero, tras lo cual, se añade una pequeña cantidad de ditionito sódico y se agita. La lectura a 550 nm debe ser de 0.20-0.24.

Para establecer la reacción control, se programa el espectrofotómetro para leer en los límites de densidad óptica de 0.100 y -0.025 durante un tiempo de 2 a 3 minutos. Tras esto, se deposita en una cubeta de vidrio de espectrofotómetro 3 mL del "cóctel de reacción" previamente calentado a 25°C. Se ajusta el cero del espectro con esta mezcla de reacción y a

continuación se añade cantidades comprendidas entre 4 y 15  $\mu\text{L}$  de una solución de xantina oxidasa (XOD), que contiene 10  $\mu\text{L}$  de enzima concentrado en 0.5 mL de tampón fosfato K, hasta obtener una tasa de reducción del citocromo c de 0.025 unidades. Esta reacción se efectúa 3-4 veces y se calcula el valor medio de XOD necesario para obtener la mencionada tasa de reducción del citocromo c.

Para la medida de la actividad SOD en la muestra problema se depositan 3 mL del "cóctel de reacción" en la cubeta de vidrio y se añaden 50  $\mu\text{L}$  de la muestra problema previamente descongelada. Se agita y se ajusta el cero. Seguidamente se añade la cantidad de XOD determinada en la reacción control, se agita y se inicia la lectura durante 2 a 3 minutos. Hay que tener en cuenta que la dilución de XOD puede perder actividad con el tiempo, por lo que se debe repetir periódicamente la reacción control y ajustar la cantidad de XOD que se debe utilizar.

La expresión de la actividad enzimática se realiza según la definición de McCord y Fridovich (1969), quienes consideran 1 unidad de actividad como el 50% de inhibición de la reacción control a 25 °C. De manera que:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{V_{\text{control}} - V_{\text{problema}}}{V_{\text{control}}} \times 100$$

$$\text{Unidades/ mL} = \frac{\% \text{ inhibición}}{50\%} \times \frac{1}{\text{mL muestra}} \times \text{factor dilución}$$

La determinación de las proteínas existentes en los extractos vegetales se realizó según el método de Bradford (1976). La actividad específica del enzima (U/mg) se calculo como la relación entre la actividad total y la concentración de proteínas.

#### *Estudio isoenzimático de la SOD.*

Esta parte del estudio se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) a diferentes concentraciones de acrilamida/bis-acrilamida (normalmente 10% en el gel separador y 3% en el gel concentrador). Las distintas isoenzimas SOD se detectaron en los geles mediante el método de la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) con los radicales  $\text{O}_2^{\cdot-}$  generados fotoquímicamente (Beuchamp y Fridovich, 1971).

### **3.14. Estudio de la actividad nitrato reductasa (NR) en plantas de lechuga micorrizadas o no y sometidas a estrés hídrico.**

#### **3.14.1. Diseño experimental.**

El ensayo consistió en 5 tratamientos (Inoculación con *G. mosseae*, *G. deserticola*, *G. fasciculatum*, control sin fertilizar y control fertilizado con P) y 2 niveles de hidratación de las plantas. Cada tratamiento presentaba 5 repeticiones, con lo cual resultaron 50 unidades experimentales con una planta cada una. Durante las primeras 6 semanas todas las plantas se cultivaron a -0.04 MPa de potencial hídrico en el suelo y a partir de ese momento, hasta el final del ensayo, la mitad de las plantas se sometieron a estrés consistente en mantenimiento del potencial hídrico en -0.17 MPa.

#### **3.14.2. Suelo y material biológico.**

El suelo fué diluido con arena de cuarzo en proporción 1/1 v/v y esterilizado según la metodología habitual, ya expuesta. 500 g de la mezcla de suelo y arena estériles fueron depositados en cada una de las macetas. En ellas se sembraron varias semillas de *Lactuca sativa*. Después de su germinación, las plántulas fueron seleccionadas para dejar sólo una por maceta, la que presentaba un tamaño más uniforme. Los hongo seleccionados para este ensayo fueron *Glomus deserticola* (Trappe, Bloss y Menge), *Glomus fasciculatum* (Thax. y Gerd.) Gerd. y Trappe y *Glomus mosseae* (Nicol. y Gerd.) Gerd. y Trappe. Los tres inóculos procedían de un cultivo en maceta de *Lactuca sativa* L, siendo el número de propágulos infectivos similar en todos. Las plantas control recibieron 5 mL de un filtrado del inóculo para asegurar una microflora microbiana similar en todos los tratamientos exceptuando los propágulos MA.

#### **3.14.3. Condiciones de cultivo.**

Las plantas fueron cultivadas en cámara de cultivo bajo las condiciones descritas en el apartado 3.5.3. de esta sección.

El experimento duró un total de 12 semanas. Durante las seis primeras semanas de crecimiento, la humedad del suelo se mantuvo en torno a la capacidad de campo (-0.04 MPa) mediante aplicación diaria de la cantidad adecuada de agua. A partir de ese momento, la mitad de las plantas se sometieron a un estrés consistente en reducir la humedad del suelo a -0.17 MPa.

#### 3.14.4. Determinaciones.

Al cosechar las plantas (12 semanas después de la siembra) se separó el sistema radical de la parte aérea y se procedió a determinar los pesos frescos y secos de ambas partes de la manera usual. Una porción de las raíces fué utilizada para la detección y cuantificación de la presencia de los hongos formadores de micorrizas arbusculares.

También se determinó el contenido en nutrientes (N y P) de las plantas según el método descrito en el apartado 3.4. de esta sección.

##### *Extracción del enzima NR.*

En el momento de la cosecha, 1 g de material vegetal fresco, tomado 6 horas después de haber comenzado el fotoperiodo (para eliminar las fluctuaciones diurnas), fué usado para la extracción del enzima nitrato reductasa. Con este material se procedió a la preparación de un extracto utilizando 10 mL de una mezcla de extracción (Dailey et al., 1982) compuesta por:

50 mM Tris pH 8.0

3 mM EDTA-Na

250 mM Sacarosa

1  $\mu$ M Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x2 (H<sub>2</sub>O)

5  $\mu$ M FAD

2 mM DTT

1.5 mM PMSF

10 mM Cisteina

0.5 % (p/v) PVPP

El material vegetal se homogeniza durante 3 minutos en Sorvall a 10.000 rpm. El homogenizado se filtra a través de una gasa doble y se centrifuga a 3000 g durante 5 minutos. El sobrenadante se vuelve a centrifugar a 30.000 g durante 20 minutos, tomándose, de nuevo, el sobrenadante, que se congela en alícuotas de 1 mL a -70 °C. Todos estos procesos se realizaron a una temperatura comprendida entre 0 y 3 °C.

##### *Cuantificación de la actividad NR*

La actividad nitrato reductasa se valora siguiendo la aparición de nitritos en el medio, según la metodología empleada por Kaiser y Lewis (1984) y Becana et al. (1985) modificada por Caba et al. (1990). La mezcla de reacción, en un volumen final de 2 mL contenía:

0.6 mL de tampón fosfato potásico 100 mM pH 7.8  
0.2 mL de  $\text{NO}_3\text{K}$  100 mM  
0.2 mL de cisteína 10 mM  
0.4 mL de NADH 2mM  
0.6 mL de extracto problema

La reacción se inicia con la adición del enzima (extracto). Los tubos así preparados se llevaron a incubación en baño termostatzado a 30 °C durante 30 minutos. La reacción se detiene mediante la adición a los tubos de 0.1 mL de acetato de zinc 1M y agitando vigorosamente, para asegurar la completa oxidación del NADH residual. El blanco se obtiene sustituyendo el enzima por medio de extracción y los controles a tiempo cero deteniendo la reacción inmediatamente antes de la incubación. Trás la incubación se procedió a centrifugar a 3500 g, durante 15 minutos y, en alícuotas de 1 mL de sobrenadante se determina la cantidad de nitrito formado. Esto se realiza mediante la reacción de diazotación del nitrito (Snell y Snell, 1949). Para ello, a las alícuotas de 1 mL de sobrenadante se les añade 1 mL de sulfanilamida y 1 mL de N 1-naftil-etilendiamina diclorohidrato (NNEDA). La mezcla se completa con agua destilada hasta un volumen de 5 mL y, tras agitar vigorosamente, se deja desarrollar el color durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se mide la absorbancia debida al color a 540 nm en el espectrofotómetro.

Para la cuantificación del nitrito formado se confeccionó una curva patrón con concentraciones conocidas de nitrito obtenidas a partir de una solución de  $\text{NO}_2\text{K}$ . La actividad NR se expresó como  $\text{nmol NO}_2^- \text{ formado g}^{-1} \text{ Pf. h}^{-1}$ .

Reactivo de sulfanilamida: Se disuelve 1 g de sulfanilamida (Merck calidad analítica) en 20 mL de HCl concentrado y se diluye hasta 100 mL con agua destilada.

Reactivo de N 1-naftil-etilendiamina diclorohidrato (NNEDA): Se disuelven 20 mg de NNEDA en 100 mL de agua destilada, conservándose en frasco topacio a 4 °C.

La determinación de las proteínas existentes en los extractos vegetales se realizó, también, según el método de Bradford (1976).

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Evaluación del grado de compatibilidad funcional y efectividad de siete hongos MA en el mantenimiento de las relaciones hídricas de plantas de lechuga sometidas a períodos sucesivos de estrés hídrico.

Las siete especies de *Glomus* ensayadas incrementaron el crecimiento de la planta tanto en condiciones de estrés como de adecuado aporte de agua. No obstante, el efecto de los períodos sucesivos de estrés hídrico progresivo sobre el crecimiento de la planta hospedadora dependió de la especie de hongo MA implicada en la simbiosis. Así, en el momento de la cosecha, las plantas presentaron pesos de parte aérea y raíz significativamente distintos de acuerdo con el hongo inoculado. La mayor producción de biomasa se alcanzó en las plantas inoculadas con *G. deserticola*, independientemente del tratamiento hídrico, mientras que el hongo menos efectivo resultó ser *G. occultum*. Las diferencias en estimulación del crecimiento entre ambos endofitos oscilaron entre 273% en condiciones de buena irrigación y 821% en condiciones de estrés hídrico (Tabla 1). La colonización por cualquiera de las especies de *Glomus* ensayadas fué más efectiva que la aplicación del fertilizante. De hecho, las medidas semanales del intercambio de gases sólo se pudieron realizar en las plantas micorrizadas, ya que las no inoculadas carecían de un tamaño adecuado para estas determinaciones, de manera que, en estos tratamientos sin inocular, los procesos fotosintéticos sólo pudieron ser evaluados al finalizar el experimento (semana 11).

El estrés hídrico impuesto disminuyó el peso de parte aérea entre un 9% en plantas colonizadas por *G. deserticola* y un 70% en aquellas colonizadas por *G. occultum*. La clasificación de las especies fúngicas, por orden de eficiencia, basada en la mayor tolerancia a la sequía (menor disminución del crecimiento de parte aérea) fué: *G. deserticola* > *G. fasciculatum* > *G. mosseae* > *G. etunicatum* > *G. intraradices* > *G. caledonium* > *G. occultum*. La capacidad de *G. deserticola* para inducir mayor tolerancia al estrés en la planta hospedadora se evaluó como un menor descenso del crecimiento bajo las condiciones estudiadas.

El desarrollo radical también se afectó negativamente por el estrés hídrico excepto en el caso de las plantas colonizadas por *G. mosseae* (Tabla 1). Respecto al nivel de colonización radical, el más invasivo de los hongos ensayados resultó ser *G. deserticola* y el menos *G. caledonium*. En cualquier caso, la capacidad infectiva de los endofitos no varió, en general, con el estrés aplicado (Tabla 2).

El contenido foliar de prolina resultó ser un buen parámetro para medir estrés hídrico. La sequía incrementó la concentración de este regulador osmótico (Tabla 2) especialmente en las plantas colonizadas por *G. deserticola*.

La captación de nutrientes por la planta fue considerablemente afectada por la especie fúngica implicada en la asociación (Tabla 3). La exposición al estrés hídrico no disminuyó significativamente los contenidos en nutrientes de las plantas colonizadas por los endofitos más eficientes (*G. deserticola* y *G. etunicatum* por ejemplo) mientras que la adquisición de nutrientes en las plantas colonizadas por *G. occultum* resultó limitada a consecuencia de la sequía. El contenido en P y K se mantuvo constante, como consecuencia del estrés, en las plantas colonizadas por el hongo más eficiente pero, estos niveles se redujeron considerablemente en las plantas infectadas por el hongo menos efectivo. La diferencia en el contenido en P en las plantas asociadas a los hongos más ó menos efectivos osciló entre 224% y 369% en función de la disponibilidad de agua. Es de destacar que *G. intraradices* incrementó significativamente los contenidos en Ca y Mg de las plantas bajo cualquier régimen hídrico.

Respecto a los parámetros fotosintéticos tales como, la actividad fotosintética, eficiencia en el uso del agua, transpiración y conductancia estomática, incrementaron notablemente a lo largo del cultivo de las plantas (Figura 1). Así, en plantas con 6 semanas (antes del comienzo del estrés hídrico), la colonización MA no afectó, prácticamente, a ninguna de estas medidas fisiológicas, exceptuando a la conductancia estomática. Sin embargo, los efectos de la asociación simbiótica sobre estos parámetros se hicieron evidentes a partir de la séptima semana de crecimiento. Es importante señalar que las plantas no inoculadas no presentaron un tamaño adecuado para poder determinar en ellas estos parámetros hasta el final del ensayo (semana 11). Es por ello que los datos de evolución temporal de dichos procesos presentados en esta Memoria se refieren sólo a las plantas micorrizadas. En general, el estrés hídrico progresivo afectó negativamente a estos parámetros, especialmente a la tasa fotosintética y EUA (Tablas 4-7). Las plantas colonizadas por *G. occultum* mostraron los menores valores fotosintéticos así como la reducción más fuerte de dichas medidas como consecuencia de cualquiera de los niveles de estrés hídrico aplicado. *G. deserticola* fue el endofito que más eficientemente incrementó y mantuvo la tasa de estos parámetros, tanto en condiciones de estrés como de adecuado aporte de agua. La mayor reducción de la tasa fotosintética y EUA, como consecuencia del estrés, se evidenció en la semana 9 (debido a la mayor limitación hídrica). La transpiración y la conductancia estomática fueron más reducidas durante la semana 8 (bajo un estrés hídrico moderado de -0.10 MPa).

Es importante destacar el comportamiento diferencial de las distintas especies de *Glomus* utilizadas en este ensayo. En cuanto a la tasa fotosintética, *G. deserticola*, *G.*

*etunicatum*, *G. mosseae* y *G. occultum* mostraron gran sensibilidad al estrés (incluso ligero, -0.06 MPa) mientras que *G. fasciculatum* y *G. caledonium* fueron capaces de mantener la tasa fotosintética y la EUA en valores próximos a los alcanzados en condiciones de adecuado aporte hídrico, hasta que el estrés no alcanzó su valor máximo (-0.17 MPa). Por lo tanto, dependiendo del endofito implicado en la simbiosis y del grado de limitación hídrica, la tasa fotosintética fué modificada de manera diferente por las distintas especies de *Glomus* durante los períodos de estrés. De hecho, a -0.17 MPa, las plantas colonizadas por *G. mosseae*, presentaron una de las tasas fotosintéticas más bajas (19.3 nmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), mientras que, en estas mismas condiciones, las plantas colonizadas por *G. intrarádices* fueron las que menos disminuyeron este parámetro.

Tras dos semanas de rehidratación después del estrés, la mayoría de las plantas mostraron una gran capacidad de recuperación de los parámetros fisiológicos, los cuales alcanzaron valores equiparables o superiores a los encontrados en las plantas no estresadas. En estas condiciones, la tasa fotosintética y EUA más altas las presentaron las plantas colonizadas por *G. deserticola*, los otros aislados fúngicos no tuvieron un efecto relevante.

Al comparar, en su conjunto, los valores de los distintos parámetros evaluados (semana 11) en las plantas colonizadas por el endofito más eficaz y no sometidas a estrés respecto al menos eficaz, encontramos incrementos de 313% (actividad fotosintética), 322% (eficiencia en uso del agua), 148% (transpiración) y 147% (conductancia estomática). El tratamiento con *G. deserticola* fué el que maximizó los valores de todos los parámetros fisiológicos tanto en condiciones de estrés como de adecuada irrigación.

**Tabla 1.** Efecto del estrés hídrico e inoculación con hongos MA (7 *Glomus* spp.) sobre el peso seco de parte aérea y raíz y relación raíz/parte aérea de plantas de lechuga.

Tratamientos	Peso seco PA (g)		Peso seco raíz (g)		Raíz/parte aérea	
	-0.04 MPa	Estrés	-0.04 MPa	Estrés	-0.04 MPa	Estrés
Control	0.56k	0.15l	0.49f	0.16f	0.87c	1.06a
Control-P	1.15j	0.26l	0.87e	0.29f	0.75b	1.11a
<i>G. deserticola</i>	6.00a	5.50bc	2.23a	1.66b	0.37efg	0.30fgh
<i>G. etunicatum</i>	5.94ab	4.98d	1.87b	1.44c	0.31fgh	0.29gh
<i>G. intraradices</i>	5.43c	4.52e	1.75b	1.30cd	0.32fgh	0.29gh
<i>G. fasciculatum</i>	5.08d	4.39e	1.68b	1.38d	0.33fgh	0.31fgh
<i>G. mosseae</i>	4.54e	3.87f	1.43cd	1.30cd	0.31fgh	0.34fgh
<i>G. caledonium</i>	3.53g	2.70h	1.46cd	0.97e	0.41e	0.36ef
<i>G. occultum</i>	2.20i	0.67k	1.27d	0.35f	0.57d	0.57d

Para cada parámetro, los valores seguidos por la misma letra no son significativamente ( $P < 0.05$ ) distintos según el test de rango múltiple de Duncan ( $n = 5$ ).

**Tabla 2.** Efecto del estrés hídrico e inoculación con hongos MA (7 *Glomus* spp.) sobre la colonización radical y acumulación foliar de prolina (nmol/g P.F.) en plantas de lechuga.

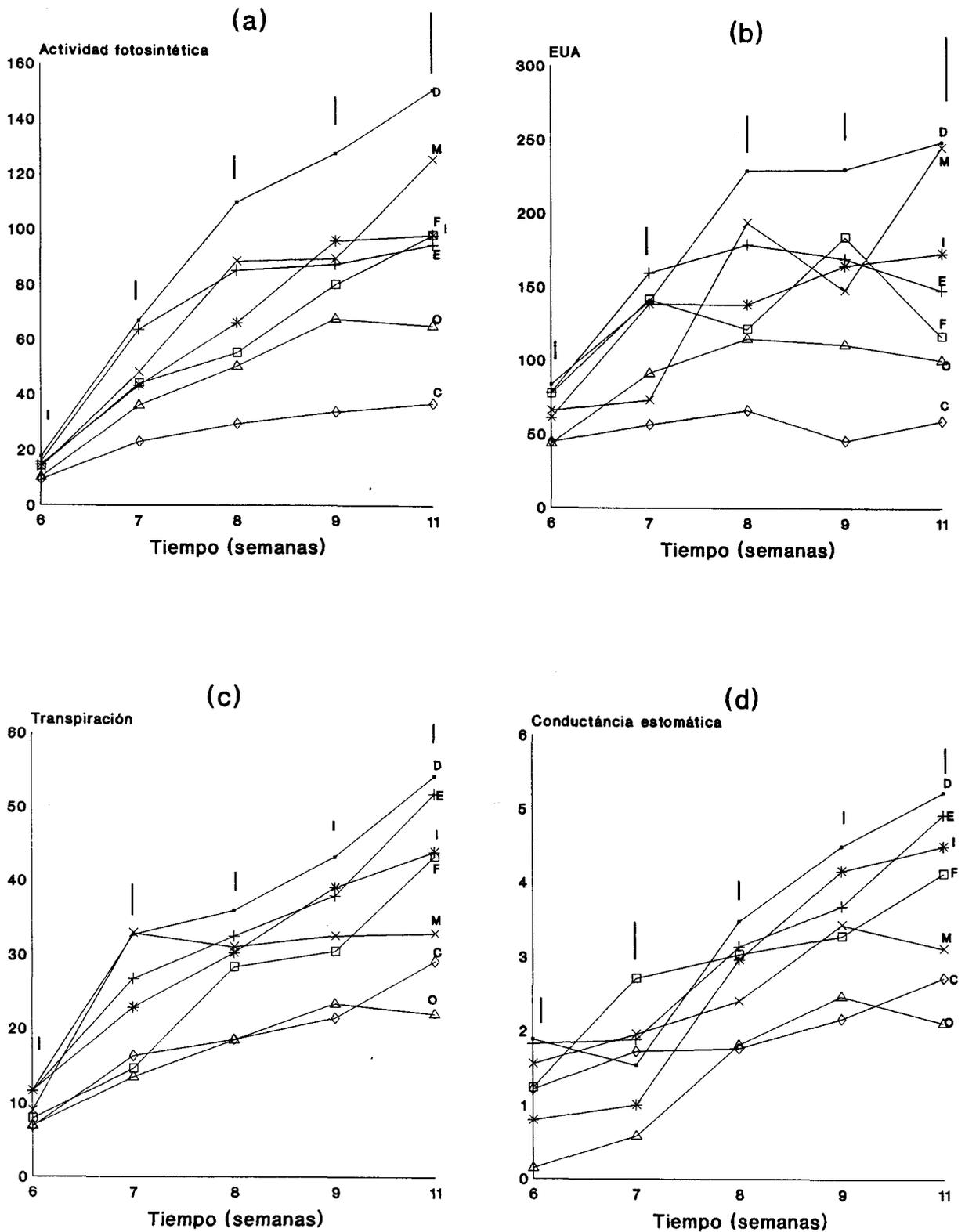
Tratamientos	% colonización MA		Prolina	
	-0.04 MPa	Estrés	-0.04 MPa	Estrés
Control	0g	0g	12.3g	16.2g
Control-P	0g	0g	14.8g	16.4g
<i>G. deserticola</i>	92.3a	94.1a	79.3bcd	119.6a
<i>G. etunicatum</i>	59.4d	65.5cd	62.8cde	93.4ab
<i>G. intraradices</i>	86.5ab	86.5ab	57.8def	40.8ef
<i>G. fasciculatum</i>	68.5cd	63.2cd	50.0def	94.7ab
<i>G. mosseae</i>	69.7c	79.4b	38.3ef	79.4bcd
<i>G. caledonium</i>	32.6f	27.2f	30.5f	42.6ef
<i>G. occultum</i>	42.0e	32.0f	50.8def	87.9bc

Para cada parámetro, los valores seguidos por la misma letra no son significativamente ( $P < 0.05$ ) distintos según el test de rango múltiple de Duncan ( $n = 5$ ).

**Tabla 3.** Efecto del estrés hídrico e inoculación con hongos MA (7 *Glomus* spp.) sobre el contenido de N, P, K, Ca y Mg (mg/planta) de plantas de lechuga.

Tratamientos	-0.04 MPa				
	N	P	K	Ca	Mg
Control	18.1ij	0.83fg	57.0f	15.3h	4.9ef
Control-P	21.0i	1.12f	63.4ef	15.7h	6.2e
<i>G. deserticola</i>	37.7ef	3.61a	97.6a	29.1cde	8.4d
<i>G. etunicatum</i>	40.6bcdef	3.55ab	90.6abc	31.1cd	10.1cd
<i>G. intraradices</i>	33.8g	2.90cd	98.8a	52.2a	16.9a
<i>G. fasciculatum</i>	43.6b	2.88cd	99.8a	34.3bc	8.8d
<i>G. mosseae</i>	42.7bc	2.56d	83.1cd	23.9efg	10.4cd
<i>G. caledonium</i>	41.5bcde	1.93e	89.2abc	31.2cd	10.0cd
<i>G. occultum</i>	37.1fg	1.61e	70.1e	19.1gh	6.1e
	Estrés				
	N	P	K	Ca	Mg
Control	15.3j	0.64g	51.0f	13.9h	3.9f
Control-P	20.3i	0.87fg	60.1ef	14.1h	4.9ef
<i>G. deserticola</i>	39.5cdef	3.51ab	91.0abc	28.8cde	9.1d
<i>G. etunicatum</i>	42.6bcd	3.18bc	84.2bcd	28.5cdef	8.8d
<i>G. intraradices</i>	38.1def	2.40d	88.9abc	39.0b	12.4bc
<i>G. fasciculatum</i>	46.8a	2.76cd	92.9ab	38.5bc	12.7b
<i>G. mosseae</i>	41.0bcde	2.00e	70.1e	20.6fg	8.3d
<i>G. caledonium</i>	41.7bcd	1.60e	75.0de	25.5def	8.1de
<i>G. occultum</i>	26.3h	0.95f	38.1g	13.3h	3.9f

Para cada parámetro, los valores seguidos por la misma letra no son significativamente ( $P < 0.05$ ) distintos según el test de rango múltiple de Duncan ( $n = 5$ ).



**Figura 1.** Evolución temporal de la actividad fotosintética (a) ( $\text{nmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), eficiencia en el uso del agua (b) ( $\text{mmol CO}_2/\text{mol H}_2\text{O} \times 10^5$ ), tasa transpiratoria (c) ( $\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y conductancia estomática (d) ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) en plantas de lechuga colonizadas por siete especies de *Glomus* (*G. deserticola*, D; *G. etunicatum*, E; *G. intrarradices*, I; *G. fasciculatum*, F; *G. mosseae*, M; *G. caledonium*, O) y cultivadas bajo condiciones de adecuado aporte de agua (MDS.05) ( $n = 5$ ).

**Tabla 4.** Evolución de la actividad fotosintética ( $\text{nmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) en plantas de lechuga colonizadas por siete especies de *Glomus* y cultivadas bajo condiciones de adecuado aporte de agua (-0.04 MPa), sometidas a periodos sucesivos de estrés hídrico (-0.06, -0.10 y -0.17 MPa) y rehidratadas hasta -0.04 MPa.

Tratamientos	Semana 6	Semana 7		Semana 8		Semana 9		Semana 11	
	-0.04 MPa	-0.04 MPa	-0.06 MPa	-0.04 MPa	-0.10 MPa	-0.04 MPa	-0.17 MPa	-0.04 MPa	Rehidratadas -0.04 MPa
Control	-	-	-	-	-	-	-	34.9f	30.8f
Control-P	-	-	-	-	-	-	-	45.3f	40.1f
<i>G. deserticola</i>	17.4a	66.9a	44.3bc	109.6a	67.9c	127.3a	42.2e	150.6b	198.8a
<i>G. etunicatum</i>	15.6ab	63.4a	44.8bc	85.2b	67.4c	87.3bc	25.4ef	94.4cde	91.9cde
<i>G. intraradices</i>	14.8ab	43.3bcd	45.1bc	66.0cd	44.2f	95.5b	59.8d	97.9cde	123.3bcd
<i>G. fasciculatum</i>	14.0b	44.0bc	39.2bcde	55.1def	53.8def	79.5c	41.2e	97.9cde	104.2cde
<i>G. mosseae</i>	13.6b	47.6b	37.1cde	87.8b	57.5cde	89.0bc	19.3fg	125.2bc	89.4cde
<i>G. caledonium</i>	9.1c	22.9f	19.9f	29.4g	28.2g	33.8ef	17.9fg	36.4f	65.3ef
<i>G. occultum</i>	10.0c	35.9de	9.3g	50.2ef	25.7g	66.9cd	7.9g	65.0def	70.8ef

Dentro de cada evaluación semanal, los valores seguidos por la misma letra no son significativamente distintos ( $P < 0.05$ ) según el test de rango múltiple de Duncan ( $n = 5$ ).

**Tabla 5.** Evolución de la eficiencia en uso del agua ( $\text{mmol CO}_2 / \text{mol H}_2\text{O} \times 10^5$ ) en plantas de lechuga colonizadas por siete especies de *Glomus* y cultivadas bajo condiciones de adecuado aporte de agua (-0.04 MPa), sometidas a periodos sucesivos de estrés hídrico (-0.06, -0.10 y -0.17 MPa) y rehidratadas hasta -0.04 MPa.

Tratamientos	Semana 6	Semana 7		Semana 8		Semana 9		Semana 11	
	-0.04 MPa	-0.04 MPa	-0.06 MPa	-0.04 MPa	-0.10 MPa	-0.04 MPa	-0.17 MPa	-0.04 MPa	Rehidratadas -0.04 MPa
Control	-	-	-	-	-	-	-	47.4fg	43.0fg
Control-P	-	-	-	-	-	-	-	43.1fg	37.9g
<i>G. deserticola</i>	83.3a	139.1a	78.5cde	228.8a	157.9bcd	230.1a	84.1f	248.6ab	287.5a
<i>G. etunicatum</i>	77.7a	159.5a	131.2ab	178.9bc	176.8bc	169.0bc	49.6g	147.9cde	127.9def
<i>G. intraradices</i>	60.7ab	138.3a	108.8bc	138.1cde	87.2fg	164.7bc	119.3de	172.7cde	189.8bcd
<i>G. fasciculatum</i>	76.9a	141.5a	78.9cde	121.2def	110.3ef	184.6b	82.8f	116.6def	160.3cde
<i>G. mosseae</i>	65.4ab	72.9de	45.9ef	193.5ab	90.0fg	148.1cd	37.6gh	245.0ab	129.8def
<i>G. caledonium</i>	44.4b	56.4ef	45.4ef	66.1g	63.4g	45.4gh	36.1gh	58.9f	144.3de
<i>G. occultum</i>	43.4b	91.3cd	29.1f	114.8def	106.5efg	110.9e	20.4h	100.3ef	108.4ef

Dentro de cada evaluación semanal, los valores seguidos por la misma letra no son significativamente distintos ( $P < 0.05$ ) según el test de rango múltiple de Duncan ( $n = 5$ ).

**Tabla 6.** Evolución de la tasa transpiratoria ( $\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) en plantas de lechuga colonizadas por siete especies de *Glomus* y cultivadas bajo condiciones de adecuado aporte de agua (-0.04 MPa), sometidas a periodos sucesivos de estrés hídrico (-0.06, -0.10 y -0.17 MPa) y rehidratadas hasta -0.04 MPa.

Tratamientos	Semana 6		Semana 7		Semana 8		Semana 9		Semana 11	
	-0.04 MPa	-0.04 MPa	-0.06 MPa	-0.04 MPa	-0.10 MPa	-0.04 MPa	-0.17 MPa	-0.04 MPa	Rehidratadas -0.04 MPa	
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	11.4g	9.2g
Control-P	-	-	-	-	-	-	-	-	13.5g	9.9g
<i>G. deserticola</i>	11.9a	31.9ab	33.0ab	35.3a	27.4def	42.9a	34.8c	54.3a	54.1a	
<i>G. etunicatum</i>	11.5a	26.7bc	20.1def	32.4b	25.1ef	37.9b	31.5d	51.7a	50.5a	
<i>G. intraradices</i>	11.6a	22.8cd	20.5cde	30.2bcd	27.2def	39.0b	28.5ef	43.8b	40.8bc	
<i>G. fasciculatum</i>	7.8b	14.6efg	23.9cd	28.3cde	26.7ef	30.4e	27.6f	43.2b	43.5b	
<i>G. mosseae</i>	8.9b	32.8ab	34.9a	31.0bc	24.9f	32.5d	25.6g	32.8d	39.0c	
<i>G. caledonium</i>	6.7b	16.3cde	9.7gh	18.5g	14.6h	21.6i	17.8j	29.1de	27.8e	
<i>G. occultum</i>	6.9b	13.4fg	4.0h	18.5g	3.4i	23.4h	7.6k	21.9f	11.5g	

Dentro de cada evaluación semanal, los valores seguidos por la misma letra no son significativamente distintos ( $P < 0.05$ ) según el test de rango múltiple de Duncan ( $n = 5$ ).

**Tabla 7.** Evolución de conductancia estomática ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) en plantas de lechuga colonizadas por siete especies de *Glomus* y cultivadas bajo condiciones de adecuado aporte de agua (-0.04 MPa), sometidas a periodos sucesivos de estrés hídrico (-0.06, -0.10 y -0.17 MPa) y rehidratadas hasta -0.04 MPa.

Tratamientos	Semana 6		Semana 7		Semana 8		Semana 9		Semana 11	
	-0.04 MPa	-0.04 MPa	-0.06 MPa	-0.04 MPa	-0.10 MPa	-0.04 MPa	-0.17 MPa	-0.04 MPa	Rehidratadas -0.04 MPa	
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	1.70ij	1.30jk
Control-P	-	-	-	-	-	-	-	-	1.70ij	1.50j
<i>G. deserticola</i>	1.85a	1.53bcd	1.71bc	3.47a	1.06gh	4.50a	3.49d	5.22a	5.00ab	
<i>G. etunicatum</i>	1.86a	1.88b	1.14bcdef	3.14b	2.48d	3.68c	3.17e	4.92ab	4.68bc	
<i>G. intraradices</i>	0.79c	1.00cdefg	0.83defg	2.96bc	1.25fg	4.16b	2.85f	4.49cd	3.80ef	
<i>G. fasciculatum</i>	1.23bc	2.70a	1.29bcde	3.03bc	2.64cd	3.28e	2.72f	4.12de	3.99ef	
<i>G. mosseae</i>	1.55ab	1.95b	0.71defg	2.40d	0.86h	3.42d	2.45g	3.11g	3.65f	
<i>G. caledonium</i>	1.22bc	1.73bc	0.38fg	1.76e	1.42f	2.15h	1.72i	2.72gh	2.56h	
<i>G. occultum</i>	0.14d	0.58efg	0.17g	1.81e	0.33i	2.47g	0.75j	2.11i	1.06j	

Dentro de cada evaluación semanal, los valores seguidos por la misma letra no son significativamente distintos ( $P < 0.05$ ) según el test de rango múltiple de Duncan.

#### 4.2. Estudio del efecto del estrés salino sobre el crecimiento, ajuste osmótico y procesos fotosintéticos en plantas de lechuga.

El peso seco de las plantas (Tabla 8) disminuyó al aumentar la salinidad del medio. Comparando el crecimiento vegetal en los niveles salinos medio (4 g ClNa Kg<sup>-1</sup>) y alto (5 g ClNa Kg<sup>-1</sup>) respecto al nivel bajo (3 g ClNa Kg<sup>-1</sup>), las plantas control disminuyeron su peso en un 32% en ambos niveles. En las plantas fertilizadas con P, la disminución del crecimiento fué de un 17% y 35% respectivamente. En los tratamientos micorrizados, las plantas inoculadas con *G. mosseae* disminuyeron su peso en un 19% y 24%, las colonizadas por *G. fasciculatum* en un 5% y 2% y las inoculadas con *G. deserticola* en un 1% y 15%, respectivamente.

En todos los niveles salinos ensayados las plantas micorrizadas crecieron más que los dos tratamientos control. Esta diferencia en biomasa producida se acentuó al incrementar el nivel de salinidad a que fueron sometidas las plantas. Así, en el nivel bajo de sal, *G. mosseae*, *G. fasciculatum* y *G. deserticola* incrementaron el crecimiento de las plantas con respecto a las control, incluso las fertilizadas con P, en un 87%, 57% y 59%, respectivamente, mientras que cuando la salinidad ascendió (niveles medio y alto) esta diferencia de producción vegetal fué superior al 110% en todos los casos. Entre los tratamientos micorrizados no se encontraron diferencias significativas en relación con este parámetro, mientras que cuando la salinidad fué de 4 g ClNa Kg<sup>-1</sup> las plantas control crecieron un 22% menos que las fertilizadas con P (Tabla 8).

En cuanto al desarrollo del sistema radical, éste siguió una tendencia similar pero, en los niveles bajo y medio de sal, resultó afectado por el hongo colonizador. Así, las plantas colonizadas por *G. fasciculatum* presentaron menor peso seco de raíz que las inoculadas con *G. mosseae* o *G. deserticola* (Tabla 8).

La colonización de la raíz por los hongos MA no se afectó por el nivel salino aplicado en el medio (Tabla 9). *G. deserticola* fué el hongo que más colonizó el sistema radical en los tres niveles de sal ensayados.

Respecto a la acumulación de prolina, ésta aumentó cuando lo hizo la salinidad del medio, pero su incremento fué considerablemente menor en el caso de las plantas micorrizadas (excepto en el tratamiento con *G. mosseae*) que en el caso de los dos tratamientos controles. Observando la Tabla 9, se puede comprobar que los tratamientos inoculados con *G. fasciculatum* y *G. deserticola* sólo incrementaron el contenido en prolina en un 2% y 10% respectivamente al pasar del nivel bajo de sal al medio, y que este incremento fué del 26% y 20% respectivamente al llegar al nivel superior de sal. Las plantas control, sin embargo,

incrementaron sus contenidos en prolina en un 63% y 71% en los niveles medio y alto de sal respectivamente.

Los parámetros fotosintéticos resultaron estar significativamente incrementados en las plantas micorrizadas en todos los casos, excepto en el nivel medio de salinidad, donde las plantas colonizadas con *G. mosseae* o *G. fasciculatum* no presentaron diferencias significativas en la tasa fotosintética respecto a los tratamientos sin inocular (Figura 2). Lo mismo ocurrió con la conductancia estomática en las plantas inoculadas con *G. fasciculatum*. En el nivel bajo de sal, las plantas asociadas a *G. mosseae* o a *G. fasciculatum* incrementaron la tasa fotosintética y la eficiencia en uso del agua en más de un 75% respecto a las fertilizadas con P. Sin embargo, las asociadas a *G. deserticola* incrementaron estos dos parámetros por encima del 90%. En el nivel medio de sal, sólo las plantas colonizadas por *G. deserticola* incrementaron significativamente (46%) la tasa fotosintética respecto a las fertilizadas con P. El aumento de la eficiencia en uso del agua osciló entre un 39% (*G. mosseae*), 105% (*G. fasciculatum*) y 114% (*G. deserticola*). En el nivel alto de sal, ambos parámetros incrementaron en más del 100% sobre los tratamientos controles, independientemente del endofito considerado. Es de destacar el hecho de que sólo en las plantas micorrizadas los valores de estos parámetros fisiológicos fueron considerablemente mayores en el nivel alto de sal que en el nivel medio, mientras que los dos tratamientos sin micorrizar disminuyeron estos valores al aumentar la salinidad del medio.

Los datos de concentración de nutrientes en la parte aérea de las plantas muestran que en los tres niveles de salinidad ensayados, la concentración de N (Tabla 10) fué significativamente superior en las plantas que no fueron inoculadas (control y control-P) respecto a las colonizadas con cualquiera de los tres hongos. No obstante, en los dos niveles inferiores de sal en el medio, el contenido en N de estas plantas prácticamente no resultó afectado por el tratamiento microbiano. Así, en el nivel bajo, sólo las plantas colonizadas por *G. deserticola* presentaron menor captación de N que el resto de tratamientos. En el nivel medio de sal, el contenido en N fué similar en todos los tratamientos. Cuando la sal aplicada fué 5 g ClNa Kg<sup>-1</sup>, las plantas fertilizadas con P presentaron un mayor contenido en N que las plantas control y las micorrizadas.

En relación con la concentración de P (Tabla 11), las plantas fertilizadas con P presentaron valores similares a los encontrados en las colonizadas por *G. mosseae* y *G. fasciculatum*, excepto en el nivel inferior de sal donde este valor fué incluso mayor que en las plantas colonizadas por *G. deserticola*. Respecto al contenido en P en las plantas, en los tres niveles salinos, las plantas control mostraron un menor contenido que las micorrizadas. Aquellas plantas asociadas con *G. deserticola* mostraron los valores más altos de contenido

en P con independencia del nivel de sal. También, las plantas fertilizadas con P tenían un contenido en P similar a aquellas colonizadas por *G. mosseae* y *G. fasciculatum*.

**Tabla 8.** Peso seco de parte aérea y raíz (g/planta) de plantas de lechuga control, fertilizadas con P o micorrizadas y cultivadas con tres niveles de salinidad en el medio.

Tratamientos	3 g ClNa kg <sup>-1</sup>		4 g ClNa kg <sup>-1</sup>		5 g ClNa kg <sup>-1</sup>	
	<u>P.A.</u>	<u>Raíz</u>	<u>P.A.</u>	<u>Raíz</u>	<u>P.A.</u>	<u>Raíz</u>
Control	0.97b	0.20d	0.66c	0.16c	0.65b	0.13b
Control-P	1.01b	0.22d	0.84b	0.15c	0.66b	0.15b
<i>G. mosseae</i>	1.81a	0.47a	1.47a	0.33a	1.39a	0.28a
<i>G. fasciculatum</i>	1.52a	0.31c	1.45a	0.28b	1.49a	0.26a
<i>G. deserticola</i>	1.54a	0.40b	1.53a	0.35a	1.31a	0.26a

En cada columna, los valores seguidos por la misma letra no son significativamente distintos ( $P < 0.05$ ) según el test de rango múltiple de Duncan ( $n = 5$ ).

**Tabla 9.** Contenido en prolina (nmol/g P.F.) y porcentaje de colonización radical de plantas de lechuga control, fertilizadas con P o micorrizadas y cultivadas con tres niveles de salinidad en el medio.

Tratamientos	3 g ClNa kg <sup>-1</sup>		4 g ClNa kg <sup>-1</sup>		5 g ClNa kg <sup>-1</sup>	
	<u>Prolina</u>	<u>%Coloniz.</u>	<u>Prolina</u>	<u>%Coloniz.</u>	<u>Prolina</u>	<u>%Coloniz.</u>
Control	249a	0c	406a	0c	426a	0c
Control-P	217a	0c	263b	0c	379b	0c
<i>G. mosseae</i>	178b	70b	239b	64b	343bc	68b
<i>G. fasciculatum</i>	245a	69b	250b	65b	309c	62b
<i>G. deserticola</i>	154b	87a	170c	83a	185d	83a

En cada columna, los valores seguidos por la misma letra no son significativamente distintos ( $P < 0.05$ ) según el test de rango múltiple de Duncan ( $n = 5$ ).

**Tabla 10 .** Porcentaje y contenido total de N (mg/planta) en plantas de lechuga control, fertilizadas con P o micorrizadas y cultivadas con tres niveles de salinidad en el medio.

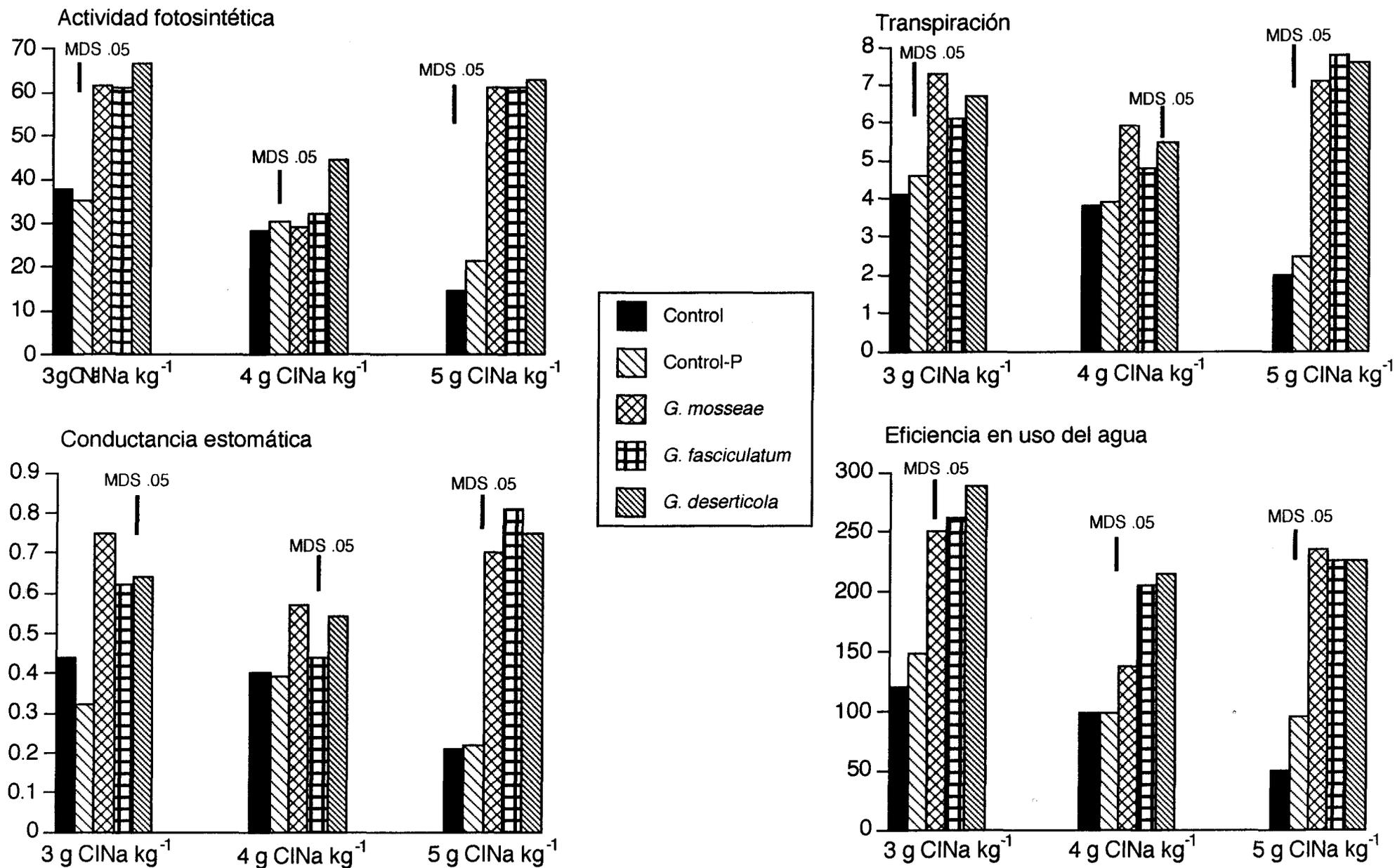
Tratamientos	3 g CINA kg <sup>-1</sup>		4 g CINA kg <sup>-1</sup>		5 g CINA kg <sup>-1</sup>	
	<u>N (%)</u>	<u>N total</u>	<u>N (%)</u>	<u>N total</u>	<u>N (%)</u>	<u>N total</u>
Control	1.4a	16.3a	1.6a	13.3a	1.5a	15.7bc
Control-P	1.4a	15.6a	1.4a	11.3a	1.6a	19.9a
<i>G. mosseae</i>	0.8b	15.0a	0.9b	13.2a	0.9b	12.2cd
<i>G. fasciculatum</i>	0.9b	15.0a	0.9b	13.8a	1.0b	12.9cd
<i>G. deserticola</i>	0.8b	11.6b	0.8b	12.8a	0.9b	11.3d

En cada columna, los valores seguidos por la misma letra no son significativamente distintos ( $P < 0.05$ ) según el test de rango múltiple de Duncan ( $n = 5$ ).

**Tabla 11 .** Porcentaje y contenido total de P (mg/planta) de plantas de lechuga control, fertilizadas con P o micorrizadas y cultivadas con tres niveles de salinidad en el medio.

Tratamientos	3 g CINA kg <sup>-1</sup>		4 g CINA kg <sup>-1</sup>		5 g CINA kg <sup>-1</sup>	
	<u>P (%)</u>	<u>P total</u>	<u>P (%)</u>	<u>P total</u>	<u>P (%)</u>	<u>P total</u>
Control	0.10c	1.2c	0.12c	1.3d	0.09c	0.92c
Control-P	0.23a	2.3b	0.15bc	1.7c	0.12b	1.02bc
<i>G. mosseae</i>	0.11c	2.2b	0.12c	1.8c	0.14b	1.90b
<i>G. fasciculatum</i>	0.12c	2.0b	0.14c	2.0bc	0.14b	1.80b
<i>G. deserticola</i>	0.18b	2.8a	0.21a	3.2a	0.21a	2.60a

En cada columna, los valores seguidos por la misma letra no son significativamente distintos ( $P < 0.05$ ) según el test de rango múltiple de Duncan ( $n = 5$ ).



**Figura 2:** Actividad fotosintética (nmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), tasa transpiratoria (μmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), conductancia estomática (mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y eficiencia en el uso del agua (mmol CO<sub>2</sub>/mol H<sub>2</sub>O · 10<sup>5</sup>) de plantas de lechuga micorrizadas (*G. mosseae*, *G. fasciculatum* o *G. deserticola*) o sin inocular (control y control-P) cultivadas con tres niveles de salinidad en el medio (n = 5).

#### 4.3. Determinación del efecto del estrés salino sobre la capacidad infectiva y efectividad simbiótica de un hongo de colección comparado con un aislado autóctono adaptado a zonas salinas.

*Primera Parte.* En el nivel salino más bajo (0.25 g ClNa kg<sup>-1</sup>) sólo *G. deserticola* incrementó significativamente el crecimiento vegetal, con independencia de la localización de la fuente de inóculo (Tabla 12). Sin embargo, el crecimiento radical si fué estimulado significativamente por los dos endofitos, experimentando un incremento de hasta 60% respecto a las plantas control en el caso del tratamiento con *G. deserticola* aplicado en el mismo compartimento que la planta hospedadora.

La capacidad colonizadora del endofito autóctono (Tabla 12) fué menor que la de *G. deserticola* tanto al situar el inóculo con la planta o a una distancia de 11 cm (sin contacto directo con la raíz). No obstante, ninguno de los dos endofitos disminuyó su capacidad infectiva como consecuencia de la proximidad o lejanía de la raíz, llegando, incluso, *G. deserticola* a colonizar más activamente el sistema radical de la planta hospedadora cuando el inóculo se aplicó en contacto con ésta.

La captación de N y P (Tabla 13) también resultó fuertemente estimulada en las plantas colonizadas por *G. deserticola*, si bien, el porcentaje de ambos elementos en la planta no sufrió diferencias significativas (excepto las plantas control en relación al P). La especie de *Glomus* autóctona de suelos salinos también incrementó la acumulación de P respecto a las plantas control, pero no la de N.

Al aplicar un nivel salino de 0.5 g ClNa kg<sup>-1</sup>, *G. deserticola* continuó siendo el endofito más activo en cuanto a estimulación del crecimiento vegetal y de la captación de N y P (Tablas 12 y 13), no evidenciándose efecto de la distancia a la cual se colocó el inóculo. Sin embargo, las plantas asociadas con el endofito autóctono si resultaron afectadas negativamente por la distancia, presentando, un 17% menos de crecimiento que las control. Además, al situar el inóculo a distancia de la planta hospedadora, este endofito no estimuló la captación de N y P e, incluso, los contenidos de ambos elementos en las plantas asociadas con esta especie fúngica fueron menores que en las plantas control. No obstante, las diferencias no fueron significativas. En este nivel salino no hubo estimulación del crecimiento radical por parte de los hongos. Sólo el tratamiento con *Glomus* sp. autóctono aplicado en la proximidad de la planta presentó un valor significativamente mayor que el control.

En este nivel de sal (0.5 g ClNa kg<sup>-1</sup>), ambos endofitos disminuyeron significativamente la capacidad colonizadora al aplicar el inóculo a 11 cm de la planta

hospedadora. En cualquier caso, esta disminución fué mayor para *Glomus* sp. autóctono que para *G. deserticola*.

La aplicación de 0.75 g CINa Kg<sup>-1</sup> no alteró el comportamiento de los endofitos observado en el nivel salino anterior (Tablas 12 y 13). Las plantas colonizadas por *G. deserticola* continuaron presentando los mayores crecimientos y contenidos en N y P, cualquiera que fuera la localización del inóculo, mientras que *Glomus* sp. autóctono fué afectado negativamente por la distancia de la raíz, aunque las diferencias no fueron significativas. En estas condiciones, lo que si disminuyó significativamente respecto a las plantas control fué el contenido en N.

Curiosamente, el tratamiento con *Glomus* sp. autóctono próximo a la raíz continuó teniendo un efecto positivo sobre el desarrollo radical.

También, en este nivel salino, ambos endofitos disminuyeron su capacidad infectiva como consecuencia de la distancia, siendo esta disminución mucho más acentuada en el caso de *Glomus* sp. autóctono (40%) que en *G. deserticola* (24%).

*Segunda Parte.* El crecimiento de las plantas situadas en el compartimento C fué considerablemente menor que el de las crecidas en el compartimento A (Tabla 14). El efecto de los dos endofitos sobre el crecimiento de la planta hospedadora fué distinto. Así, en el nivel de 0.25 g CINa kg<sup>-1</sup> las plantas colonizadas con *Glomus* sp. autóctono presentaron un mayor desarrollo (38% y 119% más que *G. deserticola* dependiendo de la localización inicial del inóculo). En cualquier caso la capacidad colonizadora del micelio (procedente de las plantas del primer ensayo) fué la misma en todos los casos, ya que no se apreciaron diferencias significativas en los porcentajes de colonización.

En el nivel salino provocado por 0.5 g CINa Kg<sup>-1</sup> se aprecia el efecto negativo de la distancia que debe recorrer el micelio para infectar a estas nuevas plantas sobre la eficiencia de la simbiosis. Así las plantas procedentes de los tratamientos en los que el inóculo original se localizaba en el compartimento B, son los que presentan un mayor crecimiento.

Al igual que en el anterior nivel salino, la colonización radical provocada por ambos hongos fué similar en todos los casos.

El incremento del contenido de sal a 0.75 g CINa Kg<sup>-1</sup> no afectó a la capacidad colonizadora de ambos endofitos. El desarrollo vegetal, no obstante, si fué menor que en los niveles salinos anteriores.

**Tabla 12:** Peso seco de parte aérea y raíz (g) y porcentaje de colonización MA de plantas de lechuga cultivadas en suelo con tres niveles crecientes de CINa. El inóculo se situó en el mismo compartimento que la planta huésped (0 cm) o en un compartimento alejado 11 cm de la misma.

Posición del inóculo	Tratamientos	0.25 g CINa Kg <sup>-1</sup>			0.5 g CINa Kg <sup>-1</sup>			0.75 g CINa Kg <sup>-1</sup>		
		Parte aérea	Raíz	% infección	Parte aérea	Raíz	% infección	Parte aérea	Raíz	% infección
0 cm Compart. A	<i>G. desertícola</i>	3.2a	2.4a	61.0b	3.1a	1.4ab	77.6a	3.4a	1.9ab	69.6a
	<i>Glomus</i> sp.	2.4b	1.9a	55.5c	2.9a	2.4a	72.2a	3.1a	3.0a	71.0a
	Control	2.1b	1.5b	0d	1.8b	0.9b	0d	1.7b	0.8b	0c
11 cm Compart. B	<i>G. desertícola</i>	3.5a	2.2a	69.3a	3.1a	1.6ab	61.8b	3.3a	2.5a	53.0b
	<i>Glomus</i> sp.	2.3b	1.9a	57.3c	1.5b	1.0b	53.7c	1.5b	1.2b	42.6b

En cada columna, los valores seguidos por letras distintas son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) según el test de rango múltiple de Duncan ( $n = 4$ ).

**Tabla 13:** Porcentaje y contenido total (mg/planta) de N y P en plantas de lechuga cultivadas en suelo con tres niveles crecientes de CINa. El inóculo se situó en el mismo compartimento que la planta huésped (0 cm) o en un compartimento alejado 11 cm de la misma.

Posición del inóculo	Tratamientos	0.25 g CINa Kg <sup>-1</sup>				0.5 g CINa Kg <sup>-1</sup>				0.75 g CINa Kg <sup>-1</sup>			
		N%	N total	P%	P total	N%	N total	P%	P total	N%	N total	P%	P total
0 cm Compart. A	<i>G. desertícola</i>	1.8a	57.3a	0.29a	9.2a	1.9a	60.2a	0.31a	9.7a	1.5b	52.9ab	0.28a	8.6a
	<i>Glomus</i> sp.	1.4a	34.3b	0.27a	6.7b	1.8a	48.0a	0.29a	8.2a	1.5b	47.3ab	0.27a	8.3a
	Control	2.1a	36.0b	0.16b	2.8c	1.6a	30.9b	0.16b	3.3b	2.3a	40.3b	0.22ab	3.8b
11 cm Compart. B	<i>G. desertícola</i>	1.8a	58.9a	0.27a	9.2a	1.6a	49.7a	0.28a	9.0a	1.7b	57.4a	0.28a	9.6a
	<i>Glomus</i> sp.	1.8a	41.7b	0.30a	6.8b	1.6a	23.4b	0.19b	2.5b	1.0c	14.5c	0.19b	3.4b

En cada columna, los valores seguidos por letras distintas son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) según el test de rango múltiple de Duncan ( $n = 4$ ).

**Tabla 14:** Peso seco de parte aérea y raíz (g) y porcentaje de colonización MA de plantas de lechuga cultivadas en suelo con tres niveles crecientes de CINA en un compartimento situado a 17 cm del inóculo.

Posición del inóculo	Tratamientos	0.25 g CINA Kg-1			0.5 g CINA Kg-1			0.75 g CINA Kg-1		
		Parte aérea	Raíz	% infección	Parte aérea	Raíz	% infección	Parte aérea	Raíz	% infección
0 cm Compart. A	<i>G. desertícola</i>	0.26bc	0.09bc	75.1a	0.19c	0.10b	64.0a	0.18b	0.10b	69.5a
	<i>Glomus sp.</i>	0.36b	0.17ab	80.0a	0.20c	0.12b	65.4a	0.17bc	0.08bc	73.1a
	Control	0.27bc	0.11b	0b	0.19c	0.09b	0b	0.11c	0.05c	0b
11 cm Compart. B	<i>G. desertícola</i>	0.21c	0.14b	81.2a	0.36b	0.14b	69.7a	0.16c	0.08bc	78.3a
	<i>Glomus sp.</i>	0.46a	0.22a	80.1a	0.46a	0.21a	58.0a	0.31a	0.13a	80.0a

En cada columna, los valores seguidos por letras distintas son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) según el test de rango múltiple de Duncan ( $n = 4$ ).

#### 4.4. Estudio de la contribución de las hifas fúngicas a la captación de agua por plantas micorrizadas.

Los resultados obtenidos (Figura 3) indican que la captación de agua por la planta resultó modificada por la presencia del hongo micorrízico. Cuando no se aplicó ningún agua en el compartimento hifal 2 (CH-2) el efecto de *G. deserticola* sobre el peso fresco de la planta fué considerable (incremento del 80% respecto a las plantas control fertilizadas con P), mientras que *G. fasciculatum* igualó el efecto de la fertilización con P. No obstante, cuando en el CH-2 se aplicó un potencial hídrico en suelo de -0.05 MPa, la efectividad de la micorrización se hizo más evidente, incrementando la cosecha de las plantas colonizadas por *G. fasciculatum* en un 153% y la de las plantas colonizadas por *G. deserticola* en un 216% respecto al tratamiento control fertilizado. Cuando el nivel hídrico del CH-2 incrementó a -0.01 MPa, ambos hongos presentaron igual efectividad. No obstante, *G. fasciculatum* reaccionó positivamente ante el incremento de agua en este compartimento aumentando en un 33% el crecimiento de las plantas colonizadas respecto al nivel hídrico anterior, mientras que las plantas inoculadas con *G. deserticola* mantuvieron similar crecimiento en ambos niveles.

El contenido hídrico en las hojas (Figura 3) mostró que un incremento en el agua del CH-2 significó un aumento también de agua en la planta. Sin embargo la acumulación foliar de agua fué significativamente menor en las plantas control que en las de los tratamientos micorrizados. En ausencia de agua en el CH-2, no hubo diferencias significativas, respecto a este parámetro, entre las plantas inoculadas con *G. fasciculatum* y las controles, mientras que en el caso de *G. deserticola*, las plantas presentaron el mayor contenido hídrico. Al adicionar cantidades crecientes de agua en el compartimento hifal, las plantas micorrizadas mejoraron significativamente la acumulación de agua en comparación con las plantas fertilizadas con P.

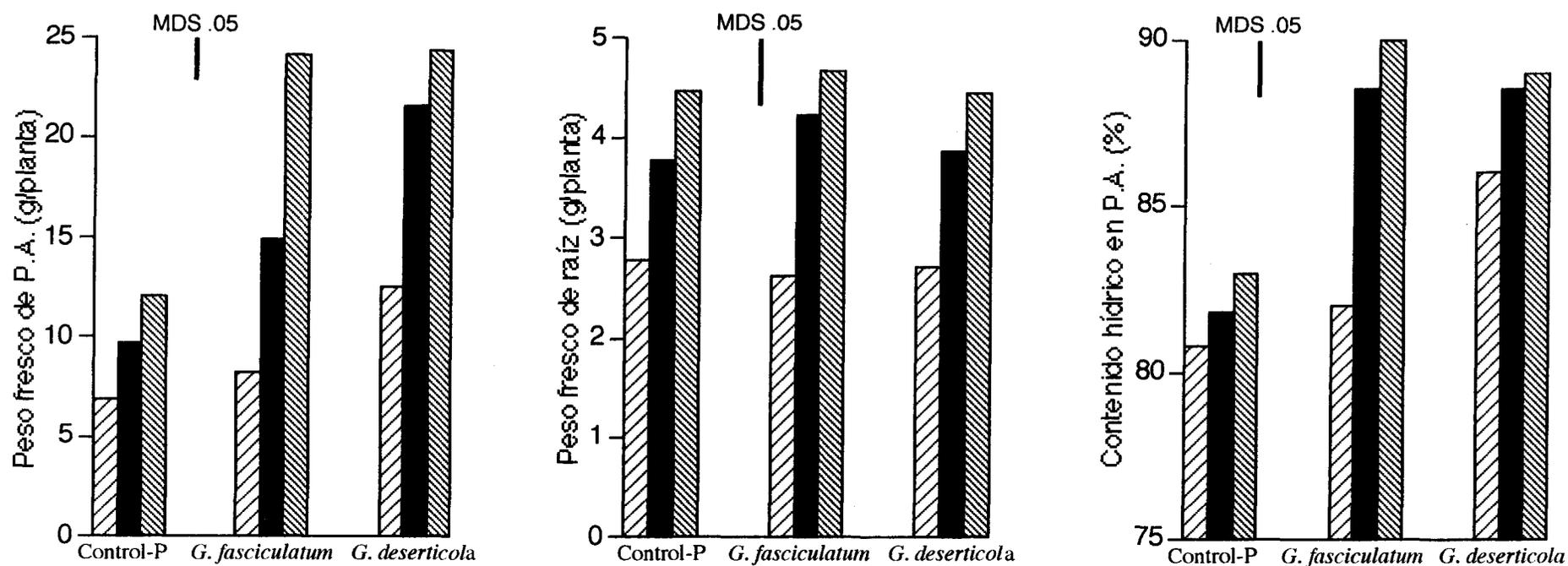
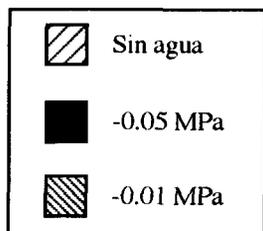
Dentro de cada nivel de agua aplicado en el CH-2, las tasas de crecimiento radical no variaron sustancialmente entre los tratamientos micorrizados y el control (Figura 3). Lo mismo ocurrió respecto al porcentaje de colonización radical provocado por cada uno de los dos hongos MA (Tabla 15).

Cuando no se aplicó agua en el compartimento hifal, la tasa fotosintética, EUA y eficiencia fotosintética en el uso del fósforo (EFUF) no difirieron significativamente entre las plantas control y las micorrizadas (excepto EFUF en *G. fasciculatum*) (Tabla 17). En cualquier caso, la aplicación de agua (-0.05 y -0.01 MPa) en dicho compartimento incrementó estos parámetros, especialmente en las plantas micorrizadas, siendo el efecto más relevante el encontrado en las plantas colonizadas por *G. fasciculatum*. Mientras que éste endofito afectó principalmente a la tasa fotosintética, EUA y EFUF, otros parámetros como la transpiración y

conductancia estomática alcanzaron sus valores máximos en las plantas inoculadas con *G. deserticola* independientemente del contenido hídrico del compartimento hifal.

En relación con la captación de nutrientes, en general, las plantas fertilizadas con P no captaron nutrientes más eficientemente (excepto N) en función del agua aplicada en el CH-2. Sin embargo, las plantas asociadas a *G. deserticola* aumentaron notablemente su contenido nutritivo en todos los regímenes hídricos ensayados. El aumento del contenido hídrico en CH-2 de -0.05 MPa hasta -0.01 MPa no varió el contenido en nutrientes de las plantas colonizadas por este hongo. Por otro lado, el nivel óptimo de agua para la captación de nutrientes en el caso de *G. fasciculatum* resultó ser -0.01 MPa (Tablas 18 y 19).

La prueba realizada para poner de manifiesto la existencia y actividad del micelio fúngico en el compartimento hifal indicó (Tabla 16) que la capacidad de colonización MA de las hifas existentes en el CH-2 dependió altamente del contenido hídrico en tal compartimento. Así, se evidenció una baja infectividad del micelio cuando este se había desarrollado en condiciones de sequía. Cuando el potencial hídrico del suelo de este compartimento era de -0.05 MPa, ambos micelios de los respectivos hongos presentaron una gran capacidad colonizadora, la cual disminuyó, en el caso del micelio procedente de *G. fasciculatum*, cuando el potencial hídrico del suelo descendió a -0.01 MPa.



**Figura 3.** Peso fresco de parte aérea y raíz y contenido hídrico de plantas de lechuga colonizadas por *G. fasciculatum* o *G. desertiicola* o no inoculadas y fertilizadas con P, cultivadas con tres niveles de humedad (Sin agua, -0.05 MPa or -0.01 MPa) en el compartimento hifal 2 (n = 5).

**Tabla 15.** Colonización radical (%) en plantas de lechuga cultivadas en medio con tres niveles hídricos (sin agua, -0.05 MPa ó -0.01 MPa) en el compartimento hifal.

Tratamientos	Sin agua	-0.05 MPa	-0.1 MPa
Control-P	0d	0d	0d
<i>G.fasciculatum</i>	70c	78bc	79bc
<i>G.desertícola</i>	78bc	88a	86ab

En cada columna, los valores seguidos por la misma letra no son significativamente distintos ( $p < 0.05$ ) según el test de rango múltiple de Duncan ( $n = 5$ ).

**Tabla 16.** Colonización radical (%) en plantas de lechuga infectadas a partir del micelio existente en el compartimento hifal 2.

Tratamientos	Sin agua	-0.05 MPa	-0.1 MPa
Control-P	0d	0d	0d
<i>G.fasciculatum</i>	10.5c	75a	55b
<i>G.desertícola</i>	14.0c	73a	77a

En cada columna, los valores seguidos por la misma letra no son significativamente distintos ( $p < 0.05$ ) según el test de rango múltiple de Duncan ( $n = 5$ ).

**Tabla 17.** Tasa fotosintética ( $\text{nmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), transpiración ( $\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), conductancia estomática ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), eficiencia en el uso del agua (EUA,  $\text{mmol CO}_2/\text{mol H}_2\text{O}$ ) y eficiencia fotosintética en el uso del P (EFUF  $\text{nmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ mg P}^{-1}$ ) de plantas de lechuga fertilizadas con P o micorrizadas y cultivadas con tres niveles de hídricos (Sin agua, -0.05 MPa o -0.01 MPa) en el compartimento hifal.

Tratamiento		Fotosint.	Transpiración	Conductancia	EUA ( $\times 10^5$ )	EFUF
Control-P	Sin agua	13g	18.4e	2.4e	17e	4.9g
	-0.05 MPa	52ef	24.6d	3.1d	76de	14.7e
	-0.01 MPa	75de	28.8cd	3.5d	112d	18.7d
<i>G. fasciculatum</i>	Sin agua	25fg	19.8e	2.3e	38e	8.0f
	-0.05 MPa	187c	31.3c	3.6d	301c	27.9c
	-0.01 MPa	565a	51.4b	5.9c	886a	44.5a
<i>G. desertícola</i>	Sin agua	23fg	26.7d	3.1d	36e	4.2g
	-0.05 MPa	96d	53.8b	6.7b	134d	8.2f
	-0.01 MPa	426b	59.7a	7.3a	594b	35.3b

Dentro de cada columna, los valores seguidos por la misma letra no son significativamente distintos ( $P < 0.05$ ) según el test de rango múltiple de Duncan ( $n = 5$ ).

**Tabla 18.** Concentración (%) de N, P, K, Ca y Mg en plantas de lechuga fertilizadas con P o micorrizadas y cultivadas con tres niveles de humedad (Sin agua, -0.05 MPa o -0.01 MPa) en el compartimento hifal 2.

Tratamientos		N	P	K	Ca	Mg
Control-P	Sin agua	2.3a	0.11c	4.5a	1.3a	0.36ab
	-0.05 MPa	2.2ab	0.10cd	4.3ab	1.1bcd	0.30cd
	-0.01 MPa	2.1abc	0.10cd	3.7c	0.9de	0.21e
<i>G. fasciculatum</i>	Sin agua	1.9cd	0.11c	3.7c	0.8e	0.24de
	-0.05 MPa	1.9cd	0.12bc	4.1bc	1.0cde	0.34bc
	-0.01 MPa	1.9cd	0.14ab	4.4ab	1.1bcd	0.42a
<i>G. desérticola</i>	Sin agua	2.0abc	0.14ab	4.0bc	1.0cde	0.28cd
	-0.05 MPa	1.9cd	0.14ab	4.2ab	1.1bcd	0.32bc
	-0.01 MPa	1.6d	0.14ab	4.1bc	1.2ab	0.33bc

Dentro de cada columna, los valores seguidos por la misma letra no son significativamente distintos ( $P < 0.05$ ) según el test de rango múltiple de Duncan ( $n = 5$ ).

**Tabla 19.** Contenido en N, P, K, Ca y Mg (mg/planta) en plantas de lechuga fertilizadas con P o micorrizadas y cultivadas con tres niveles de humedad (Sin agua, -0.05 MPa o -0.01 MPa) en el compartimento hifal 2.

Tratamientos		N	P	K	Ca	Mg
Control-P	Sin agua	29c	1.4c	16.0cd	57c	4.5d
	-0.05 MPa	38b	1.7c	18.4c	74b	5.1cd
	-0.01 MPa	41ab	1.8c	17.4c	72b	4.1d
<i>G. fasciculatum</i>	Sin agua	29c	1.6c	12.5d	56c	3.6d
	-0.05 MPa	38b	2.5b	19.3c	78b	6.6c
	-0.01 MPa	45a	3.9a	27.0b	114a	10.2a
<i>G. desérticola</i>	Sin agua	38b	2.6b	17.6c	74b	5.2cd
	-0.05 MPa	47a	4.0a	29.6ab	108a	8.3b
	-0.01 MPa	45a	4.1a	33.2a	114a	9.3ab

Dentro de cada columna, los valores seguidos por la misma letra no son significativamente distintos ( $P < 0.05$ ) según el test de rango múltiple de Duncan ( $n = 5$ ).

#### 4.5. Evaluación del efecto de la aplicación de ácido N-morfolino etano sulfónico (MES) sobre el desarrollo micelial y la captación de agua por las hifas.

Los datos obtenidos en este ensayo vuelven a confirmar lo observado en el anterior, especialmente cuando no se aplicó el tampón MES. Así, la presencia de los hongos MA afectó a la captación de agua por la planta (Figuras 4 y 5). Sin embargo, el efecto de los hongos fué diferente en función de la aplicación o no de tampón MES. En general, el comportamiento apreciado fué el mismo en ambos casos, pero mucho más amplificado y evidente cuando no se aplicó el tampón MES.

Así, en ausencia de tal producto, y en el caso de falta de agua en el CH-2, ambos hongos MA incrementaron en igual medida el peso fresco de las plantas respecto al control sin micorrizar (40%) (Figura 4). Cuando el contenido hídrico del CH-2 se incrementó a -0.01 MPa el tratamiento control no experimentó ningún incremento significativo en el crecimiento de las plantas respecto a la situación hídrica anterior, mientras que las plantas colonizadas por *G. fasciculatum* incrementaron su desarrollo en 68% y las inoculadas con *G. deserticola* lo hicieron en un 73%. En estas condiciones hídricas, las plantas colonizadas con *G. deserticola* presentaron una tasa de crecimiento mayor que las colonizadas por *G. fasciculatum*.

En cuanto al desarrollo radical, éste siguió una trayectoria muy similar a la marcada por la parte aérea de las plantas (Figura 4).

El contenido hídrico foliar de estas plantas (Figura 4) fué mayor cuando se aplicó agua en el compartimento hifal que cuando éste permaneció seco. No obstante, los valores obtenidos fueron significativamente menores para el tratamiento control que en los tratamientos micorrizados.

Realmente, es en parámetros tales como tasa fotosintética o la eficiencia en uso del agua (Figura 4) donde se evidenció un gran efecto de la captación de agua procedente del compartimento hifal situado a 15 cm de la raíz. En este sentido, mientras que la tasa fotosintética de las plantas controles (sin acceso al compartimento donde se aplicaba el tratamiento hídrico) no experimentó ninguna variación apreciable como consecuencia del aporte de agua en el compartimento hifal, los tratamientos micorrizados experimentaron incrementos de éste parámetro de 219% (*G. fasciculatum*) y 250% (*G. deserticola*).

La tasa fotosintética alcanzó su valor máximo en aquellas plantas asociadas a *G. deserticola*. En el caso de la transpiración y WUE ocurrió exactamente igual que con la tasa fotosintética.

En cuanto al porcentaje de colonización de las raíces por los hongos MA (Figura 5), no se apreciaron diferencias significativas entre ambos endofitos. La aplicación de agua en el CH-2 afectó a la capacidad colonizadora de *G. fasciculatum* que incrementó significativamente el porcentaje de colonización radical como consecuencia de la presencia de agua en dicho compartimento.

La prueba para determinar la presencia y actividad del micelio fúngico en el CH-2 (Figuras 5 y 7) demuestra que el micelio fué más abundante cuando no hubo aplicación de tampón MES. *G. deserticola* produjo, en todos los casos, un mayor porcentaje de infección en la planta huésped que *G. fasciculatum*. Ambos hongos incrementaron este parámetro como consecuencia del aumento de agua disponible en el compartimento hifal.

Los datos de captación de nutrientes por estas plantas (Figura 5), indican que la concentración de N sólo se vio afectada por la disponibilidad de agua en el CH-2 en el caso del tratamiento control fertilizado, el cual incrementó este parámetro al aumentar la disponibilidad de agua. Por el contrario, el contenido en N de las plantas micorrizadas incrementó al hacerlo la disponibilidad hídrica, mientras que en el tratamiento control fertilizado no hubo diferencias significativas entre los dos niveles hídricos aplicados en el CH-2.

La concentración de P en las plantas (Figura 5) resultó mayor en el tratamiento control fertilizado que en las plantas micorrizadas. Sin embargo, el contenido total de P fué mayor en las plantas micorrizadas que en las fertilizadas con P, principalmente cuando se aplicó agua en el CH-2.

En presencia de MES, y en el caso de falta de agua en el CH-2, ambos hongos MA incrementaron en igual medida el peso fresco de las plantas respecto al control sin micorrizar (135%) (Figura 6). Cuando el contenido hídrico del CH-2 se incrementó a -0.01 MPa el tratamiento control no experimentó ningún incremento significativo en el crecimiento de las plantas respecto a la situación hídrica anterior, mientras que las plantas colonizadas por *G. fasciculatum* incrementaron su desarrollo en 29% y las inoculadas con *G. deserticola* lo hicieron en un 17%.

En cuanto al desarrollo radical, éste siguió una trayectoria muy similar a la marcada por la parte aérea de las plantas (Figura 6).

El contenido hídrico foliar de estas plantas (Figura 6) fué mayor cuando se aplicó agua en el compartimento hifal que cuando éste permaneció seco (excepto en las plantas control). Los valores obtenidos en presencia de agua en el compartimento hifal fueron significativamente menores en el tratamiento control que en los tratamientos micorrizados.

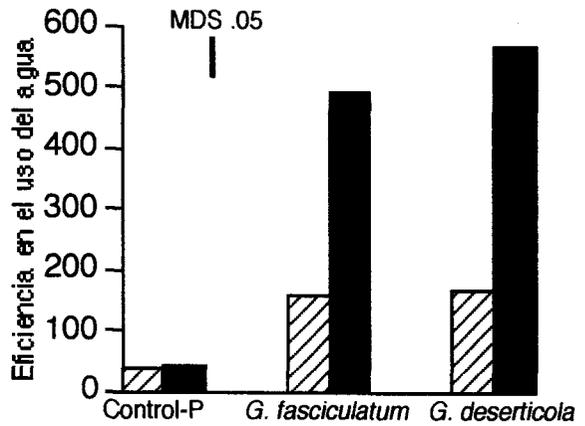
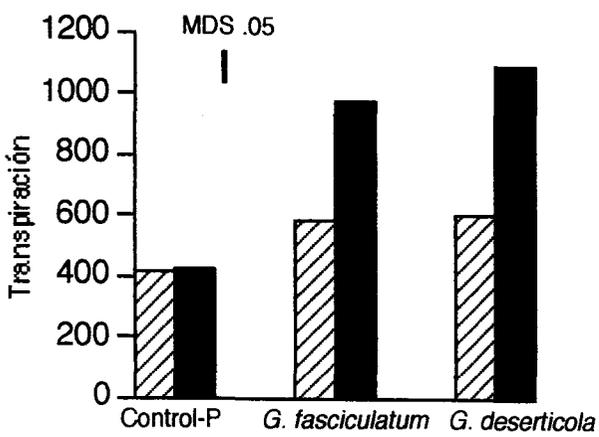
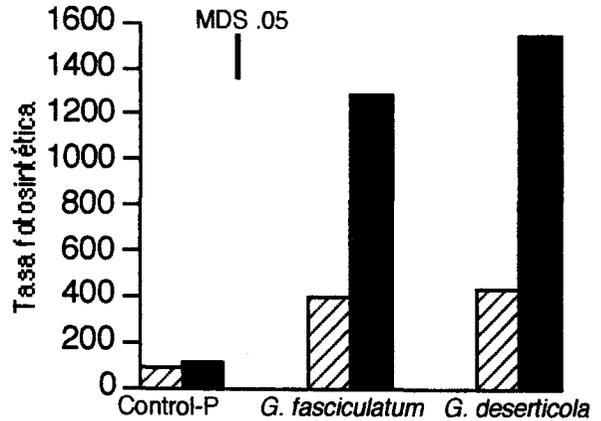
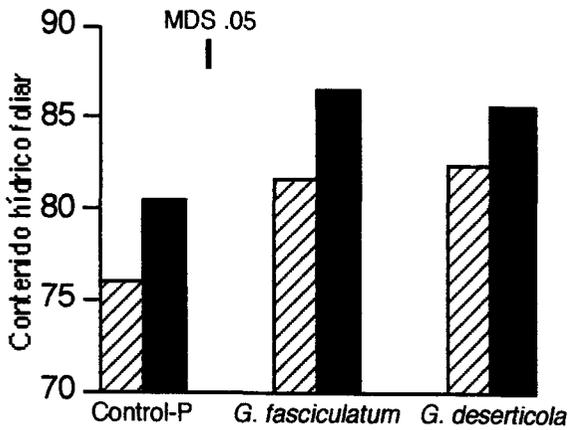
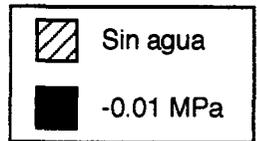
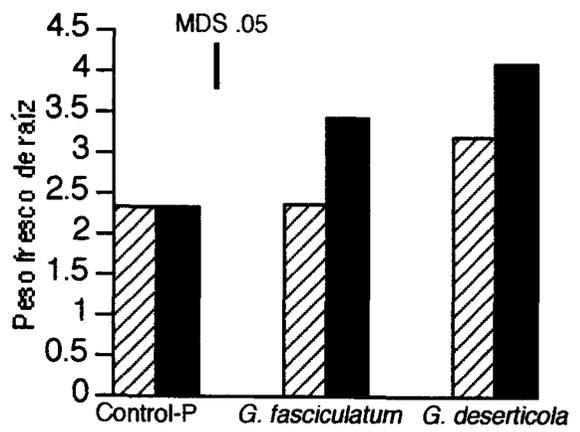
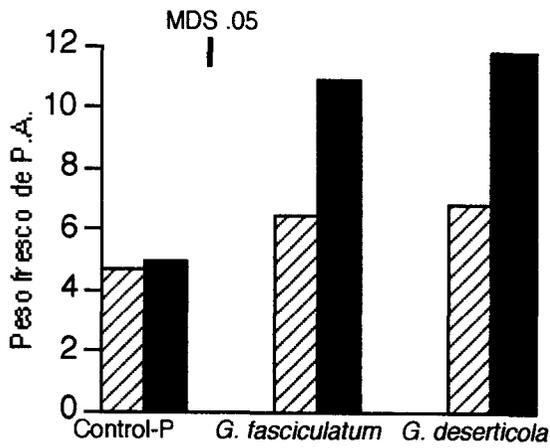
En parámetros tales como tasa fotosintética o la eficiencia en uso del agua (Figura 6) se evidenció un efecto de la captación de agua procedente del compartimento hifal situado a 15 cm de la raíz. En este sentido, mientras que la tasa fotosintética de las plantas controles (sin acceso al compartimento donde se aplicaba el tratamiento hídrico) no experimentó ninguna variación apreciable como consecuencia del aporte de agua en el compartimento hifal, los tratamientos micorrizados experimentaron incrementos de éste parámetro de 109% (*G. fasciculatum*) y 27% (*G. deserticola*).

El MES provocó un efecto distinto al deseado, resultando especialmente negativo, respecto a la situación sin MES para *G. deserticola*. En el caso de la transpiración y WUE ocurrió exactamente igual que con la tasa fotosintética.

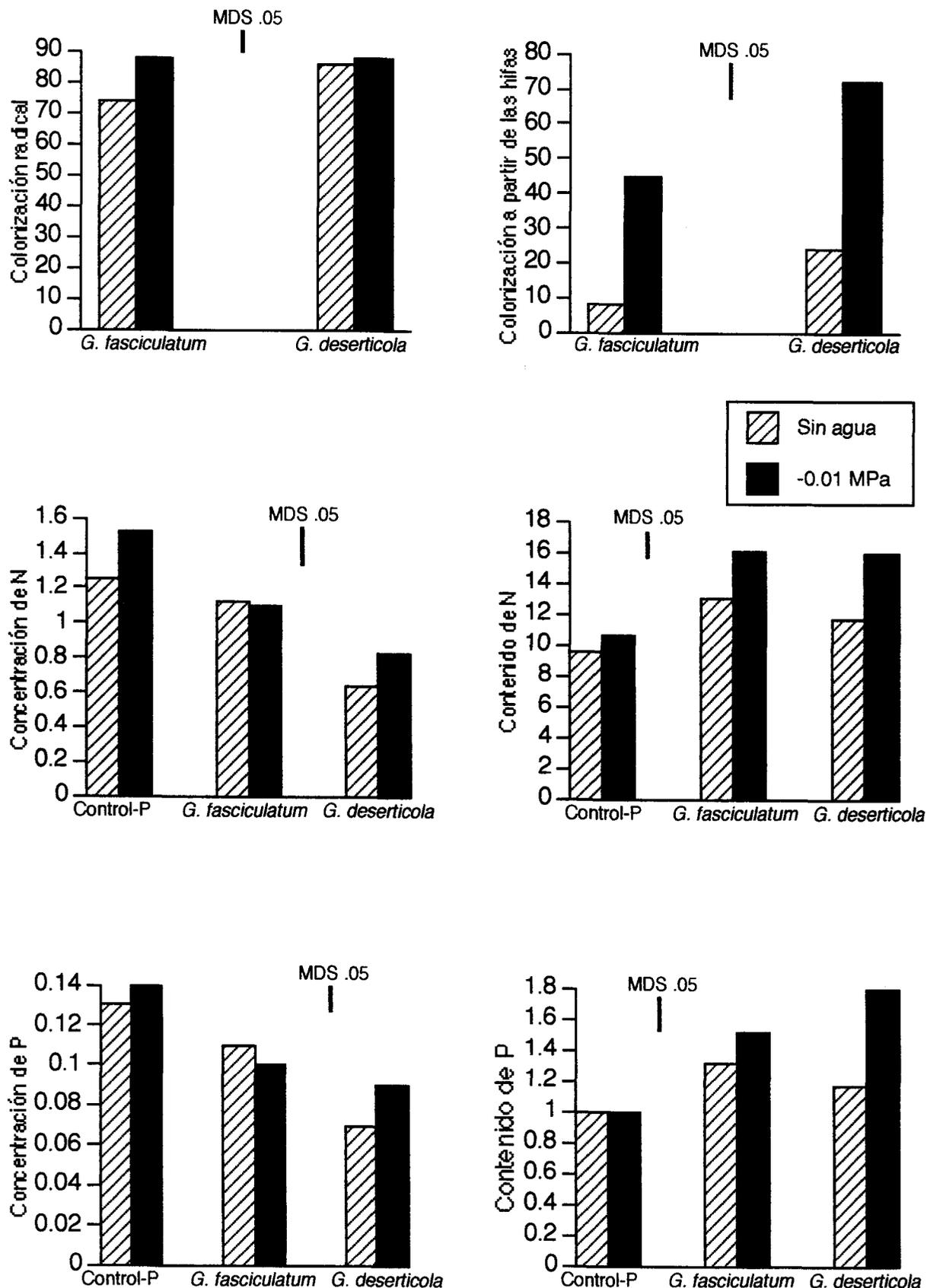
En cuanto al porcentaje de colonización de las raíces por los hongos MA (Figura 7), *G. deserticola* fué el endofito que presentó una mayor capacidad colonizadora. La aplicación de agua en el CH-2 no afectó a la capacidad colonizadora de los endofitos.

Los datos de captación de nutrientes por estas plantas, indican que la concentración de N (Figura 7) sólo se vio afectada por la disponibilidad de agua en el CH-2 en el caso del tratamiento control fertilizado, el cual disminuyó este parámetro al aumentar la disponibilidad de agua. Por el contrario, el contenido en N de las plantas micorrizadas incrementó al hacerlo la disponibilidad hídrica, mientras que en el tratamiento control fertilizado se produjo una disminución de este parámetro al incrementar la disponibilidad de agua en tal compartimento.

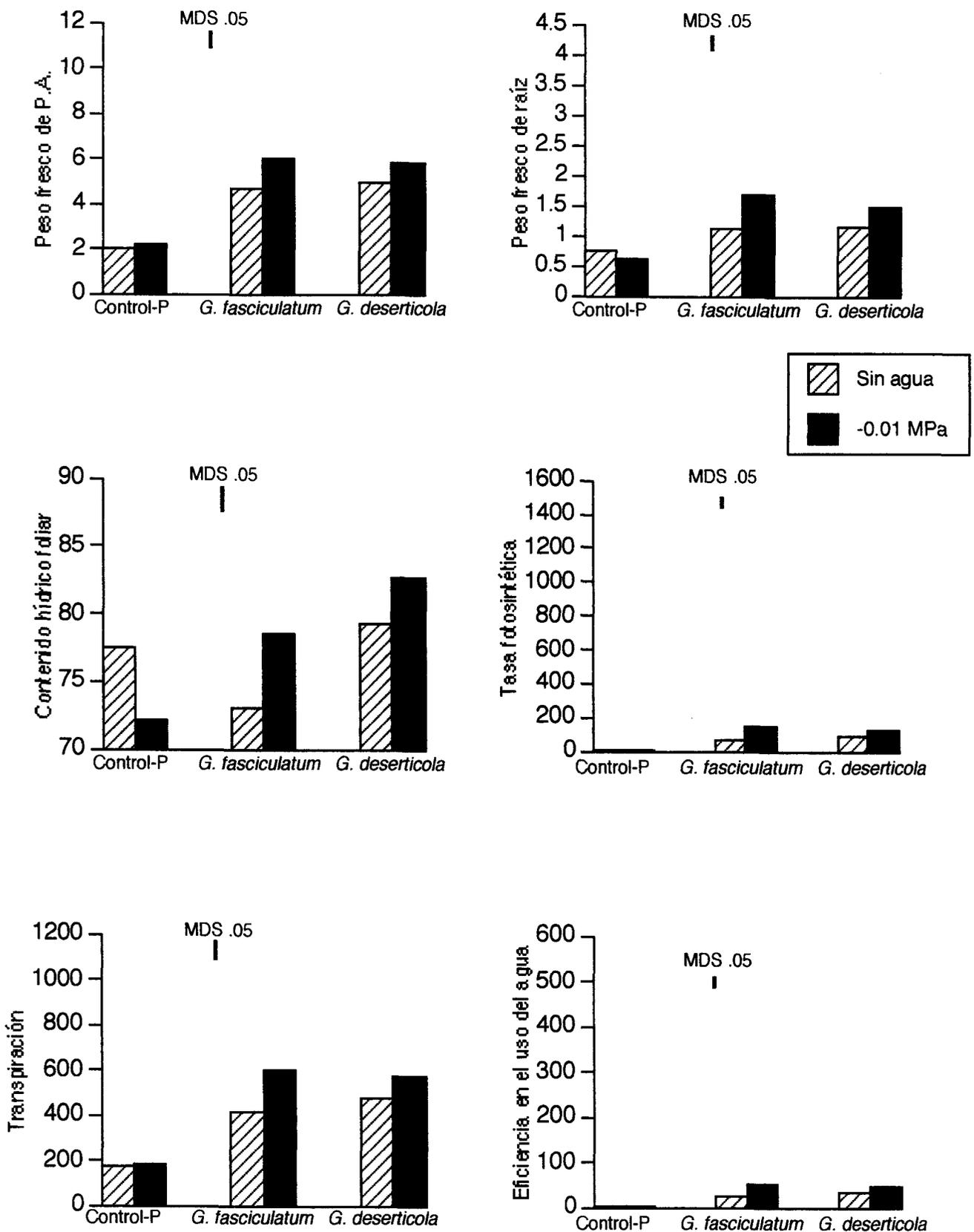
La concentración de P en las plantas (Figura 7) resultó mayor en el tratamiento control fertilizado que en las plantas micorrizadas cuando no se aplicó agua en el CH-2, mientras que al aplicar agua en dicho compartimento este efecto no se evidenció. Sin embargo, el contenido total de P fué similar en todos los tratamientos (excepto control-P en presencia de agua en el CH-2).



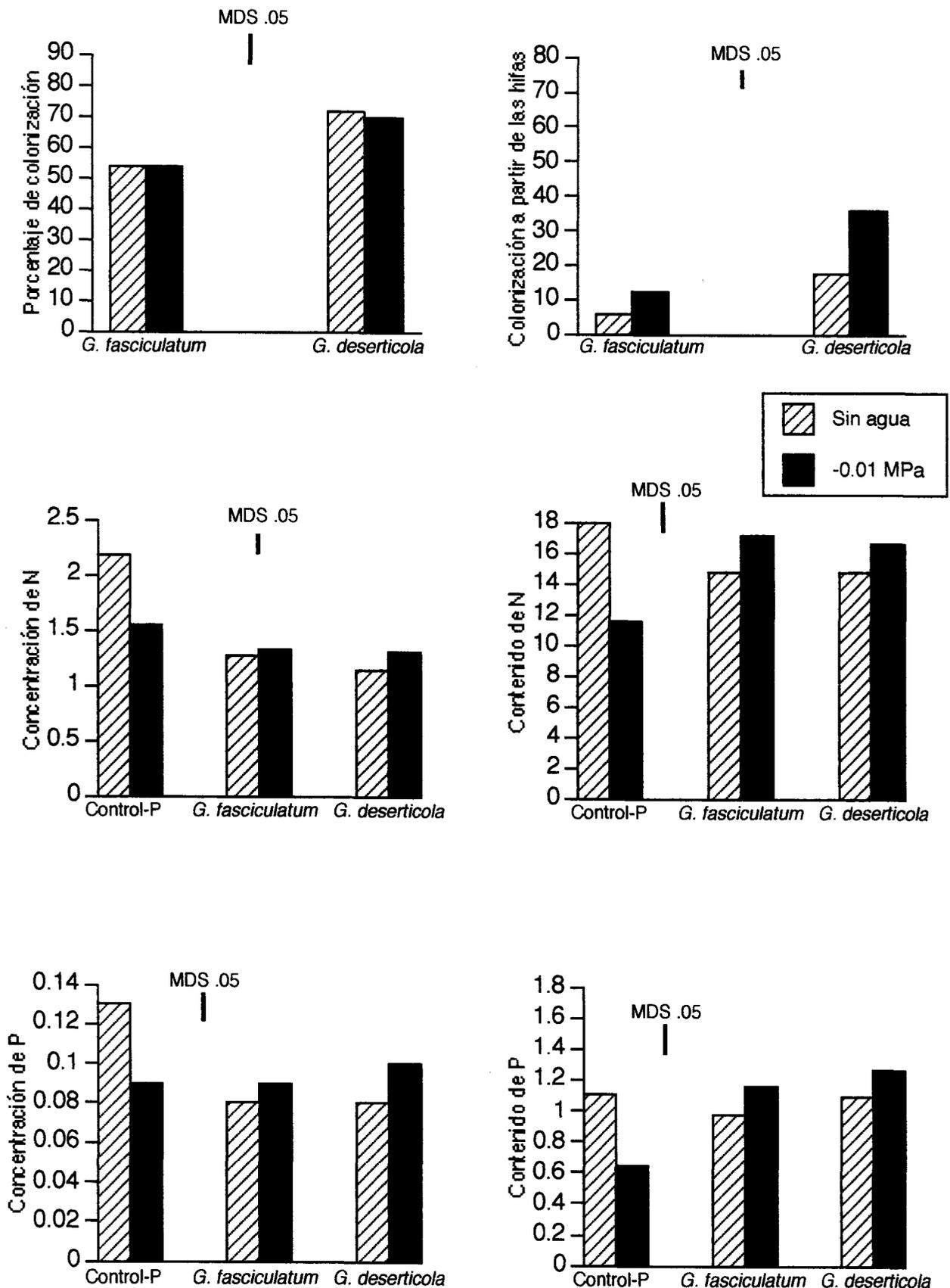
**Figura 4.** Peso fresco de parte aérea y raíz (g), contenido hídrico foliar (%), actividad fotosintética (nmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), transpiración (μmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y eficiencia en el uso del agua (mmol CO<sub>2</sub> / H<sub>2</sub>O x 10<sup>5</sup>) en plantas de lechuga colonizadas por *G. fasciculatum* o *G. deserticola* o no inoculadas y fertilizadas con P, cultivadas con dos niveles hídricos (sin agua y -0.01 MPa) en el compartimento hifal 2 y **no adicionadas** de tampón MES (n = 5).



**Figura 5.** Nivel de colonización radical (%), colonización a partir de las hifas del compartimiento hifal 2 (%), concentración de N y P (%) y contenido total de N y P (mg/planta) en plantas de lechuga colonizadas por *G. fasciculatum* o *G. deserticola* o no inoculadas y fertilizadas con P, cultivadas con dos niveles de humedad (sin agua y -0.01 MPa) en el compartimiento hifal 2 y **no adicionadas** de tampón MES (n = 5).



**Figura 6.** Peso fresco de parte aérea y raíz (g), contenido hídrico foliar (%), actividad fotosintética ( $\text{nmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), transpiración ( $\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y eficiencia en el uso del agua ( $\text{mmol CO}_2 / \text{H}_2\text{O} \times 10^5$ ) en plantas de lechuga colonizadas por *G. fasciculatum* o *G. deserticola* o no inoculadas y fertilizadas con P, cultivadas con dos niveles hídricos (sin agua y -0.01 MPa) en el compartimento hifal 2 y **adicionadas** de tampón MES ( $n = 5$ ).



**Figura 7.** Nivel de colonización radical (%), colonización a partir de las hifas del compartimiento hifal 2 (%), concentración de N y P (%) y contenido total de N y P (mg/planta) en plantas de lechuga colonizadas por *G. fasciculatum* o *G. deserticola* o no inoculadas y fertilizadas con P, cultivadas con dos niveles de humedad (sin agua y -0.01 MPa) en el compartimiento hifal 2 y **adicionadas** de tampón MES (n = 5).

#### 4.6. Estudio de la viabilidad de esporas de tres hongos formadores de micorrizas arbusculares después de un periodo de almacenamiento en suelo con diferentes niveles de potencial hídrico.

Los resultados muestran que las esporas de *G. mosseae* fueron muy sensibles a la humedad del suelo durante el periodo de almacenamiento, siendo más infectivas cuando se incubaron en suelo con -0.04 MPa de potencial hídrico (Tabla 20). En las diluciones 1/4 y 1/16 las esporas de este hongo disminuyeron su capacidad infectiva a 32-18%, cuando el potencial hídrico del suelo fué de -0.8 MPa, y a 12-13% respectivamente cuando el suelo permaneció seco durante el periodo de almacenamiento.

El comportamiento de las esporas de *G. fasciculatum* fué distinto (Tabla 20). La mayor infectividad se obtuvo cuando el potencial hídrico del suelo fué de -0.8 MPa, alcanzando, en las diluciones 1/4 y 1/16, un incremento de infectividad, en relación a -0.04 MPa, de 410% y 240% respectivamente (Tabla 21).

Las esporas de *G. deserticola* mostraron su mayor infectividad (23% de colonización radical) en suelo con alto contenido en agua.

La falta de humedad en el suelo durante el periodo de almacenamiento de las esporas disminuyó considerablemente la capacidad infectiva de las mismas. Los valores óptimos de potencial hídrico resultaron ser: -0.8 MPa para *G. fasciculatum* y -0.04 MPa para *G. mosseae* y *G. deserticola*.

En el presente estudio quedó claro que la reducción del número de esporas conlleva a una pérdida progresiva en la intensidad de la infección micorrízica en todos los casos. Así, el número más probable de 8 esporas fué insuficiente para inducir colonización radical. Cuando el número de esporas fué de 32, se produjo una infección detectable y con 125 esporas el porcentaje de colonización radical osciló entre 8% y 23% dependiendo del nivel hídrico del suelo durante el tiempo de almacenamiento de las esporas. (Tabla 20).

**Tabla 20:** Porcentaje de colonización radical de plantas de lechuga producido a partir de esporas de tres especies de *Glomus* después de 6 meses de almacenamiento en suelo seco o con diferentes potenciales hídricos y diluidas hasta 1/4, 1/16 o 1/64 con suelo.

Tratamientos	-0.04MPa			-0.8MPa			Seco		
	1/4	1/16	1/64	1/4	1/16	1/64	1/4	1/16	1/64
<i>G.mosseae</i>	9.2b	6.8c	1de	2.9c	1.2de	0e	1.1b	0.9b	0c
<i>G.fasciculatum</i>	1.9d	1.1de	0e	7.8a	2.6cd	0e	1.3b	1.1b	0c
<i>G.desertícola</i>	23.3a	8.7b	0e	5.3b	2.3cd	0e	2.0a	1.1b	0c

Para cada nivel de humedad del suelo, los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) según el test de rango múltiple de Duncan ( $n = 3$ ).

**Tabla 21:** Valores relativos \* (%) del porcentaje de colonización alcanzado en plantas de lechuga a partir de esporas de tres especies de *Glomus* después de 6 meses de incubación en suelo seco o a -0.8 MPa.

Tratamientos	1/4 (125 esporas)			1/16 (32 esporas)			1/64 (8 esporas)		
	-0.04 MPa	-0.8 MPa	Seco	0.04 MPa	-0.8 MPa	Seco	0.04 MPa	-0.8 MPa	Seco
<i>G.mosseae</i>	100	32	12	100	18	13	100	0	0
<i>G.fasciculatum</i>	100	410	68	100	240	100	0	0	0
<i>G.desertícola</i>	100	23	9	100	26	13	0	0	0

\* valores a -0.04 MPa = 100%

#### 4.7. Estudio del efecto del Ca en la resistencia al estrés osmótico (hídrico) originado mediante aplicación de polietilenglicol (PEG) al medio de cultivo.

No se evidenció efecto del Ca aplicado en el medio sobre el desarrollo de las plantas micorrizadas. Sólo los tratamientos sin micorrizar disminuyeron su crecimiento al aplicar 8 mM de Ca en el medio. El tratamiento fertilizado con P fué el que alcanzó un mayor desarrollo en todos los niveles de Ca ensayados (Tabla 22). El nivel de Ca aplicado tampoco afectó, salvo excepciones, al crecimiento radical.

La capacidad colonizadora de ambos hongos resultó negativamente afectada por el aumento de Ca en el medio, de manera que ambos endofitos disminuyeron el nivel de colonización radical a partir de 6 mM Ca, en el caso de *G. mosseae*, o a partir de 4 mM Ca en el caso de *G. fasciculatum*.

Los datos de captación de nutrientes (Tabla 23) indican que al aumentar el nivel de Ca en el medio incrementó la captación de N en todos los tratamientos. Las plantas inoculadas con *G. fasciculatum* fueron las que captaron mayor cantidad de N. Sólo cuando la disponibilidad de Ca era baja (2 mM) las plantas control captaron menos N que cualquiera de los otros tratamientos.

Las plantas fertilizadas con P, como era de esperar, presentaron los valores más altos de contenido en P. En general, se observa una tendencia a disminuir el contenido de P al aumentar la disponibilidad de Ca en el medio (excepto en el caso de *G. fasciculatum*). En relación al Ca, al igual que ocurría con el N, fué captado con mayor eficacia por las plantas colonizadas por *G. fasciculatum*. En menor medida lo hicieron las plantas fertilizadas con P y las inoculadas con *G. mosseae*. Las que captaron menos Ca fueron las del tratamiento control.

En todos los tratamientos se produjo un aumento en la acumulación de Ca en la planta a medida que incrementaba la disponibilidad del mismo en el medio. En los tratamientos sin micorrizar sólo se detectaron diferencias al comparar los niveles alto y bajo de Ca, mientras que en los tratamientos micorrizados se produjo el mayor aumento en el contenido de Ca de las plantas a partir de 6 mM Ca.

La inducción del estrés mediante la exposición de las plantas a PEG durante 22 h provocó la síntesis y acumulación de prolina (Figura 8). Esta síntesis de prolina alcanzó su valor máximo cuando la cantidad de agente osmótico aplicada fué de 20%. En cualquier caso, el efecto del aporte de concentraciones crecientes de Ca al medio fué diferente para las plantas micorrizadas que para las no inoculadas. Las micorrizadas disminuyeron la acumulación de tal agente osmoregulador a medida que aumenta la concentración de Ca. Este

efecto es mucho más pronunciado en las plantas colonizadas por *G. fasciculatum* que en el caso de *G. mosseae*, para ambas concentraciones de PEG. No obstante, la mayor diferencia entre plantas micorrizadas y controles en relación a este parámetro se observó cuando el PEG se aplicó en solución al 10% (que provoca un estrés más moderado). En este caso, las plantas control acumularon un 304% más de prolina que las colonizadas por *G. fasciculatum*.

Es destacable el hecho de que en los dos niveles de PEG (10 y 20%) que inducen estrés hídrico moderado o fuerte, las plantas micorrizadas acumularon más prolina que las no micorrizadas cuando el nivel de Ca en el medio era inferior a 6 mM. A partir de este nivel ya se produce un cambio de tendencia.

El contenido relativo de agua en las plantas (Figura 9) también resultó negativamente afectado por la aplicación de PEG. No obstante, la variación observada es mucho menor que en el caso de la acumulación de prolina.

Los mayores valores de contenido relativo de agua se obtienen en las plantas no sometidas a la acción del PEG. En estas condiciones, los tratamientos sin micorrizar no mostraron variación apreciable en relación con el nivel de Ca aplicado al medio. Sin embargo, los dos tratamientos micorrizados aumentaron su contenido relativo de agua al incrementar el nivel de Ca.

Al aplicar 10% PEG, ambos tratamientos micorrizados aumentaron su contenido relativo de agua a medida que la disponibilidad de Ca en el medio era mayor. Los dos tratamientos controles se comportaron de un modo totalmente contrario. Al aumentar la concentración de PEG al 20% el efecto observado fué similar al anterior.

En cualquiera de los niveles de PEG aplicados, las plantas inoculadas presentaron menores contenidos relativos de agua que los dos tratamientos controles cuando el nivel de Ca fué inferior a 2 mM, igualándose al aplicar 4 mM y mostrándose el efecto diferencial a partir de 6 mM. Estos resultados son análogos a los obtenidos con la acumulación de prolina.

**Tabla 22.** Peso seco de parte aérea y raíz (g) y colonización radical (%) de plantas de lechuga micorrizadas (*G. mosseae* ó *G. fasciculatum*) o no inoculadas (Control) o fertilizadas con P (Control-P) cultivadas en medio con cuatro niveles crecientes de Ca.

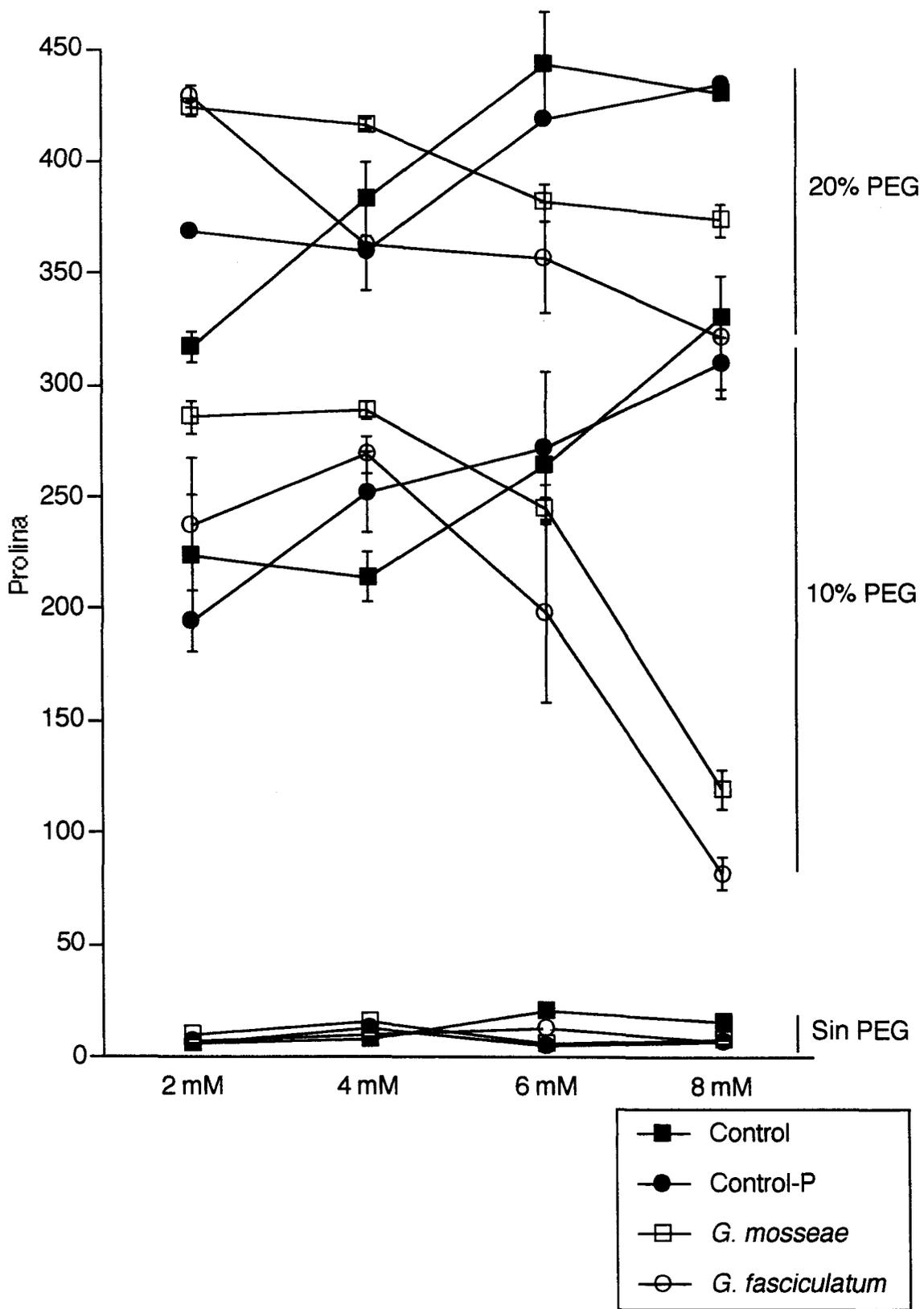
Tratamientos	Peso Seco Parte Aérea				Peso Seco Raíz				% Colonización Radical			
	2 mM	4 mM	6 mM	8 mM	2 mM	4 mM	6 mM	8 mM	2 mM	4 mM	6 mM	8 mM
Control	2.8cd	2.8cd	2.8cd	2.2e	3.6cd	5.2a	3.7cd	3.2cd	0d	0d	0d	0d
Control-P	3.4a	3.2ab	3.5a	2.9bc	3.5cd	3.8cd	3.4cd	4.9ab	0d	0d	0d	0d
<i>G. mosseae</i>	2.5de	2.6de	2.8cd	2.4de	3.8cd	3.5cd	3.4cd	2.7d	87a	81a	72bc	71bc
<i>G. fasciculatum</i>	2.9bc	2.8cd	2.6de	2.8cd	3.8cd	4.9ab	4.2bc	3.0cd	83a	74b	71b	66c

Para cada parámetro, los valores seguidos de la misma letra resultan no significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) según el test de rango múltiple de Duncan ( $n = 9$ ).

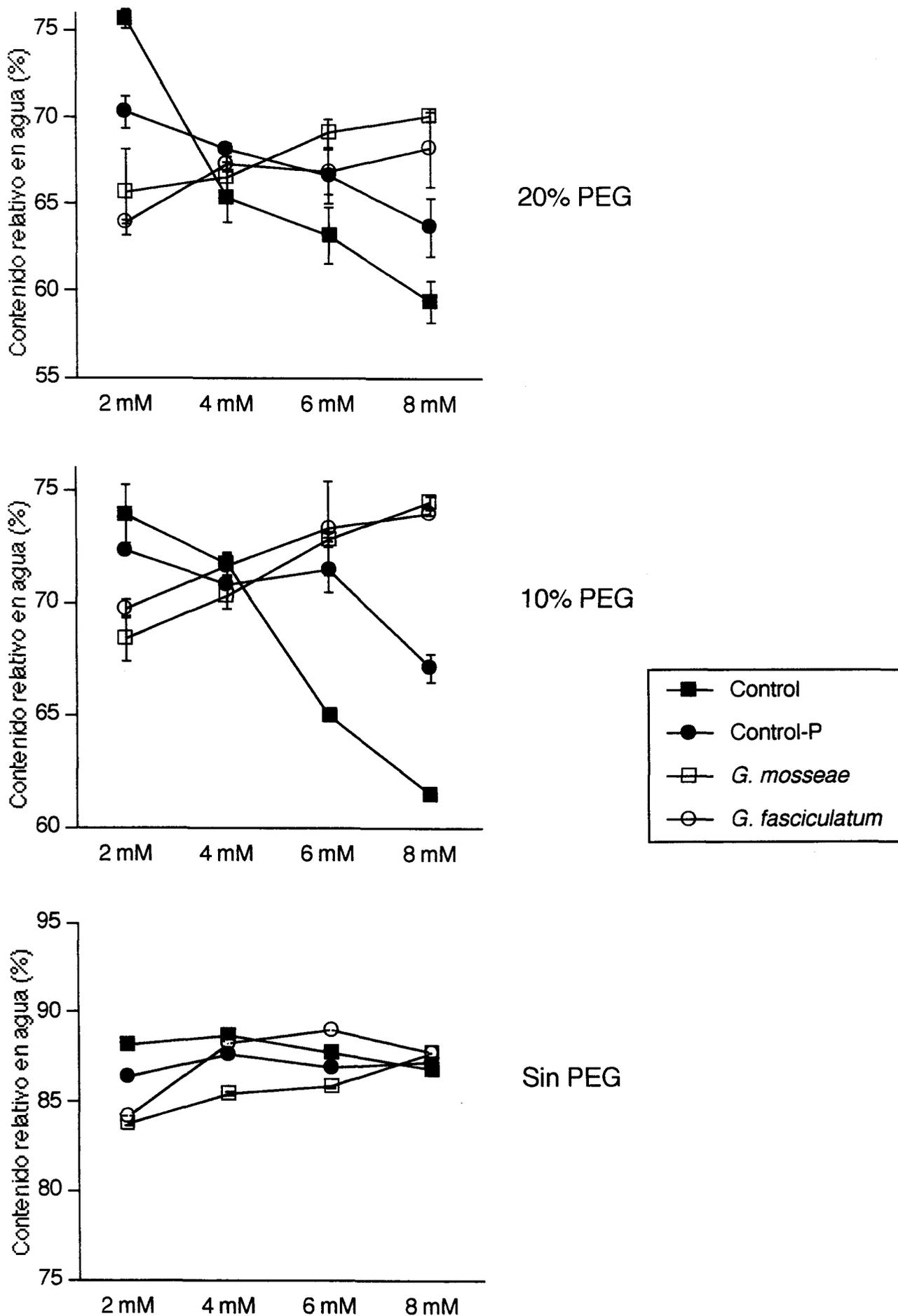
**Tabla 23.** Contenido total (mg/planta) de N, P y Ca en plantas de lechuga micorrizadas (*G. mosseae* ó *G. fasciculatum*) o no inoculadas (Control) o fertilizadas con P (Control-P) cultivadas en medio con cuatro niveles crecientes de Ca.

Tratamientos	N total				P total				Ca total			
	2 mM	4 mM	6 mM	8 mM	2 mM	4 mM	6 mM	8 mM	2 mM	4 mM	6 mM	8 mM
Control	28.2f	31.1ef	49.2bc	53.8b	2.9de	3.0de	2.9de	2.5e	15.9f	20.5e	22.5de	22.7de
Control-P	37.7de	32.4ef	52.6b	59.8b	4.2a	3.9ab	3.5bc	3.3cd	21.3e	21.8de	24.8cd	26.2bc
<i>G. mosseae</i>	34.4ef	32.6ef	43.9cd	55.7b	3.5bc	3.3cd	2.9de	2.8e	19.8e	20.1e	23.9d	27.0b
<i>G. fasciculatum</i>	46.8c	43.1cd	53.7b	70.4a	3.3cd	3.3cd	3.1de	3.7bc	23.4d	24.6cd	27.0b	29.5a

Para cada parámetro, los valores seguidos de la misma letra resultan no significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) según el test de rango múltiple de Duncan ( $n = 5$ ).



**Figura 8.** Contenido en prolina (nmol/g P.F.) de plantas de lechuga micorrizadas (*G. mosseae* o *G. fasciculatum*) o no inoculadas (Control) y fertilizadas con P (Control-P) cultivadas en medio con cuatro niveles crecientes de Ca y sometidas o no a la acción del PEG (n = 3).



**Figura 9.** Contenido relativo de agua en plantas de lechuga micorrizadas (*G. mosseae* o *G. fasciculatum*) o no inoculadas (Control) o fertilizadas con P (Control-P) cultivadas en medio con cuatro niveles crecientes de Ca y sometidas o no a la acción del PEG (n = 3).

#### 4.8. Estudio del efecto del K en la resistencia al estrés osmótico (hídrico) originado mediante aplicación de polietilenglicol (PEG) al medio de cultivo.

La exposición de las plantas a la acción del PEG durante 22 h no afectó a los parámetros mostrados en las Tablas 24 y 25. El aporte de K a la solución nutritiva en niveles crecientes no tuvo efecto sobre el crecimiento de las plantas dadas las condiciones experimentales empleadas. Sólo aquellas que fueron fertilizadas con P presentaron mayor crecimiento que en las del resto de tratamientos. Respecto al desarrollo radical, en general, el aumento de K desde el nivel mínimo (0.7 mM) a los niveles superiores (3.7 mM y 6.7 mM) incrementó significativamente el peso de raíz. Este incremento fué mayor en el caso de las plantas control no fertilizadas con P. Por el contrario, las plantas colonizadas por *G. fasciculatum* resultaron negativamente afectadas, en este parámetro, por el aumento del aporte de K al medio.

La relación raíz/parte aérea también aumentó con el aporte de K excepto en el caso de las plantas asociadas a *G. fasciculatum*.

En las condiciones experimentales de este ensayo se alcanzó una colonización radical considerable en todos los tratamientos micorrizados. Sólo *G. fasciculatum* resultó negativamente afectado por el incremento de potasio en el medio. El resto de tratamientos fúngicos no mostraron diferencias apreciables entre ellos o en función del K aportado.

En relación con la captación de nutrientes (Tabla 25), el contenido en N de las plantas incrementó cuando lo hizo la concentración de K (a partir de 0.7 mM para los dos tratamientos sin micorrizar y de 3.7 mM en los micorrizados).

El contenido en N de las plantas control y fertilizadas con P fué mayor o igual al de las plantas micorrizadas. El contenido en P resultó afectado por la concentración de K en el medio sólo en las plantas colonizadas por *G. deserticola* y por *G. fasciculatum*, las cuales disminuyeron significativamente este parámetro al adicionar 3.7 mM K. Al aplicar 6.7 mM K, el contenido en P alcanzó el valor máximo y equiparable al control fertilizado.

A medida que incrementó el contenido de K en el medio, lo hizo en el vegetal. En los tres niveles de K ensayados, las plantas micorrizadas captaron mayor cantidad de este elemento que las no micorrizadas, particularmente en los niveles bajo y alto. Cuando la concentración de K aplicada fué de 6.7 mM, *G. mosseae* resultó el endofito más efectivo.

La exposición de las plantas al estrés (15% de PEG) afectó negativamente a la actividad fotosintética en los tres niveles de K ensayados (Figura 10). No obstante, esta

reducción fué mayor en los tratamientos sin micorrizar que en las plantas micorrizadas con cualquiera de los endofitos. Este hecho fué más evidente cuando la disponibilidad de K en el medio era baja (0.7 mM). Así las plantas control y fertilizadas con P disminuyeron su actividad fotosintética en 60% y 55% respectivamente por la acción del PEG, mientras que la reducción para las plantas micorrizadas fué 20% (*G. deserticola*), 14% (*G. fasciculatum*) y 11% (*G. mosseae*). Al aumentar la disponibilidad de K (3.7 mM y 6.7 mM), el efecto depresor del PEG sobre este parámetro fué ya de rango similar en las plantas micorrizadas y en las no micorrizadas.

Los datos de tasa fotosintética indican también como a partir de 3.7 mM K las plantas colonizadas por *G. fasciculatum* fueron las que presentaron mayores valores de actividad fotosintética, tanto en ausencia como en presencia de PEG.

Los datos de eficiencia en uso del agua (Figura 10) muestran como cuando el K era deficitario (0.7 mM), tanto en ausencia como presencia de PEG, las plantas colonizadas presentaron mayores valores de este parámetro que las no colonizadas, siendo *G. mosseae* el tratamiento que alcanzó el valor más alto. Al aumentar el aporte de K al medio a 3.7 mM, el tratamiento fertilizado con P fué el que alcanzó valores máximos, pero al llegar a 6.7 mM K fueron *G. deserticola* y *G. fasciculatum* los que mostraron mayor eficiencia en el uso del agua. Curiosamente, en este nivel de K, las plantas colonizadas por *G. mosseae* fueron las que presentaron valores más bajos para este parámetro. Estos resultados demuestran la particular sensibilidad de cada endofito a un determinado factor o elemento.

Los resultados de transpiración (Figura 11) indican que, en todos los tratamientos y niveles de K, la aplicación del agente estresante (PEG) al medio redujo este parámetro. En el nivel de K más bajo (0.7 mM) las plantas colonizadas por *G. mosseae* exhibieron tasas transpiratorias más bajas que las del resto de tratamientos. En el nivel de 3.7 mM K, estas plantas equipararon su tasa transpiratoria con la de las colonizadas por *G. fasciculatum* y control-P o con la de las plantas no sometidas a estrés. Cuando el nivel de K aplicado al medio fué de 6.7 mM se produjo un notable incremento de la tasa transpiratoria en las plantas colonizadas por *G. mosseae*, siendo en presencia de PEG cuando este efecto se hizo más evidente. Por el contrario las colonizadas por *G. deserticola* disminuyeron significativamente este parámetro en presencia y ausencia de PEG.

En relación con la conductancia estomática (Figura 11), en general, ésta no resultó afectada significativamente por la aplicación de PEG ni por el nivel de K adicionado al medio de cultivo.

**Tabla 24.** Peso seco (g) de parte aérea y raíz, relación raíz/parte aérea y porcentaje de infección micorrícica de plantas de lechuga inoculadas con tres hongos MA comparadas con plantas fertilizadas con fosfato y control en función del nivel de K en el medio (mM K).

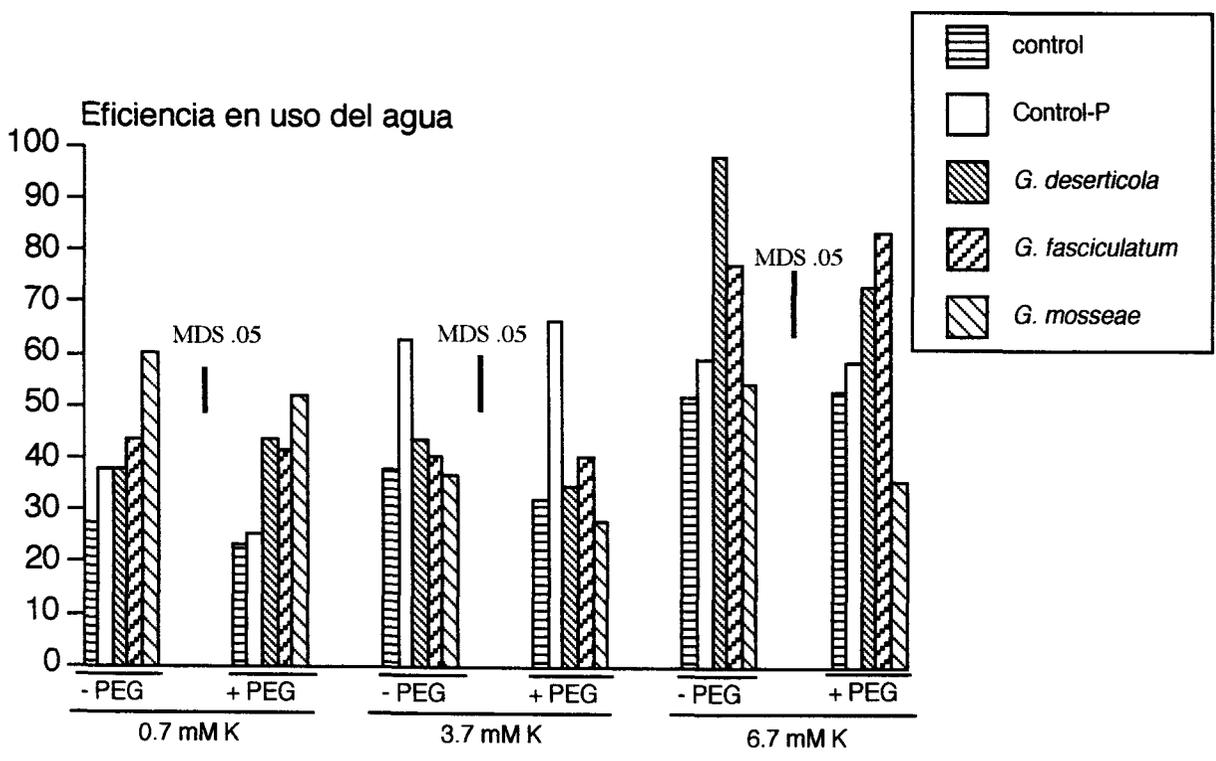
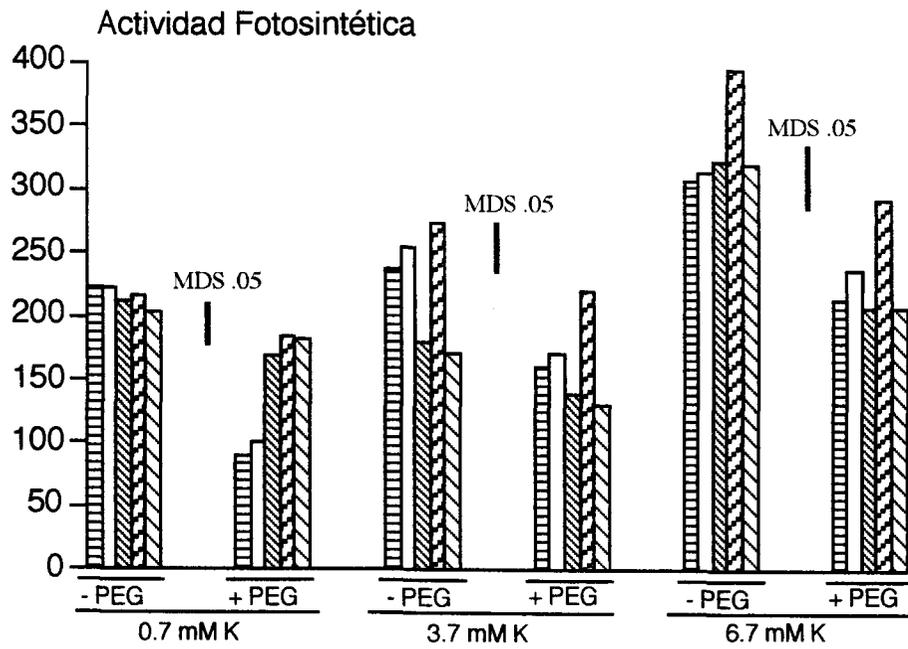
Tratamientos	Parte aérea			Raíz			R/P.A.			% colonización AM		
	0.7 mM	3.7 mM	6.7 mM	0.7 mM	3.7 mM	6.7 mM	0.7 mM	3.7 mM	6.7 mM	0.7 mM	3.7 mM	6.7 mM
Control	1.01b	1.10b	1.16ab	0.48e	0.63d	0.77bc	0.47d	0.57d	0.66c	0c	0c	0c
Control-P	1.31a	1.40a	1.30a	0.67d	0.95a	0.96a	0.51d	0.68c	0.73bc	0c	0c	0c
<i>G. desertícola</i>	0.87b	0.91b	1.03b	0.54e	0.77bc	0.80b	0.62cd	0.69c	0.78b	86a	84ab	86a
<i>G. fasciculatum</i>	0.82b	0.92b	0.93b	0.81b	0.63d	0.66d	0.99a	0.68c	0.71bc	89a	73b	73b
<i>G. mosseae</i>	1.07b	0.97b	0.93b	0.72cd	0.86ab	0.90ab	0.67c	0.88ab	0.97a	83ab	85a	83ab

Para cada parámetro, los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) según el test de rango múltiple de Duncan ( $n = 8$ ).

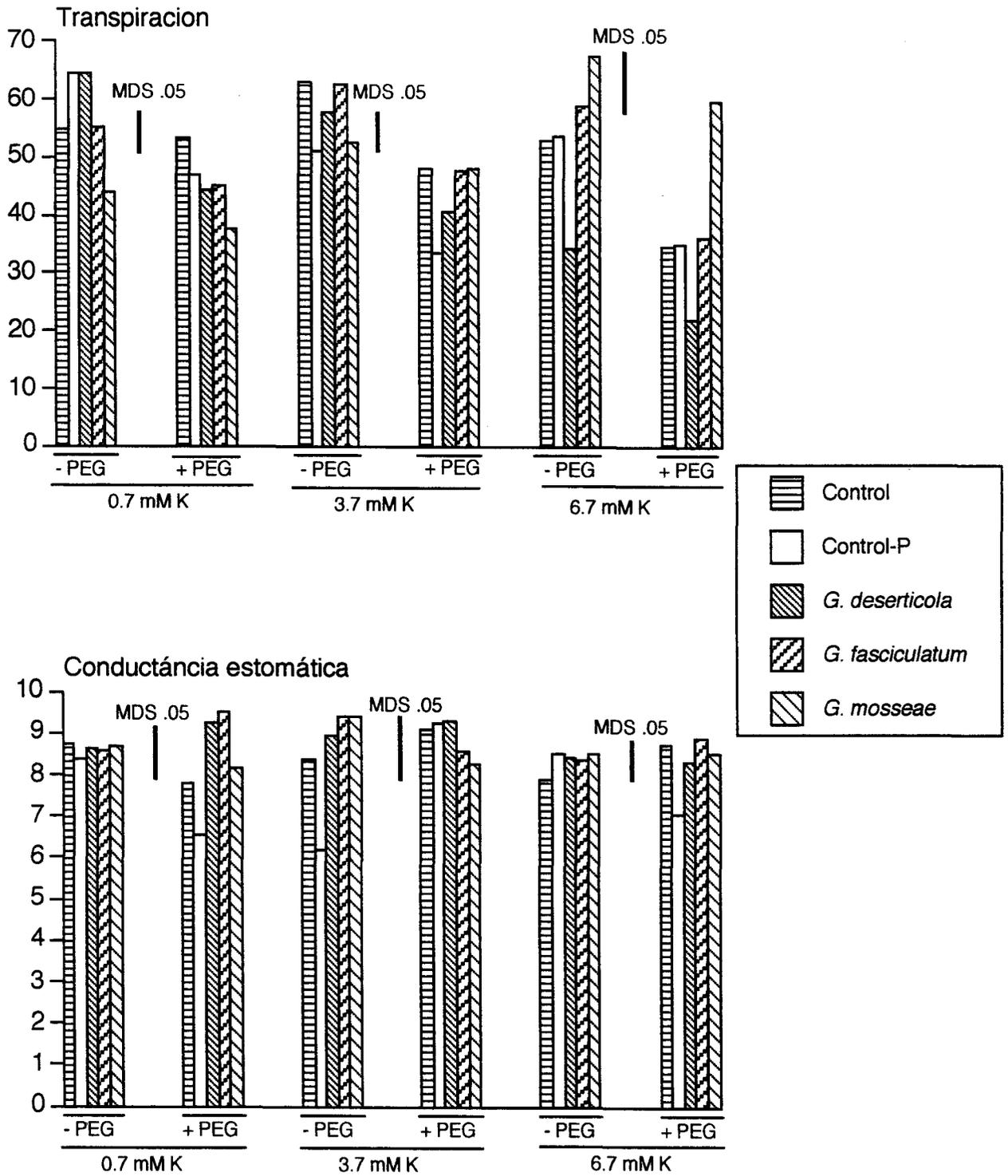
**Tabla 25.** Contenido en nutrientes (mg/planta) en plantas de lechuga inoculadas con tres hongos MA comparadas con plantas fertilizadas con fosfato y control en función del nivel de K en el medio (mM K).

Tratamientos	N			P			K		
	0.7 mM	3.7 mM	6.7 mM	0.7 mM	3.7 mM	6.7 mM	0.7 mM	3.7 mM	6.7 mM
Control	37bc	48ab	51a	2.3cd	2.5cd	2.0de	11.1f	63.1d	87.8c
Control-P	32d	44ab	43ab	2.7bc	2.8bc	2.9ab	12.3f	68.7d	84.3c
<i>G. desertícola</i>	39bc	34cd	42ab	2.5cd	1.8e	3.4a	23.6e	68.1d	100.4b
<i>G. fasciculatum</i>	39bc	29d	37bc	2.0de	1.1f	3.2ab	22.1e	78.1c	102.2b
<i>G. mosseae</i>	34cd	35cd	46ab	2.2cd	2.1cd	2.7bc	16.7ef	91.7bc	120.6a

Para cada parámetro, los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) según el test de rango múltiple de Duncan ( $n = 5$ ).



**Figura 10.** Actividad fotosintética ( $\text{nmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y eficiencia en el uso del agua ( $\text{mmol CO}_2/\text{mol H}_2\text{O} \times 10^5$ ) de plantas de lechuga inoculadas con tres hongos MA comparadas con plantas fertilizadas con P o control en función del nivel de K en el medio y de la aplicación o no de PEG ( $n = 4$ ).



**Figura 11.** Tasa transpiratoria ( $\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y conductancia estomática ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) de plantas de lechuga inoculadas con tres hongos MA comparadas con plantas fertilizadas con P o control en función del nivel de K en el medio y de la aplicación o no de PEG ( $n = 4$ ).

#### 4.9. Evaluación de la actividad superóxido dismutasa (SOD) en plantas de lechuga micorrizadas o no y sometidas a estrés hídrico.

La inoculación con los hongos formadores de MA incrementó significativamente el peso de las plantas en todas las condiciones ensayadas tras 5 semanas de cultivo de las mismas (Tabla 26). En ambas situaciones hídricas, *G. mosseae* incrementó el crecimiento vegetal en torno a un 200% respecto a las plantas control y *G. deserticola* lo hizo en torno a un 150%.

El contenido hídrico de las plantas (Tabla 26) fue similar en las plantas control y en las colonizadas por *G. mosseae*, resultando levemente mayor en aquellas colonizadas por *G. deserticola*. En todos los tratamientos el contenido hídrico disminuyó como consecuencia del estrés.

La colonización micorrízica (Tabla 26) no se afectó por el estrés hídrico, siendo mayor en el caso de las plantas colonizadas por *G. deserticola* que en aquellas colonizadas por *G. mosseae*.

A las ocho semanas de cultivo se mantuvo el efecto positivo de la micorrización sobre el crecimiento vegetal. En este estadio, el incremento fue de un 95% y un 191% dependiendo del hongo y el régimen hídrico. La disminución del contenido hídrico foliar como consecuencia de la limitación del aporte de agua al medio fue más notoria en este estadio que en las plantas cosechadas tras sólo cinco semanas de crecimiento. El tratamiento con *G. deserticola* presentó, en este caso también, los mayores valores para este parámetro.

El porcentaje de colonización radical (Tabla 26) incrementó con el tiempo y, al igual que en el caso anterior, las plantas inoculadas con *G. deserticola* fueron colonizadas más intensamente que las inoculadas con *G. mosseae*.

La concentración de proteínas y la actividad SOD fueron determinadas en hoja y raíz. Los resultados de parte aérea (Tabla 27) indican que la concentración de proteínas incrementó a lo largo del cultivo. A su vez, todos los tratamientos disminuyeron la concentración de proteínas como consecuencia del estrés (excepto las plantas colonizadas por *G. mosseae* a las ocho semanas de cultivo). El tratamiento con *G. deserticola* fue el que indujo la mayor síntesis de proteínas. Las plantas micorrizadas presentaron mayor concentración de proteínas, particularmente sin limitación hídrica.

Los resultados de actividad SOD se expresan como actividad total o actividad específica (Tabla 27). La actividad total resultó mayor en las plantas micorrizadas que en las controles bajo las dos condiciones hídricas (-0.04 y -0.17 MPa) ensayadas (excepto en las

plantas no sometidas a estrés e inoculadas con *G. mosseae* a las ocho semanas de cultivo). La mayor actividad SOD la presentaron las plantas colonizadas por *G. deserticola*.

Las diferencias de actividad SOD específica entre tratamientos son mucho más acusadas. A las cinco semanas de cultivo, en condiciones de estrés, la actividad SOD fué significativamente mayor en las plantas colonizadas que en las controles. En estas condiciones, el incremento de actividad fué de 100% (*G. mosseae*) y 124% (*G. deserticola*). Bajo condiciones de adecuado aporte de agua, no se apreciaron diferencias significativas. Así mismo, debido al estrés, se observó un incremento de actividad SOD específica y éste fué mayor en las plantas micorrizadas. Así, las controles incrementaron la actividad en un 17% como consecuencia del estrés, mientras que las inoculadas lo hicieron en un 93% (*G. mosseae*) y en un 128% (*G. deserticola*).

A las ocho semanas de cultivo, la actividad SOD específica fué menor que la cuantificada a las cinco semanas. No obstante, se mantuvieron tendencias similares. Así pues, las plantas micorrizadas también presentaron mayor actividad SOD que las controles bajo condiciones de estrés. Cuando las plantas fueron sometidas a estrés hídrico (-0.17 MPa), el incremento de actividad respecto a los valores encontrados a -0.04 MPa fué de 50% (control), 116% (*G. mosseae*) y 133% (*G. deserticola*).

En cuanto a la determinación de proteínas y actividad SOD en raíz (Tabla 28), los resultados obtenidos demuestran que tras cinco semanas de cultivo, la concentración de proteínas, pese a que incrementó por la inoculación con los hongos MA, no lo hizo de manera significativa. Trás ocho semanas de crecimiento vegetal, las plantas colonizadas por *G. deserticola* presentaron una concentración de proteínas mayor que los otros dos tratamientos. En relación con la actividad SOD total, tanto a las cinco como a las ocho semanas de cultivo sólo hubo diferencias significativas entre los tratamientos al someter a las plantas a estrés hídrico. Así, las plantas control presentaron menores valores que las micorrizadas y, dentro de éstas, fueron las colonizadas por *G. deserticola* las que presentaban una mayor actividad total. Al igual que en parte aérea, la actividad total en raíz fué menor en las plantas con ocho semanas que en las que se cosecharon a las cinco semanas.

La actividad específica en raíz fué la más afectada por la micorrización, produciéndose, a las cinco semanas, un incremento de actividad por encima del 16%, al cultivarse a -0.04 MPa de potencial hídrico en el suelo. Al someter las plantas a estrés hídrico (-0.17 MPa) este incremento pasó a un 99% y 150% para las plantas colonizadas por *G. mosseae* y *G. deserticola*, respectivamente. No obstante, al igual que en parte aérea, lo más significativo en raíz fué que mientras las plantas control prácticamente no incrementaron la actividad SOD a consecuencia del estrés (sólo un 6%), las colonizadas por *G. mosseae* lo hicieron en un 81%

y las colonizadas por *G. deserticola* en un 117%. Dichas tendencias se mantuvieron a lo largo del cultivo.

Si se considera la suma de actividad SOD en parte aérea y raíz (Figura 12) se observa que, mientras las plantas control prácticamente no incrementaron la distribución de dicha actividad como consecuencia del estrés, el incremento de actividad encontrado en las plantas micorrizadas fué consecuencia, principalmente, del efecto del estrés hídrico.

Los resultados de la Tabla 29 indican que, a las cinco semanas, las plantas controles no sometidas a estrés presentaron mayor captación de N, mientras que cuando se sometieron a estrés este elemento fué captado más activamente por las colonizadas por *G. deserticola*.

Respecto al P, las plantas micorrizadas no sometidas a estrés y de cinco semanas presentaron valores más altos de P (concentración y contenido) que las controles, pero al ser sometidas a estrés, sólo las plantas colonizadas por *G. mosseae* presentaron mayor contenido y concentración de P.

El contenido de nitrógeno (Tabla 29) no se vio afectado por el régimen hídrico ni por el tratamiento microbiano en las plantas de ocho semanas. Sólo la concentración de N resultó mayor en las plantas controles que en las micorrizadas. La concentración y el contenido total de P incrementaron con la micorrización, especialmente en las plantas colonizadas por *G. mosseae*.

El estudio isoenzimático llevado a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida reveló la existencia de una única banda de actividad SOD, la cual resultó igual en todos los tratamientos, con independencia del nivel hídrico aplicado, del estadio de crecimiento de las plantas y de la procedencia del material vegetal (hoja o raíz) (Figura 13).

**Tabla 26:** Peso seco de parte aérea, contenido en agua y colonización radical (%) de plantas de lechuga inoculadas con *G. mosseae* o *G. deserticola* o sin inocular (control), crecidas en condiciones de adecuado aporte de agua (-0.04 MPa) o sometidas a estrés hídrico (-0.17 MPa) y cosechadas tras 5 u 8 semanas de cultivo.

Tratamientos	5 Semanas			8 Semanas		
	<u>Peso Seco</u>	<u>Contenido en agua</u>	<u>Coloniz. MA</u>	<u>Peso Seco</u>	<u>Contenido en agua</u>	<u>Coloniz. MA</u>
	g	%	%	g	%	%
<b>-0.04 MPa</b>						
Control	0.16d	91b	0c	0.80c	87a	0c
<i>G. mosseae</i>	0.75a	91b	60b	2.33a	84b	68b
<i>G. deserticola</i>	0.46b	94a	75a	2.01ab	88a	82a
<b>-0.17 MPa</b>						
Control	0.12d	89c	0c	0.90c	82c	0c
<i>G. mosseae</i>	0.47b	88c	63b	2.20a	81c	73b
<i>G. deserticola</i>	0.30c	92b	76a	1.76b	84b	87a

En cada columna, los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) según el test de rango múltiple de Duncan ( $n = 5$ ).

**Tabla 27.** Concentración de proteínas (mg/mL) y Actividad SOD total (U/mL) y específica (U/mg) en **hojas** de plantas de lechuga inoculadas con *G. mosseae* o *G. deserticola* o no inoculadas (control), cultivadas bajo condiciones de adecuado aporte de agua (-0.04 MPa) o sometidas a estrés hídrico (-0.17MPa) y cosechadas tras 5 u 8 semanas de cultivo.

Tratamientos	5 Semanas			8 Semanas		
	<u>Proteínas (<math>\times 10^{-3}</math>)</u>	<u>Actividad SOD</u>		<u>Proteínas (<math>\times 10^{-3}</math>)</u>	<u>Actividad SOD</u>	
		Total	Específica		Total	Específica
<b>-0.04 MPa</b>						
Control	66c	12.6c	191b	125b	14.1c	113d
<i>G. mosseae</i>	81b	18.8b	232b	109bc	16.0c	147cd
<i>G. deserticola</i>	106a	23.3b	220b	166a	21.7b	131cd
<b>-0.17 MP</b>						
Control	55d	12.3c	224b	104c	17.6c	169b
<i>G. mosseae</i>	62c	27.8a	448a	110bc	34.1a	317a
<i>G. deserticola</i>	62c	31.1a	502a	116bc	35.4a	305a

En cada columna, los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) según el test de rango múltiple de Duncan ( $n = 5$ ).

**Tabla 28.** Concentración de proteínas (mg/mL) y Actividad SOD total (U/mL) y específica (U/mg) en raíz de plantas de lechuga inoculadas con *G. mosseae* o *G. deserticola* o no inoculadas (control), cultivadas bajo condiciones de adecuada irrigación (-0.04 MPa) o sometidas a estrés hídrico (-0.17 MPa) y cosechadas tras 5 u 8 semanas de cultivo.

Tratamientos	5 semanas			8 semanas		
	Proteínas (x10 <sup>-3</sup> )	Actividad SOD		Proteínas (x10 <sup>-3</sup> )	Actividad SOD	
		Total	Específica		Total	Específica
<b>-0.04 MPa</b>						
Control	27.0a	8.0d	296d	33.0b	7.4d	224d
<i>G. mosseae</i>	31.1a	10.7d	344c	29.2b	7.4d	253cd
<i>G. deserticola</i>	35.2a	12.7cd	361c	39.1a	10.3cd	263c
<b>-0.17 MPa</b>						
Control	27.2a	8.5d	313cd	28.1b	7.9d	281c
<i>G. mosseae</i>	30.0a	18.7b	623b	27.5b	13.1bc	476a
<i>G. deserticola</i>	34.2a	26.8a	784a	40.5a	15.3a b	378b

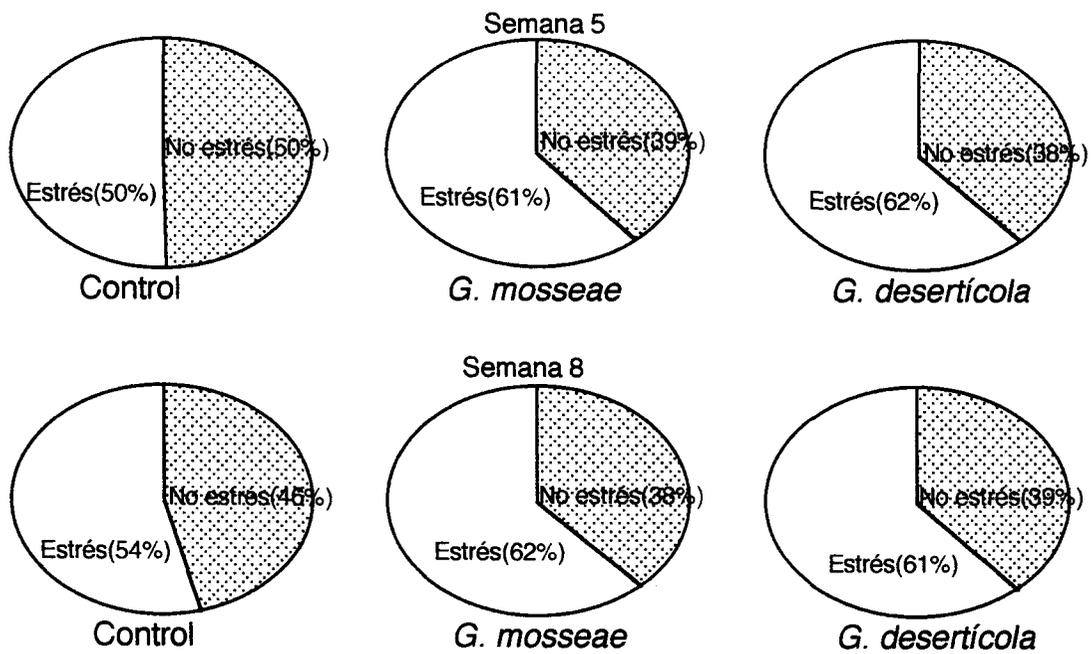
En cada columna, los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (P<0.05) según el test de rango múltiple de Duncan (n = 5).

**Tabla 29.** Concentración de N y P (%) y contenido total (mg/planta) en plantas de lechuga inoculadas con *G. mosseae* o *G. deserticola* o sin inocular (control), crecidas en condiciones de adecuado aporte de agua (-0.04 MPa) o sometidas a estrés hídrico (-0.17 MPa) y cosechadas tras 5 u 8 semanas de cultivo.

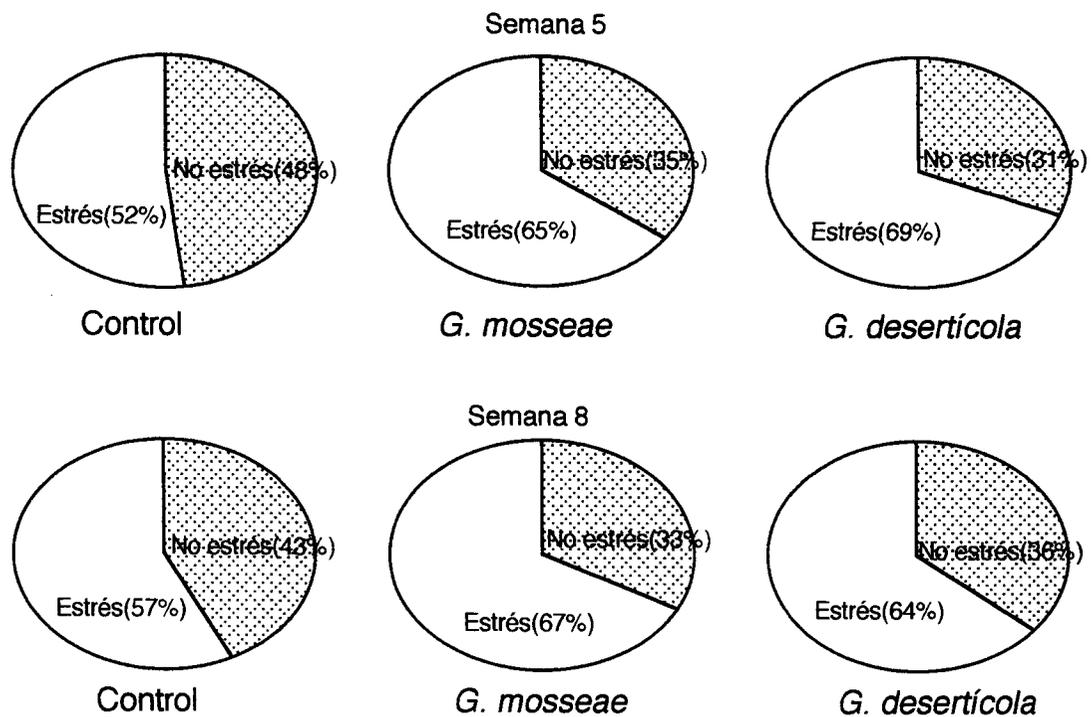
Tratamiento	5 Semanas				8 Semanas			
	NITROGENO		FOSFORO		NITROGENO		FOSFORO	
	%	Total	%	Total	%	Total	%	Total
<b>-0.04 MPa</b>								
Control	3.6a	15.8a	0.14d	0.6c	1.8a	14.4a	0.09d	0.8d
<i>G. mosseae</i>	1.8cd	12.0b	0.20c	1.4ab	0.7c	15.1a	0.14a	3.1a
<i>G. deserticola</i>	2.7b	11.3b	0.27b	1.1b	0.8c	15.3a	0.14a	2.7b
<b>-0.17 MPa</b>								
Control	1.7d	10.6bc	0.20c	1.3b	1.5b	14.9a	0.07e	0.7d
<i>G. mosseae</i>	1.6d	8.1c	0.32a	1.6a	0.7c	14.1a	0.12bc	2.5b
<i>G. deserticola</i>	2.4bc	16.5a	0.18c	1.3b	0.9c	13.8a	0.11c	1.9c

En cada columna, los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (P< 0.05) según el test de rango múltiple de Duncan (n = 5).

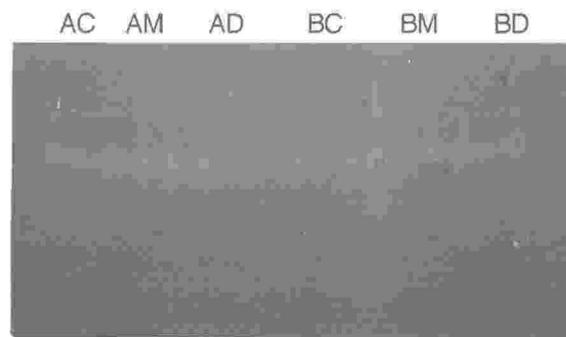
### Actividad SOD total



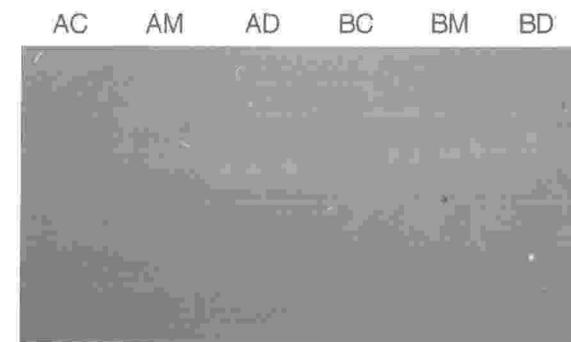
### Actividad SOD específica



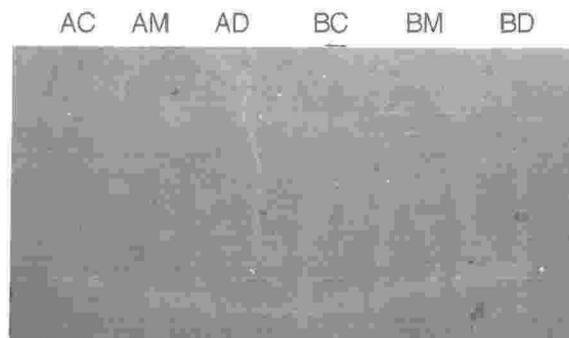
**Figura 12.** Efecto del estrés hídrico sobre la actividad SOD (parte aérea + raíz) en plantas de lechuga inoculadas con *G. mosseae* o *G. deserticola* o sin inocular (control), crecidas en condiciones de adecuado aporte de agua o sometidas a estrés hídrico y cosechadas tras 5 u 8 semanas de cultivo.



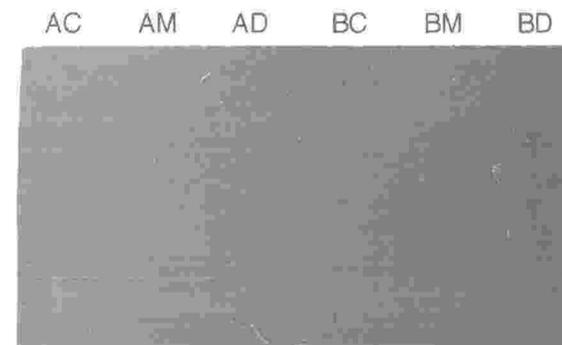
Semana 5. Parte aérea



Semana 5. Raíz



Semana 8. Parte aérea



Semana 8. Raíz

**Figura 13.** Estudio isoenzimático de la actividad SOD en plantas de lechuga inoculadas con *G. mosseae* (M) o *G. deserticola* (D) o control (C), cultivadas con adecuado aporte de agua (A) o sometidas a estrés hídrico (B) y cosechadas tras 5 u 8 semanas de cultivo.

#### 4.10. Estudio de la actividad nitrato reductasa (NR) en plantas de lechuga micorrizadas o no y sometidas a estrés hídrico.

El peso seco de parte aérea fué mayor en las plantas micorrizadas que en las controles en las plantas cultivadas con adecuado aporte de agua (-0.04 MPa) (Tabla 30). Las fertilizadas con P mostraron similar crecimiento que las inoculadas con *G. fasciculatum*. Ambas alcanzaron un mayor desarrollo vegetal que las inoculadas con *G. mosseae*. Pero, las colonizadas por *G. deserticola* fueron las que presentaron el mayor peso seco de parte aérea.

El estrés hídrico aplicado (-0.17 MPa) disminuyó el crecimiento en todas las plantas, pero, mientras esta disminución fué del 78% (control) y 67% (Control-P) en las plantas sin micorrizar, en las micorrizadas sólo disminuyó un 38% (*G. mosseae*), 33% (*G. fasciculatum*) y 15% (*G. deserticola*).

En relación con el peso seco de raíz (Tabla 30), el efecto encontrado fué similar, si bien, en este caso, no hubo diferencias significativas entre los tres hongos MA.

El estudio del contenido hídrico (Tabla 30) de la planta mostró valores similares entre los tres tratamientos micorrizados y el fertilizado con P cuando las plantas se cultivaron a -0.04 MPa de potencial hídrico. Las plantas controles presentaron un contenido hídrico significativamente menor que las micorrizadas. Al someter las plantas al estrés hídrico (-0.17 MPa), aquellas que estaban micorrizadas disminuyeron levemente su contenido hídrico, mientras que esta reducción fué mucho más pronunciada en las plantas control y fertilizadas con P.

Los datos de colonización radical (Tabla 30) indican que los tres hongos fueron bastante efectivos en la colonización de la raíz de la planta huésped. No se produjeron diferencias significativas como consecuencia del estrés hídrico, siendo *G. deserticola* el hongo más infectivo en todos los casos.

El estudio de la actividad NR (Tabla 30), indicó la existencia de grandes diferencias entre las plantas micorrizadas y las no micorrizadas, tanto en situaciones de adecuado aporte de agua como de estrés hídrico. En el primero de los casos (-0.04 MPa) las plantas inoculadas con *G. deserticola*, presentaron los valores más altos de esta actividad enzimática, seguidas, pero con un descenso significativo, por las colonizadas por *G. mosseae*, y por último por las colonizadas por *G. fasciculatum*. Las plantas no micorrizadas presentaron valores más bajos que las anteriores, siendo el tratamiento control el que mostró una menor actividad NR. En relación con las plantas control, las colonizadas por *G. deserticola* incrementaron la actividad NR en un 132%. La aplicación del estrés hídrico (-0.17 MPa) originó una disminución

generalizada de la actividad NR. No obstante, mientras que esta disminución de actividad fué de un 57% (control) y 40% (control-P) para las plantas sin inocular, en las plantas colonizadas por *G. fasciculatum* y *G. deserticola* resultó ser de sólo 18% y 13% respectivamente. El tratamiento con *G. mosseae*, sin embargo, también disminuyó considerablemente (42%) la actividad NR a consecuencia del estrés. En cualquier caso, las diferencias entre las plantas micorrizadas y las no micorrizadas se siguieron manteniendo. En este sentido la comparación entre los tratamiento control y *G. deserticola* resultó en torno a un 369% más de actividad NR en el último. El tratamiento control-P presentó mayor actividad que el control, pero bastante menor que la encontrada en las plantas micorrizadas. *G. deserticola* fué el tratamiento con una mayor actividad.

En cuanto a la concentración de proteínas (Tabla 30), ésta no sufrió ninguna variación como consecuencia del estrés o de la micorrización.

Los datos de nutrición vegetal (Tabla 31) indican que todas las plantas no sometidas a estrés captaron N con eficiencia, y sólo las asociadas a *G. deserticola* incrementaron significativamente el contenido en N. El efecto negativo del estrés hídrico sobre la captación de N por estas plantas fué algo neutralizado en las que habían sido inoculadas con alguno de los hongos MA, en especial las colonizadas por *G. deserticola*.

En relación al contenido en P, se puede comprobar que, en condiciones de adecuado aporte de agua, la fertilización con P fué efectiva y estas plantas equipararon su crecimiento y asimilación de P con las inoculadas con *G. fasciculatum*, incrementando ambos parámetros respecto a las colonizadas por *G. mosseae* y, por supuesto, respecto al las plantas control. No obstante, cuando se aplicó el estrés hídrico, la fertilización con P dejó de ser efectiva, y las plantas del tratamiento fertilizado sólo equipararon su concentración de P con las inoculadas con *G. mosseae*, de manera que la nutrición en P fué significativamente menor que en aquellas plantas asociadas a *G. fasciculatum* o *G. deserticola*.

**Tabla 30.** Peso seco de parte aérea y raíz (g), contenido hídrico (%), colonización radical (%), actividad NR (mol/g P.F./ h) y proteínas (mg/mL) en plantas de lechuga sin micorrizar (control), fertilizadas con P (control-P) o inoculadas con *G. mosseae*, *G. fasciculatum* o *G. desertícola* y crecidas en condiciones de adecuado aporte de agua (-0.04 MPa) o sometidas a estrés hídrico (-0.17 MPa).

Tratamiento	Peso seco		Contenido hídrico	Colonización MA	Actividad NR (x10 <sup>-7</sup> )	Proteínas (x10 <sup>-3</sup> )
	P. aérea	Raíz				
<b>-0.04 MPa</b>						
Control	2.7d	1.2b	82.3b	0c	18.2d	0.18a
Control-P	4.2b	1.2b	83.8a	0c	19.2d	0.17a
<i>G. mosseae</i>	3.6c	1.5a	84.6a	81.9b	36.8b	0.17a
<i>G. fasciculatum</i>	4.2b	1.6a	84.8a	82.7b	25.6c	0.17a
<i>G. desertícola</i>	4.6a	1.4a	84.1a	92.5a	42.2a	0.17a
<b>-0.17 MPa</b>						
Control	0.6f	0.3e	74.7d	0c	7.8f	0.17a
Control-P	1.4e	0.5d	77.9c	0c	11.6e	0.16a
<i>G. mosseae</i>	2.6d	0.7cd	82.3b	80.1b	21.4d	0.17a
<i>G. fasciculatum</i>	2.8d	0.8c	81.9b	80.0b	21.0d	0.17a
<i>G. desertícola</i>	3.9bc	0.9c	81.6b	90.2a	36.6b	0.17a

En cada columna, los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) según el test de rango múltiple de Duncan ( $n = 5$ ).

**Tabla 31.** Concentración de N y P (%) y contenido total (mg/planta) en plantas de lechuga sin micorrizar (control), fertilizadas con P (control-P) o inoculadas con *G. mosseae*, *G. fasciculatum* o *G. deserticola* y crecidas en condiciones de adecuado aporte de agua (-0.04 MPa) o sometidas a estrés hídrico (-0.17 MPa).

Tratamientos	NITROGENO		FOSFORO	
	%	Total	%	Total
<b>-0.04 MPa</b>				
Control	1.2c	31.5c	0.04f	2.8e
Control-P	0.8d	34.0c	0.14bc	6.2b
<i>G. mosseae</i>	0.9d	31.8c	0.09e	3.5d
<i>G. fasciculatum</i>	0.8d	34.2c	0.16ab	6.6b
<i>G. deserticola</i>	1.1c	49.7a	0.19a	7.8a
<b>-0.17 MPa</b>				
Control	1.8a	18.5e	0.10de	1.1f
Control-P	1.4b	18.7e	0.10de	1.4f
<i>G. mosseae</i>	1.1c	30.0cd	0.10de	2.8e
<i>G. fasciculatum</i>	0.9d	24.8d	0.15bc	4.2c
<i>G. deserticola</i>	1.1c	42.4b	0.12cd	4.6c

En cada columna, los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) según el test de rango múltiple de Duncan ( $n = 5$ ).

## V. DISCUSION

El conocimiento de la fisiología y metabolismo de las diversas especies, tanto vegetales como microbianas, que se desarrollan en ambientes áridos está aún lejos de entenderse por completo, existiendo muchas incógnitas por resolver que están siendo objeto de investigación. Actualmente se empiezan a conocer a nivel molecular las respuestas a corto plazo al estrés hídrico, habiéndose descubierto proteínas cuya síntesis es inducida por la sequía (Keikkila et al., 1984). Cuando se comprendan mejor las funciones de estas proteínas, será interesante manipularlas con el fin de aumentar la tolerancia al déficit hídrico. Igualmente, es importante destacar que la variación en la tolerancia a la sequía se debe, probablemente, a los efectos e interacciones de muchos mecanismos y que, por tanto, la causa principal de variación en el rendimiento en un ambiente seco no se puede relacionar con un atributo aislado (Austin, 1989). También es esencial un buen manejo de los ecosistemas sometidos a sequía para impedir así su destrucción mediante un tipo de agricultura inadecuada. Indudablemente, con un buen conocimiento de los ecosistemas implicados y de la biología de las especies componentes, se podrá llegar a conocer mejor cómo se pueden explotar adecuadamente en un tipo de agricultura sostenible.

La eficiencia de los hongos MA se mide, normalmente, en términos de efecto sobre el crecimiento de la planta hospedadora bajo diferentes condiciones ambientales. En el presente estudio, el efecto del estrés hídrico en plantas colonizadas por distintas especies de hongos del género *Glomus* mostró que algunas de estas especies fueron más efectivas que otras en cuanto al aumento de la tolerancia de la planta hospedadora a un determinado nivel de sequía. El endofito más eficiente de los utilizados en este estudio resultó ser *G. deserticola*, mientras que los menos eficientes fueron *G. caledonium* y *G. occultum*. Las especies de *Glomus* utilizadas se caracterizan por estar presentes en suelos mediterráneos neutros o alcalinos de interés agrícola (Hayman et al., 1976). En estos suelos áridos o semiáridos, la falta de humedad afecta al movimiento de los nutrientes, de manera que el micelio fúngico extrarradical, al aumentar la superficie de exploración, incrementa la captación de nutrientes y agua por las raíces (Bethlenfalvay et al., 1988).

La mejora de las relaciones hídricas de la planta hospedadora así como de su crecimiento es un efecto generalizado de la colonización MA (Graham y Syvertson, 1984; Bethlenfalvay et al., 1987; Sánchez-Díaz et al., 1990). La naturaleza del estrés (severidad y duración), así como el nivel de compatibilidad funcional de la asociación hongo-planta puede afectar, específicamente, la actividad de la micorriza bajo condiciones de estrés hídrico. En este sentido, plantas colonizadas por endofitos tales como *G. deserticola*, *G. etunicatum*, *G. mosseae* y *G. occultum* mostraron una gran sensibilidad para disminuir la fijación de CO<sub>2</sub>,

incluso ante un estrés ligero (-0.06 MPa), mientras que si el hongo colonizador era *G. fasciculatum*, por ejemplo, al someter las plantas a un estrés ligero o moderado (-0.06 y -0.10 MPa), éstas mantuvieron el valor de este parámetro prácticamente invariable respecto al obtenido bajo condiciones de adecuado aporte de agua. En plantas colonizadas por *G. etunicatum* sólo se redujo la EUA cuando se aplicó un estrés hídrico severo (-0.17 MPa). Estos resultados pueden explicar parte de las estrategias por las que los hongos MA alteran las relaciones hídricas de las plantas, con consecuencias relevantes para tolerar la sequía, aclimatación y recuperación de los déficits hídricos. La simbiosis MA es capaz de mejorar los mecanismos de defensa de la planta hospedadora ante el estrés como resultado de cambios en ciertos mecanismos fisiológicos. El estrés hídrico disminuye la fijación de CO<sub>2</sub>. Dependiendo de la combinación hongo-planta y del grado de limitación hídrica, las plantas micorrizadas pueden afectar, en distinto grado, las tasas fotosintéticas durante periodos de sequía (Ruiz-Lozano et al., 1995b). En este sentido, el aumento de la fijación de CO<sub>2</sub> se ha considerado como una estrategia de tolerancia del estrés (Gale y Zerony, 1985). También se ha descrito que los cambios producidos por los hongos MA sobre la transpiración y conductancia estomática pueden considerarse como mecanismos por los que las plantas micorrizadas incrementan su resistencia frente al estrés hídrico. Las diferentes especies de hongos MA pueden presentar mayores o menores requerimientos carbonados y/o distintas dinámicas de desarrollo de la colonización radical. Ello puede tener efectos interactivos sobre la disponibilidad de C en la planta hospedadora, así como en su posterior drenaje. No obstante, hay que tener en cuenta que los hongos MA tienen la capacidad de incrementar la fijación de CO<sub>2</sub> (Gale y Zerony, 1985).

Las diferencias observadas en este estudio en cuanto a la relación entre transpiración y conductancia estomática, en plantas micorrizadas sometidas a estrés con respecto a las cultivadas con un adecuado aporte de agua, indican que hay un efecto de las MA sobre la EUA, como también observaron Nelsen (1987) y Bethlenfalvay et al. (1987).

El efecto de los hongos MA sobre el "estatus" hídrico de la planta ha sido asociado con la mejora de la nutrición de la planta hospedadora, principalmente P (Graham y Syvertson, 1984). No obstante, también se ha propuesto que este efecto de los hongos MA ocurre por un mecanismo independiente de la captación de P (Augé et al., 1986; Bethlenfalvay et al., 1988).

Cuando las plantas de lechuga micorrizadas fueron sometidas a periodos sucesivos y progresivos de estrés hídrico, no se encontró una relación estrecha entre los valores de la fijación de CO<sub>2</sub> en las plantas y la resistencia a la sequía. El efecto protector de los hongos MA frente al estrés hídrico parecía estar relacionado, más bien, con los efectos que los

endofitos tuvieron sobre el aumento de la conductancia estomática y la transpiración, así como su papel en la captación de P y K.

Se sabe que el K juega un papel clave en la tolerancia de las plantas al estrés hídrico pues parece ser el soluto catiónico responsable de la apertura y cierre de estomas en respuesta a cambios en el estado hídrico de las células guarda de las hojas (Eakes et al., 1991).

El ajuste del potencial osmótico de las hojas requiere de un balance osmótico intracelular (Naidoo, 1985 y 1986). La prolina se acumula en las hojas y aumenta el ajuste osmótico. Los valores de contenido en prolina encontrados en este estudio fueron siempre mayores en las plantas estresadas que en las cultivadas con adecuado aporte de agua. A su vez, el incremento en el contenido de este agente osmótico fué mayor en las plantas control, fertilizadas con P o en aquellas colonizadas por los endofitos menos eficientes. Otros como *G. deserticola* (el más eficiente) incrementaron poco el contenido en prolina. Esto es importante, puesto que plantas con un menor aumento en el contenido de prolina indican poseer una mejor tolerancia a la sequía (Ruiz-Lozano et al., 1995a).

Las respuestas encontradas en la planta varían, no sólo con la especie fúngica asociada, sino también dentro de los distintos aislados pertenecientes a la misma especie procedentes de diferentes lugares (Bethlenfalvay et al., 1989). La variación en las respuestas pueden deberse a cambios en la eficiencia de captación de nutrientes y también, a interacciones fisiológicas entre los simbioses ya que, desde un punto de vista fisiológico, la eficiencia fúngica depende de la cantidad de nutrientes transferidos a la planta por unidad de carbohidratos utilizada por el hongo. Los hongos MA requieren carbono procedente de la planta hospedadora (Pang y Paul, 1980), lo cual supone un coste en carbohidratos para la planta, ya que los compuestos carbonados aportados al hongo dejan de estar disponibles para la producción de biomasa vegetal. Los niveles de colonización y las estrategias de infección deben afectar también los balances hidrocarbonados en un momento dado y, por consiguiente, el equilibrio fisiológico de la simbiosis. En este estudio, los niveles de colonización radical determinados al final del ensayo variaron entre los distintos hongos, siendo *G. deserticola* el que produjo mayores niveles de infección. Esta alta infectividad no se afectó como consecuencia del estrés hídrico aplicado. Ello sugiere que esta especie es la más adaptada ya que provocó la colonización más agresiva. A su vez, este hongo fué el más efectivo y a que incrementó la tolerancia a la sequía de la planta en términos de mantenimiento de la tasa de crecimiento bajo condiciones de estrés y de un uso del agua más eficiente.

Nuestros resultados apoyan el hecho de que existe una variación en la fisiología de la simbiosis en las distintas combinaciones planta-hongo MA. La respuesta al estrés hídrico por

parte de diferentes especies fúngicas puede ser atribuida a mecanismos fisiológicos (fijación de CO<sub>2</sub>, transpiración, EUA) y nutricionales (P, Ca, K), de acuerdo con la estrategia utilizada por el hongo implicado en la asociación simbiótica, las características del estrés y la capacidad intrínseca de cada hongo para resistir el estrés.

La selección de hongos MA para su introducción en ambientes secos es una estrategia prometedora. Los hongos más adaptados y eficientes son potencialmente importantes para el mantenimiento y restauración del equilibrio planta-suelo en el contexto de una agricultura sostenible, y cobran especial relevancia en ecosistemas sometidos a limitación hídrica.

En este contexto, cabe, también, señalar que los suelos salinos ocupan más del 7% de la superficie terrestre. Las características de los suelos salinos que inhiben o reducen la supervivencia y desarrollo de las plantas incluyen un pH desfavorable, desbalance de iones esenciales y alteraciones de la estructura del suelo que reducen la aereación y la capacidad de retención de agua (Abrol y Sandhu, 1985; Bettenay, 1986). Se han identificado dos efectos como las causas más probables de la toxicidad que induce el exceso de sal: el efecto iónico y el efecto osmótico. El primero de ellos implica interferencias con iones esenciales dentro de la planta y una disminución de la tasa fotosintética. El efecto osmótico está asociado con la falta de extensión de la pared celular y de expansión celular, lo cual lleva al cese del crecimiento (Lewis, et al. 1989).

La inoculación con hongos MA en lugares salinizados puede mejorar rápidamente la tolerancia de las plantas y, consiguientemente, su crecimiento (Reddel et al., 1986; Jain et al., 1989). Se sabe que la adición de varios tipos de sales al suelo influye negativamente en la colonización micorrízica de la raíz (Chambers et al., 1980). No obstante, en este estudio, la cantidad de sal aplicada en el medio no afectó a la capacidad colonizadora de ninguno de los tres hongos MA utilizados, siendo *G. deserticola* el más activo. Esto puede ser debido a que la infección MA debía estar bastante extendida cuando se aplicó la sal (1 mes después de la siembra de las semillas).

El incremento de la salinidad en el medio redujo el crecimiento de raíz y parte aérea, aunque este efecto fué mayor en las plantas sin inocular que en las micorrizadas. Así, en plantas colonizadas por *G. fasciculatum*, por ejemplo, sólo se redujo el peso seco de parte aérea en un 2% al comparar el nivel de salinidad más elevado con el más bajo. Esto demuestra el efecto beneficioso de la micorrización sobre el crecimiento de las plantas bajo estas condiciones de estrés. Las plantas control y fertilizadas con P mostraron un crecimiento similar a las micorrizadas antes de la adición de la sal, pero no mantuvieron la producción de biomasa vegetal en una tasa similar cuando se les aplicó la sal. De hecho, en el nivel salino más alto, las plantas micorrizadas incrementaron el peso seco de parte aérea más de un 100%

en relación a las plantas fertilizadas con P. Los resultados de este estudio concuerdan con lo observado por distintos autores, que encontraron un efecto positivo de la micorrización sobre el crecimiento, en condiciones salinas, de lavándula (Azcón et al., 1976), cebolla (Hirrell y Gerdemann, 1980) y pimiento (Ojala et al., 1983).

Una de las respuestas mejor conocida de las plantas a la sequía y otros estreses que afectan a su estado osmótico es la acumulación de solutos solubles de bajo peso molecular como la prolina (Aspinall y Paleg, 1981). La presencia de los hongos MA en las raíces puede alterar el balance osmótico ya que éstos tienen la capacidad de modificar la composición de carbohidratos (Augé et al., 1987) y aminoácidos como la prolina (Ruiz-Lozano et al., 1995a) en la planta hospedadora. Posiblemente, estos cambios fisiológicos jueguen un papel en el aumento de la tolerancia al estrés salino.

En el presente estudio, el contenido en prolina de las plantas aumentó al hacerlo la salinidad. Según Paleg et al. (1985), la acumulación de este soluto está regulada por tres procesos inducidos por el estrés: 1) pérdida del control negativo de la síntesis de prolina, 2) estimulación de la síntesis de prolina por glutamato, y 3) inhibición de la oxidación de la prolina. Así mismo, se encontró mayor concentración de N en los tratamientos sin micorrizar que en los micorrizados. Esto puede deberse al alto contenido en prolina que presentaron las plantas sin inocular, ya que la prolina es un aminoácido nitrogenado y su síntesis requiere de un aporte de este elemento (Prior et al., 1987). También es posible que se manifieste un "efecto concentración" ya que las plantas micorrizadas presentaron mucho mayor crecimiento y esto diluye la concentración de los nutrientes (Poss et al., 1985). En relación con el P, las plantas colonizadas por *G. deserticola* presentaron los mayores contenidos en este elemento, mientras que las fertilizadas con P igualaron el contenido de las inoculadas con *G. mosseae* y *G. fasciculatum*, pudiéndose considerar como el control más válido de dichos tratamientos, ya que nos permite valorar efectos adicionales a los provocados por este nutriente.

Aunque se ha sugerido que la mayor tolerancia que presentan las plantas micorrizadas ante el estrés salino se puede deber a un aumento en la nutrición mineral, especialmente P (Graham, 1986), el efecto de los hongos MA no debe limitarse exclusivamente a este mecanismo. Así, se sabe que los hongos MA pueden afectar a la producción de hormonas vegetales (Barea y Azcón-Aguilar, 1982; Danneberg et al., 1992; Goicoechea et al., 1995) o mejorar la captación de agua (Hardie, 1985; Faber et al., 1991; Ruiz-Lozano y Azcón, 1995a). Otros mecanismos a considerar son el ajuste osmótico de la planta que permitiría el mantenimiento de la turgencia foliar, así como los efectos de los hongos MA sobre procesos fisiológicos de la planta tales como fotosíntesis, transpiración, conductancia estomática y EUA. En este sentido, en el presente estudio, se encontraron, en las plantas micorrizadas, valores más altos de actividad fotosintética, transpiración, conductancia y EUA que en las no

micorrizadas. Así, en el nivel superior de sal (5 g ClNa kg<sup>-1</sup>), el incremento en fotosíntesis y EUA de las plantas colonizadas por cualquiera de los hongos respecto a las no colonizadas fué superior al 100%. Esto es muy importante, ya que los hongos MA son un sumidero de productos fotoasimilados y, en ausencia de un mecanismo compensador, podrían causar una inhibición del crecimiento de la planta hospedadora. No obstante, se sabe que los hongos MA también pueden incrementar la fijación de CO<sub>2</sub> por parte de la planta (Kucey y Paul, 1982; Azcón et al., 1992).

Curiosamente, los valores obtenidos para los parámetros fotosintéticos eran mayores en el nivel superior de sal que en el medio, pero sólo en el caso de las plantas micorrizadas. Esto puede ser debido a un "efecto de reacción" de la micorriza frente al aumento de sal en el medio. Esta idea concuerda con los resultados obtenidos al someter a las plantas de lechuga a periodos sucesivos de estrés hídrico creciente, lo cual originaba una disminución brusca de la fotosíntesis y demás parámetros asociados al iniciar los periodos de estrés, pero estos parámetros aumentaban (probablemente como una respuesta de adaptación) a medida que el estrés hídrico lo hacía también (Ruiz-Lozano et al., 1995b).

De acuerdo con los resultados obtenidos, los tres hongos utilizados en este estudio fueron efectivos protegiendo a la planta hospedadora contra los efectos nocivos de la sal. El efecto de *G. mosseae* o *G. fasciculatum* en el tolerancia que confieren a la planta frente a la sal no se puede atribuir al aumento en el contenido de P con respecto a las plantas control, puesto que no hubo diferencias significativas entre ambos tratamientos micorrizados y el fertilizado con P. El mecanismo por el cual estos dos hongos aumentan la tolerancia de la planta hospedadora ante el estrés salino parece basarse en procesos fisiológicos (incremento de fotosíntesis, transpiración, conductancia estomática y EUA) más que en un efecto motivado por el incremento en la captación de nutrientes. El comportamiento de la micorrización por *G. deserticola* parece ser distinto, pues en este caso el aumento de la captación de P parece estar también implicado en el efecto protector. Esto concuerda con los resultados de Poss et al. (1985) quienes encontraron que el principal papel de este hongo en la mejora del crecimiento de plantas de cebolla cultivadas en suelo salino consistía en el aumento de la captación de P.

Observando los datos del segundo ensayo de salinidad, se puede apreciar como el aumento de la salinidad en el medio no afectó significativamente al crecimiento o al contenido en nutrientes de las plantas inoculadas con *G. deserticola*, mientras que las plantas inoculadas con *Glomus* sp. autóctono (el endofito procedente de ambiente salino) colocado a distancia de la raíz (en el compartimento B) disminuyeron apreciablemente el crecimiento vegetal y la captación de N y P al pasar de 0.25 g ClNa kg<sup>-1</sup> a los niveles superiores de salinidad. Además, dentro de cada nivel de salinidad, las plantas colonizadas por esta especie del

género *Glomus* disminuyeron considerablemente el crecimiento vegetal y sus contenidos de N y P, mientras que las colonizadas por *G. deserticola*, no sufrieron el efecto de la distancia de colocación del inóculo. En este sentido, se sabe que muchos hongos MA presentan comportamientos individuales específicos respecto a la tolerancia que confieren a la planta hospedadora frente a temperaturas extremas del suelo, pH, humedad y salinidad (Menge, 1983). El distinto comportamiento de ambas especies sugiere, así mismo, que el incremento del desarrollo vegetal y de la capacidad de captar nutrientes originado por los hongos MA en suelos salinos, no está, necesariamente, relacionado con la salinidad existente en el hábitat de procedencia de estas especies fúngicas. Esta observación coincide con lo encontrado en tomate por Poss et al. (1985) con aislados de *G. mosseae* y *G. fasciculatum* procedentes de lugares afectados de salinidad en los cuales, las plantas crecieron poco, tanto a concentraciones muy bajas de sal en el medio como a concentraciones altas.

Quizás el efecto encontrado para el crecimiento sea un reflejo de lo que ocurrió con la capacidad infectiva de los hongos que no fué interferida por el incremento de sal en el medio cuando el inóculo se aplicó junto a la planta hospedadora (compartimento A), aunque si lo fué al localizarse a distancia (11 cm) de la misma. En este último caso, la capacidad colonizadora de ambos endofitos disminuyó a medida que la salinidad del suelo aumentaba. Se sabe que la aplicación de varios tipos de sal al suelo afecta a la capacidad infectiva y supervivencia de los hongos MA (Chambers et al., 1980; Menge et al., 1987). Así, sales que contienen Na y Cl influyen negativamente la germinación de *Gigaspora margarita* (Hirrell, 1981) y la colonización de plantas de cebolla por parte de hongos MA disminuye al aumentar el contenido en ClNa del suelo (Hirrell y Gerdemann, 1980). En caso de estar situadas en la proximidad de la raíz, el efecto estimulante de ésta puede contrarrestar el negativo de la sal. Además, si la sal afecta la germinación y/o crecimiento micelial, retardando o inhibiendo su desarrollo lo hará, consecuentemente, su capacidad infectiva.

La tolerancia a la sal debe ser un factor importante para la supervivencia, reproducción y desarrollo de los hongos MA en suelos salinos (Dixon et al., 1993). En este estudio, sin embargo, la capacidad colonizadora del micelio procedente de las plantas previamente micorrizadas fué la misma en todos los casos, ya que no se apreciaron diferencias significativas en los porcentajes de colonización. El crecimiento vegetal, por el contrario, si que se vio afectado por el hongo implicado en la asociación. La colonización por *Glomus* sp. autóctono fué más efectiva, con independencia del nivel salino. Por tanto, lo que debe de ser mayor es la eficiencia funcional del micelio generado por este hongo en condiciones salinas, pero no la capacidad infectiva del mismo.

En el nivel salino provocado por 0.5 g ClNa Kg<sup>-1</sup> cuando el inóculo original se localizaba en el compartimento B, a 11 cm de la planta, la distancia que debe recorrer el micelio

para colonizar a estas nuevas raíces repercutió en la eficiencia de la simbiosis. La masa de micelio existente en el compartimento central (B) es superior y por ello puede infectar con mayor facilidad y efectividad a la nueva planta hospedadora.

Puesto que el incremento de la sal a  $0.75 \text{ g CINa Kg}^{-1}$  no afectó la capacidad colonizadora de ambos endofitos mientras que el desarrollo vegetal si fué menor que en los niveles salinos anteriores, se puede concluir que la eficiencia simbiótica de los hongos disminuyó con el aumento de la sal en el medio, pero ésta no afectó a la capacidad infectiva de los mismos.

Aunque los efectos de los hongos MA en la protección de las plantas ante la sequía o ante el componente osmótico del estrés salino han sido estudiados (Bethlenfalvay et al., 1988; Sánchez-Díaz y Honrubia, 1994; Ruiz-Lozano et al., 1995a y b), se sabe muy poco acerca del papel del micelio extrarradical ante la mayor o menor disponibilidad de agua en el suelo. En relación a este aspecto, el presente estudio informa sobre mecanismos que permiten una mejor interpretación de los hecho. Así pues, el efecto positivo de los hongos MA incrementó al hacerlo el contenido hídrico en el compartimento hifal 2 (CH-2), especialmente en el caso de *G. fasciculatum*. La capacidad de cada una de las dos especies de *Glomus* para captar agua fué distinta. Así, *G. fasciculatum* no incrementó considerablemente el crecimiento vegetal hasta que el potencial hídrico en el CH-2 fué de  $-0.01 \text{ MPa}$ , mientras que *G. deserticola* no varió su efecto pese a que el aporte de agua en este compartimento fuese bajo ( $-0.05 \text{ MPa}$ ).

La variación en la captación de agua por el micelio MA puede explicar por diferencias en la extensión de la red de hifas de cada especie se. Si el diámetro de las hifas es similar para ambos hongos ( $2-5 \mu\text{m}$ , Gerdemann y Trappe, 1974), las diferencias en la respuesta de la planta hospedadora se pueden deber a la capacidad específica de cada hongo para captar agua. Realmente, no conocemos la densidad de hifas en el CH-2, aunque se observó un gran número de las mismas tras la tinción de una muestra de este compartimento. La colonización micorrízica de las plantas originada tras utilizar como inóculo el micelio generado en el suelo procedente del CH-2 indicó que la infectividad de las hifas de ambos hongos fué la misma, por lo que la densidad de hifas debía ser similar.

La alteración de las condiciones del suelo disminuyen la capacidad infectiva generada por el micelio fúngico (Jasper et al., 1987). En concordancia con ello, observamos que la capacidad colonizadora del micelio procedente del CH-2 fué baja en ambas especies cuando el suelo permaneció seco. Al incrementarse el agua en este compartimento, se produjo un aumento considerable de la infectividad. En el caso de *G. fasciculatum*, las hifas fueron más infectivas a  $-0.05 \text{ MPa}$ , mientras que en el caso de *G. deserticola*, no hubo variación en la

capacidad infectiva al variar la cantidad de agua aplicada. No sabemos si, lo encontrado en *G. fasciculatum*, se trata de un efecto motivado por decrecimiento de capacidad infectiva o disminución de la cantidad de micelio producido bajo condiciones de sequedad.

El hecho de encontrar mayor captación de nutrientes en las plantas colonizadas que en las no micorrizadas a medida que aumentó la disponibilidad de agua en el CH-2 indica que estas hifas también actuaron tomando nutrientes de dicho compartimento debido a su capacidad de extenderse y explorar un volumen de suelo mayor. Este efecto es importante cuando la disponibilidad de agua y nutrientes es limitada. En este sentido, se ha propuesto que las micorrizas pueden ser más importantes para el crecimiento vegetal bajo condiciones de sequía que cuando la humedad del suelo es adecuada (Sánchez-Díaz et al., 1990; Sánchez-Díaz y Honrubia, 1994). El hecho de que las plantas micorrizadas capten más P que las no micorrizadas puede influir en el efecto del micelio en la adquisición de nutrientes (Fitter, 1988). No obstante, en este estudio la concentración de P fue similar en las plantas fertilizadas con P y las colonizadas por *G. fasciculatum*. Sólo aquellas plantas asociadas con *G. deserticola* tuvieron mayor concentración de P, aunque ésta no se afectó por la disponibilidad de agua en el CH-2. Estos resultados sugieren que la micorrización aumenta la resistencia a la sequía por mecanismos distintos en unos casos (*G. fasciculatum*) y adicionales en otros (*G. deserticola*) de la captación de P. La posibilidad de un efecto hormonal en el hecho observado en este estudio debería de ser considerada, ya que los hongos MA son capaces de modificar los niveles de citoquininas y ácido abscísico en las plantas (Dixon et al., 1988; Danneberg et al., 1992; Goicoechea et al., 1995).

Los incrementos en fotosíntesis, transpiración, conductancia estomática y EUA producidos en las plantas micorrizadas como consecuencia de la aplicación de agua desde lugares inaccesibles a la raíz, indican transferencia de agua por parte de las hifas. Esto concuerda con los resultados de Hardie (1985) quién encontró que la ausencia de hifas extrarradicales tenía un efecto negativo sobre el flujo transpiratorio. También observó una recuperación más rápida de este flujo en las plantas micorrizadas que en los tratamientos control. Por todo ello, concluyó que las hifas extrarradicales incrementaban la superficie de absorción de agua y pueden ser uno de los componentes esenciales en la mejora de la captación de agua por las raíces micorrizadas.

Las hifas, que tienen un diámetro de entre 2 y 5  $\mu\text{m}$ , pueden penetrar en poros del suelo que son inaccesibles a los pelos radicales (10-20  $\mu\text{m}$  de diámetro). La longitud total de hifas puede alcanzar 50  $\text{m cm}^{-3}$  de suelo según Allen (1991), quién estimó que la tasa de transporte de agua de las hifas externas podía ser de 0.28  $\text{ng s}^{-1}$  por cada punto de entrada, suficiente para mantener relaciones hídricas normales en la planta. De otro lado, Faber et al.

(1991) calcularon tasas de transporte de agua de 760 y 375 nL h<sup>-1</sup> hacia la planta por el micelio externo.

Los resultados de este ensayo confirman que los hongos MA influyen la nutrición, captación de agua y, el intercambio gaseoso de la planta. Cada uno de estos mecanismos contribuye a una mayor tolerancia de la planta al estrés hídrico. Los resultados indican también que las especies fúngicas estudiadas difieren entre sí en cuanto a su eficiencia para captar y transportar agua dependiendo de las disponibilidades hídricas del medio. La cuantificación de la contribución relativa de los hongos MA para captar agua es de especial importancia cuando se consideran ambientes áridos o semiáridos.

Se ha indicado que existen diferentes sustancias capaces de afectar el desarrollo de los hongos MA, en simbiosis o *in vitro* (Siqueira et al., 1982; Hepper, 1986; Nair et al., 1991). En este sentido Carr (1991) encontró que el uso de ácido N-morfolino etano sulfónico (MES) como tampón producía incrementos considerables del desarrollo micelial producido a partir de esporas de *G. caledonium*. Con posterioridad, también se ha indicado un efecto positivo de esta sustancia sobre la producción de micelio por parte del hongo *G. intraradices* en asociación con plantas de trébol, sin que hubiera efecto negativo sobre el crecimiento vegetal (Vilariño, comunicación personal).

Con estos antecedentes, nos decidimos a probar el efecto del tampón MES sobre la producción de micelio a partir de plantas de lechuga colonizadas por *G. deserticola* y *G. fasciculatum* con el fin de evidenciar si esta supuesta estimulación de la producción de micelio se traduciría en un incremento de la captación de agua procedente del compartimento donde sólo tenían acceso las hifas fúngicas (CH-2). Los datos obtenidos confirman nuestros resultados del experimento anterior, de manera que la presencia de los hongos MA incrementó la captación de agua procedente del CH-2 por parte de la planta. Sin embargo, se evidenció un efecto negativo del MES respecto a los mismos tratamientos sin aplicación del mencionado tampón. De hecho, el test para determinar la presencia y actividad del micelio fúngico en el CH-2 demuestra que el micelio fue más abundante cuando no hubo aplicación de tampón MES.

En este ensayo, en el cual se utilizó una mezcla de suelo y arena en proporción 1/9 v/v en el CH-2, la captación de nutrientes es mucho menor que cuando la mezcla de suelo y arena era en proporción 1/1 v/v. De esta manera conseguimos reducir el posible efecto nutricional que podía mediar en la respuesta de la planta ante la disponibilidad de agua y nutrientes en el CH-2. Los resultados obtenidos indican que, si bien los contenidos de N y P resultaron algo mayores en las plantas micorrizadas respecto a las control, el porcentaje de ambos elementos es similar (N) para todos los tratamientos, o, incluso, resulta menor (P) en

las plantas micorrizadas. Ello es una evidencia que permite descartar que el efecto encontrado pueda ser atribuido a un efecto nutricional. La captación directa del agua por las hifas fúngicas parece ser el principal responsable de los efectos observados en las plantas micorrizadas para el crecimiento vegetal y para los procesos implicados en el intercambio gaseoso (fijación de CO<sub>2</sub>, transpiración y EUA), a medida que aumenta la disponibilidad de agua en el compartimento hifal.

El efecto negativo del tampón MES sobre el desarrollo de la simbiosis puede ser adscrito a las condiciones de cultivo utilizadas en este estudio, pues las plantas crecieron con limitación hídrica en el compartimento radical, lo cual pudo provocar que el compuesto se acumulara produciendo efectos perjudiciales en las plantas y el hongo similares a un exceso de salinidad. De hecho, las plantas tratadas con MES mostraron síntomas de succulencia (igual que las plantas crecidas en condiciones salinas). En los estudios en los cuales se había evidenciado el efecto positivo del MES sobre el desarrollo de la simbiosis, las condiciones de cultivo implicaban una gran disponibilidad hídrica (Vilariño, comunicación personal). Otra cuestión a tener en cuenta es que la aplicación de MES provoca una disminución significativa del pH del suelo, lo que podría haber afectado al desarrollo de los hongos utilizados en este estudio (*G. deserticola* y *G. fasciculatum*), al ser éste un factor que afecta la germinación de las esporas MA, el crecimiento del micelio y la colonización de la planta hospedadora (Davis et al., 1983; Abbott y Robson, 1985b; Koomen et al., 1987).

La supervivencia e infectividad de los hongos MA en los ecosistemas afectados por la falta de agua es un factor de gran importancia para el mantenimiento de la capacidad colonizadora de los endofitos autóctonos, lo que puede condicionar la supervivencia de las futuras plantas que crezcan en estos lugares. Los hongos MA pueden reproducirse a partir de varios tipos de propágulos infectivos (esporas, fragmentos de hifas e hifas dentro de raíces vivas). El propágulo más resistente es la espora, por lo que juegan un papel muy importante para el desarrollo, dispersión y persistencia de los hongos MA. La importancia relativa respecto a la supervivencia de estos propágulos difiere entre las especies fúngicas y se ven afectadas por las condiciones ambientales (Gazey et al., 1983). Además, la viabilidad de un inóculo es afectada por el periodo de permanencia en el suelo (Daft et al., 1987). No obstante, se sabe muy poco sobre los requerimientos del medio que afecten a la supervivencia y viabilidad de las esporas tras largos periodos de sometimiento a diferentes condiciones de humedad.

Los resultados obtenidos en el test de infectividad de las esporas en raíces de lechuga mostraron que su viabilidad, o sea, su potencial como inóculo se vio afectado por el contenido de agua del suelo al que se sometieron durante su almacenamiento. Los resultados demuestran que la humedad del suelo es un factor importante en la resistencia de las esporas,

afectando la viabilidad de las mismas (Daft et al., 1987). En cualquier caso, el efecto de la humedad del suelo sobre la infectividad de las esporas dependió de la especie del hongo en cuestión. Así, las esporas de *G. mosseae* y *G. deserticola* fueron más infectivas después de almacenamiento en suelo a -0.04 MPa mientras que las de *G. fasciculatum* mostraron mayor infectividad cuando el potencial hídrico del suelo durante el periodo de incubación fué de -0.8 MPa. Este hecho no puede ser atribuido a un distinto grado de adaptación a la sequía de las esporas debido a las condiciones de cultivo utilizadas para su obtención, puesto que todas se habían obtenido de cultivos de lechuga crecidas en mezcla de suelo/arena en proporción 1/9 v/v utilizando una solución nutritiva como fuente de nutrientes. Este sistema es similar a un cultivo hidropónico, con lo cual, no puede inducir adaptación de las esporas a la sequía (Ruiz-Lozano y Azcón, 1995b). El efecto encontrado parece estar, más bien, relacionado con la distinta capacidad de cada hongo para tolerar la sequía.

Se sabe que la germinación de las esporas está afectada por varios factores físicos como pH (Green et al., 1976), temperatura (Daniels y Trappe, 1980) y potencial hídrico (Sylvia y Schenck, 1983). En este estudio, la falta de humedad en el suelo durante el tiempo de incubación de las esporas disminuyó considerablemente su capacidad infectiva, al igual que habían encontrado Sylvia y Schenck (1983).

En la naturaleza, los propágulos micorrízicos deben permanecer viables (con capacidad infectiva) desde un periodo de crecimiento de plantas hasta el siguiente. Por ello, bajo condiciones de sequía, la pérdida de viabilidad es un factor crítico en el éxito o supervivencia de los hongos MA. Los resultados obtenidos en las presentes condiciones experimentales muestran como ninguno de los tres hongos ensayados fué capaz de colonizar la raíz cuando el número más probable de esporas fué 8, indicando que se requiere un mínimo de 30 esporas para conseguir un nivel detectable de infección (Ruiz-Lozano y Azcón, 1995b).

El efecto micorriza sobre nutrición y crecimiento no se expresó, como se pretendía, en las condiciones de cultivo, casi hidropónicas, utilizadas en el ensayo de niveles de Ca. En todos los niveles de Ca, las plantas fertilizadas con P crecieron más que las micorrizadas. No obstante, la aplicación de 8 mM Ca afectó negativamente a los dos tratamientos no micorrizados. Este efecto no se encontró en relación con el peso de raíz. El aumento del Ca en el medio disminuyó la capacidad colonizadora de ambos hongos. Este efecto negativo ha sido, también, descrito para un gran número de sales que afectan la capacidad infectiva y supervivencia de los hongos MA (Chambers et al., 1980; Menge et al., 1987).

La exposición de las plantas al PEG provocó que las micorrizadas acumularan algo más de prolina que las no micorrizadas cuando el nivel de Ca en el medio era inferior a 6 mM. A partir de este nivel, se produce un cambio de tendencia, y son las plantas controles las que

acumulan más prolina. Con 8 mM de Ca se manifiesta un cambio drástico en cuanto al contenido en prolina entre tratamientos micorrizados y controles, particularmente cuando el estrés aplicado fué moderado (10% PEG). En el caso del contenido relativo de agua (CRA), tras aplicar el estrés, las plantas micorrizadas presentaron menores contenidos de agua que los dos tratamientos controles cuando el nivel de Ca fué de 2 mM, igualándose al aplicar 4 mM e invirtiéndose esta tendencia a partir de 6 mM de Ca en el medio. Esto, parece indicar que al cultivar las plantas micorrizadas con sólo 2 ó 4 mM Ca en el medio, éstas sufren en mayor medida los efectos del estrés hídrico respecto a los tratamientos control, debido a un posible déficit de Ca (Ramalho et al., 1995). Esta observación es contraria a lo encontrado en el resto de ensayos que componen la presente Memoria, en los cuales las plantas micorrizadas siempre han sufrido en menor medida el estrés hídrico que las no micorrizadas, por lo que han acumulado menor cantidad de prolina. Esto implica que sus requerimientos en Ca son más elevados de lo que estos niveles le aportan y que este déficit sería menos importante en las plantas sin micorrizar. El efecto observado empieza a remitir a partir de un aporte de 6 mM Ca, especialmente en las plantas asociadas a *G. fasciculatum*. La explicación de este fenómeno, pese a poseer una concentración de Ca similar a las controles, puede tener relación directa con el aumento de superficies de membrana que se produce en las raíces de plantas micorrizadas (Bago, 1994), al ser el Ca un elemento requerido para la regulación y estabilidad de dichas membranas (Alam, 1993). De esta manera las plantas micorrizadas necesitarían cantidades de Ca en el medio superiores a las no micorrizadas y al no estar disponibles se produciría una falta de regulación de las membranas radicales que originaría un efecto más negativo del estrés hídrico, de ahí la mayor concentración de prolina y menor contenido relativo en agua de aquellas plantas. Esta posible falta de regulación de las membranas en plantas micorrizadas se observa, incluso, en ausencia de PEG. Así, las plantas micorrizadas incrementaron su CRA al hacerlo el Ca disponible, mientras que los tratamiento control no sufrieron modificación apreciable de este índice. Esta idea de la deficiencia de Ca puede estar apoyada por los datos de contenido en Ca de las plantas. Así, ambos tratamientos micorrizados incrementaron significativamente su contenido en Ca a partir de 6 mM Ca aplicado en el medio de cultivo, y esta mayor captación de Ca pudo contribuir a evitar los efectos negativos del PEG. Este hecho fué más evidente en las plantas inoculadas con *G. fasciculatum*, que fueron las que acumularon mayor cantidad de Ca y también las que disminuyeron en mayor medida su contenido en prolina.

En el presente estudio, se demuestra la validez de utilizar el contenido en prolina como indicador sensible al estrés. De hecho, la imposición del estrés (PEG) fué durante un tiempo muy breve y en plantas de similar crecimiento. De acuerdo con estos resultados, el contenido de Ca en planta ejerce un notable efecto sobre los balances hídricos, neutralizando el efecto del estrés, especialmente el moderado (10% PEG), pero sólo cuando las plantas están micorrizadas. Este singular comportamiento, imputable a la micorrización, no parece ser

consecuencia de un efecto directo motivado por la concentración de Ca en planta (no hay diferencias con los controles). El Ca debe actuar, más bien, modificando mecanismos fisiológicos responsables de este hecho. En estudios previos (Azcón y Barea, 1992) se observó que la planta, en virtud de la micorrización, ejerce un efecto "tampón" ante excesos del elemento.

Para el estudio del efecto del potasio sobre la resistencia a la sequía, se utilizó el mismo sistema de cultivo de las plantas descrito anteriormente para el caso del Ca (Azcón et al., 1995). En las condiciones experimentales utilizadas, las plantas micorrizadas no presentaron mayor crecimiento que las controles. Es importante distinguir entre los mecanismos a través de los cuales la simbiosis MA mejora las relaciones hídricas de las plantas y la simple captación de nutrientes, pero esto sólo se puede conseguir con controles adecuados. En este ensayo, el hecho de encontrar valores mayores de aquellos parámetros relacionados con el estatus hídrico de la planta (tasa fotosintética y EUA) es una indicación de la actividad directa del hongo no mediada por aspectos nutritivos.

El potasio juega un papel clave en la defensa de la planta frente al estrés hídrico puesto que es el catión que regula la apertura y cierre de los estomas en respuesta al estatus hídrico de las células guarda (Cosgrove y Hedrich, 1991). Así, existe una correlación entre la concentración de K en estas células y el movimiento estomático, bien cuando se cierra durante el estrés o cuando se vuelven a abrir cuando el estrés disminuye (Eakes et al., 1991). Por tanto, está bien establecido que el K es un elemento esencial que influye en la resistencia estomática, transpiración, intercambio de CO<sub>2</sub> y, en general, en el balance hídrico de la planta (Mengel, 1984). En este sentido, la reducción de la actividad fotosintética debida al PEG fué mayor en los tratamientos sin micorrizar que en las plantas micorrizadas con cualquiera de los endofitos. Este hecho fué más evidente cuando la disponibilidad de K en el medio era baja (0.7 mM). Así, las plantas control y fertilizadas con P disminuyeron su actividad fotosintética, tras la aplicación del PEG, en un 60% y 55% respectivamente, mientras que la reducción para las plantas micorrizadas fué 20% (*G. deserticola*), 14% (*G. fasciculatum*) y 11% (*G. mosseae*). El incremento en el contenido de K debido a la micorrización puede ser el responsable de este efecto. Al aumentar la disponibilidad de K hasta 6.7 mM, el efecto depresor del PEG sobre este parámetro fué ya de rango similar en las plantas micorrizadas y en las no micorrizadas. Esto indica que el aumento en el contenido de K en las plantas sin micorrizar neutraliza el efecto depresor del PEG. Este efecto del PEG es potenciado por la escasez de K, por lo que las plantas micorrizadas, al disponer de mayor cantidad de K (Rygiewicz y Bledsoe, 1984) son menos afectadas por el estrés. En este sentido, Robin et al. (1989) tomaron plantas de dos variedades de trébol que presentaban distinta tolerancia al déficit hídrico, una resistente (variedad Crau) y otra sensible (variedad Huia), y las mantuvieron en cultivo hidropónico con dos niveles de K en el medio, uno bajo (0.005 mM) y

otro alto (5 mM). Después de dos meses de cultivo, las plantas fueron sometidas a estrés hídrico inducido mediante PEG. Se ensayaron dos niveles de este agente estresante, 10% y 20%. Los autores determinaron el efecto del estrés sobre el potencial hídrico en las hojas y resistencia estomática. Los resultados obtenidos indicaban que el K era un factor importante que determina la resistencia al estrés hídrico en plantas de trébol. Así, el potencial hídrico en las hojas aumentaba al hacerlo la concentración de K en el medio, siendo mayor para la variedad Crau. Del mismo modo, la resistencia estomática aumentaba con el nivel de PEG aplicado, pero este aumento se vio contrareestado por la aplicación de 5 mM de K al medio de cultivo. En el presente estudio, la EUA también se favoreció al incrementar el K en el medio.

Es destacable el hecho de que cuando el K aplicado al medio alcanzó 6.7 mM, la tasa fotosintética resultó significativamente incrementada en todos los tratamientos respecto a la obtenida con la aplicación de los dos niveles de K inferiores. En este sentido, si se comparan el nivel superior de K aplicado con el inferior, el incremento de actividad fotosintética resultó ser de 37% (Control), 41% (Control-P), 52% (*G. deserticola*), 82% (*G. fasciculatum*) y 57% (*G. mosseae*) cuando no se sometieron a estrés (Sin PEG), mientras que este valor fue 138% (Control), 143% (control-P), 22% (*G. deserticola*), 59% (*G. fasciculatum*) y 16% (*G. mosseae*) cuando las plantas fueron sometidas a estrés (15% PEG). Esto indica que el aporte de K al medio favoreció principalmente a las plantas sin micorrizar sometidas a estrés, ya que éstas eran las que tenían menores concentraciones de K, mientras que las micorrizadas se vieron favorecidas también, pero en menor medida, pues sus contenidos en K eran superiores (Azcón et al., 1995).

El distinto comportamiento de *G. mosseae* y *G. deserticola* en relación con la tasa transpiratoria y el nivel de K aplicado al medio, se puede relacionar también con el contenido en K de las plantas colonizadas por estos hongos. Así, en el nivel de K más bajo (0.7 mM) *G. mosseae* también tenía un contenido en K más bajo que los otros tratamientos micorrizadas, en el nivel intermedio de K (3.7 mM) lo incrementan considerablemente y ya en el nivel superior (6.7 mM) presentan contenidos de K significativamente mayores que el resto de tratamientos, al igual que la tasa transpiratoria.

La simbiosis MA origina un gran número de cambios en el metabolismo de la planta (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988; Arines et al., 1993; Palma et al., 1993). No obstante, se conoce poco sobre los mecanismos bioquímicos responsables de dichos cambios. La asociación MA se caracteriza, también, porque el sistema de hifas extrarradicales contribuye a la captación de agua y nutrientes y origina una rizosfera modificada, que puede ser favorable para la protección de la planta hospedadora frente a situaciones de estrés (Sylvia y Williams, 1992). Tsang et al. (1991) estudiaron la regulación de los enzimas superóxido dismutasas

(SODs) en plantas sometidas a estrés, y llegaron a la conclusión de que el estrés oxidativo es un componente más del estrés ambiental.

Aunque el oxígeno es un elemento esencial para la vida, su presencia en organismos vivos implica que algunos productos de su metabolismo se pueden formar en el nicho celular. Así, en presencia de un donador adecuado de electrones, y con una pequeña cantidad de energía de activación, se produce la forma reactiva del radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Además, bajo condiciones de pH ácido, la presencia de donadores de electrones permite la formación del anión peróxido, el radical hidroxilo y, por último, agua (Elstner, 1987).

El efecto tóxico de los radicales  $O_2^{\cdot-}$  se atribuye, comúnmente, a su capacidad para originar radicales  $\cdot OH$ , más poderosos, vía reacción de Haber-Weiss (Halliwell, 1982) catalizada por un metal. No obstante, también hay evidencias de que los radicales  $O_2^{\cdot-}$  *per se* pueden originar daño celular (Fridovich, 1986). En este sentido, las SODs, al catalizar el paso del  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$  y  $O_2$ , constituyen un importante mecanismo de defensa celular frente a los radicales libres originados bajo condiciones de estrés (Tsang et al., 1991).

En el presente estudio, la actividad SOD total en hoja resultó incrementada en las plantas micorrizadas respecto a las control, tanto en condiciones de adecuado aporte de agua como de estrés hídrico. No obstante, este incremento fué mayor bajo condiciones de estrés hídrico. En un principio se podía pensar que la existencia de mayor actividad SOD total en las plantas colonizadas que en las controles se debería al proceso de colonización radical por parte del hongo (Palma et al., 1993; Arines et al., 1994). Así, el hecho de que esta actividad sea aún mayor en las plantas inoculadas con *G. deserticola* que en las inoculadas con *G. mosseae* (principalmente a las ocho semanas) apoya esta idea, al ser *G. deserticola* un colonizador más activo del sistema radical, como demuestran los datos de infección MA. Sin embargo, el hecho de que la actividad específica de las plantas cultivadas con adecuado aporte de agua no muestre diferencias significativas entre el tratamiento control y las micorrizadas (excepto en raíz a las cinco semanas), y que las verdaderas diferencias de actividad ocurrieran en las plantas sometidas a estrés, donde las micorrizadas presentaron incrementos de actividad por encima del 100% sobre las no inoculadas, hace pensar que sólo una pequeña parte de la actividad SOD puede ser debida al proceso de colonización radical, el resto debe ser atribuida a otros procesos fisiológicos que afecten al estado oxidativo de la planta (como puede ser la acción del estrés hídrico). En efecto, se sabe que los sistemas antioxidantes de las plantas actúan como importantes mecanismos de tolerancia ante el estrés, debido a la protección de las membranas contra el daño causado por las especies tóxicas del oxígeno; superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radicales hidroxilo ( $\cdot OH$ ) que se originan bajo condiciones de estrés ambiental y xenobiótico (Burke et al., 1985; Shaaltiel y Gressel, 1986; Shaaltiel et al., 1988; Asada, 1994; Foyer et al., 1994). Así mismo, se ha

encontrado una relación entre estimulación de la actividad SOD y la resistencia a diferentes tipos de estrés como sequía (Burke et al., 1985; Dhindsa y Matowe, 1981) y salinidad (Kayupova y Klyshev, 1984).

En relación con todo esto, Malan et al. (1990) encontraron una correlación entre las actividades SOD y glutathion reductasa y la tolerancia de distintas variedades de maíz al estrés hídrico. Ellos indicaron que la mayor actividad antioxidante permitiría mantener altos contenidos de clorofila bajo cualquier situación de estrés oxidativo. Así, en aquellas variedades resistentes a la sequía, con un eficiente sistema que elimine las especies tóxicas del oxígeno, los cloroplastos y la clorofila resultan protegidos, asegurando de este modo el mantenimiento de la fotosíntesis y por tanto la capacidad de producción de biomasa, bajo las condiciones ambientales adversas.

Nuestros resultados indican que las plantas inoculadas con *G. mosseae* incrementaron el crecimiento vegetal respecto a las control en torno a un 200% y las inoculadas con *G. deserticola* lo hicieron en torno a un 150%, incluso bajo condiciones de estrés hídrico. Ello significa que la simbiosis MA ayuda a las plantas frente al estrés hídrico, manteniendo intacto o poco alterado su sistema fotosintético. Curiosamente, en este experimento, las plantas colonizadas por *G. mosseae* crecieron más que aquellas colonizadas por *G. deserticola*. No obstante, el tratamiento con *G. deserticola* mostró los valores más altos de contenido hídrico foliar, colonización radical, concentración de proteínas y actividad SOD. Esto concuerda con previos resultados de esta Memoria según los cuales las plantas colonizadas por *G. deserticola* presentaron, siempre, el mayor desarrollo y estimulación de los mecanismos de defensa contra los efectos del estrés (Ruiz-Lozano y Azcón, 1995a; Ruiz-Lozano et al., 1995a y b).

En el presente estudio, se ha encontrado menor actividad específica SOD en las plantas de ocho semanas de cultivo que en las de cinco semanas. Este hecho contrasta con lo encontrado por Longa et al. (1994) en *Castanea sativa*, quienes comprobaron que la actividad SOD era mayor en hojas senescentes que en las hojas verdes. La senescencia de la planta es un proceso natural y regulado genéticamente, en el curso del cual se producen importantes cambios en el metabolismo vegetal (Thimann, 1987). Durante la senescencia foliar se ha observado un incremento de la concentración de las especies activas de oxígeno. Probablemente, esto sea debido a la inducción de los sistemas generadores de estas especies oxidantes y/o a un descenso en el mecanismo de defensa frente a ellas (Leshem, 1988; Strother, 1988). Probablemente, a las ocho semanas no se había alcanzado, aún, la senescencia, por lo que no llegó a inducirse un incremento de la actividad SOD. En relación a esto, Tanaka y Sugahara (1980) encontraron hasta cinco veces más actividad SOD en hojas

jóvenes que en hojas más viejas, y que las primeras eran más resistentes a la toxicidad del SO<sub>2</sub>.

Otro claro síntoma de senescencia es la disminución de las proteínas por aumento de la actividad proteolítica (Huffaker, 1990; Nock et al., 1992). No obstante, en nuestro estudio, la concentración de proteínas en hoja fué mayor en las plantas cosechadas en último lugar. En raíz, no se apreciaron diferencias significativas en este parámetro como consecuencia de la edad de la planta. De hecho, la concentración de proteínas disminuyó sólo afectada por el estrés hídrico, lo cual está de acuerdo con lo encontrado por Dhindsa (1987). Por tanto, aunque no se han medido parámetros característicos de senescencia (peroxidación lipídica, contenido en clorofila o producción de etileno), los resultados obtenidos sobre actividad SOD y contenido en proteínas indican que se puede descartar la existencia de estrés debido al uso de plantas senescentes.

Se sabe que existen diferencias cualitativas y cuantitativas en la expresión de proteínas en plantas asociadas con micorrizas arbusculares (Dumás et al., 1989; Pacovsky, 1989; Wyss et al., 1990; Arines et al., 1993; Schellenbaum et al., 1993). Así, en tabaco (Dumás et al., 1990) y soja (Pacovsky, 1989) se ha demostrado que la formación de micorrizas incrementa la expresión de proteínas de bajo peso molecular. No obstante, Arines et al. (1993) encontraron expresión de polipéptidos de alto peso molecular en trébol. En el presente estudio, las plantas colonizadas por *G. deserticola* fueron las que presentaron mayores concentraciones de proteínas en hoja en todas las condiciones, mientras que las colonizadas por *G. mosseae* sólo presentaron mayor contenido en proteínas que las control cuando se cosecharon a las cinco semanas de cultivo. En relación con la SOD las diferencias encontradas son sólo cuantitativas (mayor actividad en plantas micorrizadas que en las control como consecuencia del estrés aplicado), no encontrándose diferencias cualitativas algunas, ya que el estudio isoenzimático mediante electroforesis en gel de poliacrilamida demostró la existencia de una sola banda de actividad, igual en todos los tratamientos y condiciones de cultivo. Este hecho contrasta con lo descrito por Palma et al. (1993) quienes encontraron que la asociación de *Glomus mosseae* con plantas de trébol inducía la aparición de dos bandas isoenzimáticas nuevas, una Mn-SOD II y mycCu-Zn-SOD. La última resultó ser específica de esta asociación, mientras que la Ma-SOD también aparecía en nódulos de la asociación *Rhizobium-Trifolium pratense*. En cualquier caso, lo difícil es saber cual es el papel de estas proteínas inducidas por la simbiosis, ya que se han encontrado incrementos de enzimas pectinolíticas (García-Romera et al., 1991), superóxido dismutasa (Palma et al., 1993), fosfatasa ácida (Pacovsky et al., 1991), nitrato reductasa y glutamino sintetasa (Azcón et al., 1992).

Los datos de acumulación de N y P en estas plantas reflejan un claro efecto de concentración en el caso del N, parámetro que fué superior en las plantas controles que en las micorrizadas, ya que las primeras crecieron mucho menos (esto es especialmente evidente en las plantas cosechadas a las ocho semanas). En cuanto al fósforo, es evidente que las plantas micorrizadas captaron más cantidad de tal elemento. No obstante, el efecto positivo que la micorrización ejerce sobre el desarrollo de la actividad SOD en las condiciones de cultivo de este ensayo no se puede atribuir al incremento de la nutrición fosforada ya que, mientras que la disponibilidad de P fué mayor en las plantas micorrizadas no sometidas a estrés (-0.04 MPa), esto no se tradujo en un aumento significativo de la actividad SOD específica. En las plantas sometidas a estrés (-0.17 MPa), el contenido de P fué mayor en las plantas colonizadas por *G. mosseae* que en las colonizadas por *G. deserticola*, pero la actividad SOD específica no mostró diferencias significativas entre ambos tratamientos. De ahí que la existencia de mayor actividad SOD en las plantas micorrizadas se puede adscribir a un efecto directo de los hongos MA.

Otro de los sistemas enzimático afectados por el estrés hídrico es el encargado de la asimilación del nitrato. El nitrato es la principal fuente de nitrógeno para la mayoría de las plantas superiores. La tasa global de asimilación de nitrato por las plantas es de unos  $2 \times 10^{13}$  kg de nitrógeno por año (Guerrero et al., 1981), lo cual es 100 veces mayor que la tasa de fijación biológica de  $N_2$ . La nitrato reductasa (NR) es el primer enzima en la asimilación del nitrato y, probablemente, supone el paso limitante de este proceso (Guerrero et al., 1981; Campbell, 1988).

La capacidad para asimilar nitrato la poseen ciertas bacterias, algunos hongos y la mayoría de algas y plantas superiores (Hoff et al., 1992). En las plantas micorrizadas, el simbionte fúngico puede influenciar la asimilación de nitrato por la planta hospedadora (France y Reid, 1983). En este sentido, se han encontrado diferencias en la utilización del nitrato entre especies fúngicas y razas en cultivo puro (Ho y Trappe, 1980; Plassard et al., 1985; Sarjala, 1990). En adición a esto, la NR parece ser bastante sensible al estado metabólico y fisiológico de la planta, de ahí que se pueda utilizar como indicador de estrés y otros cambios en la fisiología de la planta (Srivastava, 1980). Hasta muy recientemente (Azcón et al., 1992; Tobar et al., 1994a y b), no se ha demostrado la participación activa de la micorriza en la captación de este ion. De ahí que la información al respecto se escasa.

Puesto que los niveles de actividad NR son mayores en hoja que en cualquier otro órgano de la planta (Campbell, 1988), en el presente estudio se ha utilizado dicho tejido vegetal para la determinación de tal actividad.

Los datos obtenidos, indican que las plantas micorrizadas tenían mayor actividad NR que los tratamientos sin micorrizar, y que esta diferencia de actividad es mayor en situación de estrés hídrico. Así, las plantas colonizadas por *G. deserticola*, por ejemplo, presentaron un 132% más de actividad que las controles, al cultivarse con adecuado aporte de agua, mientras que esta diferencia de actividad resultó ser de un 369% al estar sometidas a estrés hídrico. Esto concuerda con los datos de Tobar (1991), quien encontró que al disminuir el nivel hídrico en el medio, la actividad NR se mantuvo particularmente elevada en las plantas micorrizadas en relación a las no inoculadas. Ello indica una especial capacitación de dichas plantas para asimilar  $\text{NO}_3^-$  en condiciones limitantes para el desarrollo vegetal, lo cual debe de traducirse en una mayor producción de biomasa por parte de la planta así como en un mayor contenido de N (Sinha y Nicholas, 1981; Venkataramana et al., 1987). En nuestro estudio, hay una clara correlación entre actividad NR, desarrollo vegetal y contenido en N de las plantas, de manera que el tratamiento que presentó más actividad NR (*G. deserticola*), también fué el que produjo mayor biomasa y acumulación de N, tanto en condiciones de estrés como de adecuado aporte de agua. Los tratamientos control y control-P fueron los que disminuyeron en mayor medida el crecimiento de parte aérea como consecuencia del estrés, lo cual ocurrió también con la actividad NR y, consecuentemente, con el contenido en N de las plantas.

El hecho de encontrar mayor actividad NR en las plantas micorrizadas que en las control, puede ser debido a que este enzima requiere altas cantidades de fosfato, el cual se acompleja con el molibdeno del enzima para facilitar, así, su reducción (Hageman y Reed, 1980). De este modo se puede establecer una relación directa entre el alto contenido en P de las plantas colonizadas por *G. deserticola* y el hecho de presentar los valores más altos de actividad NR. No obstante, en el presente estudio también se incluye un control adicionado de fósforo que, bajo condiciones de adecuado aporte de agua, incrementó el desarrollo y el contenido de P de las plantas hasta valores similares a los encontrados en las plantas micorrizadas y este hecho no se tradujo en un incremento de actividad NR. Al contrario, las plantas fertilizadas con P presentaron una actividad NR menor que cualquiera de las micorrizadas. Además, en estas condiciones de riego (-0.04 MPa), las plantas colonizadas por *G. mosseae* presentaron bajos contenidos de P pero una actividad NR considerable. Ello induce a pensar que, o bien el hongo MA es el que incrementa la actividad NR de la planta hospedadora (independientemente del P) o, el hongo, presenta *per se* dicha actividad. Ambas posibilidades han sido descritas (Tobar, 1991; Ho y Trappe, 1980; Plassard et al., 1985). Vézina et al. (1989) encontraron, en ectomicorrizas, que la infección por parte del hongo modificaba las actividades enzimáticas asimiladoras del nitrógeno en pino, y que la naturaleza de los cambios dependía del hongo implicado en la simbiosis. Esta última observación también aparece en nuestros resultados pues, mientras que *G. deserticola* fué el hongo que indujo en mayor medida la actividad NR, *G. fasciculatum* resultó bastante menos efectivo, principalmente al cultivarse con adecuado aporte de agua (-0.04 MPa).

Este hecho no debe estar relacionado con la capacidad colonizadora de los hongos ya que, a pesar de que *G. deserticola* es el hongo más infectivo, los otros dos hongos mostraron una capacidad colonizadora similar y, sin embargo, *G. fasciculatum* indujo una menor actividad NR que *G. mosseae* al cultivarse a -0.04 MPa de potencial hídrico en el suelo.

Un factor a considerar, también, en el incremento de actividad NR debido a la micorrización, es el contenido hídrico de las plantas, el cual era mayor en las plantas micorrizadas que en las no inoculadas (presumiblemente debido a la mejora de las relaciones hídricas en las primeras). Esto puede haber contribuido a mantener la mayor actividad NR en las plantas micorrizadas, ya que se sabe que esta actividad disminuye en hojas expuestas a deshidratación (Shaner y Boyer, 1976; Aparicio Tejo y Sánchez Díaz, 1982) debido al descenso del flujo de nitrato desde las raíces hasta las hojas.

De acuerdo con el análisis de los resultados obtenidos se pueden establecer las conclusiones que a continuación se detallan.

## VI. CONCLUSIONES.

1) La micorrización induce en la planta tolerancia al estrés hídrico, lo cual se puede atribuir a mecanismos tanto de tipo fisiológico (alteración de procesos relacionados con el intercambio gaseoso y ajuste osmótico) como nutricionales. Los cambios producidos en la fisiología de la planta dependen del hongo implicado, siendo *G. deserticola* el más efectivo.

2) Los tres hongos MA ensayados (*G. mosseae*, *G. fasciculatum* y *G. deserticola*) resultaron ser efectivos en la protección de la planta frente al estrés salino. Los mecanismos por los cuales *G. mosseae* y *G. fasciculatum* aumentan la tolerancia de la planta hospedadora se basan, principalmente, en la estimulación de procesos fisiológicos relacionados con el intercambio gaseoso. En el caso de *G. deserticola*, el incremento de la captación de P parece estar, también, implicado en tal efecto protector.

3) La capacidad colonizadora de *G. deserticola* o la de la especie de *Glomus* aislada de suelos salinos no resultó afectada por el incremento de salinidad en el suelo, mientras que la eficiencia simbiótica de estos hongos (en términos de incremento de biomasa vegetal y contenido en nutrientes) sí que disminuyó al incrementar la salinidad del medio, resultando más negativamente afectado la especie de *Glomus* autóctona que *G. deserticola*.

4) Se demostró la captación de agua por las hifas extrarradicales de los hongos MA pero, mientras que *G. deserticola* fue capaz de funcionar eficientemente cuando el suelo donde se desarrollaban las hifas contenía -0.05 MPa de potencial hídrico, *G. fasciculatum* no resultó totalmente efectivo hasta que este valor fue de -0.01 MPa.

5) El potencial hídrico del medio afecta la viabilidad de los propágulos de hongos MA. Las esporas de *G. mosseae* y *G. deserticola* resultaron más infectivas tras almacenamiento en suelo con -0.04 MPa de potencial hídrico, mientras que las de *G. fasciculatum* lo fueron en suelo con -0.8 MPa.

6) El incremento de Ca en la planta aumentó la resistencia de ésta al estrés en el caso de estar micorrizadas, mientras que afectó negativamente a las plantas no micorrizadas.

7) El potasio juega un papel clave en la defensa de la planta frente al estrés hídrico, por lo que el aumento de su contenido en las plantas micorrizadas incrementa considerablemente la tolerancia de las mismas al estrés

8) La micorrización incrementa considerablemente la actividad superóxido dismutasa en las plantas como mecanismo de defensa frente al estrés hídrico.

9) La actividad nitrato reductasa disminuyó como consecuencia del estrés hídrico aplicado. No obstante, se mantiene considerablemente más incrementada en las plantas micorrizadas (principalmente con *G. deserticola*) que en las control.

10) La formación de micorrizas arbusculares facultas, por tanto, a la planta hospedadora para tolerar el estrés hídrico. El mecanismo responsable de este efecto dependerá de las circunstancias particulares bajo las cuales se desarrolla la planta, de manera que la micorriza potenciará a aquel proceso que esté limitando la supervivencia y el desarrollo vegetal.

## VII. BIBLIOGRAFIA

- Abbott, L.K. y Robson, A.D. 1985a.** Formation of external hyphae in soil by four species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 99: 245-255.
- Abbott, L.K. y Robson, A.D. 1985b.** The effect of soil pH on the formation of VA mycorrhizas by two species of *Glomus*. *Aust. J. Soil Res.* 23: 253-261.
- Abrol, I.P. y Sandhu, S.S. 1985.** Growth responses of *Eucalyptus tereticornis* and *Acacia nilotica* to selected methods of site preparation in a highly sodic soil. *Int. Tree Crops J.* 3: 171-183.
- Alam, S.M. 1993.** Nutrient uptake by plants under stress conditions. En: *Handbook of Plant and Crop Stress*. Ed. Pessarakli, M. Marcel Dekker Inc. New York, pp. 227-246.
- Alexander, T., Meier, R., Toth, R. y Weber, H.C. 1988.** Dynamics of arbuscule development and degeneration in mycorrhizas of *Triticum aestivum* L. and *Avena sativa* L. with reference to *Zea mays* L.. *New Phytol.* 110: 363-370.
- Allen, M.F. 1982.** Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae on water movement through *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag ex Steud. *New Phytol.* 93: 227-236.
- Allen, M.F. 1985.** Phytohormone actions: An integrative approach to understanding diverse mycorrhizal responses. *Proc. 6th North Amer. Conf. Mycorrh.* pp.158-160.
- Allen, M.F. 1991.** The Ecology of Mycorrhizae. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 9-22.
- Allen, E.B. y Allen, M.F. 1986.** Water relations of xeric grasses in the field: interactions of mycorrhizas and competition. *New Phytol.* 104: 559-571.
- Allen, M.F. y Boosalis, M.G. 1983.** Influence of two species of VA mycorrhizal fungi on drought tolerance of winter wheat. *New Phytol.* 93: 67-76.
- Allen, M.F., Moore, T.S. y Christensen, M. 1980.** Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* by vesicular-arbuscular mycorrhizae. I. Cytokinin increases in the host plant. *Can J. Bot.* 58: 371-374.
- Allen, M.F., Moore, T.S. y Christensen, M. 1982.** Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* by vesicular-arbuscular mycorrhizae. II. Altered levels of gibberellin-like substances and abscisic acid in the host plant. *Can J. Bot.* 60: 468-471.

- Antolín, M.C. y Sánchez-Díaz, M. 1992.** Photosynthetic nutrient use efficiency, nodule activity and solute accumulation in drought stressed alfalfa plants. *Photosynthetica* 27: 459-604.
- Aparicio-Tejo, P. y Sánchez-Díaz, M. 1982.** Nodule and leaf nitrate reductases and nitrogen fixation in *Medicago sativa* L. under water stress. *Plant Physiol.* 69: 479-482.
- Arines, J., Quintela, M., Vilariño, A. y Palma, J.M. 1994.** Protein patterns and superoxide dismutase activity in non-mycorrhizal and arbuscular-mycorrhizal *Pisum sativum* L. plants. *Plant Soil* 166: 37-45.
- Arines, J., Palma, J.M. y Vilariño, A. 1993.** Comparison of protein patterns in non-mycorrhizal and vesicular-arbuscular mycorrhizal roots of red clover. *New Phytol.* 123: 763-768.
- Asada, K. 1995.** Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. En: *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants*. Eds. Foyer, C.H. y Moullineaux, P.M. CRC Press. Boca Raton, pp. 77-104.
- Aspinall, D. y Paleg, L.G. 1981.** Proline accumulation: physiological aspects. En: *Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants*. Eds. Paleg, L.G. y Aspinall, D., Academic Press, Sydney, pp. 205-241.
- Augé, R.M. 1989.** Do VA mycorrhizae enhance transpiration by affecting host phosphorus content?. *J. Plant Nutr.* 12: 743-753.
- Augé, R.M., Hickok, L.G. y Stodola, A.J.W. 1989.** Psychrometric pressure-volume analysis of osmoregulation in roots, shoots and whole sporophytes of salinized *Ceratopteris*. *Plant Physiol.* 91: 322-330.
- 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 Physiol.* 82: 765-770.
- Augé, R.M., Schekel, K.A. y Wample, R.L. 1987.** Leaf water and carbohydrate status of VA mycorrhizal rose exposed to drought stress. *Plant Soil* 99: 291-302.
- Augé, R.M. y Stodola, A.J.W. 1990.** An apparent increase in symplastic water contributes to greater turgor in mycorrhizal roots of droughted rose plants. *New Phytol.* 155: 285-295.
- Austin, R.B. 1989.** Prospects for improving crop production in stressful environments. En: *Plants Under Stress*. Eds Jones, H.G., Flowers, T.J. y Jones M.B. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 235-248.

- Ayres, P.G. y West, H.M. 1993.** Stress responses in plants infected by pathogenic and mutualistic fungi. En: *Plant Adaptation to Environmental Stress*. Eds. Fowden, L., Mansfield, T. y Stoddart, J., Chapman and Hall. London, pp. 295-311.
- Azcón, R. 1987.** Germination and hyphal growth of *Glomus mosseae* *in vitro*: Effects of rhizosphere bacteria and cell-free culture media. *Soil Biol. Biochem.* 19: 417-419.
- Azcón, R. y Barea, J.M. 1992.** The effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae in decreasing Ca acquisition by alfalfa plants in calcareous soils. *Biol. Fertil. Soils* 13: 155-159.
- Azcón, R., Barea, J.M. y Hayman, D. 1976.** Utilization of rock phosphate in alkaline soils by plants inoculated with mycorrhizal fungi and phosphate solubilizing bacteria. *Soil Biol. Biochem.* 13: 19-22.
- 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 from two <sup>15</sup>N-labelled sources by *Glomus mosseae*, a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol.* 97: 381-396.
- Azcón, R. Gómez, M. y Tobar, R.M. 1992.** Effects of nitrogen source on growth, nutrition, photosynthetic rate and nitrogen metabolism of mycorrhizal and phosphorus-fertilized plants of *Lactuca sativa* L. *New Phytol.* 121: 227-234.
- Azcón, R, Ruiz-Lozano, J.M. y Gómez, M. 1995.** Effect of potassium on *Glomus* spp. symbiosis tolerance to PEG-induced water stress, evaluated as leaf-gas exchange and related parameters. En: *Mycorrhizas in Integrated Systems. From Genes to Plant Development*. Eds Azcón-Aguilar, C. y Barea, J.M. Bruselas, UE. (En prensa).
- Azcón-Aguilar, C., Díaz-Rodríguez, R.M. y Barea, J.M. 1988.** Effect of free-living fungi on the germination of *Glomus mosseae* on soil extract. En: *Mycorrhizae: Physiology and Genetics*. Eds. Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. INRA, Paris, pp. 515-519.
- Azcón-Aguilar, C., Gianinazzi-Pearson, V., Fardeau, J.C. y Gianinazzi, S. 1986.** Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing bacteria on growth and nutrition of soybean in a neutral-calcareous soil amended with <sup>32</sup>P, <sup>45</sup>Ca tricalcium phosphate. *Plant Soil* 96: 3-15.
- Bago, B. 1990.** Efecto de distintos compuestos azufrados sobre el crecimiento independiente del hongo formador de micorrizas VA *Glomus mosseae*. Memoria de Licenciatura. Universidad de Granada. Granada. España.
- Bago, B. 1994.** Alteraciones fisiológicas en membranas de micorrizas arbusculares. Tesis Doctoral de la Universidad de Granada. Granada. España.

- Bagyaraj, D.J. 1984.** Biological interactions with VA mycorrhizal fungi. En: *VA Mycorrhiza*. Ed. Powell C.LI. y Bagyaraj D.J., CRC Press. Boca Raton, Florida, pp. 35-46.
- Bannister, J.V., Bennister, W.H. y Rotilio, G. 1987.** Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 22: 118-180.
- Barea, J.M. 1986.** Importance of hormones and root exudates in mycorrhizal phenomena. En: *Mycorrhizae: Physiology and Genetics*. Eds. Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. INRA, Paris, pp. 177-187.
- Barea, J. M. y Azcón-Aguilar, C. 1982.** Production of plant growth-regulating substances by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 810-813.
- Barea, J. M. y Azcón-Aguilar, C. 1983.** Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants. En: *Advances in Agronomy*. Ed. Brandy, N.C. Academic Press. New York, pp. 1-54.
- Barea, J.M., Azcón-Aguilar, C. y Roldán-Fajardo, B. 1984.** Avances recientes en el estudio de las micorrizas VA. I. Formación, funcionamiento y efectos en nutrición vegetal. *Anal. Edafol. Agrobiol.* 43: 659-677.
- Barea, J.M., Azcón-Aguilar, C., Ocampo, J.A. y Azcón, R. 1991.** Morfología, anatomía y citología de las micorrizas vesículo-arbusculares. En: *Fijación y Movilización Biológica de Nutrientes*. Vol. II. Eds. Barea, J.M., Olivares, J. y Gorgé, J. CSIC, Madrid, pp. 149-173.
-  **Barea, J.M. y Jeffries, P. 1995.** Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil-plant systems. En: *Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. Eds. Varma, A. y Hock, B. Springer-Verlag, Berlin, pp. 521-561.
- Barkley, K.B. y Gregory, E.M. 1990.** Tetrameric manganese superoxide dismutases from anaerobic *Actinomyces*. *Arch. Biochem. Biophys.* 280: 192-200.
- Barrs, H.D. y Weatherley, P.E. 1962.** A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Aust. J. Biol. Sci.* 15: 413-428.
- Bates, L. S., Waldren, R.P. y Teare, I.D. 1973.** Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39: 205-207.
- Beauchamp, C.O. y Fridovich, I. 1971.** Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44: 276-287.

- Becana, M., Paris, F.J., Sandalio, L.M. y del Río, L.A. 1989.** Isoenzymes of superoxide dismutase in nodules of *Phaseolus vulgaris* L., *Pisum sativum* L., and *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Plant Physiol.* 90:1286-1292.
- Becana, M., Aparicio-Tejo, P.M. y Sánchez-Díaz, M. 1985.** Nitrate and nitrite reduction in the plant fraction of alfalfa root nodules. *Physiol. Plant.* 65: 185-188.
- Bécard, G. y Fortin, J.A. 1988.** Early events of vesicular-arbuscular mycorrhizal formation on Rit-DNA transformed roots. *New Phytol.* 108: 211-218.
- Bécard, G., Piché, Y., y Fortin, J.A. 1988.** Some aspects of the biotrophy of VAM fungi. *Abstracts of the 2nd European Symposium on Mycorrhizae.* Praga. p. 11.
- Beevers, L. y Hageman, R.H. 1980.** Nitrate and nitrite reduction. En: *The Biochemistry of Plants.* Vol V. Ed. Mifflin, B.J., Academic Press, New York, pp. 115-167.
- Beilby, J.P. y Kidby, K.D. 1982.** The early synthesis of RNA, protein, and some associated metabolic events in germinating vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores of *Glomus caledonium*. *Can. J. Microbiol.* 28: 623-628.
- Berta, G., Sgorbatti, S., Soler, V., Fusconi, A., Trotta, A., Citterio, A., Bottone, M.G., Sparvoli, E., Scannerini, S. 1990.** Chromatin structure variations in host nuclei of VA mycorrhiza. *New Phytol.* 114: 199-205.
- Berta, G., Tagliasacchi, A.M., Fusconi, A., Gerlero, D. Trotta, A. y Scannerini, S. 1991.** The mitotic cycle in root apical meristems of *Allium porrum* L. is controlled by the endomycorrhizal fungus *Glomus* sp. strain E<sub>3</sub>. *Protoplasma* 161: 12.
- Bethlenfalvay, G.J., Brown, M.S., Ames, R.N. y Thomas, R.S. 1988.** Effects on drought on host and endophyte development in mycorrhizal soybeans in relation to water use and phosphorous uptake. *Physiol. Plant.* 72: 565-571.
- Bethlenfalvay, G.J., Brown, M.S., Franson, R.L. y Mihara, K.L. 1989.** The *Glycine-Glomus-Bradyrhizobium* symbiosis. IX. Nutritional, morphological and physiological responses of nodulated soybean to geographic isolates of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Physiol. Plant.* 76: 226-232.
- Bethlenfalvay, G.J., Brown, M.S. y Newton, W.E. 1987.** Photosynthetic water-and nutrient-use efficiency in a mycorrhizal legume. En: *Proceedings of the 7<sup>th</sup> North American Conference on Mycorrhizae.* Gainesville, Florida, pp. 231-233.

- Bethlenfalvay, G.J. y Schüepp, H. 1994.** Arbuscular mycorrhizas and agrosystem stability. En: *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems*. Eds. Gianinazzi, S. y Schüepp, H. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 117-132.
- Bettenay, E. 1986.** Salt affected soils in Australia. *Reclam. Reveg. Res.* 5: 167-179.
- Beyrle, H. 1995.** The role of phytohormones on the function and biology of mycorrhizas. En: *Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. Eds. Varma, A. y Hock, B. Springer-Verlag, Berlin, pp.365-391.
- Bonfante-Fasolo, P. 1984.** Anatomy and morphology of VA Mycorrhizae. En: *VA Mycorrhiza*. Eds. Powell, C.L.I. y Bagyaraj, D.J. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 35-46.
- Bonfante-Fasolo, P. 1987.** Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae: Fungus-plant interactions at the cellular level. *Symbiosis* 3: 249-268.
- Bonfante-Fasolo, P. 1994.** Ultrastructural analysis reveals the complex interactions between root cells and arbuscular mycorrhizal fungi. En: *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems*. Eds. Gianinazzi, S. y Schüepp, H. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 73-89.
- Bonfante-Fasolo, P. y Bianciotto. 1995.** Presymbiotic versus symbiotic phase in arbuscular endomycorrhizal fungi: morphology and cytology. En: *Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. Eds. Varma, A. y Hock, B. Springer-Verlag, Berlin, pp. 229-251.
- Bonfante-Fasolo, P. y Perotto, S. 1992.** Plants and endomycorrhizal fungi: the cellular and molecular basis of their interaction. En: *Molecular Signals in Plant-Microbe Communications*. Eds. Desh Pal S. Verma. CRC Press. Boca Raton, Florida, pp. 445-470.
- Bonfante-Fasolo, P. y Scanerini, S. 1992.** The cellular basis of plant-fungus interchanges in mycorrhizal associations. En: *Mycorrhizal Functioning*. Ed. Allen, M.T. Chapman y Hall, Nueva York-Londres, pp. 65-101.
- Bradford, M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms of protein, utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brown, M.S. y Bethlenfalvay, G. J. 1987.** The *Glycine-Glomus-Rhizobium* symbiosis. VI. Photosynthesis in nodulated, mycorrhizal, or N- and P-fertilized soybean plants. *Plant Physiol.* 85: 120-123.

- Buonario, R., Della Torre, G. y Montalbini, P. 1987.** Soluble superoxide dismutase (SOD) in susceptible and resistant host-parasite complexes of *Phaseolus vulgaris* and *Uromyces phaseoli*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 31: 173-184.
- Burggraaf, A.J.P. y Beringer, J.E. 1989.** Absence of DNA synthesis in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi during in vitro development. *New Phytol.* 111: 25-33.
- Burke, J.J., Gamble, P.E., Hatfield, J.L. y Quisenberry, J.E. 1985.** Plant morphological and biochemical responses to field water deficits. I. Responses of glutathione reductase activity and paraquat sensitivity. *Plant Physiol.* 79: 415-419.
- Buwalda, J.G., Stribley, D.P. y Tinker, P.B. 1984.** The development of endomycorrhizal root systems. V. The detailed pattern of infection and the control of development of infection level by host in young leek plants. *New Phytol.* 96: 411-427.
- Caba, J.M., Lluch, C., Hervas, A. y Ligeró, F. 1990.** Nitrate metabolism in roots and nodules of *Vicia faba* in response to exogenous nitrate. *Physiol. Plant.* 79: 531-539.
- Campbell, W.H. 1988.** Nitrate reductase and its role in nitrate assimilation in plants. *Physiol. Plant.* 74: 214-219.
- Capaccio, L.C.M. y Callow, J.A. 1982.** The enzymes of polyphosphate metabolism in vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytol.* 91: 81-91.
- Caplan, A., Claes, B., Dekeyser, R. y Van Montagu, M. 1990.** Salinity and drought stress in rice. En: *The Impact of Biotechnology in Agriculture (Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, Vol. 8)*. Ed. Sangwan, R.S. y Sangwan-Norrel, B.S. Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 391-402.
- Carling, D. E., Riehle, W.G., Brown, M.F. y Johnson, D.R. 1978.** Effects of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus on nitrate reductase and nitrogenase activities in nodulating and non-nodulating legumes. *Phytopathol.* 68: 1590-1596.
- Carr, G.R. 1991.** Use of zwitterionic hydrogen ion buffers in media for growth test of *Glomus caledonium*. *Soil Biol. Biochem.* 23: 205-206.
- Chambers, C.A. Smith, S.E. y Smith, F.A. 1980.** Effects of ammonium and nitrate ions on mycorrhizal infection, nodulation and growth of *Trifolium subterraneum*. *New Phytol.* 85: 47-62.
- Cheeseman, J.M. 1988.** Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant Physiol.* 87: 547-550.

- Cooper, K.M. 1984.** Physiology of VA mycorrhizal associations. En: *VA Mycorrhiza*. Ed. Powell, C.LI. y Bagyaraj, D.J., CRC Press. Boca Raton, Florida, pp. 155-203.
- Cooper, K.M. y Tinker, P.B. 1978.** Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. II. Uptake and translocation of phosphorous, zinc and sulphur. *New Phytol.* 81:43-52.
- Cooper, K.M. y Tinker, P.B. 1981.** Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. IV. Effect of environmental variables on movement of phosphorous. *New Phytol.* 81: 237-239.
- Cosgrove, D.J. y Hedrich, R. 1991.** Strech-activated chloride, potassium and calcium channels coexisting in plasma membranes of guard cells of *Vicia faba* L. *Planta* 186: 143-153.
- Cox, G. y Tinker, P.B. 1976.** Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. I. The arbuscule and phosphorous transfer: a quantitative ultrastructural study. *New Phytol.* 77: 371-378.
- Cress, W.A., Throneberry, G.O. y Lindsey, D.L. 1979.** Kinetics of phosphorous absorption by mycorrhizal and non-mycorrhizal tomato roots. *Plant Physiol.* 64: 484-487.
- Daft, M.J. y Okusanya, B.O. 1973.** Effects of *Endogone* mycorrhiza on plant growth VI. Influence of infection on the anatomy and reproductive development in four hosts. *New Phytol.* 72: 1333-1339.
- Daft, M.J., Spencer, D. y Thomas G.E. 1987.** Infectivity of vesicular arbuscular mycorrhizal inocula after storage under various environmental conditions. *Trans. Bri. Mycol. Soc.* 88: 21-27.
- Daley, F.A., Warner, R.L., Somers, D.A. y Kleinhofs, A. 1982.** Characteristic of a nitrate reductase in a barley mutant deficient in NADH nitrate reductase. *Plant Physiol.* 69: 1200-1204.
- Daniels, B.A. 1984.** Ecology of VA mycorrhizal fungi. En: *VA Mycorrhiza*. Eds. Powell C.LI. y Bagyaraj D.J., CRC Press. Boca Raton, Florida, pp. 35-46.
- Daniels, B.A. y Trappe, J.M. 1980.** Factors affecting spore germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus epigaeus*. *Mycologia* 72: 457-471.
- Danneberg, G., Latus, C., Zimmer, W., Hundeshagen, B., Schneider-Poestch, H. J. y Bothe, J. 1992.** Influence of vesicular arbuscular mycorrhiza on phytohormone balances in maize (*Zea mays* L). *J. Plant Physiol.* 141: 33-39.

- Davies, F.T., Potter, J.R. y Linderman, R.G. 1992.** Mycorrhiza and repeated drought exposure affect drought resistance and extraradical hyphae development of pepper plants independent of plant size and nutrient content. *J. Plant Physiol.* 139: 289-294.
- Davis, E.A., Young, J.L. y Linderman, R.G. 1983.** Soil lime level (pH) and VA-mycorrhiza effects on growth responses of sweetgum seedlings. *Soil Sci. Am. J.* 47: 251-256.
- Dehne, H.W. 1986.** Influence of VA mycorrhizae on host plant physiology. En: *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*. Eds. Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S., INRA. Paris, pp. 431-435.
- Del Río, L.A., Sevilla, F., Sandalio, L.M. y Palma, J.M. 1991.** Nutritional effect and expression of SODs: induction and gene expression; diagnostics; prospective protection against oxygen toxicity. *Free Rad. Res. Commun.* 12-13: 819-827
- Dexheimer, J., Kreutz-Jeanmarie, C., Gérard, M.J. Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. 1986.** Approche cellulaire du fonctionnement des endomycorhizes à vésicules et arbuscules: les plasmalemmes de l'interface. En: *Mycorrhizae: Physiology and Genetics*. Eds. Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. INRA, Paris. pp, 277-283.
- Dhindsa, R.S. 1987.** Glutathione status and proteins synthesis during drought and subsequent rehydration in *Tortura ruralis*. *Plant Physiol.* 83: 816-819.
- Dhindsa, R.S. y Matowe, W. 1981.** Drought tolerance in two mosses: correlated with enzymatic defence against lipid peroxidation. *J. Exp. Bot.* 32: 79-91.
- Dixon, R.K., Garret, H.E. y Cox, G.S. 1985.** Cytokinins in leaves of mycorrhizal citrus. En: *Proceedings 6th North American Conference on Mycorrhizae*. Ed. Molina, R., Forest Research Laboratory, Oregon State University. Corvallis.
- Dixon, R.K., Garret, H.E. y Cox, G.S. 1988.** Cytokinins in the root pressure exudate of *Citrus jambhiri* colonized by vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Tree Physiol.* 4: 9-18.
- Dixon, R.K., Rao, M.V. y Garg, V.K. 1993.** Salt stress affects in vitro growth and in situ symbiosis of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 3: 63-68.
- Dumas, E., Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. 1989.** Production of new soluble proteins during VA endomycorrhiza formation. *Agric. Ecos. Environ.* 29: 111-114.
- Dumas, E., Tahiri-Alaoui, A., Gianinazzi, S and Gianinazzi-Pearson V. 1990.** Observations on modifications in gene expression with VA endomycorrhiza development in tobacco: qualitative and quantitative changes in protein profiles. En: *Endocytobiology IV*. Eds. P.

- Nardon, V. Gianinazzi-Pearson, A.H. Granier, L. Margulis and D.C.Smith. INRA, Lyon. France, pp. 153-157.
- Duncan, D.B. 1955.** Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11: 1-42.
- Drüge, U. 1992.** Zur Wachstumsfördererung von Lein (*Linum ausitatisimum* L.) durch VA Mykorrhiza unter besonderer Berücksichtigung der Cytokinine. Dissertation Univ. Hannover.
- Drüge, U. y Schönbeck, F. 1992.** Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection on transpiration, photosynthesis and growth of flax (*Linum usitatissimum* L) in relation to cytokinin levels. *J. Plant Physiol.* 141: 40-48.
- Eakes, D.J., Wright, R.D. y Sailer, J.R. 1991.** Water relations of *Salvia splendens* "Bonfire" as influenced by potassium nutrition and moisture stress conditioning. *J. Am. Hort. Sci.* 116: 712-715.
- Edriss, M.H., Davis, R. M. y Burger, D.W. 1984.** Influence of mycorrhizal fungi on cytokinin production in sour orange. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 109: 587-590.
- Elstner, E.F. 1987.** Metabolism of activated oxygen species. En: *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive treatise*, Vol. II. Eds. Stumpf, P.K. y Conn, E.E. Academic Press, London, pp.253-315.
- Estaún, M.V. 1991.** Efecto de las micorrizas vesículo-arbusculares en las relaciones hídricas y el crecimiento de plantas sometidas a estrés salino. Tesis Doctoral, Universidad de Granada. Granada, España.
- Faber, B., Zasoski, R.J., Munns, D.N. y Shakel, K. 1991.** A method for measuring hyphal nutrient and water uptake in mycorrhizal plants. *Can. J. Bot.* 69: 87-94.
- Farquhar, G.D. y Sharkey, Th.D. 1982.** Stomatal conductance and photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33: 317-345.
- Fischer, R.A. y Turner, N.C. 1978.** Plant productivity in the arid and semiarid zones. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29: 277-317.
- Fitter, A.H. 1985.** Functional significance of root morphology and root system architecture. En: *Ecological Interactions in Soil*. Eds. Fitter, A.H., Atkinson, D., Read, D.J. y Usher, M.B. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 87-106.
- Fitter, A.H. 1988.** Water relations of red clover *Trifolium pratense* L. as affected by VA mycorrhizal infection and phosphorus supply before and during drought. *J. Exp. Bot.* 39: 595-603.

- Flowers, T.J. 1985.** Physiology of halophytes. *Plant Soil* 89:41-56.
- Foyer, C.H., Lelandais, M. y Kunert, K.J. 1994.** Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.* 92: 696-717.
- France, R.C. y Reid, C.P. 1983.** Interactions of nitrogen and carbon in the physiology of ectomycorrhizae. *Can. J. Bot.* 61: 964-984.
- Frank, A.B. 1885.** Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Baume durch unterirdische Pilze. *Ber. Dtch. Bot. Ges.* 3: 128.
- Frey, B., Vilariño, A., Schüepp, H. y Arines, J. 1994.** Chitin and ergosterol content of extraradical and intraradical mycelium of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Soil Biol. Biochem.* 26: 711-717.
- Fridovich, I. 1986.** Superoxide dismutases. En: *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, Vol. 58. Ed. Meister, A. John Wiley & Sons, New York, pp. 61-97.
- Gale, J. y Zeroni, M. 1985.** The cost to plants of different strategies of adaptation to stress and the alleviation of stress by increasing assimilation. *Plant Soil* 89: 57-67.
- Gallaud, I. 1905.** Etude sur les mycorhizes endotrophes. *Rev. Gen. Bot.* 17: 5.
- García-Garrido, J.M., García-Romera, I. y Ocampo, J.A 1992.** Cellulase production by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol. y Gerd.) Gerd. y Trappe. *New Phytol.* 121:221-226.
- García-Romera, I., García-Garrido, J.M., Martínez-Molina, E. y Ocampo, J.A. 1990.** Possible influence of hydrolitic enzymes on vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of alfalfa. *Soil Biol. Biochem.* 22: 149-152.
- García-Romera, I., García-Garrido, J.M. y Ocampo, J.A. 1991.** Pectolytic enzymes in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *FEMS Microbiol. Let.* 78: 343-346.
- Gazey, C., Abbott, L.K. y Robbison, A.D. 1993.** VA mycorrhizal spores from three species of Acaulospora: germination, longevity and hyphal growth. *Mycol. Res.* 97: 785-790.
- George, E., Häussler, K., Vetterlein, D., Gorgus, E. y Marschner, H. 1992.** Water and nutrient translocation by hyphae of *Glomus mosseae*. *Can. J. Bot.* 60: 2130-2137.
- Gerdemann, J.W. 1971.** Fungi that form the vesicular-arbuscular type of endomycorrhizae. En: *Mycorrhizae*. Ed. Hacskaylo, E., USDA Publ. No.1189. Washington D.C, pp. 9-18.

- Gerdemann, J.W. y Nicholson, J.H., 1963.** Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet-sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46:235-244.
- Gerdemann, J.W. y Trappe, J.M. 1974.** The Endogonaceae in the Pacific Northwest. En: *Mycologia Memoir* 5. New York Botanica Garden. New York.
- **Guerrero, M.G., Vega, J.M. y Losada, M. 1981.** The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 32: 169-204.
- Gianinazzi-Pearson, V. y Azcón-Aguilar, C. 1991.** Fisiología de las micorrizas vesículo-arbusculares. En: *Fijación y Movilización Biológica de Nutrientes*. Vol. II. Eds. Gorgé, J., Barea, J.M. y Olivares, J. CSIC, Madrid, pp. 175-202.
- Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. 1989.** Phosphorous metabolism in mycorrhizae. En: *Nitrogen, Phosphorous and Sulphur Utilization by Fungi*. Eds, Boddy, L., Marchant, R. y Read, D.J., Cambridge University Press, Cambridge, pp. 227-241.
- Gianinazzi-Pearson, V., Smith, S.E., Gianinazzi, S. y Smith, F.A. 1991.** Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizas. V. Is H<sup>+</sup>-ATPase a component of ATP-hydrolysing enzyme activities in plant-fungus interfaces?. *New Phytol.* 117: 61-74.
- Giovannetti, M. y Mosse, B. 1980.** An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular infection in roots. *New Phytol.* 84: 489-500.
- Giovannetti, M., Sbrana, C., Citernesi, A.S., Avio, L., Gollotte, A., Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. 1994.** Recognition and infection process, basis for host specificity of arbuscular mycorrhizal fungi. En: *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems*. Eds. Gianinazzi, S. y Schüepp, H. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 61-72.
- Glenn, M.G., Chew, F.S. y Williams, P.H. 1988.** Influence of glucosinolate content of *Brassica* (Cruciferae) roots on growth of vesicular-arbuscular mycorrhiza fungi. *New Phytol.* 110: 217-225.
- Goicoechea, N., Antolín, M.C. y Sánchez-Díaz, M. 1995.** Cytokinins in drought stressed mycorrhizal and nonmycorrhizal alfalfa plants. En: *Mycorrhizas in integrated systems: from genes to plant development*. Eds. Azcón-Aguilar C. y Barea, J.M. Bruselas. UE. (En prensa).
- Gorham, J., Win Jones, R.G. y McDonnel, E. 1985.** Some mechanisms of salt tolerance in crop plants. *Plant Soil* 89: 15-40.

- Graham, J.H. 1986.** Citrus mycorrhizae: Potential benefits and interactions with pathogens. *Hort. Sci.* 21: 1302-1306.
- Graham, J.H. y Syvertson, J.P. 1984.** Influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on the hydraulic conductivity of roots of two citrus rootstocks. *New Phytol.* 97: 277-284.
- Grieve, A.M. y Walker, R.R. 1983.** Uptake and distribution of chloride, sodium and potassium ions in salt-treated citrus plants. *Aust. J. Agric. Res.* 34: 133-143.
- Green, N.E., Graham, S.O. y Schenck, N.C. 1976.** The influence of pH on the germination of vesicular-arbuscular spores. *Mycologia* 68: 929-934.
- Grippiolo, R. 1981.** Il processo di un fungo vesicolo-arbuscolare. I Osservazioni ultrastrutturali sulla penetrazione del fungo da cellula nella radice. *Allionia* 24: 49.
- Hageman, R.H. y Reed, A.J. 1980.** Nitrate reductase from higher plants. *Methods. Enzimol.* 49: 270-280.
- Halliwell, B. 1982.** The toxic effects of oxygen in plant tissues. En: *Superoxide Dismutase*, Vol. 1. Ed. Oberley, L.W., C.R.C. Press, Boca Raton, pp. 89-124.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. 1989.** Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press. Oxford.
- Hampp, R. y Schaeffer, C. 1995.** Mycorrhiza-carbohydrate and energy metabolism. En: *Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. Eds. Varma, A. y Hock, B. Springer-Verlag, Berlin, pp. 267-296.
- Hardie, K. 1985.** The effect of removal of extraradical hyphae on water uptake by vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *New Phytol.* 101: 667-684.
- Hardie, K. y Leyton, L. 1981.** The influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on growth and water relations of red clover. I. In phosphate deficient soil. *New Phytol.* 89: 599-608.
- Harley, J. L. y Smith, S.E. 1983.** Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London.
- Hayman, D.S. 1982a.** Influence of soils and fertility on activity and survival of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Phytopathol.* 72: 1119-1125.
- Hayman, D.S. 1982b.** Practical aspects of vesicular-arbuscular mycorrhiza. En: *Advances in Agricultural Microbiology*. Ed. Subba Rao, N.S., IBH Publ., New Delhi, pp.73-325.
- Hayman, D.S. 1983.** The physiology of vesicular-arbuscular endomycorrhizal symbiosis. *Can. J. Bot.* 61: 944-963.

- Hayman, D.S., Barea, J.M. y Azcón, R. 1976.** Vesicular arbuscular mycorrhiza in southern Spain: its distribution in crops growing in soil of different fertility. *Phytopathol. Mediterr.* 15: 1-6.
- Hepper, C.M. 1979.** Germination and growth of *Glomus caledonium* spores: The effects of inhibitors and nutrients. *Soil Biol. Biochem.* 11: 269-277.
- Hepper, C.M. 1984.** Isolation and culture of VA mycorrhizal fungi. En: *VA Mycorrhiza*. Eds. Powell C.LI. y Bagyaraj D.J., CRC Press. Boca Raton, Florida, pp. 95-112.
- Hepper, C.M., 1986.** Growth of hyphae of *Glomus* spores in the presence of sulphur-containing compounds. En: *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*. Eds. Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. INRA, Paris. pp. 177-187.
- Hepper, C.M. y O'Shera, J. 1984.** Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in lettuce (*Lactuca sativa*) in relation to calcium supply. *New Phytol.* 110: 207-215.
- Hewitt, E.J. 1952.** Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Tech. Commun. n° 22, Farnham Royal. Commonwealth Agricultural Bureau, Bucks. Gran Bretaña, 547 pp.
- Hirrell, M.C. 1981.** The effect of sodium and chloride salts on the germination of *Gigaspora margarita*. *Mycologia* 73: 610-617.
-  **Hirrell, M.C. y Gerdemann, J.W. 1980.** Improved growth of onion and bell pepper in saline soils by two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44: 654-655.
- Ho, I. y Trappe, J.M. 1975.** Nitrate reducing capacity of two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia* 67: 886-888.
- Ho, I. y Trappe, J.M. 1980.** Nitrate reductase activity of nonmycorrhizal Douglas-fir rootlets and of some associated mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 54: 395-398.
- Hoff, T., Stummann, B.M. y Henningsen, K.W. 1992.** Structure, function and regulation of nitrate reductase in higher plants. *Physiol. Plant.* 84: 616-624.
- Hsiao, T.C. 1973.** Plant responses to water stress. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24: 519-570.
- Hsiao, T.C. y Läuchli, A. 1986.** Role of potassium in plant-water relations. En: *Advances in Plant Nutrition II*. Eds. Tinker, B. y Läuchli, A. Praeger Publishers, New York, pp. 281-302.
- Huffaker, R.C. 1990.** Proteolytic activity during senescence of plants. *New Phytol.* 116: 199-231.

- Jain, R.K., Paliwal, K. Dixon, R.K. y Gjerstad, D.H. 1989.** Improving productivity of multipurpose trees on substandard soils in India. *J. For.* 87: 38-42.
- Jakobsen, I. 1995.** Transport of phosphorus and carbon in VA mycorrhizas. En: *Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. Eds. Varma, A. y Hock, B. Springer-Verlag, Berlin, pp. 297-324.
- Jakobsen, I., Abbot, L.K. y Robson, A.D. 1992.** External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. II. Hyphal transport of  $^{32}\text{P}$  over defined distances. *New Phytol.* 120, 509-516.
- Jakobsen, I., Joner, E.J. y Larsen, J. 1994.** Hyphal phosphorus transport, a keystone to mycorrhizal enhancement of plant growth. En: *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems*. Eds. Gianinazzi, S. y Schüepp, H. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 133-146.
- Jasper, D.A., Abbot, L.K. y Robson, A.D. 1989a.** Soil disturbance reduces the infectivity of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 112: 93-99.
- Jasper, D.A., Abbot, L.K. y Robson, A.D. 1989b.** Hyphae of a vesicular-arbuscular fungus maintain infectivity in dry soil, except when soil is disturbed. *New Phytol.* 112: 101-107.
- Jasper, D.A., Robson, A.D. y Abbot, L.K. 1987.** The effect of surface mining on the infectivity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Aust. J. Bot.* 35: 641-652.
- Jeffries, P. y Barea, J.M. 1994.** Biogeochemical cycling and arbuscular mycorrhizas in the sustainability of plant-soil systems. En: *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems*. Eds. Gianinazzi, S. y Schüepp, H. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 101-116.
- Johnson, C.R. 1984.** Phosphorus nutrition on mycorrhizal colonization, photosynthesis, growth and nutrient composition of *Citrus aurantium*. *Plant Soil* 80: 35-42.
- Jones, H.G. 1985.** Partitioning stomatal and non-stomatal limitations to photosynthesis. *Plant Cell Environ.* 8: 95-104.
- Jones, H.G. 1992.** Plants and microclimate, Cambridge University Press, Cambridge.
- Kaiser, W.M. 1987.** Effects of water deficits on photosynthetic capacity. *Physiol. Plant.* 71: 142-149.
- Kaiser, J.J. y Lewis, O.A.M. 1984.** Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in leaves and roots of nitrate fed *Helianthus annuus* L. *Plant Soil* 70: 127-130.

- Kayupova, G.A. y Klyshev, L.K. 1984.** Superoxide dismutase of pea roots under the influence of high NaCl concentrations. *Soviet Plant Physiol.* 31: 441-445.
- Keikkila, J.J., Papp, J.E.T., Schultz, G.A. y Bewley, J.D. 1984.** Introduction of heat shock protein messenger RNA in maize mesocotyls by water stress, abscisic acid and wounding. *Plant Physiol.* 76: 270-274.
- Kendrick, B. y Berch, S. 1985.** Mycorrhizae: applications in agriculture and forestry. En: *Comprehensive Biotechnology*. Vol. 4. Ed. Robinson, C.W. Pergamon Press, Oxford, pp. 109-152.
- Koomen, I., Grace, C. y Hayman, D.S. 1987.** Effectiveness of single and multiple mycorrhizal inocula on the growth of clover and strawberry plants at two soil pHs. *Soil Biol. Biochem.* 19: 539-544.
- Koske, R.E. 1981.** Multiple germination by spores of *Gigaspora gigantea*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 76: 328-330.
- Koske, R.E. 1982.** Evidence for a volatile attractant from plants roots affecting germ tubes of a VA mycorrhizal fungus. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 79: 305-310.
- Kothari, S.K., Marschner, H. y Römheld, V. 1991.** Contribution of the VA mycorrhizal hyphae in acquisition of phosphorous and zinc by maize grown in a calcareous soil. *Plant Soil* 131: 177-185.
- Kucey, R.M.N. y Paul, E.A. 1982.** Carbon flow, photosynthesis, and N<sub>2</sub> fixation in mycorrhizal and nodulated faba beans (*Vicia faba* L.). *Soil Biol. Biochem.* 14: 407-412.
- Kylin, A. y Quatrano, R.S. 1975.** Metabolic and biochemical aspects of salt tolerance. En: *Plants in Saline Environments*. Eds. Poljakoff-Mayber, A. y Gale, J., Springer-Verlag, Berlin, pp. 147-167.
- Lachica, M., Aguilar, A. y Yáñez, J. 1973.** Análisis foliar. Métodos analíticos utilizados en la Estación Experimental del Zaidín. *Anal. Edafol. Agrobiol.* 32: 1033-1047.
- Lei, J., Bécard, G., Catford, J.G. y Piché, Y. 1991.** Root factors stimulate <sup>32</sup>P uptake and plasmalemma ATPase activity in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *New Phytol.* 118: 289-294.
- Lerner, H.R. 1985.** Adaptation to salinity at the plant cell level. *Plant Soil* 89: 3-14.
- Leshem, Y.Y. 1988.** Plant senescence processes and free radicals. *Free Rad. Biol. Med.* 5: 39-49.

- Levy, Y. y Krikun, J. 1980.** Effect of vesicular-arbuscular mycorrhiza on *Citrus jambhiri* water relations. *New Phytol.* 85: 25-32.
- Lewis, O.A.M., Leidi, E.O. y Lips, S.H. 1989.** Effect of nitrogen source on growth response to salinity stress in maize and wheat. *New Phytol.* 111: 155-160.
- Lewitt, J. 1952.** Responses of plants to environmental stresses. Academic Press, New York, 697 p.
- Li, X., George, E. y Marschner, H. 1991a.** Extension of the phosphorous depletion zone in VA-mycorrhizal white clover in a calcareous soil. *Plant Soil* 136: 41-48.
- Li, X., George, E. y Marschner, H. 1991b.** Phosphorous depletion and pH decrease at the root-soil and hyphae-soil interfaces of VA mycorrhizal white clover fertilized with ammonium. *New Phytol.* 119: 397-404.
- Linderman, R.G. 1988.** VA (Vesicular-Arbuscular) mycorrhizal symbiosis. ISI Atlas of Science. *Animals Plants* 1: 183-188.
- Long, S.P. y Hällgren, J.E. 1987.** Measurements of CO<sub>2</sub> assimilation by plants in the field and the laboratory. En: *Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis*, 2nd ed. (Eds. Coombs, J., Hall, D.O., Long S.P. y Scurlock J.M.O.), Pergamon Press. Oxford, England, pp. 62-94.
- Longa, M.A., del Río, L.A. y Palma, J.M. 1994.** Superoxide dismutases of chesnut leaves, *Castanea sativa*: Characterization and study of their involvement in natural leaf senescence. *Physiol. Plant.* 92: 227-232.
- Longstreth, D.J. y Nobel, P.S. 1979.** Salinity effects on leaf anatomy. Consequences for photosynthesis. *Plant Physiol.* 63: 700-703.
- Losada, M. y Guerrero, M.G. 1979.** The photosynthetic reduction of nitrate and its regulation. En: *Photosynthesis in Relation to Model Systems*. Ed. Barber, J., Elsevier, Amsterdam. pp. 365-408.
- Malan, C., Greyling, M.M. y Gressel, J. 1990.** Correlation between CuZn superoxide dismutase and glutathione reductase, and environmental and xenobiotic stress tolerance in maize inbreds. *Plant Sci.* 69: 157-166.
- Mansfield, T.A. 1987.** Hormones as regulators of water balance. En: *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*. Ed. Davies, P.J., Martinus Nijhoff Publishers, Boston, pp. 411-413.

- Match, T., Matsushita, N. y Takahashi, E. 1988.** Salt tolerance of the reed plant *Phragmites communis*. *Physiol. Plant.* 72: 8-14.
- Marx, C., Dexheimer, J., Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. 1982.** Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. IV. Ultracytoenzymological evidence (ATPase) for active transfer processes in the host-arbuscular interface. *New Phytol.* 90: 37-43.
- McCord, J.M. y Fridovich, I. 1969.** Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055.
- McDonald, R.M. y Lewis, M. 1978.** The occurrence of some acid-phosphatases and dehydrogenases in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *New Phytol.* 80: 135-141.
- Menge, J.A. 1983.** Utilization of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture. *Can. J. Bot.* 61: 1015-1024.
- Menge, J.A., Steirle, D., Bagyaraj, D.J., Johnson, E.L.V. y Leonard, R.T. 1978.** Phosphorus concentrations in plants responsible for inhibition of mycorrhizal infection. *New Phytol.* 80: 575-578.
- Mengel, K. 1984.** Le potassium en physiologie végétale. *C.R. Acad. Agric. Fr.* 70: 1365-1376.
- Mertz, S.M., Heithaus, J.J. Jr. y Bush, R.L. 1979.** Mass production of axenic spores of the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 72: 167-169.
- Michelsen, A. y Rosendahl, S. 1990.** The effect of VA mycorrhizal fungi, phosphorus and drought stress on the growth of *Acacia nilitica* and *Leucaena leucocephala* seedlings. *Plant Soil* 124: 7-13.
- Minotti, P.L. y Jackson, W.A. 1970.** Nitrate reduction in the roots and shoots of wheat seedlings. *Planta* 95: 36-44.
- Morgan, J.M. 1984.** Osmoregulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 299-319.
- Morton, J.B. 1988.** Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: Classification nomenclature and identification. *Mycotaxon* 32: 267-324.
- Morton, J.B., Franke, M. y Bentivenga, S.P. 1995.** Developmental foundations for morphological diversity among endomycorrhizal fungi in Glomales. En: *Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. Eds. Varma, A. y Hock, B. Springer-Verlag, Berlin, pp. 669-684.

- Mosse, B. y Hepper, C.M. 1975.** Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organ cultures. *Physiol. Plant Pathol.* 5: 215-223.
- Mosse, B., Stribley, D.P. y Le Tacon, F. 1981.** Ecology of mycorrhizae and mycorrhizal fungi. *Adv. Microbiol. Ecol.* 5: 137-210.
- Munns, R., Greenway, H. y Kirts, G.D. 1983.** Halotolerant eukaryotes. En: *Encyclopedia of Plant Physiology*. Eds. Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B. y Ziegler, H., Vol 12C. Springer-Verlag, Berlin, pp. 59-135.
- Naidoo, G. 1985.** Effects of waterlogging and salinity on plant water relations and on the accumulation of solutes in three mangrove species. *Aquat. Bot.* 22: 133-143.
- Naidoo, G. 1986.** Response of the mangrove *Rhizophora mucronata* L. to high salinities and low osmotic potentials. *S. Afri. J. Bot.* 52: 124-128.
- Nair, M. G., Safir, G. R. y Siqueira, J. O. 1991.** Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza-stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 434-439.
- Nemec, S. 1981.** Histochemical characteristics of *Glomus etunicatum* infection of *Citrus lemon* fibrous roots. *Can. J. Bot.* 59: 609-614.
- Nemec, S. y Meredith, F.I. 1981.** Amino acid content of leaves in mycorrhizal and nonmycorrhizal citrus rootstocks. *Ann. Bot.* 47: 351-358.
- Nelsen, C.E. 1987.** The water relations of vesicular-arbuscular mycorrhizal systems. En: *Ecophysiology of VA mycorrhizal plants*. Ed. Safir G.R. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 71-79.
- Nelsen, C.E. y Safir, G.R. 1982.** The water relations of well watered, mycorrhizal and nonmycorrhizal onion plants. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 107: 271-274.
- Nock, L.P., Rogers, L.J. y Thomas, H. 1992.** Metabolism of proteins and chlorophyll in leaf tissue of *Festuca pratensis* during chloroplast assembly and senescence. *Phytochemistry* 31: 1465-1470.
- Notton, B. A. y Hewitt, E.J. 1978.** Structure and properties of higher plant nitrate reductase, specially *Spinacea olearacea*. En: *Nitrogen Assimilation in Plants*. Eds. Hewitt, E.J. y Cuttings, C.V., Academic Press, New York, pp. 227-244.
- Oaks, A. 1979.** Nitrate reductase in roots and its regulation. En: *Nitrogen Assimilation in Plants*. Eds. Hewitt, E.J. y Cuttings, C.V. Academic Press, New York, NY. pp. 217-226.

**Ojala, J.C., Jarrell, W.M., Menge, J.A. y Johnson, E.L.V. 1983.** Influence of mycorrhizal fungi on the mineral nutrition and yield of onion in saline soil. *Agronomy* 75: 225-259.

**Oliver, A.J., Smith, S.E., Nicholas, D.J.D. y Wallace, W. 1983.** Activity of nitrate reductase in *Trifolium subterraneum*: Effects of mycorrhizal infection and phosphate nutrition. *New Phytol.* 94: 63-79.

**Olsen, S.R. y Dean, L.A. 1965.** Phosphorus. En: *Methods of Soil Chemical Analysis*, Part 2. Eds. C.A. Black. Amer. Soc. Agron., Madison, Wis., pp. 1035-1049.

**Pacovsky, R.S. 1989.** Carbohydrate, protein and amino-acid status of *Glycine-Glomus-Bradyrhizobium* symbioses. *Physiol. Plant.* 75: 346-354.

**Pacovsky, R.S., Da Silva, P., Carvalho, M.T. y Tsai, S.M. 1991.** Growth and nutrient allocation in *Phaseolus vulgaris* L. colonized with endomycorrhizae or *Rhizobium*. *Plant Soil* 132: 127-137.

**Paleg, I.G., Stewart, G.R. y Starr, R. 1985.** The effect of compatible solutes on proteins. *Plant Soil* 89: 83-94.

**Palma, J. M., Longa, M.A., del Río, L.A. y Arines, J. 1993.** Superoxide dismutase in vesicular-arbuscular red clover plants. *Physiol. Plant.* 87: 77-83.

**Pang, P.C. y Paul, E.A. 1980.** Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizae on <sup>14</sup>C and <sup>15</sup>N distribution in nodulated faba beans. *Can. J. Soil Sci.* 60: 241-250.

**Peña, J.I., Sánchez-Díaz, M., Aguirreolea, J. y Becana, M. 1988.** Increased stress tolerance of nodule activity in the *Medicago-Rhizobium-Glomus* symbiosis under drought. *J. Plant Physiol.* 133: 79-83.

**Phillips, J.M. y Hayman, D.S. 1970.** Improved procedure of clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55: 159-161.

**Pizzi, A. y Cameron, F.A. 1986.** Flavonoid tannins: structural wood components for drought-resistance mechanisms of plants. *Wood Sci. Technol.* 20: 119-124.

**Plassard, C., Scheromm, P. y Llamas, H. 1985.** Nitrate assimilation by maritime pine and ectomycorrhizal fungi in pure culture. En: *Physiological and Genetic Aspects of Mycorrhizae*. Eds. Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. INRA, Paris. pp. 383-394.

**Poljakoff-Mayber, A. 1975.** Morphological and anatomical changes in plants as a response to salinity stress. En: *Plants in Saline Environments*. Eds Poljakoff-Mayber, A. y Gale, J. Springer-Verlag, Berlin, pp. 97-117.



- Poss, J.A., Pond, E., Menge, J.A. y Harrell, W.M. 1985.** Effect of salinity on mycorrhizal onion and tomato in soil with and without additional phosphate. *Plant Soil* 88: 307-319.
- Porter, W.M. 1979.** The most probable number method for enumerating infective propagules of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Aust. J. Soil Res.* 17: 515-519.
- Powell, C.L.I. 1976.** Development of mycorrhizal infections from *Endogone* spores and infected root segments. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 66: 439-445.
- Prior, J., Tuohy, J. y Whiting, J. 1987.** Interrelationships between aspects of nitrogen metabolism and solute accumulation and the distribution of subtropical woody plants in southeast Africa. *New Phytol.* 107: 427-439.
- Puppo, A., Dimitrijevic, L. y Rigaud, J. 1982.** Possible involvement of nodule superoxide dismutase and catalase in leghemoglobin protection. *Planta* 156: 374-379.
- Rabinovitch, H.D. y Fridovich, I. 1983.** Superoxide radicals, superoxide dismutases and oxygen toxicity in plants. *Photochem. Photobiol.* 37: 679-690.
- Ramalho, J.C., Rebelo, M.C., Santos, M.E., Antunes, M.L. y Numes, M.A. 1995.** Effects of calcium deficiency on *Coffea arabica*. Nutrient changes and correlation of calcium levels with some photosynthetic parameters. *Plant Soil* 172: 87-96.
- Raudaskoski, M. 1992.** Cell and molecular biology of the cytoskeleton in filamentous fungi. COST Action 8.10. Torino.
- Rea, P.A. y Sanders, D. 1987.** Tonoplast energitization: two H<sup>+</sup> pumps, one membrane. *Physiol. Plant.* 71: 131-141.
- Reddel, P., Foster, R.C. y Bowen, G.D. 1986.** The effects of sodium chloride on growth and nitrogen fixation in *Casuarina obesa* Miq. *New Phytol.* 102: 297-408.
- Rhodes, J.D. 1982.** Soluble salts. En: *Methods of Soil Analysis*. Parte 2. Ed. Page, A.L. American Society of Agronomy. Madison, WI. USA. pp. 167-179.
- Robin, C., Shamsun-noor, L. y Guckert, A. 1989.** Effect of potassium on the tolerance to PEG-induced water stress of two white clover varieties (*Trifolium repens* L.). *Plant Soil* 120: 153-158.
- Ruiz-Lozano, J.M. y Azcón, R. 1995a.** Hyphal contribution to water uptake in mycorrhizal plants as affected by the fungal species and water status. *Physiol. Plant.* 95 (En prensa).

- Ruiz-Lozano, J.M. y Azcón, R. 1995b.** Viability and infectivity of mycorrhizal spores after long term storage in soils with different water potentials. *Appl. Soil Ecol.* (En prensa).
- Ruiz-Lozano, J.M., Azcón, R. y Gómez, M. 1995a.** Effects of arbuscular-mycorrhizal *Glomus* species on drought tolerance: Physiological and nutritional plant responses. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 456-460.
- Ruiz-Lozano, J.M., Gómez, M. y Azcón, R. 1995b.** Influence of different *Glomus* species on the time-course of physiological plant responses of lettuce to progressive drought stress periods. *Plant Sci.* 110: 37-44.
- Rygiewicz, P.T. y Bledsoe, C.S. 1984.** Mycorrhizal effects on potassium fluxes by northwest coniferous seedlings. *Plant Physiol.* 76: 918-923.
- Sánchez-Díaz, M. 1989.** Adaptación de la vida vegetal a la aridez. En: *Zonas Áridas en España*. Real Academia de Ciencias Exacta, Físicas y Naturales, Madrid, pp. 175-197.
- Sánchez-Díaz, M. y Honrubia, M. 1994.** Water relations and alleviation of drought stress in mycorrhizal plants. En: *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems*. Eds Gianinazzi, S. y Schüepp, H. Birkäuser Verlag. Basel. Switzerland, pp. 167-178.
- 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 Sci.* 71: 215-221.
- Safir, G.R., Boyer, J.S. y Gerdemann, J.W. 1971.** Mycorrhizal enhancement of water transport in soybean, *Science* 172: 581-583
- Safir, G.R., Boyer, J.S. y Gerdemann, J.W. 1972.** Nutrient status and mycorrhizal enhancement of water transport in soybean. *Plant Physiol.* 49: 700-702.
- Safir, G.R. 1985.** Water relations and drought tolerance of vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. IAEA TECDOC-338, pp. 127-132.
- Sanders, F.E. y Sheikh, N.A. 1983.** The development of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in plant root systems. *Plant Soil* 71: 223-246.
- Sanders, F.E. y Tinker, P.B. 1973.** Phosphate inflow into mycorrhizal roots. *Pestic. Sci.* 4: 385-395.
- Sarjala, T. 1990.** Effect of nitrate and ammonium concentration on nitrate reductase activity in five species of mycorrhizal fungi. *Physiol. Plant.* 79: 65-70.

- Scanerini, S. y Bonfante-Fasolo, P. 1983.** Comparative ultrastructural analysis of mycorrhizal associations. *Can. J. Bot.* 61: 917-943.
- Schellenbaum, L., Gianinazzi, S. y Gianinazzi-Pearson, V. 1993.** Comparison of acid soluble protein synthesis in roots of endomycorrhizal wild type *Pisum sativum* and corresponding isogenic mutants. *J. Plant Physiol.* 141: 2-6.
- Shaner, D.L. y Boyer, J.S. 1976.** Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L.) leaves. II. Regulation by nitrate flux. *Plant Physiol.* 58: 449-504.
- Serrano, R. 1989.** Structure and function of plasma-membrane ATPase. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 61-94.
- Shaaltiel, Y., Glazer, A., Bocion, P.F. y Gressel, J. 1988.** Cross tolerance to herbicidal and environmental oxidants of plant biotypes tolerant to paraquat, sulfur dioxide and ozone. *Pest. Biochem. Physiol.* 31: 13-23.
- Shaaltiel, Y. y Gressel, J. 1986.** Multienzyme oxygen radical detoxifying system correlated with paraquat resistance in *Conyza bonariensis*. *Pest. Biochem. Physiol.* 26: 22-28.
- Sieverding, E. y Toro, S. 1988.** Influence of soil water regimes on mycorrhiza. V. Performance of different VAM fungal species with cassava. *J. Agron. Crop Sci.* 161: 322-332.
- Sinha, S.K. y Nicholas, D.J.D. 1981.** Nitrate reductase. En: *The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants*. Eds. Paleg, L.G. y Aspinall, D. Academic Press, New York, pp. 145-169.
- Siqueira, J.O. 1987.** Cultura axénica e monoxénica dos fungos micorrízicos vesículo-arbusculares. II Reunião Brasileira sobre Micorrizas. São Paulo. pp. 44-70.
- Siqueira, J.O., Hubbell, D.H. y Schenck, N.C. 1982.** Spore germination and germ tube growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *in vitro*. *Mycologia* 74: 952-959.
- Siqueira, J.O., Sylvia, D.M., Gibson, J. y Hubbell, D.H. 1985.** Spores, germination and germ tubes of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Can. J. Microbiol.* 31: 965-972.
- Smith, S.E. 1980.** Mycorrhizas of autotrophic higher plants. *Biol. Rev.* 55: 475-510.
- Smith, S.E. y Gianinazzi-Pearson, V. 1988.** Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 221-244.

- Smith, S.E. y Smith, F.A. 1990.** Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport. *New Phytol.* 114: 1-38.
- Snell, F.D. y Snell, C.T. 1949.** Colorimetric methods of analysis. D. Van Nostrand Company, New York, pp. 802-807.
- Spanu, P., Boller, T., Ludwing, A., Wiemken, A., Faccio, A. y Bonfante-Fasolo, P. 1989.** Chitinase in roots of mycorrhizal *Allium porrum*: regulation and localization. *Planta* 177: 447-455.
- Srivastava, H.S. 1980.** Regulation of nitrate reductase activity in higher plants. *Phytochemistry* 19: 725-730.
- St. John, T.V., Hays, R.I. y Reid, C.P.P. 1983.** Influence of a volatile compound on formation of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Tran. Br. Myc. Soc.* 81: 153-154.
- Strother, S. 1988.** The role of free radicals in leaf senescence. *Gerontology* 34: 151-156.
- Strullu, D.G. y Gourret, J.P. 1980.** Données ultrastructurales sur l'integration cellulaire de quelques parasites on symbiotes des plantes. II. Champignons mycorrhiziens. *Bull. Soc. Bot. Fra. Actual Bot.* 127: 97.
- Strullu, D.G., Gourret, J.P., Garrec, J.P. y Fourcy, A. 1981.** Ultrastructure and electron-probe microanalysis of the metachromatic vacuolar granules occurring in *Taxus* mycorrhizas. *New Phytol.* 87: 537-545.
- Sundaresan, P., Ubalthouse-Raja, N., Gunasekaran, P. y Lakshmanan, M. 1988.** Studies on nitrate reduction by VAM fungal spores. *Curr. Sci.* 57: 84-85.
- Sylvia, D.M. y Schenck, N.C. 1983.** Germination of chlamydospores of three *Glomus* species as affected by soil matrix potential and fungal contamination. *Mycologia* 67: 30-35.
- Sylvia, D.M. y Williams, S.E. 1992.** Vesicular-arbuscular mycorrhizae and environmental stress. En: *Mycorrhizae in Sustainable Agriculture*. Eds. Bethlenfalvay, G.J. y Linderman, R.G. ASA Special Publication No. 54, Madison, pp. 101-124.
- Taleisnik, E.L. 1987.** Salinity effects on growth and carbon balance in *Lycopersicon esculentum* and *L. pennelli*. *Physiol. Plant.* 71:213-218.
- Tanaka, K. y Sugahara, K. 1980.** Role of superoxide dismutase in defense against SO<sub>2</sub> toxicity and an increase in superoxide dismutase activity with SO<sub>2</sub> fumigation. *Plant Cell Physiol.* 21: 601-611.

- Tissera, P y Ayres, P.G. 1988.** Hydraulic conductance and anatomy of roots of *Vicia faba* plants infected by *Uromyces viciae-fabae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 32: 192-207.
- Thimann, K.V. 1987.** Plant senescence: a proposed integration of the constituent processes. En: *Plant Senescence: Its Biochemistry and Physiology*. Eds. Thomson W.W., Nothnagel E.A. y Huffaker R.C. American Society of Plant Physiologist, Rockville, MD. pp. 1-19.
- Tobar, R.M. 1991.** Evaluación del papel de las micorrizas vesículo-arbusculares en la fijación y captación de nitrógeno en sistemas suelo-planta, bajo condiciones semiáridas, mediante el uso de técnicas isotópicas. Tesis Doctoral de la Universidad de Granada. Granada, España.
- Tobar, R.M., Azcón, R. y Barea, J.M. 1994a.** The improvement of plant N acquisition from an ammonium-treated, drought-stressed soil by the fungal symbiont in arbuscular mycorrhizae. *Mycorrhiza* 4: 105-108.
- Tobar, R.M., Azcón, R. y Barea, J.M. 1994b.** Improved nitrogen uptake and transport from <sup>15</sup>N-labelled nitrate by external hyphae of arbuscular mycorrhiza under water-stressed conditions. *New Phytol.* 126: 119-122.
- Tommerup, I.C. y Abbott, L.K. 1981.** Prolonged survival and viability of VA-mycorrhizal hyphae after root death. *Soil Biol. Biochem.* 13: 431-433.
- Trappe, J.M. 1986.** Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in angiosperms from an evolutionary standpoint. En: *Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants*. Ed. Safir, G.R., CRC Press. Boca Raton, Florida, pp. 5-25.
- Treichel, S., Brickmann, E., Scheitler, B. y Von Willert, D.J. 1984.** Occurrence and changes of proline content in plants in the southern Namib desert in relation to increasing and decreasing drought. *Planta* 162: 236-242.
- Tsang, W.T., Bowler, C., Herouart, D., Van Camp, W., Villarroel, R., Gentello, C. Van Montagui, M. y Inzé, D. 1991.** Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. *Plant Cell* 3: 783-792.
- Turner, N.C. 1986.** Crop water deficits: a decade of progress. *Adv. Agron.* 39: 1-51.
- Turner, N.C. y Jones, M.M. 1980.** Turgor maintenance by osmotic adjustment: A review and evaluation. En: *Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress*. Eds. Turner, N.C. y Kramer, P.J., Wiley-Inter-Science. New York, pp. 155-172.
- Turner, N.C. y Kramer, P.J. 1980.** Adaptation of plants to water and high temperature stress. John Wiley & Sons. New York.

- U.S. Department of Agriculture. 1967.** Soil survey, laboratory methods and procedures for collecting soil samples. En: *Soil Survey Investigation Report No. 1*. Soil Conservation Service, Washington, D.C., pp. 13-14.
- Venkataramana, S., Naidu, K.M. y Singh, S. 1987.** Membrane thermostability and nitrate reductase activity in relation to water stress tolerance of young sugar-cane plants. *New Phytol.* 107: 335-340.
- Vézina, L.P., Margolis, H.A., McAfee, B.J. y Delaney, S. 1989.** Changes in the activity of enzymes involved with primary nitrogen metabolism due to ectomycorrhizal symbiosis on jack pine seedlings. *Physiol. Plant.* 75: 55-62.
- Vidal, M.T. 1991.** Contribución al estudio de los factores que influyen el crecimiento *in vitro* de hongos de las micorrizas VA y su establecimiento en plantas micropropagadas. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Granada, España.
- Warner, A. y Mosse, B. 1980.** Independent spread of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 74: 407-410.
- Win Jones. R.G. 1981.** Salt tolerance. En: *Physiological Processes Limiting Plant Productivity*. Ed. Johnson, C.B., Butterworths, London, pp. 271-292.
- Win Jones, R.G. y Gorham, J. 1983.** Osmoregulation. En: *Encyclopedia of Plant Physiology* N.S. Eds. Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B. y Ziegler, H., Vol 12C. Springer-Verlag, Berlin, pp. 59-135.
- Wyss, P., Mellor, R.B. y Wiemken, A. 1990.** Vesicular-arbuscular mycorrhizas of wild type soybean and non-nodulating mutants with *Glomus mosseae* contain symbiosis specific polypeptides (mycorrhizins) immunologically cross-reactive with nodulins. *Planta* 182: 22-26.
- Yeo, A.R. 1981.** Salt tolerance in the halophyte *Suaeda maritima* L. Dum.: intracellular compartmentation of ions. *J. Exp. Bot.* 32: 487-497.