

17/64

BIBLIOTECA	
FACULTAD DE CIENCIAS	
GRANADA	
Estante	T
Tabla	17
Núm.	64

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS

USO DE N<sup>15</sup> PARA EVALUAR LOS EFECTOS DE LAS MICORRIZAS  
SOBRE LA FIJACION BIOLÓGICA DE N<sub>2</sub> Y OTROS ASPECTOS  
DE LA NUTRICION EN ASOCIACIONES **RHIZOBIUM**-LEGUMINOSA

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA	
GRANADA	
Nº Documento	26925
Nº Copia	26954

Faiza El-Atrash



MEMORIA de TESIS DOCTORAL 1988

Esta Tesis fue leído en facultad de ciencia de la Univ. de Granada  
el día 17 de Noviembre 1988.

El título : Uso de N<sup>15</sup> para evaluar los efectos de las Micorrizas  
sobre la fijación biológica de Nitrógeno y otros aspectos de la nut-  
rición en asociaciones Rhizobium-Leguminosa.

La composición del Tribunal fué la siguiente:

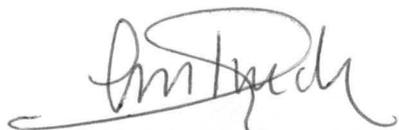
- Prof. don Enrique Montoya Gomez
- Prof. Don Luis Recalde Manrique
- Prof. Don José Olivares Páscual
- Prof. don Angel Jesús Matilla Carro
- Dra Dña Cncepcion Azcon-Aguilar

La Calificación obtenida fué: "Apto Cum Laude" .

USO DE N<sup>15</sup> PARA EVALUAR LOS EFECTOS DE LAS MICORRIZAS  
SOBRE LA FIJACION BIOLÓGICA DE N<sub>2</sub> Y OTROS ASPECTOS DE  
LA NUTRICION EN ASOCIACIONES **RHIZOBIUM**-LEGUMINOSA

MEMORIA presentada para aspirar  
al Grado de Doctor

El TUTOR:

  
CARMEN LLUCH

Fdo.: Faiza El-Atrash





Rosario Azcón  
Investigador Científico  
del C.S.I.C.

Los Directores

José Miguel Barea  
Profesor de Investigación  
del C.S.I.C.



UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS

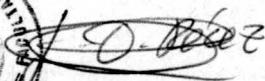
Núm. 89

DON JUAN DE DIOS PEREZ JIMENEZ, PROFESOR  
TITULAR Y SECRETARIO DE LA FACULTAD DE  
CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICO: Que la presente Tesis Doctoral corresponde a la presentada en esta Facultad por Da. FAIZA EL-ATRACH y que fué calificada con APTO "Cum laude", el día 17 de Noviembre de 1.988, por el Tribunal correspondiente, y que fué aprobado en Comisión de Doctorado celebrada el día 17 de noviembre de 1.988, siendo el Título "USO DE N<sup>15</sup> PARA EVALUAR LOS EFECTOS DE LAS MICORRIZAS SOBRE LA FIJACION BIOLÓGICA DE N<sub>2</sub> Y OTROS ASPECTOS DE LA NUTRICIÓN DE ASOCIACIONES RHIZBIUM-LEGUMINOS".

Y para que conste expido la presente certificación con el Vº. Bº. del Ilmo. Sr. Decano en Granada a Dieciseis de Enero de mil novecientos ochenta y nueve.

Vº. Bº.  
EL DECANO.

*Carb...*  
  




UNION OF FRUIT  
COMPANY OF PANAMA

... ..  
... ..  
... ..

... ..  
... ..  
... ..  
... ..  
... ..  
... ..  
... ..  
... ..  
... ..  
... ..  
... ..

... ..  
... ..  
... ..

... ..  
... ..  
... ..  
... ..  
... ..

... ..  
... ..



UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Ciencias

Fecha 25 ENE. 1989

SALIDA NUM. 89

Este trabajo está incluido dentro del Proyecto:

"Ecología, Bioquímica y Biotecnología de Micorrizas VA" (CICYT).

El material isotópico fué suministrado por la Joint IAEA/FAO División de Naciones Unidas (Viena) dentro del Programa "Pasture management".

Los análisis de  $N^{15}$  en muestras fueron realizados en el laboratorio de Agricultural Biotechnology (Sieverdorf, Austria) de la Agencia Internacional de Energía Atómica. Los directores y doctorando agradecen a dicha institución y especialmente a sus investigadores Drs Danso Zapata y Axman el apoyo científico y técnico.

*A mi madre que con callado dolor aceptó mi separación.*

*A mi padre que aún vive en mí.*

*A mis hermanos, mis tíos, y a la memoria de mi abuelo.*

*A todos los que creyeron en mí...*

*Faiza*

Al finalizar este trabajo, deseo expresar mi más profundo agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que han contribuido a lo largo de estos años a la realización del presente trabajo.

En primer lugar, a los Drs. Dña. Rosario Azcón, Investigador Científico Y D. José Miguel Barea, Profesor de Investigación directores de esta tesis doctoral, por su valiosa labor de dirección. Gracias a sus amplios conocimientos e inquietudes científicas me ha sido posible realizar este trabajo.

El Prof. José Miguel Barea ha dejado constancia de su elevada capacidad profesional. Agradezco haber contado con su apoyo científico durante este periodo de iniciación a la investigación científica.

De una forma muy especial quiero expresar mi gratitud a la Dra. Dña. Rosario Azcón, no sólo por su labor científica, sino también por su gran categoría humana, de la que me ha dejado reflejo día a día durante muchas horas de convivencia y de la que creo ha derivado una sincera amistad. En todos los momentos difíciles durante mi estancia en este país, ella ha sido mi mayor consuelo y me ha dado ánimos para seguir adelante.

Al Director de la Estación Experimental del Zaidín CSIC Dr. D. Julio Boza y al Jefe de la U.E. de Microbiología, Dr. D. José Olivares por su apoyo humano y por facilitarme la

infraestructura científica necesaria para la realización de este trabajo.

A la Dirección General de Relaciones Culturales del Ministerio de Asuntos Exteriores Español y al Ministerio de Enseñanza Superior Sirio, por la ayuda económica que me han prestado.

A los Drs. Kamal Sharaf y Muhamad Osman, de la Universidad de Damasco, por su interés y amistad que han facilitado mi estancia en este país.

A mis tutores, Dra. Dña. Carmen Lluch de la Universidad de Granada Y Dr. D. Wafa Bagdadi de la Universidad de Damasco, por su colaboración.

A Dña. Isabel López, por su trabajo de mecanografía y a José Miquel Carreto, por su ayuda de investigación.

Mi recuerdo y gratitud para Reyes Alvarez, J.L. Quesada, Teresa, Pura, Y Pilar Medina, M. Martinez, J. Rodriguez Robledo y los Drs E. Barahona y P. Ramos Y para los Personales en el Departamento de Química Agrícola cuya colaboración en la realización de este trabajo ha sido muy significativo.

A los Drs. J.A. Ocampo, C. Azcón-Aguilar y B. Roldán Fajardo, y al resto de mis compañeros de esta sección. quiero dedicarles una mención especial.

A todo el personal de la Estación, sin quienes esta tarea habría sido de mucha mayor aridez.

Y finalmente, agradezco a la Nación Española por hacerme sentir en familia en todo momento, y siempre guardaré de ella un especial recuerdo en mi corazón.

## INDICE

	<u>Pag.</u>
I. OBJETO E INTERES DEL TRABAJO.....	1
II. INTRODUCCION.....	4
1. Micorrizas.....	4
1.1. Conceptos generales.....	4
1.2. Formación de la micorriza: Proceso de colonización biotrófica de las raices.....	6
1.3. Fisiología d las micorrizas.....	12
1.4. Factores que afectan la formación de micorrizas.....	17
1.5. Posibilidades de aplicación práctica de las MVA.....	20
2. Micorrizas en leguminosas.....	23
2.1. Significado de la simbiosis <b>Rhizobium</b> -leguminosa en el ecosistema (breve resumen).....	23
2.2. Efectos de las MVA sobre FBN mediados por el aporte de P, y otros nutrientes.....	24
2.3. Interacciones <b>Rhizobium</b> -leguminosa-MVA, no medidas por nutrientes.....	26
2.4. Papel de las micorrizas en la transferencia de N en comunidades mixtas de plantas leguminosas y no-leguminosas.....	28
2.5. Coste energético de la asociación <b>Rhizobium</b> -leguminosa- micorriza.....	29
3. Factores que afectan la formación y función (FBN) de la simbiosis tripartita <b>Rhizobium</b> -leguminosa-micorriza.....	30
3.1. Efecto de la concentración de P soluble en el suelo.....	30
3.2. Efecto del N combinado.....	32
3.3. Efecto del potencial hídrico del suelo.....	33
3.4. Efecto de la salinidad.....	36

3.5. Efecto del Zn.....	39
3.6. Presencia de plantas no fijadoras, especialmente gramíneas que crecen en asociación con la fijadora.....	41
4. Cuantificación de la fijación simbiótica de N <sub>2</sub> (FBN)....	42
5. Uso de N <sup>15</sup> en la medida de FBN.....	46
5.1. Los isótopos del N.....	46
5.2. Uso de N <sup>15</sup> para determinar la eficiencia de un fertilizante para la planta.....	47
5.3. Concepto del "valor A".....	48
5.4. Metodologías basadas en el uso de N <sup>15</sup> y su aplicación a evaluar FBN.....	49
5.5. Uso de fertilizantes enriquecidos en N <sup>15</sup> para medir FBN.	51
5.5.1. Técnica de la dilución isotópica.....	52
5.5.2. Técnica del "valor A".....	53
5.5.3. Ventajas de las metodologías basadas en el uso de N <sup>15</sup> ...	54
5.5.4. Fuentes de error en las metodologías que utilizan compuestos marcados con N <sup>15</sup> .....	56
5.5.4.1. La planta control no fijadora o de referencia.....	56
5.5.4.2. Existencia de discriminación isotópica en el sistema suelo-atmósfera.....	58
5.5.4.3. Existencia de discriminación isotópica entre diferentes partes de la planta.....	59
5.5.5. Sistema no fijador, formas y dosis de fertilizante comunmente utilizadas.....	59
5.5.5.1. Planta no fijadora de referencia.....	59
5.5.5.2. Tipos de fertilizantes enriquecidos en N <sup>15</sup> .....	60
5.5.5.3. Dosis y formas de aplicación de fertilizantes marcados con N <sup>15</sup> .....	62
5.5.6. Efecto de diferentes factores que influyen la FBN, utilizando las técnicas del N <sup>15</sup> .....	63
5.6. Aplicación de la técnica de la dilución isotópica (N <sup>15</sup> ) para medir "Transferencia de N" y otros aspectos de la nutrición nitrogenada de las plantas.....	65

5.7. Uso de las técnicas que utilizan N <sup>15</sup> , para evaluar el papel de las micorrizas en FBN y "Transferencias de N"...	66
III. MATERIALES Y METODOS.....	69
1. Parte general.....	69
1.1. Obtención de suelos desprovistos de propágulos de micorriza.....	69
1.2. Aplicación del fosfato soluble al suelo.....	69
1.3. Tratamientos biológicos.....	70
1.3.1. Inoculación con hongos formadores de micorrizas VA.....	70
1.3.2. Inoculación de <b>Rhizobium</b> .....	71
1.3.3. Plantas y condiciones de cultivo.....	72
1.3.4. Adicción de N <sup>15</sup> .....	73
1.3.5. Determinaciones.....	73
1.3.6. Cuantificación de la micorrización.....	74
1.3.7. Cuantificación de la composición isotópica de N en tejidos vegetales.....	75
1.3.8. Suelos empleados.....	75
2. Ensayos específicos.....	77
2.1. Interacción <b>Rhizobium meliloti-Glomus mosseae</b> sobre cultivos separados o mezclados de alfalfa y <b>Lolium</b> a varios niveles de fosfato en el medio.....	77
2.2. Efecto del N combinado sobre la FBN en <b>Hedysarum coronarium</b> .....	77
2.3. Interacción <b>Rhizobium meliloti-alfalfa-Glomus mosseae</b> a diferentes niveles de potencial hídrico del suelo.....	78
2.4. Interacción <b>Rhizobium meliloti-alfalfa-Glomus mosseae</b> a diferentes niveles de salinidad aplicados al suelo.....	79
2.5. Interacción <b>Rhizobium meliloti-alfalfa-Glomus mosseae</b> en suelo adicionado de concentraciones crecientes de SO <sub>4</sub> Zn.	80



IV. RESULTADOS Y DISCUSION.....	82
1. Interacción de <b>Rhizobium-Glomus mosseae</b> en cultivos separados o mixtos de alfalfa y <b>Lolium</b> , a varios niveles de fosfato en el suelo.....	84
1.1. Efectos sobre la formación de la micorriza.....	84
1.2. Efectos sobre el crecimiento de las plantas.....	86
1.3. Efecto sobre la nutrición en P.....	88
1.4. Efectos sobre la nodulación y nutrición nitrogenada de las plantas.....	91
1.5. Efecto sobre la FBN.....	95
1.6. Efectos sobre la captación de N del fertilizante o suelo (Técnica de N <sup>15</sup> ).....	99
2. Efecto del N combinado sobre FBN.....	106
2.1. Efectos sobre la micorrización, crecimiento de las plantas y nutrición fosforada.....	106
2.2. Efectos sobre la nodulación y nutrición nitrogenada.....	112
2.3. Efectos sobre FBN.....	115
2.4. Efectos sobre la captación de N dl suelo o fertilizante (técnica del N <sup>15</sup> ).....	120
3. Efectos de las micorrizas ( <b>vs</b> fosfato soluble) sobre el desarrollo y funcionamiento de la simbiosis <b>R.meliloti-M. sativa</b> a difrentes niveles de potencial hídrico del suelo.....	126
3.1. Efectos sobre el crecimiento y nutrición de las plantas.....	126
3.2. Efectos sobre FBN.....	134
4. Efectos de las micorrizas ( <b>vs</b> fosfato soluble) sobre el desarrollo y funcionamiento de la simbiosis <b>R. meliloti-M. sativa</b> a diferentes niveles de salinidad.....	138
4.1. Efectos sobre el crecimiento y nutrición de las plantas.....	138
4.2. Efectos sobre FBN.....	145
5. Efectos de las micorrizas ( <b>vs.</b> fosfato soluble) sobre el desarrollo y funcionamiento de la simbiosis <b>R. meliloti-M. sativa</b> a diferentes niveles de zinc en el suelo.....	147

5.1. Efectos sobre el crecimiento de las plantas y la micorrización.....	147
5.2. Efectos sobre la captación de P y Zn.....	152
5.3. Efectos sobre la captación de N y FBN (N <sup>15</sup> ).....	156
V. DISCUSION GENERAL.....	161
1. Aplicabilidad de las técnicas que usan N <sup>15</sup> para valorar FBN y otras estimaciones asociadas.....	161
2. Análisis general de los resultados más trascendentes obtenidos.....	163
3. Avances d los conocimientos en relación con el ecosistema suelo-planta-atmósfera derivados de los resultados obtenidos.....	167
BIBLIOGRAFIA.....	170

## I. OBJETO E INTERES DEL TRABAJO

Apoyada en una extensa base experimental existe una abundante literatura científica en la que se demuestra que las simbiosis mutualísticas microbio-planta implicadas en la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) y en el ciclado de P, desempeñan un papel importante en el Ecosistema. Concretamente, se sabe que la operación de los sistemas fijadores de  $N_2$ , **Rhizobium**-leguminosa y las micorrizas (simbiosis hongo-planta, especializada en la captación de P y otros nutrientes) resulta crítica en casos tales como: a) El establecimiento de las plantas en suelos con escasa vegetación, degradados por diversas causas de estrés; b) en la estimulación del desarrollo de las plantas en suelos marginales y otras situaciones en las que el dominador común es la condición de baja fertilidad; c) en el caso de una agricultura de "mantenimiento", desarrollada mediante tecnología tipo "low-input", etc. Cuando se trata de situaciones en las que se pretende una producción agrícola intensiva, con altos

niveles de aplicación de productos químicos fertilizantes, la actuación de estos sistemas simbióticos se atenúa ya que tanto su formación como su funcionamiento se afectan negativamente por las dosis llamadas "agronómicas" de tales productos. Esta situación tiene por tanto repercusiones ecológicas dignas de considerar. Obviamente también se derivan de ello consecuencias económicas. En este sentido hay que recordar que no más del 30% del N ni del 25% del P, añadidos como fertilizantes, son utilizados por las plantas durante el año de su aplicación, pero este abonado puede afectar la potencialidad de los microsmbiontes. Es lógico que, por todo lo que antecede, hay que tener en cuenta el potencial natural de los suelos para formar tales simbiosis, y cuando sea necesario, y factible, aplicar la biotecnología adecuada para mejorarlo.

Unas plantas de sumo interés en relación a los aspectos que se comentan son las leguminosas, por su capacidad para formar simultáneamente ambos tipos de simbiosis. Como consecuencia de ello, y, en virtud de su capacidad de fijar  $N_2$  en simbiosis con **Rhizobium**, son prácticamente independientes de la aplicación de N. La capacidad de formar micorrizas resulta de un interés especial, ya que de un lado, el proceso de FBN es muy exigente en energía y por tanto en fosfato (para regenerar ATP) y de otro, el sistema radical de las leguminosas es, en general, morfológica y geoméricamente poco hábil para la búsqueda de fosfato en el suelo. La micorrización, en cuanto que mejora considerablemente tal capacidad, resulta crucial en la nutrición de estas plantas. Adicionalmente hay que resaltar el interés de las leguminosas en nutrición animal y humana así como en colonización de habitats deteriorados o precarios en fertilidad. El impacto de estas plantas en el ecosistema está fuera de duda.

En otro orden de cosas, complementario con el anterior, hay que considerar que, cuando se pretende optimizar el potencial de las leguminosas para fijar  $N_2$  en diferentes condiciones, así como evaluar el efecto negativo o positivo que puedan tener en el proceso factores o situaciones de diversa índole, es preciso disponer de una

metodología que permita distinguir la contribución real de la FBN, de la del suelo y de la de un fertilizante. Hoy se acepta que el único método directo que permite esa evaluación es el que usa trazadores isotópicos, concretamente el más empleado es el que aplica un fertilizante nitrogenado marcado con  $N^{15}$ , que se adiciona en dosis bajas al cultivo en cuestión para que no inhiba la fijación. Esta metodología permite obviamente cuantificar el efecto de cualquier tratamiento, factor o situación, sobre el proceso de FBN.

De acuerdo con lo que antecede se propone realizar una investigación con los siguientes objetivos concretos:

A) Aplicar la técnica de la dilución isotópica ( $N^{15}$ ) para:

1) Determinar el papel de las micorrizas en la nutrición nitrogenada de leguminosas y distinguir el posible efecto ejercido sobre la FBN del ejercicio sobre la captación de N del suelo.

2) Estudiar el efecto de fertilizantes químicos (N, P) sobre la FBN en sistemas **Rhizobium**-leguminosa-micorriza.

3) Estimar el papel de las micorrizas en la Transferencia de N en comunidades mixtas leguminosas (+ **Rhizobium**)-gramínea, así como el propio efecto del cultivo mixto en el proceso de FBN.

4) Cuantificar la influencia de diversas situaciones de estrés (hídrico, toxicidad al Zn, salinidad) sobre la FBN en sistemas **Rhizobium**-leguminosa en presencia y ausencia de micorrizas.

B) Determinar el efecto de los tratamientos, ó situaciones, referidos en 2), 3) y 4) sobre la formación de las micorrizas.

## II. INTRODUCCION

### 1. Micorrizas

#### 1.1. Conceptos generales

Entre los diversos tipos de relaciones o interacciones más comunmente desarrolladas por los componentes vivos del ecosistema destacan por su importancia ecológica las del tipo simbiótico. Cuando en estas asociaciones las partes implicadas derivan beneficio mutuo la simbiosis recibe el nombre de mutualística que, logicamente se desarrollan mediante interacciones biotróficas. En muchos casos implican la asociación entre organismos autótrofos y heterótrofos, entre los cuales se situa uno de los tipos de simbiosis más extendidas en el ecosistema cual es la formada entre ciertos hongos del suelo y las raices de plantas superiores. Como es ampliamente conocido tal asociación se conoce con el nombre de micorriza. Dentro de estas, las del tipo llamado vesículo-arbuscular, MVA, son las más abundantes en la naturaleza pués la forman más del 90% de las plantas habiendose demostrado que tienen una gran influencia en ecología y

nutrición vegetal. Los hongos responsables de tal asociación son miembros de la familia **Endogonaceae**, de las **Endogonales**, pertenecientes a la clase Zygomycetes. Según el reciente trabajo de revisión de Walker (1987) existen 6 géneros dentro de dicha familia: **Acaulospora**, **Entrophospora**, **Gigaspora**, **Glomus**, **Sclerocytis** y **Scutellospora**. Todos ellos poseen especies capaces de formar micorrizas VA con la mayor parte de plantas angiospermas, algunas gimnospermas y también con pteridofitas y briofitas. El presente estudio se va a centrar en este tipo de micorrizas vesículo-arbusculares (MVA), ya que son las que forman las leguminosas objeto del mismo.

El hongo formador de MVA, en adelante hongo ó endofito VA (ó MVA) es componente común de la microbiota del suelo y se encuentra como propágulo bajo diferentes formas en las que puede sobrevivir incluso en condiciones ambientales adversas. Las principales fuentes de inóculo en el suelo son: esporas, raíces micorrizadas y micelio procedentes del desarrollo de cualquiera de las dos formas antes citadas.

La condición de simbiote obligado de los hongos involucrados en este tipo de asociación ha motivado que el conocimiento acerca de su biología sea aún bastante limitado. No obstante, se sabe que las esporas poseen la información genética y la maquinaria biosintética esencial para garantizar la germinación (MacDonald y Lewis, 1978; Hepper, 1979). El uso de compuestos marcados confirma la capacidad del hongo para utilizar sustancias solubles, la existencia del ciclo de Krebs operativo, la iniciación de la glucogenesis y las rutas de la biosíntesis de aminoácidos (Beilby y Kidby, 1982). Por lo dicho anteriormente se explica que, incluso en ausencia de compuestos minerales y/o orgánicos se consiga prácticamente un 100% de germinación en condiciones axénicas (Azcón-Aguilar et al., 1986; Siqueira, 1987); o sea, que no es requerida la presencia del hospedador vegetal para la verificación del proceso de germinación. Este ocurre, por tanto, a expensas de las reservas que almacena la

espora, aunque la subsiguiente fase de desarrollo del micelio si que es dependiente de un aporte exógeno (Siqueira, 1987). No obstante, ninguno de los múltiples medios de cultivo ensayados ha permitido el desarrollo extensivo de esta fase en ausencia de planta huésped de forma que el hongo complete su ciclo de vida en cultivo axénico. En contraste con tal evidencia destaca el hecho de un posible crecimiento saprofito de endofitos VA en suelo (Warner y Mosse, 1982; Azcón-Aguilar y Barea, 1985). La germinación es sensible a algunos elementos traza (Hepper y Smith, 1976).

#### 1.2. Formación de la micorriza: Proceso de colonización biotrófica de las raíces.

Aunque en agar-agua las esporas geminan casi con un 100% de rendimiento, se ha demostrado la existencia de fungistasis en el suelo, lo que hace que sólo germine una fracción de las esporas, el 50%, como valor medio, de las esporas inoculadas según Powell (1976) y Sanders y Sheikh (1983). En algunos casos se ha demostrado la existencia de periodos de dormencia, antes de germinar (Tommerup, 1983). El proceso que desencadena la germinación de esporas no se conoce claramente. Comienza a visualizarse cuando se producen uno o varios tubos de germinación que desarrollan un micelio que se extiende radialmente y coloniza una esfera de suelo alrededor de la espora (Sanders y Skeikh, 1983). Se ha observado que el micelio originado a partir de la germinación de la espora crece en el suelo sin ser atraído ni dirigido hacia la raíz, (Mosse y Hepper, 1975; Powell, 1976). No obstante cuando, erráticamente, un hifa conecta con la zona rizosférica, es estimulada por la presencia de exudados radicales que, como es conocido, afectan el desarrollo microbiano (Barea, 1986), y empieza a ramificarse, pudiendo posteriormente asociarse con la raíz e iniciar el proceso de colonización. Después del contacto tiene lugar la formación de un "apresorio". La penetración puede realizarse a través o entre células epidérmicas de

la raíz o de los pelos radicales. Normalmente se micorrizan las raíces laterales jóvenes siendo lugares preferenciales las regiones situadas entre 0.5 y 1.5 a partir del extremo de la raíz (Hayman, 1983). Se supone que la penetración pueda ser de tipo mecánico ya que aún no se ha identificado ninguna enzima involucrada en el mecanismo de penetración aunque la posibilidad de que ocurra una actividad enzimática no ha quedado descartada.

Se han aportado algunos argumentos indirectos, que apoyan la no implicación de actividades enzimáticas líticas. Por ejemplo; la infección nunca se realiza cuando la raíz está erosionada por heridas o por que va a tener lugar la formación de raíces secundarias (Hayman, 1983). Además se ha descrito que las células con elevado contenido en  $Ca^{++}$ , que, como se sabe, incrementa la rigidez de la pared, son más susceptibles de ser infectadas que las que poseen un contenido deficiente en este elemento (Hepper y O'Shea, 1984). Una vez que alguna célula radical es colonizada, la raíz se vuelve más susceptible a infecciones posteriores, pero no se sabe si esto es consecuencia de un incremento en el vigor fisiológico del hongo o porque se ha iniciado una actividad enzimática que comienza a generalizarse.

Hace tiempo, Mosse (1962) sugirió que los microorganismos del suelo podrían estar implicados en la fase de penetración, lo cual podría estar en relación con el hecho de la producción de compuestos capaces de incrementar la permeabilidad celular (exudación) y modificar su plasticidad por microorganismos rizosféricos (Bowen, 1980). Otra posibilidad sería que la estimulación se basará en la capacidad de producción de aminoácidos, fitohormonas y vitaminas por los microorganismos que pueden estimular al hongo VA, lo que beneficiaría su potencial de colonización (Azcón et al., 1978; Azcón-Aguilar y Barea, 1985).

La planta hospedadora, obviamente, también condiciona el desarrollo de los hongos VA (Daniels-Hetrick y Bloom, 1986; Ocampo et al., 1986). La resistencia de determinadas especies vegetales (en

crucíferas y quenopodiáceas, fundamentalmente) para formar micorrizas VA es una expresión "al máximo" de dicha aseveración. Hasta ahora no se ha evidenciado ningún efecto fungitóxico en las especies vegetales llamadas "no hospedadoras" (Ocampo et al., 1980). Tampoco la cantidad ni la composición de los exudados radicales en plantas no hospedadoras, en los, teóricos, primeros estadios de la micorrización parecen ser responsables de la incompatibilidad planta-hongo (Azcón y Ocampo, 1984; Schwab et al., 1984). Sin embargo, la concentración de exudados y el ritmo de exudación en el espacio intercelular dentro de la corteza radical, es baja en plantas "no hospedadoras", "debilmente hospedadora" o adicionadas de cantidades elevadas de fosfato; ello podría explicar el hecho de que no prospere la micorrización en estas plantas (Schwab et al., 1983).

Para continuar con otros estadios del proceso de formación de las estructuras características de una micorriza, hay que decir, en primer lugar, que una micorriza funcional, está formada por dos fases: una que se desarrolla dentro de la raíz y está constituida por micelio inter e intracelular, vesículas y arbuscúlos, y otra que ocurre fuera del huésped y está constituida por el micelio extrarradical y las "células auxiliares" que sobre él se forman. Ambas fases se desarrollan casi simultáneamente (Bonfante-Fasolo, 1984).

#### a) Fase intrarradical

La colonización de una raíz por un hongo compatible comienza por la penetración de una hifa, de acuerdo con uno de los tres modelos propuestos (Bonfante-Fasolo, 1984): i) penetración celular directa en la pared de células epidérmicas, siempre rodeada del plasmalema de las células hospedadoras; ii) la hifa que se originó a partir del apresorio, atraviesa intercelularmente unas capas de células externas, y en la 3ª ó 4ª capa de células intactas penetra intracelularmente y forma unos enrollamientos característicos,

rodeados por el plasmalema del huésped que se invagina alrededor de la hifa; iii) colonización de la epidermis, sin penetración celular inicial, avanzando siempre a través de espacios intercelulares.

En cualquier caso el micelio invasor alcanza la zona central del cortex donde se extiende longitudinalmente por los espacios intercelulares. Por ramificación de este micelio se alcanza la zona más interna del cortex donde el hongo penetra en el interior de la célula originándose así las estructuras más características y funcionalmente más importantes de este tipo de simbiosis: los arbusculos. Esta denominación alude al aspecto de la estructura formada por las divisiones dicotómicas repetidas del hongo en la célula hospedadora. La hifa queda totalmente envuelta por el plasmalema de la célula vegetal penetrada, que se va plegando rodeando cada rama del arbusculo. En esta estructura es donde se realiza el intercambio nutritivo entre la planta y hongo asociados.

Otras formaciones características de este tipo de micorrizas son las denominadas vesículas, estructuras de forma globosa con un contenido lipídico, formadas en posiciones inter e intracelulares, intercalares o terminales. Su función no se conoce totalmente aunque se le acepta misión de reserva en base a su contenido lipídico. La cantidad de vesículas formadas caracteriza a determinados hongos. Así por ejemplo, son ausentes en el género *Gigaspora* y abundantes en *Glomus fasciculatum*.

Algunos detalles de la organización citológica en el micelio son la existencia de numerosas mitocondrias, pequeños núcleos y grandes vacuolas que contienen gránulos de polifosfato, gotas lipídicas y glucógeno. El diámetro de las hifas suele ser de unas 2-6  $\mu$ m y su pared, de textura fibrilar, está compuesta normalmente por una sola capa de material polisacárido y proteína. Sin embargo, para formar el arbusculo la pared del hongo sufre serias modificaciones: adelgaza y la textura fibrilar pasa a amorfa (Bonfante-Fasolo y Gianinazzi-Pearson, 1986), con lo que decrece la rigidez e incrementa la plasticidad. La pared del hongo es cada vez más delgada, a medida que

las ramas son más finas, y llega a desaparecer prácticamente en las últimas divisiones de las hifas. Entre los plasmalemas de la célula huésped y la del hongo en el arbusculo existe una matriz interfacial que es continua con el periplasma del hospedador. Esta matriz contiene fibras de polisacáridos y vesículas membranosas (Dexheimer et al., 1979) y su papel es clave en el intercambio de moléculas entre los simbioses en el arbusculo donde ocurre la transferencia activa de metabolitos. Este material es producido por el plasmalema de la célula hospedadora, destinado a la formación de la pared primaria de esa célula, sin embargo, la presencia del hongo parece afectar la organización de tales fibrillas evitando que se forme la pared. De acuerdo con ello se fortalece la idea de Harley y Smith (1983) en el sentido de que la colonización del hongo ocurre preferentemente en los lugares en donde se está sintetizando la pared. Además de estas modificaciones, las células que contienen arbusculos incrementan su protoplasma, los núcleos (poliploides, a veces) y nucleolos aumentan de tamaño, el aparato de Golgi se muestra muy activo y desaparecen los gránulos de almidón, debido posiblemente a su utilización por el hongo. El arbusculo maduro llega a ocupar un 40-50% de la célula hospedadora (Bonfante-Fasolo, 1984). La hifa arbuscular posee mitocondrias, lípidos, glucógeno, son polinucleadas y albergan abundantes vacuolas, que contienen gránulos de polifosfato (Bonfante-Fasolo, 1984).

La vida media de los arbusculos está comprendida entre los 2 y 15 días (Cox y Tinker, 1976). En la degeneración del arbusculo su pared y membrana se van colapsando y los restos van siendo cubiertos por material de polimerización de las fibrillas de polisacárido que ya vuelven a organizarse para formar la pared celular. Cuando termina el proceso de degeneración, la célula hospedadora vuelve al estado normal, e incluso puede ser invadida posteriormente y formar otro arbusculo (Hayman, 1983).

### b) Fase extrarradical

Después de iniciada la colonización intrarradical y mientras esta se desarrolla, comienza la fase de crecimiento extensivo del hongo fuera de la raíz. Este micelio genera nuevas colonizaciones entrando el proceso en una fase cíclica y progresiva. El micelio externo es una red tridimensional de hifas de naturaleza dimórfica ya que existen unas de 20-30  $\mu$ m de diámetro y otras, más efímeras, de 2-7  $\mu$ m especializadas en captar iones del suelo. En las de tamaño superior se forman las "células auxiliares" y las esporas. Estas hifas poseen un citoplasma muy vacuolado, con núcleo, mitocondrias y otras organelas (Bonfante-Fasolo, 1984). El retículo endoplasmático posee muchos ribosomas. Las hifas delgadas poseen estructura fibrilar y son no tabicadas. La pared de las esporas posee un 30% de quitina (Bonfante-Fasolo y Gianinazzi-Pearson, 1986; Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988). Una característica clave en la operatividad de la micorriza es que 1 cm de raíz puede llegar a formar varios metros de hifas (Tisdall y Oades, 1979; Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988). Estas pueden extenderse a distancias de varios cm (Rhodes y Gerdemann, 1975).

La dinámica del proceso de colonización VA usualmente sigue una curva de tipo sigmoidal. En ella la fase Lag, de lenta progresión, incluye el proceso preinfectivo que depende de la densidad de propágulos en el suelo, crecimiento radical etc. (Harley y Smith, 1983). Posteriormente, la fase de desarrollo exponencial, con un rápido incremento de la colonización paralelo al crecimiento radical. El subsiguiente estado es el de estabilización del nivel de micorrización. Tanto los factores ambientales como la planta y el hongo afectan el desarrollo de cada una de estas fases. Se han propuesto diversos modelos matemáticos para definir el desarrollo de la simbiosis. En base a ellos, se ha calculado que la extensión longitudinal de la infección primaria es del orden de 0.4 m día<sup>-1</sup> (Sanders y Sheikh, 1983) ó 1 m día<sup>-1</sup> (Smith y Walker, 1981). El

modelo propuesto por Sanders y Sheikh permite determinar la longitud de las unidades de infección, la longitud media de raíz infectada por cada punto de entrada y la velocidad relativa de multiplicación del proceso. Recientemente, Buwalda et al. (1984) y Sanders (1986) han aportado nuevos y más complicados modelos. Estos pueden predecir el desarrollo VA en cada raíz y en la totalidad del sistema, sin embargo, tienen una utilidad relativa en cuanto a que muchos factores, tales como incidencia de microorganismos rizosféricos; cambios en los ritmos de exudación, etc. no son contemplados de manera realista.

### 1.3. Fisiología de las micorrizas

La respuesta de la planta a la micorriza que más frecuentemente se ha descrito, es la estimulación del crecimiento y la causa que universalmente se acepta como principal responsable de tal "efecto micorriza", es el incremento de la concentración y/o contenido en P de los tejidos vegetales. También se han encontrado incrementos en el contenido y/o concentración de otros nutrientes en la planta. En este sentido hay que hacer constar que el concepto fundamental para entender el papel de la micorriza en nutrición vegetal se basa en la problemática derivada de la dificultad de la planta para captar aquellos nutrientes que están en baja concentración en la solución edáfica y que difunden lentamente hacia la rizosfera (Chapin, 1980; Clarkson, 1985). Así mismo, la micorrización puede ocasionar otros efectos estimuladores basados en mecanismos no mediados por el aporte directo de nutrientes.

Seguidamente se realiza un resumen de las conclusiones más revelantes concernientes a la fisiología de las micorrizas con especial énfasis en lo relativo a aspectos nutricionales. Información detallada sobre esta materia puede obtenerse en los trabajos de revisión especializados de Harley y Smith (1983); Cooper (1984); Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi (1986); Smith y Gianinazzi-Pearson

(1988).

Las micorrizas no solo incrementan la biomasa vegetal sino que también influyen en la proporción en la cual ésta se distribuye entre parte aérea y raíz. La estimulación de la captación de un nutriente limitante del crecimiento y la subsiguiente translocación de éste a la parte aérea ocasiona que se transfieran a la raíz relativamente menos productos de la fotosíntesis, ya que una proporción relativamente mayor del fotosintetizado, queda retenida en la parte aérea para utilizar los nutrientes minerales que, por acción de la micorriza, ya no están en situación limitante. Esto conduce a un incremento en la producción de materia verde. Como consecuencia, la relación entre el "peso de parte aérea/peso raíz" es más alta en plantas micorrizadas. Este hecho reviste un interés apreciable desde el punto de vista bioenergético, ya que representa un ahorro de consumo relativo de fotosintato en la parte heterotrófica (consumidora) del sistema, en beneficio de un incremento de biomasa autotrófica (Smith, 1980).

En lo referente al papel concreto de las micorrizas en la captación de nutrientes, temática recientemente revisada (Barea y González, 1987), se comienza por analizar resumidamente los efectos relacionados con la adquisición por la planta de iones de fosfato.

En el llamado proceso de "transporte de fosfato en MVA", que tiene lugar desde la solución del suelo a la planta se distinguen tres fases: a) captación de fosfato de la solución edáfica por el micelio externo; b) translocación del fosfato desde el micelio externo al interno y c) transferencia de fosfato desde el hongo a las células de la planta hospedadora. En una serie de ensayos, ya clásicos, que utilizan  $P^{32}$ , se demostró que las micorrizas utilizan la solución del suelo como fuente de fosfato, al igual que las propias raíces (ver revisión de Hayman, 1983). Esta conclusión sigue aceptándose y de forma cuantitativa es absolutamente real; sin embargo, los trabajos de Bolan et al. (1984) y (1987) sugieren que existen unas fracciones de fosfato en los suelos que son "accesibles"



a  $P^{32}$  y a hifas de las micorrizas, pero no a raíces no colonizadas por el hongo. Este hecho, demostrado por los citados autores, sólo tendría una influencia cualitativa en el proceso de captación de fosfato por micorrizas, por lo que la conclusión general es la arriba indicada.

Es conocido que los iones fosfato están en la solución del suelo en concentración muy baja. Aproximadamente esta concentración es de 0.03 mg P/L en la solución de un suelo "normal", lo que equivale a  $10^{-6}$  M. Adicionalmente, influye considerablemente el hecho de que estos iones se desplazan lentamente, mediante difusión, ya que tienden a ser retenidos a lo largo de su recorrido hacia la rizosfera, bien por adsorción a diversos tipos de superficies (minerales de arcilla y otros coloides) o bien por precipitación con Ca, Fe ó Al, según el pH del suelo. Una vez que el fosfato llega a la rizosfera, las raíces lo captan a una velocidad superior a la que el ión se desplaza hacia dicha zona; por ello, se forman unas zonas de deficiencias en P alrededor de las raíces que suelen tener 1 y 2 mm de anchura, como se ha demostrado con  $P^{32}$ . La dinámica de formación y funcionalidad de esta zona de deficiencia ha sido discutida recientemente (Kraus et al., 1987). Las hifas de la micorriza son capaces, sin embargo, de crecer y ramificarse más allá de dicha zona de deficiencia, llegando hasta distancias de incluso varios cm de la raíz. Por tanto, las micorrizas actúan en gran medida por un mecanismo meramente físico, proporcionando a la raíz un incremento en el número de sitios de captación de P, que, a su vez, están mejor distribuidos, por lo que exploran un volumen de suelo bastante superior al que una raíz, por sí misma, puede utilizar. Adicionalmente, el ión fosfato que ha sido captado por una hifa queda protegido de forma que no ocurre la re-fijación por los componentes del suelo. De otro lado, se han apuntado otros mecanismos de tipo fisiológico en el funcionamiento de las MVA (Tinker, 1980; Harley y Smith, 1983; Barea et al., 1984).

Entre estos cabe destacar los basados en una bajada en el

"umbral" mínimo de captación o en una mayor afinidad de la hifa por fosfato (Km más baja, en la reacción). Sin embargo, no se han podido generalizar estos mecanismos, ya que las informaciones son a veces contradictorias.

Una vez dentro de la hifa, el P se transloca hacia las estructuras intrarradicales del hongo agregado en forma de gránulos de polifosfato, que son impulsados a través del lumen de las hifas por corrientes citoplasmáticas hacia los arbusculos. El P circula hacia de la raíz unas 1.000 veces más rápido por las hifas externas que por difusión a través de la solución del suelo. Se sabe que el sitio prioritario de transferencia de fosfato desde el hongo a las células radicales es el arbusculo, mediante un proceso que se basa en un mecanismo activo a través de membranas vivas del hongo y planta (ver Harley y Smith, 1983; Barea et al., 1984).

La formación de gránulos de polifosfato y su degradación en el arbusculo, a donde llegaron en el interior de vacuolas arrastradas por las corrientes citoplasmáticas, está regida por unas actividades enzimáticas específicas de MVA (Capacio y Callow, 1982). El proceso, globalmente, tiene una función autoregulatora de la actividad de la micorriza ya que el almacenamiento de un exceso de fosfato en forma de gránulos, evita interferencias con el metabolismo de la célula vegetal. Cuando esta comienza a ser deficitaria en el nutriente, funcionan los mecanismos de degradación del gránulo, y se libera ortofosfato (Gianinazzi-Pearson, 1986).

Diversos trabajos experimentales o de revisión (Marx et al., 1982; Harley y Smith, 1983; Gianinazzi-Pearson et al., 1984; Clarkson, 1985; Dexheimer et al., 1986; Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1986) discuten los aspectos enzimáticos específicos del transporte de fosfato en micorrizas. Así mismo estos estudios describen el funcionamiento de ATP-asas de membrana asociadas a membrana de la célula hospedadora en el arbusculo, hecho que es fundamental para explicar el proceso activo de transferencia de fosfato a la planta.

Con respecto a la absorción de otros nutrientes, distintos del P, por micorrizas, se conoce que cuando se trata de nutrientes que circulan con facilidad hacia la rizosfera, como es el caso del nitrato o sulfato, para los que no se suelen crear zonas de deficiencia alrededor de las raíces, la contribución extra de las hifas de la micorriza a la captación de estos nutrientes es bastante limitada. Sin embargo, es de esperar una participación de la simbiosis en el aporte a la planta de iones que, como el fosfato, difunde más lentamente en la solución del suelo. Tal es el caso del amonio, cuya captación por las hifas de la micorriza es objeto de estudios, utilizando sales de amonio marcadas con  $N^{15}$  (Ames et al., 1983). De hecho se ha comprobado que el hongo posee el equipamiento enzimático adecuado para metabolizar amonio (Smith et al., 1985). Así mismo, en un ensayo en condiciones naturales, con apoyo de  $N^{15}$  (Barea et al., 1987) se sugirió que la inoculación de micorrizas incrementara la fracción de N en planta procedente del suelo. Con respecto a los micronutrientes, se ha descrito el efecto de la micorriza en la estimulación de la captación de algunos de ellos, aunque los resultados son a veces contradictorios. En el caso del Zn y Cu, si se poseen evidencias más consistentes de un incremento de la captación de estos por MVA (Tinker y Gildon, 1983; Cooper, 1984).

El papel de las micorrizas en la captación de agua es un tema bastante debatido (Peña y Sánchez-Díaz, 1983; Cooper, 1984). En líneas generales se puede decir que las MVA incrementan la resistencia de las plantas a la sequía. Aunque se está investigando la participación de diversos mecanismos de tipo fisiológico en el contexto de las relaciones hídricas en micorrizas, parece ser que el simple hecho de que las plantas continúen captando fosfato en condiciones en las cuales la movilidad de este ión es aún más problemática (sequía), puede ser una de las razones más influyentes para explicar el papel de las micorrizas aumentando la resistencia de las plantas en suelos en condiciones de potencial de agua bajo.

Se han sugerido varios mecanismos por los que las MVA pueden

afectar el crecimiento de la planta por acción no directa sobre la nutrición de ésta. Así, tenemos: a) aquellos debidos a la producción de fitohormonas; b) los inducidos mediante una acción de mejora de estructura del suelo a través de la formación y estabilización de agregados por las hifas del hongo; c) los ejercidos a través de una protección de la planta frente al ataque de patógenos (Harley y Smith, 1983; Cooper, 1984).

Aunque el hongo consume fotosintetizado compensa a la planta, no sólo por el aporte de nutrientes minerales, sino también estimulando la fotosíntesis (Cooper, 1984). Estos aspectos, de sumo interés, desde el punto de vista bioenergético, se discuten posteriormente en el caso de la doble simbiosis de microorganismos con leguminosas.

#### 1.4. Factores que afectan la formación de micorrizas

Dado que los propágulos de las MVA están virtualmente presentes en todos los suelos, se puede decir que la formación de la simbiosis está teóricamente asegurada. No obstante, las propiedades de "infectividad" de los hongos presentes y de "efectividad" en la simbiosis resultante van a ser moduladas considerablemente por varios factores: a) el grado de dependencia de la planta a las micorrizas; b) la "especificidad" de los hongos presentes para la planta en cuestión; c) la efectividad de dichos hongos, y d) las condiciones físico-químicas y biológicas del medio (Azcón-Aguilar et al., 1984).

Se entiende como dependencia de una planta a la micorrizas el hecho de que precisen de la condición de estar micorrizadas para desarrollarse adecuadamente. Las distintas especies de plantas muestran un amplio espectro de situaciones en este sentido que van desde la independencia total, como en crucíferas y quenopodiáceas, que no suelen formar micorrizas; hasta una dependencia absoluta, en el caso de ciertas plantas que son incapaces de desarrollarse, incluso en suelos de elevada fertilidad, si no están micorrizadas; pasando por una extensa gama de tipos intermedios. Considerada en el

sentido estricto del término, no hay especificidad entre especies de hongos VA y plantas superiores. Teóricamente, cualquier hongo VA puede colonizar a cualquier planta susceptible; sin embargo, si que existen grandes diferencias entre los distintos endofitos tanto en la morfología de la infección y el nivel de micorrización que producen, como en la efectividad de la MVA formada en una planta determinada. Por ello quizá fuera más lógico hablar de "compatibilidad" en las distintas combinaciones de una planta con especies de hongos VA y características del suelo. La intervención de los genotipos de los organismos implicados y la expresión fenotípica de los mismos, regulada por las condiciones ambientales, es considerada por Gianinazzi-Pearson (1983) que propone así el concepto de "compatibilidad funcional". Esta compatibilidad se va a expresar por tanto a nivel de efectos, de forma que, cuando se inocula una determinada planta con diferentes hongos VA, la respuesta a cada uno de ellos, en términos cuantitativos, suele ser distinta, lo cual permite seleccionar aquellos más favorables o compatibles para el sistema suelo-planta en cuestión (Abbott y Robson, 1984; El-Atrash et al., 1988).

Con respecto a la efectividad del hongo VA se puede decir que las características que definen la eficacia de un hongo VA son aquellas relacionadas con la estimulación de la captación de nutrientes y con la persistencia de sus efectos, es decir, la capacidad de formar un micelio extenso y bien distribuido en el suelo, así como la de producir colonizaciones extensivas en las nuevas raíces que se vayan formando. La eficacia para absorber fosfato de la solución del suelo y el tiempo que las hifas permanecen efectivas en el transporte de nutrientes hacia la planta son criterios fundamentales. Es clave considerar también la mayor o menor capacidad de intercambio nutritivo con la planta, lo cual operaría mediante una abundante formación de arbusculos, así como la mínima alteración del metabolismo del hospedador, lo que implica también un bajo consumo por el hongo de los productos carbonados de la planta.

Tanto la fertilidad natural de un suelo como los tratamientos con fertilizantes y otras prácticas agronómicas, se sabe que afectan la formación y el desarrollo de las MVA (Hayman, 1982; Mosse et al., 1981). La información disponible al respecto indica que la formación de MVA suele afectarse negativamente por la aplicación excesiva de fertilizantes químicos fosforados y nitrogenados. Esta circunstancia, aunque generalizable, no es suficiente para que se pueda predecir la respuesta de los propágulos de MVA existentes en el suelo a una adición puntual de fertilizantes. Ello se debe a que la aplicación reiterada de tales productos, o sea la llamada "historia de la fertilización de un suelo", condiciona la selección de hongos adaptados a las condiciones, capaces de formar la micorriza en suelos fértiles o fertilizados. El efecto del fosfato asimilable, ya sea propio o adicionado, de un suelo sobre la formación de la micorriza ha sido un tema muy estudiado dado su interés práctico. Se sabe que la adición de cantidades bajas de P es compatible, e incluso complementaria (Sainz y Arines, 1988b), con las MVA en la estimulación del crecimiento de la planta, pero al incrementar la dosis se comienza a interferir la formación de la simbiosis, llegándose, incluso, a la inhibición de la infección. La conclusión general es que es el nivel de fosfato en la planta, más que el del suelo, el que controla el establecimiento y función de las micorrizas (ver Azcón-Aguilar et al., 1984). Los fertilizantes nitrogenados también afectan la formación y efectos de las micorrizas (Azcón et al., 1982). Finalmente, hay que hacer notar que las diferentes especies de hongos VA muestran grados de resistencia a la aplicación de fertilizantes y productos fitosanitarios, lo cual tiene consecuencias de interés práctico en relación con la selección de hongos VA "específicos" para una planta en un suelo que ha recibido dichos aportes. Existe una amplia literatura sobre la interacción de hongos formadores de micorrizas y otros microorganismos del suelo (Azcón et al., 1976; Barea y Azcón-Aguilar, 1982a; Bagyaraj, 1984; Graham, 1988; Azcón, 1987). Quizás el aspecto más relevante sea el de

la interacción con **Rhizobium** que va a merecer un estudio detallado e independiente en las páginas que siguen.

#### 1.5. Posibilidades de aplicación práctica de las MVA

Un factor crítico en el estudio de las MVA desde el punto de vista ecofisiológico es conocer cual es el potencial real en micorrizas de un suelo. Si este es suficiente, el objetivo entonces será preservarlo, mediante las prácticas agrícolas adecuadas. En caso de que tal potencial natural sea insuficiente, hay que tratar de reforzarlo, y, en ocasiones, de sustituirlo, por medio de la inoculación con micosimbiontes adecuadamente seleccionados (El-Atrash et al., 1988).

Como esquema a seguir, para abordar en la práctica una investigación de este tipo, puede utilizarse el propuesto por Hayman (1984) que considera que los puntos más importantes a tener en cuenta son los siguientes: 1) estudio de los factores que van a determinar la conveniencia de llevar a cabo una inoculación con MVA en una situación determinada; 2) establecimiento de criterios de selección de hongos para ser usados como inoculantes; 3) metodología apropiada para preparación de inóculos y 4) estudio de técnicas de inoculación factibles en la práctica agrícola pertinente.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente sobre los factores que afectan la formación y efecto de las MVA, se puede considerar que son tres los factores primarios implicados: a) el grado de dependencia de la planta a las MVA; b) el nivel de fertilidad del suelo y c) la infectividad y eficacia de las poblaciones naturales de hongos VA.

En primer lugar conviene puntualizar el hecho de la amplia distribución de las MVA o sus propágulos en casi todos los ecosistemas lo que habla de su capacidad de supervivencia en un amplio rango de ambientes, posiblemente motivada por una coevolución con el huésped autótrofo del que depende para su desarrollo. Ello posiblemente conlleva que prevalezcan las especies más adaptadas y no

las más eficaces. La adaptabilidad es una cualidad que poseen las poblaciones naturales pero la eficiencia de las mismas, en casi todos los casos, suele ser superada por endofitos seleccionados. Hass y Krikun (1985) estiman que la eficiencia del inóculo depende del nº de propágulos existentes en el suelo. Estos autores establecen que es necesario un mínimo de 1 propágulo  $\text{ml}^{-1}$  para obtener respuesta pero para que se optimice el efecto, estiman que los endofitos eficientes en un suelo deben superar la proporción de 5 propágulos  $\text{ml}^{-1}$ .

Teniendo en cuenta que en los ambientes naturales, donde existe una población autoctona de endofitos VA, los fenómenos de competencia que se establecen entre la población autoctona y la introducida deben ser considerados (El-Atrash et al., 1988; Sainz y Arines, 1988a). El éxito de la práctica de la inoculación también está, obviamente relacionada con estos aspectos.

Usualmente, para establecer las relaciones existentes entre 2 o más especies o ecotipos de endofitos coexistentes en un medio hay que considerar las siguientes características de las especies involucradas: competitividad, agresividad, especie dominante y capacidad para desarrollarse en ese medio. Willson (1984a) concede también gran importancia al estado fisiológico de los propágulos ya que ello condiciona su capacidad competitiva. Este autor señala que cuando las razas indígenas son agresivas y abundantes es difícil llegar a introducir otra especie.

Establecer normas acerca de las interacciones entre diferentes tipos de endofitos VA es algo aventurado y complejo. La dinámica de las poblaciones depende de factores tales como tipo de suelo, vegetación, factores ambientales etc. (Koske, 1981; Jeffries, 1987; El-Atrash et al., 1988). De acuerdo a ellos es modificada la estrategia de infección que es característica de cada especie (Willson, 1984b). La existencia de ciertas afinidades hongo-hospedador (Mosse, 1972) también es condicionante del equilibrio de la interacción. Algunos hongos son más efectivos en suelo ácido mientras que otros, *G. mosseae* por ejemplo consiguen mayor



establecimiento y eficacia en suelos neutros y alcalinos (Hayman, 1983). Por otro lado, y a pesar de la inespecificidad hongo-hospedador, el grado de compatibilidad entre ellos depende de las especies implicadas y ello afecta a la extensión del micelio dentro y fuera de la raíz (Gianinazzi-Pearson, 1984). Es por ello que es difícil extraer conclusiones. Así Powell (1979) y El-Atrash et al. (1988) encuentran interacción positiva entre especies indígenas e introducidas; Koske (1981) recomienda la inoculación de grupos seleccionados basándose en el hecho de que las poblaciones indígenas suelen ser malos competidores frente a los introducidos; Abbott y Robson (1984) sugieren que el hongo más competitivo coloniza antes la raíz y que la competitividad depende de la cantidad y colocación del inóculo.

En muchos casos resulta difícil distinguir las colonizaciones producidas por los distintos endofitos, por lo que se hace complicado asociar efectos a hongos. El trabajo de López-Aguillón y Mosse (1987), que utiliza 3 endofitos que producen colonizaciones distinguibles o el de Arines et al. (1988) si que permitieron a sus autores extraer conclusiones claras de las interacciones entre hongos "establecidos" e "introducidos", tanto a nivel de infectividad como de efectividad. Hepper et al., (1986) y (1987) mediante caracterización de bandas de isoenzimas específicas de cada especie de hongo VA, sugieren la posibilidad de identificación de las especies colonizadoras y la dinámica de colonización de cada una de ellas.

En vista de la complejidad de las interacciones, como capítulo previo a la inoculación se aconseja la práctica de un ensayo en macetas donde pueda ser evaluada la efectividad de cada grupo para un determinado conjunto suelo-planta (Azcón-Aguilar et al., 1986). En otro orden de cosas (Hayman, 1983) sugiere la inoculación de un combinado de razas para asegurar el éxito de la inoculación en campo pero cuando se trata de cultivos, como ocurre en los cítricos, más sensibles a un determinado tipo de esporas (Menge, 1983; Roldán-

Fajardo, 1985; Roldán-Fajardo y Barea, 1986 ) el inóculo procedente de ella es el indicado. La selección de razas en base a la tolerancia a altos niveles de fertilidad es aconsejada por Shubert y Hayman (1986).

A pesar de que la inoculación de micorrizas VA, por la dificultad que entraña la obtención del inóculo, no es una práctica habitual a nivel agrícola si se ha efectuado desde hace tiempo obteniéndose resultados muy alentadores (Hayman, 1984; Menge, 1984; Dehne, 1987; Gianinazzi et al., 1988).

## 2. Micorrizas en leguminosas

### 2.1. Significado de la simbiosis **Rhizobium**-leguminosa en el ecosistema (breve resumen)

La contribución cuantitativa mayoritaria de la FBN a la productividad vegetal es la que deriva de la simbiosis **Rhizobium**-leguminosa. La importancia de esta simbiosis está avalada por su incidencia en la producción de alimentos y fibra, su utilización como abonado verde, y en la colonización de suelos con algún tipo de estrés. El proceso de nodulación y sus aspectos ecológicos, fisiológicos y bioquímicos; la operación y regulación del enzima nitrogenasa con todas sus implicaciones genéticas, bioquímicas y fisiológicas han sido objeto de incontables estudios. Así mismo tanto el impacto de la FBN en el ecosistema como las limitaciones de esta han recibido, y siguen recibiendo, la atención de los investigadores como es bien conocido. A modo de ejemplo, por su actualidad e incidencia en ecosistemas mediterráneos se cita la obra de recopilación de Beck y Materon (1988).

Uno de los temas más estudiados en el contexto del impacto de las leguminosas en el ecosistema es el papel de estas plantas en la transferencia de N o el uso del nutriente en cosechas subsiguientes. De todos son conocidos los beneficios de las leguminosas en rotación

de cultivos, en praderas mixtas con gramíneas, en cultivos mixtos ("en calles"). Estos estudios han sido revisados recientemente (Heichel, 1987). Los beneficios pueden ser de tipo inmediato (plantaciones mixtas coexistentes), a medio plazo (siguiente cosecha) o a largo plazo (efecto residual). Todos estos procesos se han cuantificado y en la mencionada revisión se recopilan valores numéricos. De cualquier forma, es de hacer notar que estos estudios se está reconsiderando utilizando una metodología más avanzada como las que usan isótopos estables ( $N^{15}$ ). Posteriormente se discuten estas metodologías y su aplicabilidad a la evaluación del papel de las micorrizas en la transferencia de N o en la recuperación del nutriente en cosechas subsiguientes.

La coexistencia de dos endofitos (hongos VA y **Rhizobium**) en raíces de plantas de las subfamilias Papilionoideae y Mimosoideae, en donde se encuentran todas las "leguminosas" de interés en agricultura (Hayman, 1986) constituye una entidad biológica (una simbiosis tripartita) de sumo interés científico tanto desde el punto de vista básico como aplicado. El hecho se conoce desde antiguo, pues en 1944 Asai demostró que las micorrizas eran elemento importante para el crecimiento de muchas especies de leguminosas. Su ausencia provocaba un limitado desarrollo de los nódulos en suelos de baja fertilidad. Hoy se sabe que las leguminosas herbáceas (objeto del presente estudio) y muchas leñosas, forman micorrizas VA.

## 2.2. Efectos de las MVA sobre FBN mediados por el aporte de P, y otros nutrientes

El incremento de la nodulación observado por Asai en leguminosas micorrizadas fué explicado posteriormente en base a una mejor nutrición fosforada de la planta hospedadora ya que la aplicación de fosfato ejercía una influencia similar respecto a la nodulación y fijación de  $N_2$ .

En efecto, hoy se conoce, con abundante apoyo experimental, que

la micorriza actúa positivamente sobre la simbiosis **Rhizobium**-leguminosa debido al incremento de la efectividad del sistema fijador (El-Atrash y Ocampo, 1985). En una extensa literatura científica recogida en trabajos de revisión recientes (Barea y Azcón-Aguilar, 1983; Hayman, 1986; Barea et al., 1988) se discuten diversos aspectos de la influencia de las micorrizas en la capacidad colonizadora del **Rhizobium** así como en el número y tamaño de los nódulos formados y en la actividad nitrogenasa. Estos efectos parecen ser debidos, en gran parte, a las mejores disponibilidades en fósforo de las plantas micorrizadas. El hecho es crítico ya que concretamente, Mosse et al. (1976), encuentran que la concentración de P en los tejidos de la planta debe ser superior al 0.15% para que se produzca nodulación y que el nódulo usualmente requiere, y posee, 3 veces más fósforo que la raíz que lo soporta. De hecho se sabe que la actividad nitrogenasa depende de un aporte relativamente elevado de P ya que 21 moles de ATP son requeridos para la fijación de 1 mol de N<sub>2</sub>.

Un tema inicialmente discutido fué si el "efecto micorriza" sobre la nodulación y FBN es una mera consecuencia de una acción general sobre el crecimiento y nutrición fosforada de la planta. Aunque algunos autores apoyan que los efectos de la micorriza sobre la nodulación se ejercen a través de la planta, y por tanto, la interacción **Rhizobium**-hongo VA es un caso de "mutualismo indirecto" (Cluett y Boucher, 1983). La conclusión general es que tal efecto indirecto tiene una gran participación pero también se ha demostrado que existe una estimulación "preferencial directa" de la función del nódulo por la micorrización. Así por ejemplo, Smith y Daft (1977) encontraron que las plantas micorrizadas tenían una concentración (%) de N superior que plantas control del mismo peso seco y parecida relación Parte aérea/Raíz. Posteriormente Smith y Bowen (1979) en un ensayo de tipo "time-course" confirman que el efecto de las micorrizas sobre la nodulación y actividad nitrogenasa ocurría antes que los efectos de la misma sobre el crecimiento. Los autores atribuyen el hecho a que los nódulos, debido a su gran demanda de

fosfato y proximidad a las células colonizadas por arbusculos (donde se estaba liberando el nutriente), actuaban como sumidero inmediato del mismo. Otra prueba de la existencia de demanda especial de P por el nódulo, "independiente" de la ejercida a partir de un efecto mediatizado por el aporte general de P a la planta es la que se deduce del trabajo de Asimi et al. (1980). Estos autores aplican dosis crecientes de fosfato a plantas de soja doblemente simbióticas y encuentran que primero se elimina el efecto de las MVA sobre el crecimiento, sin afectar a nodulación ni FBN, y, progresivamente, al ir aumentando la dosis, se va eliminando el efecto micorriza sobre la nodulación, y a dosis más altas el ejercido sobre la actividad nitrogenasa.

Teniendo en cuenta que las leguminosas tienen especiales demandas en otros nutrientes, tales como molibdeno, cobre, zinc etc., (Munns y Mosse, 1980) el aporte de algunos de estos nutrientes por MVA podría estar implicado en el efecto de la micorrizas sobre la FBN. Trabajos recientes (Pacovsky, 1986; Kucey y Jansen, 1987) confirman que en las implicaciones en el beneficio que las MVA proporcionan a las leguminosas están directamente implicado el aporte de Zn y Co.

### 2.3. Interacciones *Rhizobium*-leguminosa-MVA, no mediadas por nutrientes

De acuerdo con la revisión de Barea y Azcón-Aguilar (1983), se han descrito la existencia de interacciones entre ambos tipos de microorganismos y la planta hospedadora común, bien a nivel de estadíos de precolonización (cuando los microorganismos comparten micro-habitats en la rizosfera), ó durante el propio proceso de penetración de la raíz: o bien, en el desarrollo de la simbiosis. En las relaciones fisiológicas entre los tres simbioses, también se conocen efectos no mediados directamente por la participación de los microsimbioses en la nutrición mineral de la planta.

Se sabe que los microorganismos del suelo producen compuestos capaces de incrementar la permeabilidad celular y que ello afecta a los ritmos de exudación (Bowen, 1980), proceso que influye en la propia formación de las micorrizas (Barea, 1986). Concretamente, los polisacáridos exocelulares de **Rhizobium** se sabe que incrementan la exudación radical (Olivares et al., 1977) en la leguminosa específica. Así, la aplicación de esos compuestos extraídos de **R. meliloti** fueron capaces de incrementar el nivel de micorrización de **Medicago sativa** (Azcón-Aguilar et al., 1980).

De otro lado se ha comprobado que extractos libres de células de un cultivo de **Rh. meliloti** que contenía fitohormonas de tipo auxínico giberelínico y citoquinínico incrementó la colonización VA en raíces de **M. sativa** de manera similar a sustancias puras (auxinas, giberelinas y citoquininas) añadidas a la misma concentración que la encontrada para ellas en los extractos citados (Azcón et al., 1978). Como, además, los hongos VA producen también hormonas (Barea y Azcón-Aguilar, 1982b), se ha apuntado un papel de estas sustancias en el desarrollo y función de la simbiosis (Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1986). Todo ello indica un cuadro complejo de mecanismos de regulación de flujos y efectos hormonales en la triple simbiosis. Otros efectos no-nutricionales que intervienen en la fisiología de la triple simbiosis parecen estar implicados en aspectos tales como el proceso de fotosíntesis, distribución de fotosintetizados, relaciones hídricas en la planta, etc. que serán comentados más adelante en esta Introducción. Lo cierto es que la respuesta de la planta a una doble colonización se sabe que es compleja y que depende de lograr los correspondientes equilibrios entre los tres miembros de la simbiosis que, en muchos casos, sólo se explican por la intervención de procesos de regulación funcional que ocurren adicionalmente a los relacionados con el aporte de nutrientes por los microsimbiontes (Pacovsky et al., 1986).

Otras temáticas que han recibido alguna atención son las concernientes a fenómenos de competición por sitios de colonización,

o sobre la naturaleza (localizada o sistémica) de las respuestas de las interacciones entre los microsimbiontes. En estudios preliminares se había comprobado que los endofitos (hongos VA y **Rhizobium**) no compiten por sitios de colonización en la raíz (Barea y Azcón-Aguilar, 1983). Más recientemente, Ames y Bethlenfalvay (1987) han analizado la problemática antes aludida. Las conclusiones de su trabajo indican que existe una influencia localizadas, no-sistémica, y no mediada por P, del hongo en la micorriza sobre la actividad de los nódulos.

#### 2.4. Papel de las micorrizas en la transferencia de N en comunidades mixtas de plantas leguminosas y no-leguminosas

Se conoce que una fracción del Nitrógeno procedente de FBN puede ser compartido con plantas no fijadoras que crecen asociadas a las leguminosas, en un pastizal o en cualquier sistema agroforestal, por ejemplo, (Haynes, 1980).

La posibilidad de que la micorriza de una no-fijadora capte compuestos nitrogenados en la rizosfera de la leguminosa, incluso implicando micelio de una micorriza común de dos plantas (Newman, 1985) se ha apuntado, en cuanto a su implicación en la transferencia de nutrientes entre plantas de distintas especies que conviven en proximidad (Francis et al., 1986). El caso de leguminosas y gramíneas asociadas ha sido considerado, desde este punto de vista. Así, teniendo en cuenta que las leguminosas son más micotróficas que las gramíneas, las micorrizas pueden compensar la ventaja competitiva de las gramíneas para buscar fósforo, acción que ejecutan más hábilmente estas que las leguminosas por diferencias en las características de los respectivos sistemas radicales (Haynes, 1980; Munns y Mosse, 1980).

Este efecto de la micorrización se puso de manifiesto en un ensayo en condiciones controladas (Azcón-Aguilar et al., 1985), pero teniendo en cuenta que, sólo si se utiliza una técnica con trazadores

isotópicos ( $N^{15}$ ) se puede aseverar la existencia de transferencia de N, su cuantificación y el efecto de un tratamiento (por ejemplo, la micorrización), este ensayo necesita una confirmación en ese sentido. Posteriormente se analiza la metodología citada. (Apartado 5 de esta Introducción).

#### 2.5. Coste energético de la asociación *Rhizobium*-leguminosa-micorriza

Teniendo en cuenta que ambos micro-simbiontes derivan compuestos carbonados de la planta hospedadora común se ha prestado una atención considerable a estimar el coste energético de la simbiosis tripartita. Se han llevado a cabo algunos ensayos utilizando  $C^{14}$ ; así Pang y Paul (1980) encontraron un consumo extra de C en micorrizas de **Vicia faba** que equivalía a un 10% del total fotosintetizado. Posteriormente Kucey y Paul (1982) comprobaron que los nódulos de **V. faba** no micorrizada utilizaron 6% del fotosintetizado, mientras que los de plantas micorrizadas consumían 12%. Las micorrizas, en sí, utilizaron el 4% en todos los casos. Sin embargo Kucey y Paul (1982) también encontraron que el ritmo de fijación neto de C, (g C por g de Peso Seco de parte aérea por hora), incrementó en las plantas con ambos microsimbiontes, lo cual "compesaba" el coste adicional de C. En estos ensayos se suministró a las plantas control correspondientes N y/o P para obtener plantas comparables. Posteriormente, Harris et al. (1985), profundizan en estos estudios utilizando soja y un modelo similar (aportando N y/o P) para obtener controles comparables. Los nódulos de plantas no micorrizadas consumían 9% de fotosintetizado y los de la micorrizadas 12%. Las micorrizas consumieron un 17% a las 6 semanas y 8% a las 9. No obstante, los ritmos de fijación de  $^{14}CO_2$  fueron 47% superiores en plantas con los microsimbiontes que en las no inoculadas. Parte del efecto compensatorio se debió, según demuestran los autores, al aumento del área foliar específica en plantas colonizadas por los simbiontes; aunque también influyen otros

factores tales como unos controles "feed-back" que relacionan aporte de fósforo a la parte aérea y metabolismo hidrocarbonado en hoja. Las micorrizas estimularon la FBN incidiendo más sobre el desarrollo del nódulo que sobre la actividad nitrogenasa. Tal como discuten Harris et al. (1985) su trabajo es una confirmación de que muchas interacciones entre microsimbiontes se ejercen a través de la planta.

Recientemente, Doude et al. (1988), utilizando un sistema de raíz compartida ponen de manifiesto que hay un nivel de micorrización por encima del cual no hay incremento en el aporte de P y sí consumo de fotosintetizados.

### 3. Factores que afectan la formación y función (FBN) de la simbiosis tripartita *Rhizobium*-leguminosa-micorriza

Antes de desarrollar esta parte del presente estudio se anticipan dos aspectos de tipo formal; a) se intentará considerar al sistema simbiótico tripartito como un conjunto, bien entendido que en muchos casos los efectos inciden a través de alguno de los componentes y que ciertos factores son beneficiosos para uno o dos de los componentes y perjudiciales para el tercero. b) Se seleccionan un número de factores, de entre los múltiples que afectan a la simbiosis tripartita. Estos serán: i) concentración de P soluble en el suelo; ii) presencia de N combinado en el suelo; iii) potencial hídrico del suelo; iv) salinidad; v) nivel Zn en el suelo y vi) presencia de plantas no-fijadoras, especialmente gramíneas, crecidas en asociación con las leguminosas.

#### 3.1. Efecto de la concentración de P soluble en el suelo

La aplicación de fósforo es un caso típico de efectos contrarios sobre los distintos componentes del sistema simbiótico en cuestión, ya que es un factor favorable a la leguminosa, nodulación y FBN mientras que, a partir de determinadas dosis, inhibe la formación y

función de las MVA. En la literatura científica se anotan muchos ejemplos de curvas de respuesta al fosfato de leguminosas micorrizadas y no micorrizadas (ver Barea y Azcón-Aguilar, 1983). Las respuestas al fosfato del crecimiento, nutrición, nodulación y FBN en plantas micorrizadas muestran una tendencia general, que se puede resumir así: a) la micorrización estimula funciones que determinan los parámetros antes citados a dosis bajas y moderadas de fosfato; b) normalmente, las plantas micorrizadas alcanzan una cosecha "máxima relativa" a mitad de la dosis de fosfato que la que necesitan las no micorrizadas para producir tal efecto (Mosse, 1986). A dosis elevadas de fosfato los niveles de micorrización comienzan a descender, e incluso las plantas llegan a ser inmunes a la colonización. Se pueden producir depresiones del crecimiento, nodulación y FBN por dosis supraóptimas de fosfato, como se comentó anteriormente (Asimi et al., 1980).

Los mecanismos de supresión de la micorrización por fosfato han sido ampliamente discutidos (Cooper, 1984; Barea et al., 1984; Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1986). En resumen, se sabe que es el P en los tejidos de la planta el que regula la micorrización lo cual se justifica por hechos tales como: a) un descenso de la liberación de sustratos, por disminuir la permeabilidad de las membranas de las células radicales, al incrementar la síntesis de fosfolípidos en plantas suficientes en P; b) un descenso en la bajada de carbohidratos a la raíz; ya que el aporte de P controla la "retención" de estos en la parte aérea; c) finalmente, el P regula la actuación de fosfatasas específicas de la micorriza, el nivel de formación, estabilización (almacenados) y degradación, de los gránulos de polifosfato. De esta forma se regula la función, más que la formación, de la micorriza.

Conviene señalar que el efecto de interacción micorrizas x fosfato va a variar con el sistema *Rhizobium*-leguminosa implicado y va a ser modulado por la especie o ecotipo de hongo, tipo de suelo etc. como obviamente, era de esperar.

### 3.2. Efecto del N combinado

Se sabe que el nitrógeno combinado afecta al proceso de nodulación, concretamente el nitrógeno parece ser que actúa a varios niveles: a) afecta al inicio de la infección; b) favorece la senescencia de los nódulos jóvenes y todavía efectivos; c) altera el mecanismo de reconocimiento entre planta hospedadora y bacteria; d) reduce el número de pelos radicales con el "curling" característico de plantas de alfalfa (ver Ligeró, 1984).

Parecía que los nitratos podrían influir también en la acción que el ácido indol acético (AIA) ejerce en el inicio y desarrollo de la simbiosis, así, se observó que la adición de nitratos no afectó la conversión de triptófano en auxina. Sin embargo, en ausencia de nitratos, el nivel de ácido indol acético era mayor, esto puede indicar que el nitrato cataliza la destrucción del AIA. Por otra parte, se ha demostrado que la aplicación de AIA puede mitigar la inhibición de la nodulación por nitratos. Todo esto implica que el nitrógeno combinado exógeno tiene efectos significativos sobre la bacteria y sobre la planta, lo cual complica considerablemente las investigaciones y las interpretaciones.

Recientemente Ligeró et al. (1987) han encontrado como posible causa de la inhibición de la nodulación de las leguminosas por nitrógeno combinado, la mayor liberación de etileno (que es un inhibidor de la nodulación) por las raíces de las plantas crecidas en presencia de nitrato en comparación con las crecidas en su ausencia.

El nitrógeno combinado ha sido repetidamente descrito como limitante del propio proceso de la fijación de nitrógeno en leguminosas. Se han estudiado aspectos que abordan el mecanismo del posible efecto inhibidor del nitrógeno combinado. Así, se observó que a medida que se suministran nitratos a un cultivo de guisantes, la nitrato reductasa del brote incrementa espectacularmente. Estos niveles de enzima utilizan grandes cantidades de carbohidratos y azúcares reductores producidos fotosintéticamente, por tanto privan a

la raíz y a sus nódulos de que tales sustratos se consuman en el proceso de fijación. Si el nivel de carbohidratos es suficiente, la fijación de nitrógeno en nódulos es similar tanto si los cultivos han tenido o no nitratos (Ligero, 1984).

Como los nitratos en los cultivos de leguminosas pueden ser reducidos a nitritos por la nitrato reductasa de los bacteroides, los nitritos podrían inhibir la actividad nitrogenasa o formar un complejo con la leghemoglobina, que es la que se une con el oxígeno y lo transporta al bacteroide, interfiriendo con el proceso de fijación de nitrógeno. Esto está apoyado por la caída observada en la actividad de los nódulos en raíces sometidas a altos niveles de nitratos, que se ha demostrado ser debida a una gran pérdida de la leghemoglobina de los nódulos.

Herrera et al. (1987) con experimentos de medida de fotosíntesis y fijación de nitrógeno en plantas expuestas a distintas concentraciones de nitrato e intensidad luminosa confirmaron la hipótesis sobre la disminución de la disponibilidad del fotosintetizado como causa de la inhibición de la fijación de  $N_2$  por N combinado.

En relación con el efecto del N sobre las MVA existen evidencias de una influencia negativa de este nutriente, (Hayman, 1982; Azcón et al., 1982; Barea y Azcón-Aguilar, 1983). Se conoce que el amonio es más perjudicial que el nitrato, lo cual se explica sobre la base de las diferentes vías iniciales de asimilación, sistemas de almacenamiento de carboxilato y regulación del pH (Smith, 1980; Azcón et al., 1982; Raven, 1988).

### 3.3. Efecto del potencial hídrico del suelo

La incidencia del estrés hídrico en el crecimiento de las plantas tiene unas peculiaridades destacables en el caso de las leguminosas derivadas de su influencia en el proceso de FBN (Sprent, 1976 y 1981). En efecto, el nivel de humedad de un suelo afecta la

movilidad y supervivencia de **Rhizobium** en el suelo, la nodulación, actividad nitrogenasa (Sprent, 1976; Becana et al., 1986 y Aguirreola y Sánchez-Díaz, 1985). En muchos casos el efecto se ejerce mediado por la reducción de la fotosíntesis o la respiración de parte aérea o de la nodular (Aparicio-Tejo et al., 1980; Aparicio-Tejo y Sánchez-Díaz, 1982). Se ha demostrado que la séquia influye decisivamente sobre los enzimas implicados en la asimilación de amonio en los nódulos (Becana et al., 1984).

En diversos estudios se ha puesto de manifiesto que las MVA mejoran las relaciones hídricas en leguminosas en condiciones mésicas y mejoran la resistencia de las plantas al estrés hídrico (Cooper, 1984; El-Atrash et al., 1986). El primer hecho a constatar es que los hongos VA toleran un amplio margen de potenciales de agua en el suelo (adaptaciones) y pueden encontrarse en habitats tan diversos como desiertos y ambientes acuáticos (Mosse et al., 1981). No obstante, la germinación de esporas (Reid y Bowen, 1979) y el proceso general de micorrización (Mosse et al., 1981) es sensible al contenido en agua del suelo. Concretamente, se sabe que la micorrización es más rápida a niveles más bajos que la "capacidad de campo" pero se afecta negativamente cuando aumenta la sequía. Es obvio que su papel en la captación de nutrientes de difusión lenta (fosfato) pueda ser crítico cuando al disminuir el potencial de agua de un suelo, disminuye aún más la difusibilidad de dichos nutrientes.

En diversos trabajos se ha comprobado que las micorrizas ejercen un efecto beneficioso en sistemas leguminosa-**Rhizobium** en condiciones de déficit hídrico (Safir et al., 1972; Hardie y Leyton, 1981; Peña y Sánchez-Díaz, 1983; Buss y Ellis, 1985; Hardie, 1985; Kwapata y Hall, 1985; Dakessian et al., 1986; Bethlenfalvay et al., 1988; Peña et al., 1988). Estos estudios junto con otros recientes realizados con no leguminosas (Bildusas, et al., 1986; Anderson et al., 1986; Zajicek et al., 1987; Graham et al., 1987; Augé et al., 1987; Daniels-Hetrick et al., 1987), han aportado datos que permiten profundizar en el conocimiento de los efectos de las MVA en

condiciones de estrés hídrico. No obstante los mecanismos mediante los cuales las MVA pueden incrementar la resistencia a la sequía, o mejorar la captación de agua siguen planteando muchas incógnitas (El-Atrash et al., 1986).

De acuerdo con la revisión de Cooper (1984) se puede concluir diciendo que las MVA inducen una bajada de la resistencia al transporte de agua (o sea, aumenta la conductividad hidráulica) en plantas bajo condiciones de deficiencia en fósforo. Tales efectos pueden estar asociados con cambios en otros parámetros tales, como, un potencial de agua superior, unos ritmos de transpiración superiores, resistencia estomática más baja etc., cambios que se expresarían en plantas micorrizadas con respecto a las no-micorrizadas. Sin embargo, la adición de P produjo efectos similares que las MVA. Esto sugiere que los efectos se deben a la mejora de la nutrición. Sin embargo, el trabajo de Hardie y Leyton (1981) muestra que la conductividad hidráulica y los flujos de agua en raíces de trébol fueron superiores en plantas micorrizadas que en controles adicionados de fósforo.

Un aspecto clave podría ser el hecho de que la ramificación de las hifas extiende el poder de captar agua más lejos de la zona de deficiencia en agua que, típicamente, rodea la raíz en condiciones de sequía. De esta forma, las hifas sobrepasarían ese "vacío" y unirían la planta con el suelo menos deficitario en agua. Se ha estimado que las hifas transportan agua al ritmo de  $2,8 \times 10^{-5} \text{ mg s}^{-1}$  ó  $100 \text{ nl h}^{-1}$  por punto de entrada (Allen, 1982). Sin embargo, estos flujos no parecen justificar un efecto directo en la captación de agua por micorrizas, hecho que se ha confirmado con agua tritiada (Safir, 1985) en condiciones húmedas.

En condiciones de sequía se ha visto que las MVA incrementan la tolerancia a dicho estrés en leguminosas. Se apunta que esto podría ser el resultado de una mejora en la captación de agua, un incremento en la fotosíntesis, una elevación en el nivel de citoquininas (que estimula la apertura de estomas) etc. En algún caso se ha verificado,



usando trebol, que las plantas micorrizadas fueron capaces de extraer mejor la humedad del suelo (Hardie y Leyton, 1981).

Existen evidencias de que las plantas micorrizadas tienen concentraciones de prolina más bajas que los controles, hecho importante, teniendo en cuenta que este aminoácido se acumula en condiciones de estrés hídrico (Cooper, 1984).

En resumen, se puede decir que las MVA mejoran las relaciones hídricas en plantas, pero sigue siendo una incognita si el hecho es atribuible a que incrementan flujos de entrada de agua, o es una respuesta secundaria a la mejora de la nutrición o a un cambio fisiológico en la planta hospedadora.

#### 3.4. Efecto de la salinidad

Como resultado de una necesaria irrigación en suelos agrícolas, especialmente en zonas áridas y semiáridas, se produce una concentración de sales en las capas superficiales del suelo. Concretamente  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  suelen aparecer en niveles elevados. Consecuentemente, las plantas crecidas en tales condiciones salinas muestran síntomas de toxicidades específicas, deficiencias y desbalances nutricionales y dificultades en la captación de agua. Todos estos efectos están relacionados con los iones cuyo exceso provoca la salinidad. Así pues el exceso de  $\text{Cl}^-$  disminuye la captación de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^{=}$ . El de  $\text{Na}^+$  provoca desbalances en  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ , lo cual se traduce en un acusado decrecimiento de la fotosíntesis, (Plaut y Grieve, 1988).

En efecto, el cierre estomático que se provoca en situaciones de salinidad limita la asimilación y difusión de  $\text{CO}_2$ . A estos efectos negativos hay que sumar el provocado por el incremento de la actividad respiratoria, que suele duplicarse. Tal notable bajada en la producción y uso de fotoasimilados conlleva obviamente una disminución del crecimiento. Es por ello que cualquier mecanismo conducente a incrementar la tasa fotosintética puede contrarrestar

gran parte de estos efectos nocivos.

Para mantener el equilibrio osmótico en el tonoplasto bajo condiciones de hiperosmosis se requiere la acumulación en el citoplasma de solutos orgánicos (prolina-y glicocola-betaina) entre otros. Estos compuestos son difícilmente metabolizables, por lo que pueden usarse para seguir la historia del estrés de la planta (Gorhan et al., 1985). Las betainas, compuestos de amonio cuaternario, son derivados N-metilados de los aminoácidos asociados: prolina y glicocola. La producción de estos compuestos es parte del coste a la adaptación pues repercute negativamente en el crecimiento del vegetal ya que requiere gastos de asimilados y de metabolitos nitrogenados. Sin embargo, es la alternativa que les permite la supervivencia (Paleg et al., 1985; Gorhan et al., 1985). La medida de la respiración se ha utilizado, así mismo, como criterio para evaluar el coste energético de la adaptación al estrés (Gale y Zeroni, 1985) y suele representar un 25% del total de la reducción del crecimiento.

Todos estos efectos muestran especial significación en el caso de las leguminosas con elevados requerimientos energéticos. Aquí, la energía fotosintética además de ser requerida para bombear iones contra un gradiente electroquímico es necesitada como substrato en la fijación de  $N_2$ .

Hafeez et al. (1988) encuentran un decrecimiento de cosecha del 60% en **Vigna** cultivada en suelo con una conductividad de  $7.5 \text{ d S m}^{-1}$ . En este ensayo observó que **Rhizobium** en sí, no fué afectado por la salinidad pero que la nodulación y FBN fueron ampliamente reducidas. La sensibilidad de ambas actividades fué tal que la nodulación se redujo a la mitad en conductividades por encima de  $5 \text{ d S m}^{-1}$ , inhibiéndose totalmente a partir de  $10 \text{ d S m}^{-1}$ . La fijación se redujo por encima de  $7.5 \text{ d S m}^{-1}$ . El efecto puede ser ejercido a través del  $Cl^-$  que actúa sobre la resistencia del  $O_2$  en el nódulo. Plantas no leguminosas como cebada, maíz, cebolla y tomate; y especies leguminosas como judía, guisante y trébol, entre otras, han sido estudiadas en cuanto a su respuesta a condiciones de salinidad

(Hassan et al., 1970a y b; Bernstein et al., 1974; Mass y Nieman, 1978 y Champagnol, 1979). Estos autores encontraron que la respuesta más evidente de las plantas a la salinidad era la disminución de la concentración de P en sus tejidos. Así pues apuntaron la necesidad de aportar una cantidad extra de P a los cultivos desarrollados en situaciones salinas, ello consigue mejorar el crecimiento vegetal (Champagnol, 1979; Ojala et al., 1983; Pfeiffer y Bloss, 1988). Igualmente la salinidad afecta negativamente la captación de otros nutrientes tales como K, Ca, Fe y Mn. (Hassan et al., 1970a y b) aunque la magnitud y significación de este efecto depende de la especie vegetal y del tipo de sales que provocan el estado salino (Bernstein, 1964).

En el contexto del efecto de la salinidad sobre la captación de nutrientes, actividad fotosintética y balance hídrico del vegetal es importante considerar el posible papel de la micorrización VA en tales situaciones. En primer lugar, y ya conocidas desde antiguo, existen descripciones (Mason, 1928; Nicolson, 1960; Khan, 1974 y Read et al., 1976) de la presencia de hongos formadores de micorrizas VA en ambientes salinos. No cabe duda que tienen que existir adaptaciones de los hongos VA a condiciones salinas, un fenómeno de sumo interés. Así Bowen (1980) describió MVA y aisló esporas VA en un suelo que tenía más de 5.000 ppm de  $\text{Cl}^-$ , mientras que esporas especies no adaptadas son inhibidas en su desarrollo, en condiciones controladas (Hirrel y Gerdemann, 1980).

Recientemente Buwalda et al. (1983) describieron que las plantas micorrizadas acumulaban altas concentraciones de  $\text{Cl}^-$ . Los autores especularon que eso podría ser intrínsecamente necesario para que el sistema micorriza mantuviera el equilibrio de potencial eléctrico en las membranas celulares en el contexto de los fenómenos de transferencia de fosfato en los arbusculos. Si eso es así, la micorriza aumentaría los efectos de la salinidad. La situación no parece que se pueda generalizar ya que Hartmond et al. (1987) encuentra una concentración de  $\text{Cl}^-$  superior en plantas no

micorrizadas que en micorrizadas. Lo cierto es que numerosos estudios consideran la importancia de la simbiosis MVA en el crecimiento y nutrición de plantas desarrolladas en habitats salinizados. Por ejemplo, Hirrel y Gerdemann (1980) y Pond et al. (1984) observaron que la micorriza confiere a las plantas tolerancia al efecto salino con el consiguiente incremento de cosecha. El mecanismo por el que este beneficio se consigue parece ser, en primer lugar, por una mejora en la nutrición fosforada (Hirrel y Gerdemann, 1980 y Ojala et al., 1983). Pero el hecho de mejorar también las relaciones hídricas y capacidad fotosintética, observados en plantas micorrizadas, son factores a considerar en el efecto de las MVA en condiciones de salinidad (Ojala et al., 1983). Así pues Rozema et al. (1986) relacionan el incremento de crecimiento motivado por la micorrización bajo estrés salino con un incremento de elongación foliar, captación de H<sub>2</sub>O, fotosíntesis y apertura estomática así como una reducción de la resistencia al transporte del H<sub>2</sub>O en la raíz.

Los estudios de Poss et al. (1985) y Allen y Cunningham (1983) dan protagonismo al incremento en la concentración de K en plantas micorrizadas. Concretamente estos últimos autores destacan que la micorriza mantiene una relación K/Na alta, ya que la concentración de Na es la misma en plantas micorrizadas y controles, hecho que se logra mantener gracias a una excreción glandular del exceso de Na.

Finalmente, indicar que Duke et al. (1986) encuentran que las cantidades de betaina acumuladas fueron más bajas en plantas micorrizadas que en los controles, a todo los niveles de ClNa que ellos ensayaron, lo que indican una reducción del estrés salino.

### 3.5. Efecto del Zn

El Zn es un micronutriente esencial en el metabolismo vegetal. En suelos con alto contenido en arcilla, Ca<sup>++</sup>, pH elevado, etc. el Zn tiende a ser deficitario para mantener un desarrollo adecuado de las plantas. Claramente, los factores que afectan su disponibilidad son

similares a los que afectan a la del fosfato. En un ion de lenta movilidad por lo que se han descrito zonas de deficiencia en Zn rodeando a la raíz (Wilkinson et al., 1968). Es por ello por lo que las MVA estimulan su captación en forma similar a como lo hacen con el P (Tinker y Gildon, 1983). Según estos autores, y teniendo en cuenta que el Zn es esencial para el propio hongo, que lo capta del medio edáfico, es posible que este nutriente pueda circular asociado a los granos de polifosfato en el micelio del hongo.

Los estudios de Gilmore (1971) y La Rue et al. (1975) pusieron de manifiesto el efecto de las MVA en la captación de Zn. Cooper y Tinker (1978) y Pacovsky (1986) confirman el incremento en la concentración de Zn por acción de las MVA en plantas leguminosas. Estos últimos estudios tienen especial interés ya que la FBN muestran necesidades especiales en este nutriente (Munns y Mosse, 1980).

Son abundantes las descripciones del efecto de las MVA aliviando deficiencias de Zn en varias plantas (Tinker y Gildon, 1983). Al lado de ello, y teniendo en cuenta que las concentraciones de Zn en un suelo, normalmente por procesos de contaminación, llegan a ser tóxicas para la planta, la situación aparentemente se complica, tal como se recoge en la información al respecto. En efecto, ciertos niveles de Zn son tóxicos para los hongos VA, y en estudios "in vitro" (Hepper, 1979) encuentra que la germinación de esporas es inhibida a concentraciones comunmente encontradas en las solución del suelo. No obstante se han desarrollado múltiples adaptaciones de hongos VA a la concentración por Zn. Concretamente Gildon y Tinker (1981) encuentra una micorrización considerable de trébol crecido en un suelo fuertemente contaminado con Zn, con lo que las plantas llegaron a alcanzar 3.750 ppm de Zn. Un ecotipo de *Glomus mosseae* aislado de ese suelo formó micorrizas con plantas de trébol, en unas condiciones controladas, en un suelo en el que no actuaron ecotipos de *G. mosseae* de otras procedencias.

De otro lado se han descrito efectos de las MVA en relación con la toxicidad al Zn que permiten intuir una acción de "amortiguación"

posiblemente consistente en una acumulación del nutriente en el micelio, en forma "menos transferible" y utilizables por la planta (Bradly et al., 1981; Dueck et al., 1986; Shuepp et al., 1987).

Se ha citado la existencia de interacciones Zn y P, de manera que adicionando fosfato se reducen un 30% los flujos de entrada de Zn ( $\text{mg g}^{-1}$  de raíz fresca  $\text{dia}^{-1}$ ) (Wallace et al., 1978). La opinión de Tinker y Gildon (1983) es que el mecanismo puede operar en base a la reducción del nivel de micorrización por fosfato. En efecto Lambert et al. (1979) en un ensayo con leguminosas confirmaron que la adición de P reducía la captación de Zn en plantas micorrizadas pero no en controles no micorrizados.

### 3.6. Presencia de plantas no fijadoras, especialmente gramíneas que crecen en asociación con la fijadora

En un hecho bien documentado (Haynes, 1980) que las leguminosas compiten mal con las gramíneas por agua, luz y nutrientes. Por ello, en mezclas leguminosa-gramínea es común encontrar fenómenos de competencia que perjudican crecimiento, nodulación y FBN. En el trabajo de Butler y Ladd (1985b) se analiza el efecto de la densidad de siembra y la competencia que ejerce **Lolium** sobre **Medicago**. La conclusión es evidente ya que en todas las situaciones experimentales estudiadas por dichos autores el crecimiento y total de N en la leguminosa fueron reducidos por la presencia de la gramínea. En otros casos (Craig et al., 1981) la inclusión de gramínea incrementó la FBN, por que la gramínea retiraba más eficientemente el N del suelo. En cualquier caso, normalmente, la cosecha (peso seco y total de N) suele ser mayor en la mezcla gramínea-leguminosa que la obtenida creciendo las plantas separadamente. Además, en el caso de forrajeras la mezcla tiene beneficios desde el punto de vista de la nutrición animal (Haynes, 1980).

De acuerdo con todas esas premisas se han propuesto diversos programas basados en estudios ecofisiológicos y genéticos para

seleccionar ecotipos compatibles de ambos tipos de plantas (Rhodes, 1981). Otro modelo de estudios se basa en el desarrollo de una biotecnología adecuada en cuanto a la selección de **Rhizobium** y programas de inoculación de esta bacteria. Así mismo, la inoculación con VAM fué apuntada por Haynes (1980) como un método que cooperaría eficazmente para equilibrar la nutrición de las leguminosas en la mezcla. En ensayos llevados a cabo por Azcón-Aguilar et al., en condiciones controladas (1985) y en las de campo (1987) se ha confirmado el efecto beneficioso de las MVA sobre la asociación trébol-**R. trifolii**, en cuanto a superar la acción competitiva frente a **Lolium**. Finalmente, se demostró un incremento de la productividad del forraje total obtenido en la mezcla leguminosa-gramínea estudiada, con respecto a la de ambas plantas en monocultivo.

#### 4. Cuantificación de la fijación simbiótica de N<sub>2</sub> (FBN)

Es evidente que la cantidad de N<sub>2</sub> que un sistema leguminosa-**Rhizobium** puede fijar va a ser afectada por múltiples factores tales como el genotipo de cada uno de los simbioses, condiciones ambientales -especialmente situaciones de estrés de diversa índole-, tratamientos químicos, fisicoquímicos o biológicos -especialmente micorrizas-, prácticas agronómicas, etc. (Phillips et al., 1986; Danso, 1988). Es obvio que tanto para optimizar el potencial para fijar N<sub>2</sub> de una leguminosa en una situación ambiental concreta, como para evaluar el impacto de un factor determinado en el proceso, es preciso disponer de una metodología que permita cuantificar con precisión la proporción del N en la planta que procede de la fijación, distinguiéndola de la que procede de otras fuentes, tales como suelo o fertilizantes. Además, esta técnica debe ser factible de ejecutar en condiciones de campo.

Se han propuesto varios métodos para cuantificar la FBN, algunos de ellos tienen aplicabilidad en condiciones naturales. Todos presentan algún tipo de inconveniente, tal como analizan Weaver (1986)

y Hardarson et al. (1987). Sin embargo, algunos de los métodos que usan isótopos del N muestran una serie de ventajas y una utilidad tal, que les cataloga como los más apropiados para los fines aludidos. A continuación se reseñan los diferentes métodos y se resumen unos breves comentarios sobre cada uno de ellos:

a) Método basado en el incremento de la "cosecha" de N, o biomasa ("diferencia en N"). El método se basa en asumir que una planta fijadora y una no-fijadora (control), crecidas en una misma situación medio-ambiental contienen la misma cantidad de N procedente del suelo. Por simple sustracción del N contenido en la no-fijadora de la cantidad contenida en la fijadora se estima la FBN. Evidentemente, el método exige la elección de un control no-fijador apropiado que tome el mismo N del suelo que la planta fijadora, lo cual es difícil no sólo en cuanto a su elección sino, fundamentalmente, en cuanto a contrastar su funcionalidad real como tal control. La ventaja del método es su simplicidad. Cuando el contenido de N asimilable en el medio es bajo el método muestra utilidad, especialmente cuando, sólo se pretende estimar diferencias entre tratamientos simples.

En los casos en que el N sea principal factor limitante la diferencia entre la biomasa de la planta fijadora, con respecto al control no-fijador, puede ser también tomada como una estimación relativa de la capacidad de fijación de  $N_2$ .

b) Método del "balance" de N en el sistema suelo-planta. Este procedimiento se basa en medir todas y cada una de las entradas y salidas de N en un sistema suelo-planta definido y obtener indirectamente una información cuantitativa de las entradas por FBN.

En resumen, las entradas de N al sistema pueden ser por:

- Precipitación y riego.
- Fertilizantes y semillas.
- Retorno a la capa arable de un suelo de N presente en zonas

- más profundas por acción física de las raíces de las plantas.
- Fijación Biológica de  $N_2$  (FBN).

Mientras que las perdidas pueden ser por:

- Volatilización (denitrificación)
- Lavado
- Erosión
- Utilización por las plantas y retirado en la cosecha

Es obvio que trabajando en ambiente natural, pero controlado, usando lisímetros para estimar pérdidas por lavado y erosión, etc. se pueden estimar las distintas variables. Sin embargo, estas medidas independientes están sometidas a diversas fuentes de error, por lo que el método tiene bastante imprecisión. No obstante tiene validez cuando se aplica a largo plazo y se acumulan bastantes datos que permitan detectar cambios significativos en los parámetros que influyen en el balance.

c) Técnica de la "reducción de acetileno". El método se basa en dos hechos concretos: i) el acetileno es un inhibidor competitivo de la FBN y ii) la nitrogenasa cataliza la transformación de acetileno. La determinación cuantitativa de este último, el único producto de la reacción, puede efectuarse con facilidad por cromatografía gaseosa; y cuando convenga, dada la estabilidad del producto (Hardarson et al., 1987). Es un método sumamente popular, sencillo, barato, sensible y que permite ciertas comparaciones relativas entre tratamientos, lo cual lo hace útil en ensayos fisiológicos y bioquímicos relacionados con el proceso de FBN. Sin embargo, presenta numerosos y críticos inconvenientes (Weaver, 1986; Hardarson et al., 1987; Witty y Michin, 1988). De un lado, el método ofrece, una estimación puntual que es afectada considerablemente por los ciclos de variación de los ritmos de fijación durante el día. Además, los distintos requerimientos en

electrones de las reacciones catalizadas por la nitrogenasa: reducción de acetileno y de  $N_2$ , hacen preciso el uso de un factor de conversión. Normalmente se asume que este factor es 3, pero se ha comprobado que puede oscilar entre 2 y 7 (Weaver, 1986). Así mismo, se observó que cuando los nódulos, o los sistemas radicales completos, se exponen a la presencia del acetileno se aprecia descenso rápido de la actividad nitrogenasa, causada por diferencias en la resistencia inicial del nódulo a la difusión de  $O_2$  (Witty y Minchin, 1988). De otro lado, la técnica es difícil de aplicar en condiciones de campo, y que tanto el disturbar el sistema, como muestrear "todos" los nódulos, para medir en condiciones controladas, es una fuente de error considerable. Fundamentalmente, un gran inconveniente del método es que no es válido para obtener valores integrados de FBN a lo largo de un tiempo determinado.

d) Método basado en el contenido relativo en ureidos en la parte aérea de las plantas. Se sabe que en ciertas leguminosas "de grano" y en otras, como las de ecosistemas tropicales, el principal producto de la FBN que se transporta en el xilema es un grupo de compuestos de tipo ureido (Weaver, 1986). Estos compuestos se acumulan y su proporción relativa puede usarse como método de evaluar FBN en estas plantas y su contribución proporcional a la nutrición nitrogenada de las mismas; la metodología apropiada es objeto de estudio, pero, en cualquier caso, se trataría de una medida indirecta y también puntual de la FBN.

e) Uso de isótopos del N para medir FBN. Se considera que este grupo de técnicas son las únicas que ofrecen cuantificaciones directas de la FBN, permiten distinguir la proporción de N en la planta que procede del suelo (% NpdSuelo), de un fertilizante (% NpdFert) o de la atmósfera (% NpdFij) y de dar unos valores de FBN integrados para todo un ciclo de crecimiento de un sistema Leguminosa-**Rhizobium** dado. Por el interés del tema y por su incidencia directa en el presente

estudio, estas metodologías merecen la consideración especial y relativamente extensa, que sigue.

## 5. Uso de $N^{15}$ en la medida de FBN

Para facilitar el conocimiento de fundamentos y procedimientos propios de las metodologías que emplean  $N^{15}$  para cuantificar FBN es necesario establecer unos conceptos básicos sobre los isótopos del N y el llamado "valor A", correspondiente a las distintas fuentes de N para una planta. Por ello se introduce seguidamente una breve reseña de estos aspectos, claves en la problemática en cuestión.

### 5.1. Los isótopos del N

Es bien conocido que el N tiene 6 isótopos, de los cuales sólo el  $N^{14}$  y  $N^{15}$  son estables. La composición isotópica de la atmósfera y, en general, de los materiales naturales, se mantiene casi constante, de modo que la "abundancia natural" de ambos isótopos se establece en 0.336% de  $N^{15}$  y 99.634% de  $N^{14}$ , aproximadamente. En circunstancias, que después se comentan, puede haber diferencias en la abundancia natural entre atmósfera y suelo. Estas suelen ser a nivel de 4ª decimal. Independientemente de ello y asumiendo la "constancia" en la relación  $N^{15} / N^{14}$  del "medio natural" se ha desarrollado una metodología basada en conceptos como el que sigue. Si se le suministra a una planta un producto que tenga un "exceso atómico" de  $N^{15}$  (% de  $N^{15}$  por encima de los 0.366% de "abundancia natural"), la composición isotópica del N que esa planta acumule denotará un incremento en la proporción  $N^{15} / N^{14}$ . Cuanto más alto es el exceso atómico en %  $N^{15}$  en la planta, mayor ha sido la captación relativa de N procedente del producto marcado. Por el contrario, un descenso relativo en la relación  $N^{15} / N^{14}$  en esa planta, suministrada del producto marcado, indica un incremento en la captación de N a partir de fuentes no marcadas (con composición a

nivel de abundancia natural). Aunque con ciertos matices que posteriormente se discutirán, se asume de entrada que las plantas no distinguen  $N^{15}$  de  $N^{14}$ .

### 5.2. Uso de $N^{15}$ para determinar la eficiencia de un fertilizante para la planta

De acuerdo con lo que antecede el uso de  $N^{15}$  permite medir de forma directa la cantidad o porcentaje de N existente en un fertilizante que es tomado por la planta (% NpdFert) relacionando la proporción  $N^{15} / N^{14}$  en la planta con la del fertilizante, o simplemente con el % de exceso atómico (e.a.) en  $N^{15}$  en planta y fertilizante. Así:

$$\% \text{ NpdFert} = \frac{\% \text{ e.a. } N^{15} \text{ en planta}}{\% \text{ e.a. } N^{15} \text{ en fertilizante}} \times 100 \quad (1)$$

Teniendo en cuenta que la cantidad de N ( $N^{14} + N^{15}$ ) añadida con el fertilizante es conocida y el total de N en la planta es fácilmente determinable, se puede calcular la eficacia en el uso de un fertilizante (% E.U.F.), utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ E.U.F.} = \frac{\text{Total N en planta pdFert}}{\text{Total N aplicado con el fertilizante}} \times 100 \quad (2)$$

Esta ecuación permite valorar el nivel de utilización de diferentes fertilizantes y el efecto de prácticas agronómicas y condiciones ambientales diversas en el aprovechamiento de los mismos por la planta, lo que le convierte en una excelente herramienta en agronomía (Fried, 1973).

Es obvio que la no radioactividad del  $N^{15}$  facilita su uso sin

riesgos. Su determinación se realiza por Espectrometría de Masas o de Emisión.

### 5.3. Concepto del "valor A"

Existe un hecho básico en el contexto de la relaciones suelo-planta que asume que cuando a una planta se le suministran dos o más fuentes de N, tomara el nutriente de cada una de estas fuentes en proporción directa a las cantidades disponibles (en cada una de ellas); o sea, si añadimos a un suelo un fertilizante marcado con  $N^{15}$ , la planta va a tomar  $N^{15}$  del fertilizante asimilable (factor conocido, que se denomina valor  $A_{Fert}$  y  $N^{14}$  asimilable del suelo (factor no conocido, que se denomina valor  $A_{suelo}$ ). Ello permite escribir la siguiente ecuación, llamada de "proporcionalidad en la utilización de distintas fuentes de N":

$$\frac{\% \text{ NpdFert}}{A_{Fert}} = \frac{\% \text{ NpdSuelo}}{A_{Suelo}} \quad (3)$$

Teniendo en cuenta que el valor  $A_{Fert}$  para el N es la dosis de N aplicada a una superficie ( $m^2$ , ha) o volumen de suelo (maceta), expresada en mg, kg, etc. de N total aplicado. De aquí, se deduce que:

$$A_{Suelo} = \frac{\% \text{ NpdSuelo}}{\% \text{ NpdFert}} \times \text{Dosis de N aplicada} \quad (4)$$

Pero puesto que  $\% \text{ NpdSuelo} = 100 - \% \text{ NpdFert}$ , se puede escribir que:

$$A_{\text{Suelo}} = \frac{100 - \% \text{ NpdFert}}{\% \text{ NpdFert}} \times \text{Dosis N aplicada} \quad (5)$$

Donde el % NpdFert se calcula por la fórmula (1)

Ello permite calcular el valor A del suelo para el N, parámetro que indica la oferta en N de ese suelo a la planta. Se expresa en las mismas unidades de fertilizante que se utiliza para determinarlo, en fórmulas (4) ó (5) ( $\text{kg ha}^{-1}$ ;  $\text{mg/maceta...}$ ).

#### 5.4. Metodologías basadas en el uso de $\text{N}^{15}$ y su aplicación a evaluar FBN

Como se indicó anteriormente son los métodos de elección.

Se puede aceptar que existen 4 tipos de metodologías basadas en:

a) Uso de  $^{15}\text{N}_2$  (gas). Tiene escasa utilidad en condiciones naturales y grandes limitaciones en controladas.

b) Uso de fertilizantes o substratos enriquecidos en  $\text{N}^{15}$ :

i) Técnica de la dilución isotópica. Se acepta como el método más util para medir FBN.

ii) Técnica que utiliza el concepto del "valor A". Esta metodología es discutida conceptualmente, pero puede ser igualmente útil como i).

c) Uso de la diferencia existente en "abundancia natural" en  $^{15}\text{N}$  entre atmósfera y suelo. Esta técnica exige una gran precisión (4ª decimal), y es aplicable en casos, ofreciendo estimaciones de gran fiabilidad.

A continuación se discuten diversos conceptos en relación con dichas metodologías. Las fórmulas utilizadas y las ecuaciones que se

aplican (así como las ya expuestas en apartado 5.1 y 5.2) proceden de Danso et al. (1983). Dada la importancia de las técnicas agrupadas en el apartado b), y a su incidencia en el presente estudio, se les va a dedicar una atención prioritaria, que seguirá a una breve reseña sobre las técnicas a) y c) que a continuación se ofrece:

En lo que respecta al uso de  $N^{15}_2$ , es decir que realmente es un método que proporciona estimaciones directas de la fijación (Hardarson et al., 1987). La técnica exige mantener por un corto espacio de tiempo a las plantas en una cámara cerrada y suministrarles una atmósfera enriquecida con  $N^{15}$ . Evidentemente la situación difiere de las condiciones de campo y, además, las medidas son puntuales y no integradas a lo largo del tiempo. Este último hecho es importante porque la FBN está sujeta a variaciones diurnales y estacionales que hay que considerar. En este sentido, Giller et al. (1984) diseñaron una cámara que permitía el sistema radical de un número de plantas expuestas a una atmósfera enriquecida en  $^{15}N_2$ , mientras que las partes aéreas de las mismas permanecían en condiciones más naturales. El aparato permite controlar y recuperar las mezclas gaseosas aplicadas. Con este método sus autores pudieron medir FBN por bacterias asociadas a rizosfera de gramíneas y estimar su transferencia a dichas plantas.

En cuanto a la aplicación de las diferencias en "abundancia natural", de  $N^{15}$  solo se hace un breve comentario, que se extenderá en el apartado 5.5.4.2. de este capítulo de Introducción, al hecho de que tiene lugar una cierta discriminación isotópica durante el desarrollo de los suelos. Por ello, en muchos casos, estos tienen una "abundancia natural" de  $N^{15}$  ligeramente superior (normalmente a nivel de 4ª decimal) que la atmósfera (Weaver, 1986; Hardarson et al., 1987). Consecuentemente, las plantas fijadoras suelen tener una abundancia natural en  $N^{15}$  ligeramente más baja que las no fijadoras (Rennie, 1986a). Para calcular fijación por este método ( $N^{15}$ ) se aplica la ecuación:

$$N^{15} ( ) = \frac{\% \text{ e.a. } N^{15} \text{ en Planta Fijadora} - 0.366}{0.366} \times 1000$$

La principal desventaja de este método es que exige una gran precisión en las medidas y en la gran variabilidad de los enriquecimientos de los materiales naturales. Sin embargo, ha sido empleado con éxito (Domenach y Corman, 1984; Morris et al., 1985; Wada et al., 1986) y sigue siendo actualmente objeto de atención y uso (Rerkasem et al., 1988) ya que los progresos en los aparatos de medida (necesariamente espectrometros de masas, no de emisión) permiten obtener estimaciones de FBN de considerable fiabilidad.

#### 5.5. Uso de fertilizantes enriquecidos en $N^{15}$ para medir FBN

La adición de un fertilizante nitrogenado marcado con un exceso atómico en  $N^{15}$  a un suelo en el que va a crecer la planta fijadora junto con otra planta control no fijadora (planta de referencia) es la base del que se considera el único método directo que permite: a) una evaluación integrada de la FBN a lo largo de un periodo de tiempo y b) distinguir la contribución del suelo, fertilizante y atmósfera al contenido total de N en planta. Precisamente, la elección de una planta de referencia adecuada, que va a servir para estimar la relación  $N^{15} / N^{14}$  del suelo ó el N disponible en el mismo ( $A_{\text{suelo}}$ ), es crítica para la aplicación correcta de la técnica.

Existen dos variantes fundamentales en esta metodología: la llamada "técnica de la dilución isotópica" y la que precisa determinar previamente el valor A del suelo ("técnica del valor A"). Ambas se basan en los mismos dos conceptos: a) la dilución isotópica del N procedente del suelo y fertilizante, que tiene una relación  $N^{15} / N^{14}$  más alta (ya que se ha inducido un enriquecimiento con el fertilizante marcado) por el N procedente de la atmósfera, que posee una relación  $N^{15} / N^{14}$  más baja (abundancia natural); y b) la

asimilación por las plantas del N del suelo y fertilizante en proporción directa a las cantidades disponibles en cada una de estas fuentes.

Seguidamente se discuten los fundamentos y procedimientos de ambas variantes de la metodología resumiendo la información recientemente revisada (Vose y Victoria, 1986; Hardarson et al., 1987; Danso, 1988).

### 5.5.1. Técnica de la dilución isotópica

Este caso es aplicable cuando, tanto la leguminosa como la planta no fijadora ó de referencia, reciben la misma cantidad y enriquecimiento de N fertilizante. Las dosis en que esta se aplica debe ser suficiente para el crecimiento de la no fijadora y no inhibidora de la FBN por la fijadora. Evidentemente ambas plantas están utilizando una fuente de igual composición isotópica ( $N^{15} / N^{14}$ ) del conjunto suelo + fertilizante, por ello, la relación isotópica ( $N^{15} / N^{14}$ ) del N en planta que deriva del medio debe ser la misma para ambos tipos de plantas. En el caso de la fijadora la relación  $N^{15} / N^{14}$  esperada (la misma que en la no fijadora) en la práctica, es más baja, debido a que la concentración de  $N^{15}$  se diluye con  $N_2$  atmosférico de composición isotópica similar a la "abundancia natural". Dicha dilución será mayor cuanto mayor sea la eficacia del sistema fijador de  $N_2$ . Para calcular el % de N en planta que procede de la fijación (% Npd Fij), Fried y Middelboe (1977) desarrollaron unas ecuaciones que se resumen en la siguiente:

$$\% \text{ Npd Fij} = \left( 1 - \frac{\% \text{ e.a. en "Fijadora"}}{\% \text{ e.a. en "no Fijadora"}} \right) 100 \quad (6)$$

Como puede observarse esta fórmula permite calcular la proporción de N procedente de la fijación independientemente de la biomasa cosechada.

### 5.5.2. Técnica del "valor A"

En ciertos casos, para que la planta no-fijadora pueda crecer adecuadamente, es preciso suministrar una dosis de N dada, que puede resultar inhibitoria de la FBN en la planta fijadora. Evidentemente es preciso aplicar diferentes dosis, y posiblemente, enriquecimientos en  $N^{15}$  del fertilizante a ambos tipos de plantas. Estas están pues, utilizando un suelo con distintas relaciones  $N^{15} / N^{14}$ . En estos casos, aún es posible determinar FBN aplicando la metodología basada en el concepto del valor  $A_N$  del suelo (Fried y Broshart, 1975). La hipótesis se basa en el concepto del valor A, expresado en la ecuación de proporcionalidad (3) ampliada de la siguiente manera:

$$\frac{\% \text{ Npd Fert}}{A_{\text{Fert}}} = \frac{\% \text{ Npd Suelo}}{A_{\text{Suelo}}} = \frac{\% \text{ Npd Fij}}{A_{\text{Fij}}} \quad (7)$$

Así mismo, se basa en el hecho de que valor A del suelo debe permanecer constante a diferentes dosis de fertilizante nitrogenado (Danso et al., 1983).

De acuerdo con la ecuación (4) se calcula el valor  $A_{\text{Suelo}}$  para la planta no fijadora, pero cuando dicha fórmula se aplica para la planta fijadora, el valor A calculado incluye  $A_{\text{Suelo}} + A_{\text{Fij}}$  como conjunto, puesto que la fórmula estima aportes de N asimilable no enriquecidos con  $N^{15}$  o sea, todo lo que no sea fertilizante marcado. Seguidamente, se calcula el valor  $A_{\text{Fij}}$  como sigue:

$$A_{\text{fij}} = (A_{\text{Suelo}} + A_{\text{Fij}}) - A_{\text{Suelo}} \quad (8)$$

("Fijadora")                      ("no-Fijadora")

Teniendo en cuenta las ecuaciones (7) y (8)

$$\% \text{ Npd Fij} = \frac{\% \text{ Npd Fert}}{A_{\text{Fert}}} \times A_{\text{Fij}} \quad (9)$$

Como puede observarse, esta fórmula, como la (6), es independiente de la cosecha.

En diversos experimentos se ha demostrado la validez de las estimaciones de la FBN siguiendo la hipótesis del "valor A" (Danso, 1988), e incluso Fried (1985) aporta evidencia práctica y teórica de que la técnica de la "dilución isotópica" y la del "valor A" son unificables. No obstante, conceptualmente incluso, sigue siendo discutida (Vose y Victoria, 1986). Las principales críticas residen en el hecho de que a veces no se obtiene el mismo valor A usando diferentes niveles de N. Posiblemente en estos casos ocurren considerables intercambios de N entre suelo y fertilizante lo cual afecta aspectos conceptuales claves en el desarrollo del método. Así mismo, se han apuntado que las pérdidas de N por denitrificación se afectan por la dosis de N añadida. Por lo que antecede se deduce que las estimaciones de FBN utilizando la metodología basada en el "valor A" necesita ser tomadas con precaución hasta no ser contrastada.

Recientemente, Urquiaga y Boddey (1987) demuestran que mientras se mantenga que el % E.U.F. sea el mismo para la planta fijadora y la de referencia, el método del "valor A" proporciona estimaciones fiables. Se han encontrado buenas correlaciones entre las estimaciones de FBN por el "valor A" y las obtenidas por el "método de la diferencia", como ejemplo reciente, Papastylianou (1987).

### 5.5.3. Ventajas de las metodologías basadas en el uso de N<sup>15</sup>

Aunque algunas de las ventajas de estas metodologías han sido apuntadas anteriormente, se ha considerado oportuno enumerarlas, como

conjunto, en este apartado. Para ello se resume la información discutida por Rennie (1986a) y Danso (1988):

a) dan valores integrados de la FBN para estaciones de crecimiento completas tanto en condiciones controladas como en naturales.

b) Son los únicos métodos que distinguen la procedencia del N en la planta, o sea el % que proviene de la fijación, del suelo o del fertilizante. Esto es especialmente importante para comparar (y seleccionar) ecotipos o genotipos de plantas, o de *Rhizobium*, así como practicar tratamientos, con vistas a incrementar la potencialidad de sistema para FBN.

c) Como consecuencia de (a) + (b). Mediante ensayos "a lo largo del tiempo", tal como el descrito por Zapata et al. (1987) con soja, se puede averiguar la evolución de la contribución de las diversas fuentes de N a la nutrición de la planta. Ello permite "manipular" el sistema para optimizar los distintos procesos.

d) La medida del % de N que procede de fijación es independiente de la cosecha, de acuerdo con las formulas (6) y (9). Ello permite reducir los costos de  $N^{15}$ , ya que sólo es necesario marcar pequeñas sub-parcelas. Cuando se pretenden dar los datos de fijación total (por ejemplo, kg/ha de  $N_2$  fijado) lo que se hace es establecer parcelas de mayor tamaño, a las que se añade N no marcado en la misma cantidad que la que se uso en las subparcelas correspondientes, marcadas.

e) En los casos en que no se precisen estimaciones cuantitativas de la FBN sino simplemente ordenar, siguiendo el criterio de eficacia para FBN, diversos tratamientos, genotipo o ecotipo de simbiotes, etc., el método de la dilución isotópica ofrece una ventaja de sumo interés: No es necesario usar planta de referencia, no fijadora. Para ello se fijan todos los componentes del sistema, menos uno del que se quieren ensayar individuos (por ejemplo varios *Rhizobia* spp). En todos los casos (macetas, parcelas) se adiciona la misma cantidad del mismo fertilizante marcado y transcurrido el tiempo estimado, se

calcula la relación  $N^{15} / N^{14}$  en planta. Cuanto más baja es esa relación más alta es la cantidad de  $N_2$  atmosférico fijado, o sea más eficiente es el componente del sistema o tratamiento ensayado para FBN.

f) Los métodos que usan  $N^{15}$  son los más sensibles para determinar FBN.

g) Como complemento a los estudios de FBN se puede obtener, sin gasto adicional de isótopo, información complementaria sobre "Transferencia de N", descomposición de materia orgánica, estudios sobre el "balance de N" en el ecosistema, eficacia en el uso de fertilizantes etc.

#### 5.5.4. Fuentes de error en las metodologías que utilizan compuestos marcados con $N^{15}$

El uso correcto de estas metodologías tiene unas limitaciones marcadas por el correcto control de unas determinadas fuentes de error. Estas son las siguientes:

##### 5.5.4.1. La planta control no fijadora ó de referencia

Puesto que para cuantificar FBN por estos métodos es imprescindible conocer los valores integrados de la relación  $N^{15} / N^{14}$  del suelo, ó el valor A del mismo, es clave la elección de una planta de referencia adecuada. De acuerdo con Fried et al. (1983); Vose y Victoria (1986) y Rennie (1986a) las características de un sistema de referencia para su eficacia como tal se exponen a continuación, reservándose para el apartado 5.5.5. las soluciones y los sistemas que en la practica se utilizan, de acuerdo con las características que aquí se detallan.

a) Ausencia de capacidad fijadora de  $N_2$ . Teniendo en cuenta que ciertas gramíneas pueden poseer bacterias fijadoras de  $N_2$  asociadas a sus rizosfera, es importante contrastar estos hechos mediante la

técnica de la reducción de acetileno.

b) Tanto la planta fijadora como la de referencia deben tomar, a lo largo del tiempo, el N del suelo (+ fertilizante) con una relación  $N^{15} / N^{14}$  similar para ambas plantas. Este hecho no indica que ambos tipos de plantas deben tomar la misma cantidad de N mineral sino que este tenga la misma composición isotópica. Esto se considera uno de los aspectos más problemáticos para aplicar la metodología del  $N^{15}$  (Chalk, 1985). Tal similitud en los perfiles de captación de N a lo largo de los ciclos de cultivo depende, en primer lugar, de unas características morfológicas geométricas y fisiológicas del sistema radical y sus hábitos de desarrollo, así como de la distribución vertical y horizontal del N aplicado en el suelo. Los ciclos de crecimiento de ambas plantas deben ser parecidos y estas deben ser sembradas y cosechadas al mismo tiempo. Los factores ambientales deben afectar similarmente a ambos tipos de plantas. Teniendo en cuenta el decline de la relación  $N^{15} / N^{14}$  en el suelo a lo largo del tiempo (Witty, 1983), este conjunto de características es de especial interés. Aunque en el apartado 5.5.5. se citan las soluciones a estas limitaciones, se anticipa que se han seleccionado plantas de referencia que son capaces de absorber N de una zona similar a la fijadora correspondiente y que, como el  $N^{15}$  se suele acumular en horizontes superficiales se obtienen unas relaciones  $N^{15} / N^{14}$  bastante uniformes (Rennie, 1986a).

c) El sistema de cultivo. Es conocido que, en el caso de leguminosas forrajeras y, fundamentalmente, las de pastizal, las plantas crecen mezcladas en contacto con gramíneas y otras plantas no fijadoras, que suelen usarse como control en la estimación de la FBN. Esto representa, de un lado, una ventaja puesto que aparentemente ambos tipos de plantas están usando el mismo suelo en lo referentes a la relación  $N^{15} / N^{14}$ . Incluso en caso de que haya diferencias en los ritmos de descomposición de los residuos de ambas plantas, las alteraciones en las relaciones  $N^{15} / N^{14}$  en el conjunto del suelo a utilizar resulta homogénea y similar para ser usada por los dos tipos

de plantas. Pero, en otro orden de cosas, el cultivo mixto induce fuentes de error en las estimaciones de FBN por técnicas isotópicas. En primer lugar, puede ocurrir "Transferencia de N" (Weaver, 1988), como más adelante se discute. En este caso, la planta estaría recibiendo una fuente extra de N con una relación  $N^{15} / N^{14}$  similar a la "abundancia natural", proveniente, indirectamente, de FBN por la leguminosa. Ello afecta las estimaciones de la relación  $N^{15} / N^{14}$  del suelo, que debería ser alterada solo por una única fuente: el fertilizante marcado y, obviamente, el valor A del suelo. De otro lado, los fenómenos de competición entre gramíneas y leguminosas (Haynes, 1980) también alteran los ritmos de crecimiento y modifican los volúmenes relativos de suelo "disponible" para ambas plantas. Estos hechos inducen a error en las estimaciones de FBN si se utilizan plantas fijadoras y de referencias creciendo en mezcla ("intercropping").

#### 5.5.4.2. Existencia de discriminación isotópica en el sistema suelo-atmósfera

Durante la formación de los suelos ocurren ciertos cambios físicos, químicos y bioquímicos que afectan los ciclos de los nutrientes dando lugar a alteraciones en las velocidades de difusión y reacción entre isótopos. Así ocurre en el caso del N habiéndose encontrado variaciones en el fraccionamiento isotópico que pueden conducir a cambios en la abundancia natural de  $N^{15}$  en materiales naturales (Yoneyama et al., 1986 y Rennie, 1986a). Esto, evidentemente, puede conllevar a diferencias en la abundancia natural en  $N^{15}$  entre suelo y atmósfera. En ello se fundamenta el método de medir FBN basado en la "abundancia natural", tal como se describió anteriormente (apart. 5.4.). Sin embargo, las variaciones, que suelen afectar sólo a la 4ª decimal, no parecen críticas en las estimaciones utilizando compuestos marcados con  $N^{15}$  para medir FBN (Rennie, 1986a).

#### 5.5.4.3. Existencia de discriminación isotópica entre diferentes partes de la planta

En ciertos ensayos se han encontrado diferencias significativas en el enriquecimiento en  $N^{15}$  entre diferentes partes de las plantas (Henson y Hichel, 1984; Butler y Ladd, 1985a; Yoneyana et al., 1984 y 1986; Butler, 1987). Esto, probablemente, es el resultado de una discriminación isotópica durante la asimilación y transporte de N o en la síntesis de proteínas. Es obvio que ello afecta las medidas de FBN, según sea, la parte de la planta muestreada. De acuerdo con Danso (comunic. personal) conviene contrastar previamente si existe tal discriminación en el sistema particular de estudio ya que, por ejemplo en el caso de leguminosas forrageras, o en pastizales, el sistema radical tiene una influencia cuantitativa considerable, por lo que un diferente enriquecimiento entre raíz y parte aérea afectaría los datos de FBN si solo se analiza esta última, como se tiende a hacer normalmente.

#### 5.5.5. Sistema no fijador, formas y dosis de fertilizante comunmente utilizadas

La información existente ha sido recientemente revisada por Danso (1988), por lo que se utiliza dicho trabajo como base para resumir los conceptos fundamentales sobre el tema.

##### 5.5.5.1. Planta no fijadora de referencia

Se han utilizado los siguientes tipos:

- a) la misma planta fijadora (una leguminosa) no inoculada. Teóricamente este es el mejor control en suelos en los que no existe *Rhizobium* específico nativo (Rennie, 1986a).
- b) Una leguminosa fijadora inoculada con *Rhizobium* inefectivo.
- c) Isolíneas de una leguminosa resistente a la nodulación por



### Rhizobium.

Existen evidencias, por ejemplo, Vasilas y Ham (1984), que apoyan una similitud en los perfiles de captación de N mineral en leguminosas noduladoras y las correspondientes no noduladoras, por lo que estas serían un control ideal. Sin embargo, también se ha descrito la existencia de diferencias en los modelos de captación proporcionada de N del suelo y fertilizante (Boddey et al., 1984), por lo que el uso de tales tipos de plantas como control de referencia debe ser contrastado previamente.

d) La misma leguminosa adicionada de altas dosis de N. Ello implica tener que usar la técnica del valor A y ofrece el inconveniente de la no seguridad de haber inhibido la nodulación (Rennie, 1986a).

e) Una planta no leguminosa, normalmente un cereal. La literatura sobre el uso de este control es abundante, siendo las únicas limitaciones contrastar tanto la ausencia de fijación como la similitud en el uso proporcional del N del suelo ( $N^{15}$  /  $N^{14}$  del fertilizante marcado + suelo), con respecto a la planta fijadora.

#### 5.5.5.2. Tipos de fertilizantes enriquecidos en $N^{15}$

De acuerdo con Danso (1988) se pueden distinguir los diferentes tipos de fertilizantes marcados con  $N^{15}$ :

Inorgánicos	De liberación rápida	Sulfato amónico, nitratos cálcico, sódico, potásico... Urea etc.
	De liberación lenta	Nitrato potásico en "pellets" de yeso u oximida Sulfato amónico + "N-serve"

N Inmovilizado      Material vegetal marcado  
                                  Adición de sacarosa, u otro material  
                                  hidrocarbonado para acelerar la inmobi-  
                                  lización microbiana del N.  
                                  Uso del N<sup>15</sup> residual en un suelo

Los trabajos de Chalk (1985), Witty y Ritz (1984), Steel y Littler (1987), discuten la utilidad de las diferentes fuentes de N inorgánico y encuentran que estas pueden afectar las estimaciones de FBN. Uno de los factores más influyentes es la forma de N combinado, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ó NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, ya que, de acuerdo con las características del suelo, y teniendo en cuenta la diferente movilidad de ambas formas, la forma de N puede afectar los valores de fijación obtenidos dadas las diferencias, aunque sean mínimas, en los hábitos de enraizamiento de las plantas fijadora y de referencia.

Considerando la problemática asociada a la "caída" en la relación N<sup>15</sup> / N<sup>14</sup> (Witty, 1983), el tipo de fertilizante a elegir es crítico. En este sentido, se tiende al uso de fertilizantes inorgánicos de liberación lenta (Witty y Ritz, 1984) ó a la adición de un inhibidor de la nitrificación, como es el "N-serve", cuya utilidad ha sido analizada por Rennie (1986b).

Otro procedimiento es usar N inmovilizado, por ejemplo, añadiendo materia orgánica marcada (Freitas et al., 1984; Butler y Ladd, 1985a; Rennie, 1986b). En este laboratorio se ha conseguido, en un ensayo en el que se incorporó materia orgánica marcada, una estabilización adecuada de la relación N<sup>15</sup> / N<sup>14</sup> en suelo, lo que ofreció estimaciones bastante fiables de la FBN por alfalfa en condiciones de campo (Barea, 1988).

Es de notar que Ledgard et al. (1985a y b) desarrollaron una fórmula matemática que permite establecer correcciones en las estimaciones de la captación de N del suelo y fertilizante, aplicable a fuentes de N<sup>15</sup> inorgánicas, de rápida liberación.

Una recomendación habitual (Heichel et al., 1985; Danso, 1988)

es desarrollar en ensayo de tipo "time-course" para estudiar los perfiles de captación de N a lo largo del tiempo y comprobar la no existencia de desviaciones entre la planta fijadora y la de referencia. En un ensayo de este tipo, en condiciones de campo, utilizando *Trifolium repens* y *Lolium perenne* (Barea et al., 1989), se encontró una similitud aceptable en las proporciones  $N^{15} / N^{14}$  que ambos tipos de plantas tomaron del suelo + fertilizante marcado, que era  $SO_4(NH_4)_2$ . La tendencia se mantuvo a lo largo del tiempo por lo que se obtuvieron unas estimaciones de FBN de garantía.

#### 5.5.5.3. Dosis y formas de aplicación de fertilizantes marcados con $N^{15}$

Los estudios de Chalk (1985) y Danso (1988) así como la información obtenida en los Programas de Investigación Coordinados que organiza la Agencia Internacional de la Energía Atómica (IAEA/FAO) de Naciones Unidas, en los que participa este laboratorio, han alcanzado unas conclusiones, que se resumen seguidamente:

Para las leguminosas las dosis normalmente empleadas están entre 5-20 kg N/ha con un enriquecimiento entre el 5-10% de exceso atómico. Para las plantas de referencia se suelen emplear las mismas dosis y enriquecimientos, si se va a seguir la técnica de la "dilución isotópica" o de unos 100 kg N/ha del 1% de exceso atómico en  $N^{15}$ , si se va a usar la técnica del "valor A". Es obvio que el nivel de N del suelo, duración del ensayo, nivel de precisión, que esta a su vez en función del equipo disponible, etc., afectan la decisión de las dosis y enriquecimientos a utilizar.

Con respecto al método de aplicación se han propuesto varios: aplicación foliar, a "bandas", a "voleo", en solución que se inyecta al suelo (Rennie, 1986b; Danso, 1988). La experiencia ganada en Programas de IAEA / FAO indica que la aplicación en soluciones acuosas a unos 200 ml/m<sup>2</sup> proporcionan una distribución adecuada del isótopo, que se mejora si va seguida de una irrigación controlada.

#### 5.5.6. Efecto de diferentes factores que influncian la FBN, utilizando las técnicas del N<sup>15</sup>

La utilización de las metodologías basadas en el uso de compuestos enriquecidos en N<sup>15</sup> son cada día más utilizadas, a la vista de las ventajas apuntadas. Las revisiones de Chalk (1985); Phillips et al. (1986); Rennie (1986a); Hardarson et al. (1987); Heichel (1987) etc. recopilan estudios y datos de FBN en diversos ecosistemas y tipos de leguminosa (de grano, forragera, de pastizal etc.). Asimismo hay que hacer notar que se han desarrollado estudios de FBN, usando N<sup>15</sup>, con leguminosas leñosas (Zaharah, 1987) plantas actinorrizas (Gauthier et al., 1985) especies de **Sesbania**, leguminosas noduladas en tallo, (Ndoye y Dreyfus, 1988) incluso se aplica la metodología para estimar FBN en sistemas no simbióticos, tales como arroz (Marumoto, 1986), otras gramíneas (Giller et al., 1986; Rennie y Thomas, 1987) ó caña de azúcar (Freitas et al., 1984), como algunos ejemplos representativos.

Indudablemente la gran mayoría de los estudios se han efectuado en leguminosas, fundamentalmente orientados a incrementar la eficacia de la FBN mediante la "manipulación" de los distintos componentes del sistema simbiótico, ó aplicando tratamiento que se sabe afectan al proceso.

Se han realizados diversos estudios en programas de selección de genotipos de la planta, como ejemplo reciente Duc et al. (1988), que aplican diversas modalidades de la técnica de N<sup>15</sup>, para seleccionar el cultivar de leguminosa que obtiene mejores ventajas de la FBN en el ecosistema en cuestión. En otros ensayos se ha aplicado la técnica (N<sup>15</sup>) para seleccionar el genotipo de **Rhizobium** (Hardarson et al. 1984), y en otros, se ha investigado la interacción entre el genotipo de planta y el genotipo de **Rhizobium** (Senaratne et al., 1987; Douka et al., 1986; Danso et al., 1987).

En varios ensayos se ha investigado el papel de N combinado sobre la FBN, tanto en lo que se refiere a su forma de aplicación

(Butler y Ladd, 1985a), como a la vía en que es suministrado, ó a su momento de aplicación (Azfa et al., 1987). Estos estudios concluyen que una aplicación racional de N, en momento y forma adecuados, que varia con el ecosistema, puede incrementar la cosecha sin afectar FBN. Este hecho que era conocido de antiguo, se matiza y precisa utilizando el trazador isotópico ( $N^{15}$ ). Es obvio que, de acuerdo con algunos comentarios anteriores, las características del ecosistema, y más concretamente el suelo, afectan las medidas de FBN (Reicharat et al., 1987).

La densidad de siembra ha sido otro de los factores considerados en estudios con  $N^{15}$  (Butler y Ladd, 1985b; Danso et al., 1987). Los efectos son normalmente influenciados no solo por la densidad de siembra, en sí, sino porque el propio sistema es afectado por fenómenos de competencia con otras plantas no fijadoras. Los anteriores trabajos estudian tal hecho, en forma que se van a discutir más ampliamente en el siguiente apartado (5.6.).

La defoliación como proceso que afecta a la fotosíntesis y, por lo tanto, indirectamente, a la FBN, ha sido también considerada. Como cabía esperar afecta negativamente los niveles de fijación (Butler, 1987).

La fertilización con S, como factor que influye en la FBN, fué también ensayada utilizando  $N^{15}$  y su efecto fué confirmado por esta metodología (Shock et al., 1984).

Finalmente hay que referir que el aporte de P, tanto por medios químicos, como por medios biológicos, fundamentalmente por micorrizas, va a tener una influencia importante en FBN, contrastada con  $N^{15}$ . Estos estudios, dada su incidencia directa en las investigaciones que aquí se presentan, van a ser objeto de un estudio particular (apartado 5.7.).

5.6. Aplicación de la técnica de la dilución isotópica ( $N^{15}$ ) para medir "Transferencia de N" y otros aspectos de la nutrición nitrogenada de las plantas

Tanto los cultivos mixtos de plantas fijadoras y no fijadoras ("intercropping") en sus distintas modalidades (Ofori y Stern, 1987) como las rotaciones de cultivos con ambos tipos de plantas, presentan unas peculiaridades notorias desde el punto de vista de la nutrición nitrogenada, tal como fueron analizadas previamente. La técnica de la dilución isotópica es una excelente herramienta de trabajo para cuantificar la circulación de N en el ecosistema.

En el caso de cultivos mixtos simultáneos, la técnica se ha empleado para estudiar la competición de las plantas por N (Butler y Ladd, 1985b; Ismaili y Weaver, 1986; Morris y Weaver, 1987), ó para estimar tal efecto de competición junto con el de aplicar fertilizantes nitrogenados y comparar su influencia en cultivos mixtos y separados de una misma pareja de plantas (Rao et al., 1987; Danso et al., 1988). Sin embargo el aspecto más estudiado y discutido en relación con esta temática es el uso de  $N^{15}$  para investigar la existencia, y cuantificar, en su caso, "Transferencia de N" desde la planta fijadora (leguminosa, por ejemplo) a la no fijadora (gramínea, por ejemplo). Se asume que ocurre, tal transferencia si el enriquecimiento (% de exceso atómico en  $N^{15}$ ) de la gramínea en mezcla con la leguminosa es menor que cuando la gramínea crece sola. Obviamente en todos los casos se añadía al suelo la misma cantidad y riqueza de un fertilizante marcado con  $N^{15}$ . La explicación es que si la gramínea en mezcla tiene una relación  $N^{15} / N^{14}$  más baja, cuando, teóricamente, la debía tener igual que en cultivo puro, es porque ha contado con una fuente adicional de N en relación  $N^{15} / N^{14}$  a nivel de abundancia natural, y esta sólo puede ser la atmósfera, a través de FBN por la leguminosa acompañante.

La transferencia se puede cuantificar mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Npd Trans} = \left( 1 - \frac{\% \text{ N}^{15} \text{ e.a. en no-Fij en mezcla}}{\% \text{ N}^{15} \text{ e.a. en no-Fij sola}} \right) \times 100$$

Trabajos experimentales recientes (Ofori et al., 1987; Boller y Nösberger, 1987; Ta y Faris, 1987 y 1988) y artículos de revisión (Heichel, 1987; Wearer, 1987) han demostrado la existencia de "Transferencia de N". Los mecanismos propuestos han sido el llamado de "excreción ó exudación directa" de compuestos nitrogenados por parte de la leguminosa, ó el de "descomposición de nódulos". Otros autores, por ejemplo Leadgard et al. (1985c) y Kumar Rao et al. (1987) no han encontrado evidencia isotópica que apoye la existencia de transferencia. En un ensayo de campo, antes aludido (Barea et al., 1989) se encontró que la transferencia ocurría en unos cortes y no en otros. Ello sugiere que fenómenos de mineralización o de fijación de  $\text{N}^{15}$  a componentes del suelo pueden enmascarar las apreciaciones a lo largo del ciclo de cultivo, lo que puede afectar las estimaciones del fenómeno.

La técnica de la dilución isotópica permite también estudiar el beneficio que una planta no fijadora puede obtener de un cultivo previo de una fijadora. Los estudios al efecto y su cuantificación ( $\text{N}^{15}$ ) han sido recientemente revisados (Heichel, 1987).

El uso de  $\text{N}^{15}$  para estudios de mineralización de materia orgánica (Schnürer y Rosswall, 1987; Muller y Sundman, 1988) junto con los expuestos sobre FBN y "Transferencia de N", concede a estas técnicas isotópicas un gran valor para cuantificar el "Balance de N" en el ecosistema.

#### 5.7. Uso de las técnicas que utilizan $\text{N}^{15}$ , para evaluar el papel de las micorrizas en FBN y "Transferencia de N"

La bibliografía sobre el tema es escasa, aunque suficiente para apoyar las posibilidades de la técnica para definir o cuantificar el

papel de las micorrizas en dichos procesos. Así Barea et al. (1987) encontraron que las MVA estimulaban la FBN en condiciones de campo. En dicho ensayo y en el de Ames et al. (1983 y 1984) también se sugiere que las MVA puedan captar ciertas formas de N del medio.

Esto estudios necesitan ser confirmados con medidas de los cambios en el "pool" aparente de N en suelo (valor A) como consecuencia de la acción de las MVA. Ello extendería a estas micorrizas VA capacidades que se sabe poseen otros tipos de micorrizas (Lundeberg, 1970; Stribley y Read, 1974). De hecho se conoce que los hongos VA son capaces de utilizar  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$  (Bowen y Smith, 1981) y de metabolizar  $\text{NH}_4^+$  via glutamino sintetasa (Smith et al., 1985).

Otro aspecto de interés es el referente al uso de  $\text{N}^{15}$  para estudiar el papel de las MVA en "Transferencia de N". Hace algún tiempo Whittingham y Read (1982) y Francis et al. (1986) sugirieron que las hifas VA podrían actuar como canales para la transferencia directa de nutrientes de planta a planta, ya que un mismo micelio puede ser compartido por plantas que crecen en vecindad. Tales estudios fueron confirmados con  $\text{P}^{32}$ , por Newman y Ritz (1986), pero estos autores indicaron que la "Transferencia directa", a través de la hifa que une raíz con raíz, no es muy importante, por lo que apoyan que la transferencia es indirecta, a través del suelo. Utilizando  $\text{N}^{15}$ , Kessel et al. (1985) y Haystead et al. (1988) indican la existencia de transferencia de N mediada por las hifas VA. En ambos ensayos los autores utilizaron una técnica de raíz compartida, por lo que el hecho debe ser confirmado en combinaciones de plantas fijadoras y no fijadoras crecidas en condiciones naturales.

No se dispone de bibliografía en la que se haya utilizado  $\text{N}^{15}$  para cuantificar el papel de las MVA tanto ayudando a las plantas (sistemas leguminosa-**Rhizobium**) a soportar condiciones que afectan negativamente la FBN u otros procesos de la nutrición nitrogenada ni tampoco existe información en la que se estudie, usando  $\text{N}^{15}$ , las

interacciones de las micorrizas con efecto en estos procesos.

Por todo lo que antecede, y a la vista de los OBJETIVOS del presente estudio, se diseñó un PLAN DE TRABAJO, que se refleja en los distintos puntos del capítulo de MATERIAL Y METODOS, que sigue.

### III.- MATERIALES Y METODOS

#### 1.- Parte general

##### 1.1. Obtención de suelos desprovistos de propágulos de micorriza.

El suelo utilizado, en cada ensayo, se empleó mezclado con arena de cuarzo, libre de nutrientes, en la proporción 5/2 (v/v) con objeto de mejorar su textura. Esta mezcla se tinalizó, a vapor fluente por una hora durante tres días consecutivos. Mediante este tratamiento se eliminan los propágulos de los hongos productores de micorrizas. Para regenerar los demás componentes de la microbiota se adiciona un filtrado de suelo sin esterilizar. Tal filtrado se obtiene dejando en maceración durante dos o tres horas, a temperatura ambiente, suelo natural y agua (1/1, en volumen). Después de una primera fase de agitación la mezcla se mantiene en reposo al objeto de que decante la fracción más gruesa y el sobrenadante se somete a una doble filtración a través de papel Watman nº 1. El filtrado se adiciona al suelo tinalizado con lo que se restituye nuevamente el componente biológico exento de propágulos formadores de micorrizas VA.

##### 1.2. Aplicación del fosfato soluble al suelo.

Debido a que el principal efecto producido por la micorrización VA se atribuye al aporte de fosfato que el huésped recibe en su asociación con el hongo, en cualquier ensayo que se pretenda evaluar un efecto adicional de la micorrización, o sea, que no sea como consecuencia de una mejor nutrición en fosfato; se utiliza la práctica de adicionar cantidades crecientes de este elemento de forma que se obtenga un gradiente de fosforo en suelo tal que en algún nivel se desarrollen plantas similares (de parecido porte y nutrición) a las crecidas en asociación con un hongo formador de

micorrizas. La obtención de curvas de dosis-respuesta al fosfato en plantas micorrizadas y no micorrizadas permite, además, definir el grado de dependencia de la planta a las micorrizas. El valor de P asimilable en el suelo, estimado por el método de extracción con bicarbonato sódico, 0.5 M (Olsen), normalmente expresado en ppm, se considera (Stribley et al., 1980) bastante adecuado para evaluar la disponibilidad del elemento en suelos neutro-alcalinos.

Para obtener un suelo con cantidades crecientes de fosfato se prepararon soluciones del nutriente, a pH = 7, que aportaban a la mezcla suelo-arena las cantidades de fosfato requeridas para conseguir las concentraciones deseadas. Estas fueron determinadas, para cada suelo, en ensayos previos dependiendo de la naturaleza del mismo, fundamentalmente su contenido en P y su capacidad fijadora. Una vez adicionadas las soluciones de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  a la mezcla suelo-arena se mantuvo en incubación a 20 C y humedad adecuada durante un mínimo de 2 semanas. Este tiempo se estima suficiente para conseguir la estabilidad en la concentración de P en la solución del suelo. Antes de ser distribuido en las macetas correspondientes se tomó una alícuota de cada nivel para determinar mediante el método adecuado (Olsen) la cantidad de P disponible para el vegetal en ese suelo.

### 1.3.- Tratamientos biológicos

#### 1.3.1.- Inoculación con hongos formadores de micorrizas VA.

El hongo elegido para los ensayos realizados en este estudio, fué la especie **Glomus mosseae**

. La razón para seleccionar el género **Glomus** radica en su abundancia en la mayoría de los habitat cultivables y dentro de ella, la especie **G. mosseae** posee unas características de adaptabilidad que se ajustan bastante al rango de pH comunmente encontrado en los suelos de la región y en muchos de la cuenca mediterránea.

El inoculo utilizado procedía siempre de la colección de la

Estación Experimental del Zaidín. Para su obtención, se inocularon esporas de *G. mosseae* (Nicol. y Gerd.) Gerd y Trappe (Gerdemann y Trappe, 1974) a plántulas de alfalfa que se cultivaron utilizando como substrato una mezcla suelo-arena (5:2) esteril en condiciones controladas de invernadero. Al cabo de unos 4-6 meses, y después de haber determinado que la micorrización era adecuada, se eliminó la parte aérea, y el suelo en donde se había desarrollado la micorriza se conservó en bolsas de plástico a 5 C durante varios meses antes de ser utilizado. En este suelo se habían desarrollado hifas (micelio generado a partir de la raíz colonizada), esporas y esporocarpos. Cada una de estas fracciones o sea el micelio (tanto dentro como fuera de la raíz) y las esporas (en forma de clamidosporas o englobadas en un esporocarpo), son potenciales generadores de biomasa fungica al colonizar una raíz susceptible, en presencia de la cual se repetiría nuevamente el ciclo, único capaz de la reproducción del microsimbionte.

Así pues, la mezcla suelo + raíces infectadas con *Glomus mosseae*, obtenido como se ha descrito, fué el inóculo utilizado en cada uno de los ensayos que constituyen este trabajo.

Este inóculo fué aplicado tanto en semillero como en macetas de cultivo definitivo. Una alicuota del mismo (1 g/ 100 g suelo) se depositó sobre una capa de suelo-arena esteril mezclandose con ella. En superficie se depositaron las semillas esterilizadas (cubriendose con una fina capa de arena) donde germinaron y crecieron en condiciones controladas de humedad y temperatura.

### 1.3.2. Inoculación de Rhizobium

Se efectuó sobre las semillas en el momento de ser depositadas en semillero. Se adicionó una suspensión de *Rhizobium meliloti* raza Gr 4 Brm cultivado durante 48 horas a 28 C en agitación en medio Allen 79 (1957).

### 1.3.3. Plantas y condiciones de cultivo

En todos menos en uno de los ensayos la planta utilizada fué **Medicago sativa** L. CV. Aragon crecida primeramente en semillero con mezcla suelo-arena estéril, adicionado de extracto de suelo natural más **Rhizobium**. Las semillas fueron asimismo esterilizadas con  $\text{Cl}_2\text{Hg}$  al 2.5% durante 12 min.. Después de sucesivos enjuagados con agua estéril para eliminar totalmente el esterilizante se depositaron en bateas adecuadas y con el soporte descrito. El suelo utilizado para la preparación de los semilleros correspondientes a cada ensayo fué el seleccionado para la realización del ensayo definitivo.

En todos los ensayos las plantas fueron inoculadas de micorriza en semillero al objeto de que los tratamientos correspondientes portaran la infección VA en el momento del trasplante.

Al estadio de plántula más o menos desarrollada, dependiendo del tipo ensayo, la alfalfa fué transplantada a los lugares de cultivo definitivos siendo para ello cuidadosamente seleccionadas en base a un homogéneo desarrollo radicular y de parte aérea. El número de plantas transplantadas siempre excedió en una unidad al número de ellas que posteriormente seguirían hasta cultivo completo. A la semana de crecimiento se extrajo cuidadosamente la planta sobrante dejándose las mejor implantadas que mostraban un desarrollo homogéneo.

El sistema de cultivo, mantenido inalterable a lo largo de los ensayos, se realizó bajo condiciones controladas de humedad, luz y temperatura (80% H.R; fotoperiodo de 16 h; complemento de luz de  $84,5\text{W m}^{-2}$  y un entorno de temperaturas de 15 - 19 C la nocturna y 19 - 25 C la diurna). Las macetas fueron distribuidas al azar siendo rotadas semanalmente de forma que todas ellas ocuparan las distintas posiciones posibles dentro del invernadero al objeto de eliminar diferencias posicionales. La humedad se mantuvo constante a lo largo de cada ensayo. Según la naturaleza del mismo, o fué aplicada por subirrigación diariamente o por pesada para restituir el agua perdida

y mantener la humedad requerida.

Semanalmente, las plantas fueron fertilizadas con 10 ml de una solución nutritiva (Hewitt, 1952) carente de N y P, modificada para ensayos con leguminosas (Azcon-Aguilar, 1980).

En el ensayo 2.1. se utilizó como planta de referencia no fijadora el "ryegrass" (*Lolium perenne*) c.v. Verna. En el ensayo 2.2. se empleó zulla (*Hedysarum coronarium*) inoculada (fijadora) o no (no-fijadora) con su *Rhizobium* específico.

#### 1.3.4. Adicción de N<sup>15</sup>

En todos los ensayos realizados con alfalfa, a los 10 días del transplante y una vez confirmado el éxito del mismo se procedió a la aplicación del fertilizante nitrogenado  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  marcado isotópicamente. La riqueza del producto utilizado fué de 10% átomos en exceso de N<sup>15</sup> y la dosis a la que se aplicó: 2 ppm N lo que equivale a 5 Kg N ha<sup>-1</sup>. En el ensayo realizado con *Hedysarum coronarium* las dosis y riqueza de N<sup>15</sup> aplicado se describen en el apartado correspondiente.

#### 1.3.5. Determinaciones

Al final de cada ensayo, cuya duración dependía de las características del mismo, se procedió en todos los casos a determinar el peso de la materia fresca de la parte aérea convenientemente separada del sistema radical.

La parte aérea constituida en todos los casos por tallos y hojas, ya que en ninguno de los ensayos se llegó a floración, se secó a 65 C durante 16 horas y una vez estimado su peso se determinó en ella el contenido en P (usando el método colorimétrico de Molibdato de Vanadio) y el N (por el método Nessler) después de digestión (Kjeldal) y los de K, Ca, y Mg, en su caso, mediante Absorción Atómica (Lachica et al., 1973).

Para evaluar la extensión de sistema radical que poseía colonización Vesículo-Arbuscular se tomó una alicuota del mismo constituida por la fracción central cortada en segmentos de 1 cm de longitud aproximadamente. Esta fracción fué tratada y teñida de acuerdo con la técnica descrita por Phillips y Hayman (1970). El método consiste en sumergir las raíces con KOH al 10% y mantenerlas durante 1 hora a 100 C. Una vez atacadas, por este procedimiento las cubiertas celulósicas de la raíz, se lavan repetidamente con agua del grifo para eliminar restos del KOH y posteriormente se tratan durante unos minutos con ClH 0.1 N al objeto de neutralizar. En este estado se procede a la tinción de las raíces. El colorante utilizado para visualizar las estructuras fungicas fué Azul-Tripan, que presenta afinidad por la quitina. El Azul-Tripan se disuelve en Lactofenol al 0.05% y se mantiene 5 min. a ebullición en contacto con las raíces. Pasado este tiempo se elimina el colorante. Para conservar la muestra se utiliza Lactofenol en solución acuosa.

#### Preparación del Lactofenol

Acido láctico.....	100 ml
Fenol.....	20 g
Glicerol.....	50 ml
H <sub>2</sub> O.....	40 ml

Esta tinción permite visualizar claramente las estructuras fungicas en la raíz, ya que muestran un intenso color azul, facilmente distinguible.

#### 1.3.6. Cuantificación de la micorrización

Se realizó por la técnica descrita por Giovannetti y Mosse (1980) que utiliza una placa cuadrada de 10 cm de lado. Toda la superficie de la placa está distribuida en cuadrículas de 1.3 cm y sobre ella se extienden, al azar, los fragmentos de raíces teñidas.



Mediante examen al microscopio binocular de disección (30 a 40 aumentos) se puede observar fácilmente si las raíces son portadoras o no del endofito formador de la micorriza por el color y morfología diferenciada de las estructuras características.

Para cuantificar el porcentaje de la longitud de raíces micorrizadas se determina el número de intersecciones de las raíces con la cuadrícula que presentan micorrización y de las que en el punto de cruce no la presentan. De acuerdo con las formulas que discuten los autores citados el % de intersecciones que muestran infección con respecto al total de intersecciones se considera el % de longitud de raíz que es micorriza.

#### 1.3.7. Cuantificación de la composición isotópica de N en tejidos vegetales

Se realizó por espectrometría de masas (Fridler y Proksch, 1975) en el laboratorio de Biotecnología Agrícola de FAO/IAEA, Seibersdorf (Austria).

Las fórmulas aplicadas son las expuestas en la parte de Introducción de esta Memoria (apartado 5.1; 5.2; 5.5 y 5.6).

#### 1.3.8. Suelos empleados

Los suelos utilizados para realizar los ensayos han sido tomados de la provincia de Granada. Antes de ser usados fueron tamizados a través de un tamiz de 2 mm de luz de malla.

Características analíticas de los suelos

	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>
pH (H <sub>2</sub> O)	7.79	8.00	7.45
Arcilla (%)	26.80	17.41	24.50
Limo (%)	45.70	58.76	53.00
Arena (%)	27.40	23.83	22.00
Materia orgánica (%)	1.40	2.50	1.16
Nitrógeno (%)	0.31	0.15	0.10
Fósforo disponible (ppm)	4.50	3.80	11.00
CO <sub>3</sub> Ca activo (%)	7.85	1.77	6.21

El suelo A fué utilizado en los siguientes ensayos: I) interacción **Rhizobium-Glomus mosseae** sobre cultivos separados o mezclados de alfalfa-**Lolium** a varios niveles de fosfato en el medio; II) efecto de N combinado sobre la FBN en **Hedysarum coronarium**, III) interacción **Rhizobium-alfalfa-Glomus mosseae** a diferentes niveles de potencial hidricos del suelo. Las características de este suelo lo hacian aconsejable para este tipo de ensayos.

El suelo B fué utilizado en el ensayo de interacción **Rhizobium-meliloti-alfalfa-Glomus mosseae** en suelo adicionado de concentraciones de sulfato de SO<sub>4</sub>Zn.

El suelo C fué seleccionado para determinar la interacción **Rhizobium-meliloti-alfalfa-Glomus mosseae** a diferentes niveles de salinidad aplicados al suelo.

## 2. ENSAYOS ESPECIFICOS

### 2.1. Interacción *Rhizobium meliloti*-*Glomus mosseae* sobre cultivos separados o mezclados de alfalfa y *Lolium* a varios niveles de fosfato en el medio.

Tanto en este ensayo como en los que posteriormente se describen el suelo utilizado fué siempre tratado de la forma expuesta en la parte General de este apartado.

Este ensayo se realizó en suelo A. El suelo fué distribuido en cuatro fracciones y tres de ellas se adicionaron de las siguientes cantidades crecientes de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ . A la primera fracción,  $P_1$ , se le añadieron  $125 \text{ mg/Kg}^{-1}$ . a la 2ª,  $P_2$ :  $250 \text{ mg/kg}^{-1}$  y a la 3ª,  $P_3$ :  $375 \text{ mg PO}_4\text{H}_2\text{K}$  por kg de suelo. Después del oportuno periodo de incubación se determinó el P soluble (Olsen) presente en cada fracción obteniéndose los siguientes resultados que expresados en ppm de P eran  $P_0 = 4.5$ ;  $P_1 = 9.9$ ;  $P_2 = 21.0$  y  $P_3 = 32.5$ .

Cada una de las cuatro fracciones de suelo obtenidas fueron distribuidas en 30 macetas de 500 ml de capacidad (500 g por maceta). La mitad de las cuales, o sea, 15 de cada tratamiento, fueron inoculadas con *Glomus mosseae*. De ellas, 5 fueron transplantadas con cuatro plantulas de alfalfa, otras 5 con cuatro plántulas de *Lolium* y las 5 restantes con el cultivo mixto alfalfa-*Lolium*, 2 plantas de cada especie vegetal. A los 10 días del trasplante se aplicó  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  con 10%  $\text{N}^{15}$  átomos en exceso a la dosis ya indicada. Las plantas se cultivaron en invernadero bajo condiciones controladas de luz, humedad y temperatura durante 2 meses. El agua fué administrada por subirrigación durante todo el periodo de cultivo.

### 2.2. Efecto del N combinado sobre la FBN en *Hedysarum coronarium*

Para el presente estudio se seleccionó la leguminosa *Hedysarum coronarium* ya que para evaluar el  $\text{N}_2$  fijado simbioticamente por una

leguminosa bajo niveles crecientes de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ , es preciso usar la metodología basada en el cálculo del "valor A". Para ello se requiere un control no fijador siendo el más apropiado la misma planta en ausencia de **Rhizobium**. Esta circunstancia era difícil de conseguir para **Medicago sativa**, ya que existían grandes riesgos de contaminación en el transcurso del ensayo en cultivos de invernadero, pues la propia agua del riego, no estéril, o el inóculo MVA utilizado, podían aportar **Rhizobium meliloti**, dado lo común de su presencia en el ambiente. Tal hecho se evitó por la utilización de **Hedysarum coronarium**, leguminosa inhabitual en el entorno.

El suelo utilizado fué el A. Se distribuyó en macetas de 500 ml de capacidad, colocándose en cada una de ellas 500 g de la mezcla suelo-arena. Todas ellas fueron inoculadas con **Glomus mosseae**. Las semillas de **Hedysarum coronarium**, fueron depositadas (tres por maceta), una vez germinadas en condiciones de esterilidad. De las 60 macetas preparadas 30 de ellas fueron inoculadas con **Rhizobium** específico de **Hedysarum** en el momento de la siembra, y las otras 30 se mantuvieron sin inocular. A los 10 días de cultivo se procedió a aplicar los distintos tratamientos de N. Cada 5 macetas fueron fertilizadas respectivamente con: 4,8, 16, 32, y 64  $\text{mg/kg}^{-1}$  de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ , marcado isotópicamente de 10%  $\text{N}^{15}$  átomos en exceso en el caso de las dos dosis más bajas (4 y 8  $\text{mg/kg}^{-1}$ ) y de 2%  $\text{N}^{15}$  átomos en exceso en las restantes. (16, 32 y 64  $\text{mg/kg}^{-1}$ ).

Las plantas se cultivaron en invernadero bajo condiciones controladas y la humedad se aplicó por subirrigación durante los cuatro meses de duración del ensayo.

### 2.3. Interacción **Rhizobium meliloti**-alfalfa-**Glomus mosseae** a diferentes niveles de potencial hídrico del suelo.

En este ensayo se utilizó así mismo el suelo A que se distribuyó en 5 partes iguales, 3 de ellas fueron adicionadas de cantidades crecientes de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ . Estas fueron suministradas en las siguientes

concentraciones: 150 mg (nivel  $P_1$ ); 200 mg (nivel  $P_2$ ) y 250 mg  $PO_4H_2K$  por kg de suelo (nivel  $P_3$ ). Después de la incubación adecuada se determinó el contenido en P soluble (Olsen) presente en cada una de las fracciones obteniéndose los valores de 10.3 ppm en el nivel  $P_1$ ; 15.6 ppm P en el  $P_2$  y 21.8 ppm P en el  $P_3$ . Las fracciones correspondientes a los tratamientos testigo y micorrizado, ambos sin adición de fosfato, tenían una concentración de 4.5 ppm.

De cada fracción se prepararon 20 macetas de 300 ml de capacidad cada una (300 g de suelo por maceta). Se utilizaron plántulas de 5 días que fueron trasplantadas, en número de 3, a las macetas previamente preparadas. A la semana del trasplante, y una vez dejadas 2 plantas/maceta, se procedió a aplicar el tratamiento hídrico correspondiente. A cada fracción de suelo se aplicaron 4 regímenes hídricos: 100%, 90%, 82.5% y 75% de la capacidad de campo, manteniéndose, por pesada, estos niveles de humedad en suelo constantes a lo largo de todo el ensayo. El punto de marchitamiento en ese suelo era 70% de la capacidad de campo. A los 10 días del trasplante se realizó la aplicación de  $SO_4(NH_4)_2$  marcado isotópicamente. El cultivo se realizó en invernadero bajo condiciones controladas, cosechándose a los tres meses.

#### 2.4. Interacción *Rhizobium meliloti*-alfalfa-*Glomus mosseae* a diferentes niveles de salinidad aplicados al suelo.

Este ensayo fué realizado utilizando un suelo (C) cuya conductividad en el extracto de saturación era de  $2.5 \text{ dS m}^{-1}$  lo que lo caracteriza como no salino. Se distribuyó en 5 fracciones, de las cuales tres fueron adicionadas de concentraciones crecientes de  $PO_4H_2K$ : 50 ( $P_1$ ); 100 ( $P_2$ ); y 150 ( $P_3$ )  $\text{mg kg}^{-1}$  de suelo. Después de la incubación, las concentraciones de P (Olsen) en el momento de realizar el ensayo fueron:  $P_1 = 25 \text{ ppm}$   $P_2 = 37 \text{ ppm}$   $P_3 = 50 \text{ ppm}$ . Los tratamientos T y M, sin adición de fosfato, contenían 11 ppm. Cada fracción de suelo fué distribuida en macetas de 500 ml de capacidad.

Cada una de ellas recibieron 5 plántulas de alfalfa carentes de micorrización a excepción de las del tratamiento micorrizado. Pasados 2-3 días del trasplante (dejadas a 3 plantas/maceta) se procedió a aplicar, gradualmente, las soluciones que aportaban la salinidad al medio. Así pues, de las 35 macetas preparadas por cada fracción, 7 repeticiones permanecieron tal cual (T) y de las 28 restantes, 7 por cada nivel de salinidad, fueron adicionados de concentraciones crecientes de una solución de  $\text{ClNa}$ ,  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  y  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ . La composición de la solución para alcanzar el nivel 1 de salinidad ( $S_1$ ) fué 2 g  $\text{ClNa}$ , 1,4 g  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  y 0.65 g  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  en 1000 ml/agua. Los siguientes niveles ( $S_2$ ,  $S_3$  y  $S_4$ ) se consiguieron aplicando soluciones de una concentración salina doble, triple ó cuádruple de la primera. El aporte de estas soluciones fué gradual (20 ml/día) durante 9 días alternos, de manera que cada maceta recibiera 180 ml de la respectiva solución que provocaron en el suelo salinidades crecientes, que medidas como conductividad en el extracto de saturación (Alison, 1973), dieron los siguientes valores: 13.8 ( $S_1$ ), 22.2 ( $S_2$ ), 28.8 ( $S_3$ ) y 43.5 ( $S_4$ )  $\text{dS m}^{-1}$ . En este ensayo la humedad se mantuvo constante a capacidad de campo (18.2%).

Como en los ensayos ya descritos, a los diez días de crecimiento vegetal, cada maceta recibió el aporte correspondiente de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  enriquecido isotópicamente.

El cultivo se llevó a cabo en condiciones controladas de invernadero durante 10 semanas al cabo de las cuales se procedió a determinar los parámetros previamente mencionados.

#### 2.5. Interacción *Rhizobium meliloti*-alfalfa-*Glomus mosseae* en suelo adicionado de concentraciones crecientes de $\text{SO}_4\text{Zn}$ .

Para la realización de este ensayo se seleccionó el suelo B que poseía una concentración de Zn de 0.44 ppm utilizando DTPA como extractante (Lindsay y Norwell, 1978). Este contenido en Zn lo hacía aconsejable para el presente ensayo, ya que según Sing y Abrod (1986)

la deficiencia en este elemento se establece por debajo 0.5 ppm Zn asimilable.

De las cinco fracciones en las que fué separado el suelo, tres de ellas se adicionaron de niveles crecientes de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  a las siguientes concentraciones: 150, 200 y 250  $\text{mg/kg}^{-1}$  de suelo respectivamente. Después de la incubación, el P soluble evaluado fué: 10,05 ( $\text{P}_1$ ), 12,22 ( $\text{P}_2$ ) y 15,03 ( $\text{P}_3$ ) ppm P (Olsen). En los tratamientos micorrizados y testigo ( $\text{P}_0$ ) el contenido en P asimilable era 3.8 ppm. El suelo correspondiente a cada fracción, o nivel de P, fué distribuido en 25 macetas de 500 ml de capacidad (500 g/maceta) de las cuales 5 permanecieron tal cual y en el resto se aplicaron cuatro niveles de  $\text{SO}_4\text{Zn}$  en lotes de 5 repeticiones cada uno.

La capacidad de fijación del suelo para este elemento fué evaluada en un ensayo preliminar en el que se determinó que era capaz de retener un 50% si las cantidades adicionadas eran superiores a 100 ppm y un 75% para concentraciones de Zn inferiores a 100 ppm. Dicho ensayo preliminar permitió seleccionar las dosis de sulfato de zinc que aportaran al medio concentraciones de 5 y 10 ppm Zn (niveles bajos) y 400 y 800 ppm Zn (niveles altos).

Después de adicionar las cantidades de  $\text{SO}_4\text{Zn}$  seleccionadas el suelo se mantuvo durante dos semanas en incubación para estabilizar los contenidos de este elemento.

A los 10 días de trasplantadas las plántulas de alfalfa, al igual que en ensayos anteriores, se les aplicó el fertilizante N marcado isotópicamente. A lo largo del cultivo, llevado a cabo en las ya citadas condiciones controladas de invernadero, el agua fué suministrada diariamente por subirrigación.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados que configuran la presente Memoria Doctoral, considerados de forma global, ofrecen tres tipos de peculiaridades: a) En cada ensayo se investiga la incidencia de un factor, o condición, diferente sobre el sistema **Rhizobium**-leguminosa-micorriza. Ello crea una serie de situaciones experimentales diferentes y particulares que hay que analizar separadamente. b) En todos los casos hay unos hechos comunes, ya que se trata de investigar la incidencia de factores que pueden ser habituales en el ecosistema y que afectan, en general, de forma negativa, aunque, en casos, positiva, tanto a la planta como a FBN. Estos factores van a interaccionar con un factor biológico, como es la micorriza, que se sabe estimula FBN y que además ayuda a la planta, en sí, a prosperar en situaciones de dificultad. Finalmente, c), el resultado de las interacciones sobre FBN se evalúa por una técnica común en todos los casos, como es la basada en la aplicación de fertilizantes marcados

con  $N^{15}$ , cuyo uso generalizado necesita investigación y discusión. Por todo lo que antecede y para facilitar la exposición y discusión de los resultados se ha optado por tratar esta problemática, primero, en un capítulo (el presente) de RESULTADOS Y DISCUSION, en el que se analiza cada uno de los ensayos por separado; segundo, en un capítulo de DISCUSION GENERAL (que seguirá) en el que se contempla un análisis global: a) de la aplicabilidad de la metodología del  $N^{15}$ , b) de los resultados más trascendente y c) de los avances que aportan al conocimiento del ecosistema suelo-planta-atmósfera.

Antes de discutir los resultados obtenidos conviene puntualizar los siguientes aspectos: En primer lugar, solo se analizó la parte aérea de las plantas, por dificultades metodológicas en análisis de  $N^{15}$  en raíz. Realmente, al tiempo que se cortan los ensayos no parece ser muy significativa la discriminación isotópica entre parte aérea y raíz (Danso, 1988). En segundo lugar, los resultados obtenidos se exponen dando el valor medio de al menos, 5 repeticiones y el "Error Standard" al 5% de probabilidad.

1. INTERACCION DE *Rhizobium-Glomus mosseae* EN CULTIVOS SEPARADOS O MIXTOS DE ALFALFA Y LOLIUM, A VARIOS NIVELES DE FOSFATO EN EL SUELO.

1.1. Efectos sobre la formación de la micorriza

La primera observación destacable es que, en el caso de la leguminosa, ni el sistema de cultivo ni el nivel de fósforo en suelo afectaron, de forma considerable, el nivel de micorrización de las plantas (Tabla 1). Obviamente, la cantidad de P añadida, teniendo en cuenta la capacidad del suelo para retener fósforo, no fue suficiente para inhibir la micorrización. En el caso de *Lolium* la situación es la misma en lo que se refiere a las adiciones de P; sin embargo, la presencia de la leguminosa en cultivo mixto, por ser esta más micotrófica, incrementó el nivel de micorrización de la gramínea, sirviendo de fuente de inóculo para ella. Se acepta que no es posible definir un modelo generalizable para explicar los cambios en los niveles de micorrización de plantas cuando se compara el monocultivo y el cultivo mezclado (Newman, 1985). Es más, el efecto de una especie sobre la formación de MVA por otra que crece en proximidad, parece ser específico de cada combinación particular de especies (Ocampo et al., 1980). En el presente estudio, concretamente, la alfalfa estimuló la micorrización de *Lolium*.

TABLA 1

Efectos de la interacción entre nivel de P añadido al suelo (Pn), sistema de cultivo, inoculación con micorrizas (M) -frente a control no micorrizado (C)- sobre la longitud de raíz micorrizada (%).

Nivel de Fosfato en suelo	MONOCULTIVOS				CULTIVOS MIXTOS			
	ALFALFA		LOLIUM		ALFALFA		LOLIUM	
	C	M	C	M	C	M	C	M
4.5 <sup>P</sup>		63 ±7		27 ±4		64 ±7		49 ±6
9.9 <sup>P</sup>		80 ±7		28 ±5		72 ±8		40 ±6
21.0 <sup>P<sub>2</sub></sup>		71 ±8		18 ±5		67 ±6		43 ±7
32.5 <sup>P<sub>3</sub></sup>		69 ±8		23 ±4		64 ±9		39 ±8
$\bar{X}_P$		71		24		67		43

Niveles de P ( $PO_4H_2K$  mg/Kg) : 1=125 ; 2=250 ; 3=375



### 1.2. Efectos sobre el crecimiento de las plantas

Se comprobó que las MVA estimularon el crecimiento de las plantas independientemente del nivel de fosfato y, en el caso de alfalfa, también del sistema de cultivo ensayado (Tabla 2). Se aprecia que hay una tendencia a que decrezca el crecimiento de las plantas de alfalfa a niveles que pueden considerarse supraóptimos para ciertos procesos (nivel P<sub>3</sub>). Reforzando información conocida (Munns y Mosse, 1980; Barea y Azcón-Aguilar, 1983) se comprobó que las MVA mejoraron la capacidad competitiva de las leguminosas frente a gramíneas (Tabla 2). A pesar de este efecto de las MVA la competencia entre alfalfa y **Lolium** tendió a que disminuyera la cosecha de la leguminosa al incrementar la concentración de P en el suelo, confirmando información previa (ver Hayman, 1986).

MVA estimularon el crecimiento de la planta

TABLA 2

Efectos de la interacción entre nivel de P añadido al suelo (Pn), sistema de cultivo, inoculación con micorrizas (M) -frente a control no micorrizado (C)- sobre el peso seco (mg/maceta) en plantas de Lolium y alfalfa.

Nivel de Fósforo en suelo	MONOCULTIVOS				CULTIVOS MIXTOS					
	ALFALFA		LOLIUM		ALFALFA		LOLIUM		TOTAL	
	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M
0	298 ± 73	1010 ± 90	770 ± 62	929 ± 114	21 ± 7	518 ± 92	782 ± 37	537 ± 69	804 ± 36	1055 ± 94
1	494 ± 85	1033 ± 37	814 ± 47	942 ± 53	68 ± 6	386 ± 45	793 ± 145	780 ± 128	860 ± 139	1189 ± 135
2	1273 ± 69	1278 ± 116	836 ± 31	1261 ± 38	369 ± 131	381 ± 62	813 ± 75	851 ± 125	1183 ± 198	1233 ± 100
3	563 ± 83	1071 ± 115	875 ± 99	1033 ± 123	139 ± 28	267 ± 52	881 ± 93	937 ± 120	1001 ± 59	1205 ± 112
X <sub>P</sub>	657	1099	824	1041	149	388	817	776	961	1170

A pesar del efecto de la MVA, la competencia entre aa y lolium tendió a disminuir la cosecha de la planta de aa al aumentar el P.

### 1.3. Efecto sobre la nutrición en P

Independientemente de sistema de cultivo y del nivel de fosfato en suelo las MVA estimularon la captación de P por las plantas de alfalfa, tanto estimada como concentración de P (Tabla 3) como de P total en la biomasa (Tabla 4). Esto también es aplicable a **Lolium** en el caso de cultivos mixtos. Es de destacar este hecho que las micorrizas ayuden a la planta de **Lolium** a captar P del suelo en mezcla mientras que la simbiosis parece menos efectiva para esta gramínea en monocultivo, ya que el contenido de P (Tabla 4) fué menor en **Lolium** con o sin micorrizas . Estos hechos pueden explicarse por las características geométricas y morfológicas del sistema radical en estas gramíneas (Haynes, 1980) que no necesita ser reforzado por hifas de la micorriza a no ser en situaciones competitivas (Haynes, 1980).

TABLA 3

Efectos de la interacción entre nivel de P añadido al suelo (Pn), sistema de cultivo, inoculación con micorrizas (M) -frente a control no micorrizado (C)- sobre la concentración de P en planta (%).

Nivel de Fósforo en suelo	MONOCULTIVOS				CULTIVOS MIXTOS			
	ALFALFA		LOLIUM		ALFALFA		LOLIUM	
	C	M	C	M	C	M	C	M
P <sub>0</sub>	0.18 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.30 ± 0.01
P <sub>1</sub>	0.10 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.20 ± 0.01
P <sub>2</sub>	0.16 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.25 ± 0.01	0.32 ± 0.02
P <sub>3</sub>	0.15 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.29 ± 0.01
X <sub>P</sub>	0.15	0.20	0.26	0.20	0.11	0.17	0.20	0.28

TABLA 4

Efectos de la interacción entre nivel de P añadido al suelo (Pn), sistema de cultivo, inoculación de con micorrizas (M) -frente a control no micorrizado (C)- sobre el contenido total de P (mg/maceta) en plantas de Lolium y alfalfa.

Nivel de Fósforo en suelo	MONOCULTIVOS				CULTIVOS MIXTOS					
	ALFALFA		LOLIUM		ALFALFA		LOLIUM		TOTAL	
	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M
P <sub>0</sub>	0.52 ±0.05	1.46 ±0.05	1.96 ±0.17	1.51 ±0.06	0.02 ±0.01	0.77 ±0.17	1.34 ±0.01	1.61 ±0.16	1.36 ±0.10	2.37 ±0.24
P <sub>1</sub>	0.47 ±0.04	1.79 ±0.02	2.13 ±0.06	2.26 ±0.14	0.06 ±0.01	0.68 ±0.07	1.45 ±0.17	1.62 ±0.16	1.51 ±0.16	2.29 ±0.18
P <sub>2</sub>	2.08 ±0.13	3.13 ±0.07	2.46 ±0.14	2.47 ±0.06	0.54 ±0.14	0.75 ±0.07	2.06 ±0.14	2.74 ±0.22	2.60 ±0.29	3.50 ±0.19
P <sub>3</sub>	0.85 ±0.07	2.45 ±0.31	2.06 ±0.14	1.94 ±0.16	0.17 ±0.06	0.42 ±0.05	1.82 ±0.21	2.77 ±0.24	1.98 ±0.21	3.18 ±0.24
X <sub>P</sub>	0.98	2.21	2.12	2.04	0.20	0.66	1.67	2.20	1.86	2.83

en esta tabla se ve la respuesta de las plantas de alfalfa a la micorriza; mientras que es efecto de la micorriza en Lolium.

#### 1.4. Efectos sobre la nodulación y nutrición nitrogenada de las plantas

Salvo contadas excepciones las plantas de alfalfa micorrizadas muestran una concentración (Tabla 5) y contenido en N (Tabla 6) superior que los correspondientes controles no micorrizados. Esto podría explicarse simplemente por el efecto bien conocido de las MVA sobre la nodulación (Barea y Azcón-Aguilar, 1983 y Hayman, 1986), lo cual se muestra claramente en Tabla 7. Sin embargo, otros factores deben estar también implicados para poder justificar ciertas situaciones. Por ejemplo, la biomasa de N en parte aérea (Tabla 6) no se correlaciona bien con la nodulación (Tabla 7), lo que sugiere que podrían estar actuando ciertas interacciones entre el P y el N a nivel de adquisición de estos nutrientes del suelo (Azcón et al., 1978). El sistema de cultivo afectó la captación de N, y la nodulación.

Las interacciones entre micorrización, nivel de P en suelo y sistema de cultivo, y sus consecuencias sobre la nutrición nitrogenada de *Lolium* (Tabla 6) no muestran una tendencia generalizable; sin embargo, se puede decir que la micorrización, globalmente, mejoró el contenido en N de *Lolium*, en monocultivo (Tabla 6), especialmente en los niveles P<sub>2</sub> y P<sub>3</sub> de adición de fosfato.

TABLA 5

Efectos de la interacción entre nivel de P añadido al suelo (Pn), sistema de cultivo, inoculación con micorrizas (M) -frente a control no micorrizado (C)- sobre la concentración de N en planta (%).

Nivel de Fósforo en suelo	MONOCULTIVOS				CULTIVOS MIXTOS			
	ALFALFA		LOLIUM		ALFALFA		LOLIUM	
	C	M	C	M	C	M	C	M
P <sub>0</sub>	1.89 ± 0.07	1.76 ± 0.05	0.82 ± 0.02	0.69 ± 0.01	2.06 ± 0.09	2.49 ± 0.25	0.72 ± 0.07	0.88 ± 0.01
P <sub>1</sub>	1.77 ± 0.21	2.22 ± 0.04	0.80 ± 0.05	0.77 ± 0.02	2.20 ± 0.18	2.42 ± 0.30	0.76 ± 0.02	0.81 ± 0.01
P <sub>2</sub>	1.79 ± 0.05	2.05 ± 0.02	0.77 ± 0.02	0.68 ± 0.01	1.70 ± 0.09	2.09 ± 0.22	0.87 ± 0.01	0.80 ± 0.01
P <sub>3</sub>	1.24 ± 0.06	2.25 ± 0.04	0.70 ± 0.03	0.77 ± 0.01	1.96 ± 0.06	1.97 ± 0.15	0.88 ± 0.02	0.86 ± 0.01
$\bar{X}_P$	1.67	2.07	0.77	0.73	1.98	2.25	0.81	0.84



TABLA 6

Efectos de la interacción entre nivel de P añadido al suelo (Pn), sistema de cultivo, inoculación con micorrizas (M) -frente a control no micorrizado (C)- sobre el contenido Total de N (mg/maceta) en plantas de Lolium y alfalfa.

Nivel de Fostato en suelo ▼	MONOCULTIVOS				CULTIVOS MIXTOS					
	ALFALFA		LOLIUM		ALFALFA		LOLIUM		TOTAL	
	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M
P <sub>0</sub>	5.61 ± 1.11	17.70 ± 1.20	6.35 ± 0.50	6.42 ± 0.62	0.43 ± 0.15	12.82 ± 2.17	5.61 ± 0.61	4.73 ± 0.50	5.85 ± 0.74	17.58 ± 1.98
P <sub>1</sub>	8.67 ± 0.83	22.95 ± 0.55	6.56 ± 0.67	7.27 ± 0.25	1.49 ± 0.08	9.42 ± 0.97	6.05 ± 0.90	6.48 ± 1.02	7.53 ± 0.89	15.90 ± 1.87
P <sub>2</sub>	22.82 ± 0.99	26.29 ± 2.50	6.41 ± 0.77	8.67 ± 0.16	6.40 ± 1.35	7.92 ± 0.61	7.05 ± 0.61	6.81 ± 1.10	13.29 ± 2.39	15.14 ± 0.97
P <sub>3</sub>	6.98 ± 1.00	24.17 ± 2.73	6.18 ± 0.80	8.01 ± 0.89	2.72 ± 0.37	5.32 ± 0.80	7.79 ± 0.68	8.02 ± 0.93	10.51 ± 0.63	11.28 ± 0.50
X̄ <sub>P</sub>	11.02	22.10	6.25	6.82	2.72	8.16	6.62	6.51	9.29	14.97

Se nota un aumento muy marcado en el contenido de N. en las plantas de alfalfa inoculada sobre el lolium en el caso de P<sub>1</sub>/no tuvo efecto (lo mismo X que ocurrió)

TABLA 7

Efectos de la interacción entre nivel de P añadido al suelo (Pn), sistema de cultivo, inoculación con micorrizas (M) -frente a control no micorrizado (C)- sobre el número de nódulos (por maceta) en plantas de alfalfa.

Nivel de Fósforo en suelo	MONOCULTIVOS				CULTIVOS MIXTOS			
	ALFALFA		LOLIUM		ALFALFA		LOLIUM	
	C	M	C	M	C	M	C	M
$P_0$	62 ± 6	78 ± 8			8 ± 3	58 ± 6		
$P_1$	65 ± 7	82 ± 9			58 ± 7	65 ± 7		
$P_2$	66 ± 6	80 ± 7			68 ± 7	110 ± 12		
$P_3$	60 ± 6	80 ± 8			70 ± 9	115 ± 10		
$\bar{X}_P$	63	80			51	87		

### 1.5. Efecto sobre la FBN

Como cabia esperar el enriquecimiento en  $N^{15}$  de la gramínea fue con mucho superior al de la leguminosa (Tabla 8), indicando una dilución de  $N^{15}$  con  $N^{14}$  fijado de la atmósfera, en el caso de la leguminosa (Fried y Middleboe, 1977). Estos datos son críticos por que van a permitir calcular todos los parámetros en relación con la nutrición nitrogenada de las plantas entre ellos los que siguen, referentes a FBN.

Es evidente que la micorrización incrementó el porcentaje de N en planta que procede de fijación (Tabla 9), así como el total de N derivado de dicha fuente (Tabla 10), calculado teniendo en cuenta la biomasa de N en planta (Tabla 6). Tal efecto se manifestó en todas las situaciones estudiadas (Tablas 9 y 10). Estos resultados confirman, en condiciones controladas donde se dispone de plantas no micorrizadas, hechos encontrados en ensayos de campo (Barea et al., 1987). Es de hacer notar que la alfalfa en mezcla derivó casi todo su nitrógeno de la fijación. Esto se puede explicar o bien porque la gramínea estimuló el proceso de FBN o, meramente, porque la mayor capacidad competitiva de la gramínea por N, lo que reduce en N del suelo que es disponible para la leguminosa. Ambas posibilidades tienen apoyos en la literatura científica (Butler y Ladd, 1985 b; Ta y Faris, 1987). De hecho, la competición entre alfalfa y **Lolium** hizo decrecer la cantidad total de N fijado, en la mayoría de los casos (Tabla 10).

P. Fert.

TABLA 8

Efectos de la interacción entre nivel de P añadido al suelo (Pn), sistema de cultivo, inoculación con micorrizas (M) -frente a control no micorrizado (C)- sobre el % N<sup>15</sup> a.e. en plantas de Lolium y alfalfa.

Nivel de Fósforo en suelo	MONOCULTIVOS				CULTIVOS MIXTOS			
	ALFALFA		LOLIUM		ALFALFA		LOLIUM	
	C	M	C	M	C	M	C	M
P <sub>0</sub>	0.151 ±0.002	0.130 ±0.005	0.462 ±0.004	0.370 ±0.002	0.026 ±0.005	0.006 ±0.001	0.378 ±0.001	0.408 ±0.001
P <sub>1</sub>	0.052 ±0.007	0.050 ±0.001	0.430 ±0.002	0.332 ±0.005	0.020 ±0.002	0.003 ±0.001	0.403 ±0.001	0.360 ±0.005
P <sub>2</sub>	0.059 ±0.001	0.027 ±0.001	0.421 ±0.007	0.306 ±0.002	0.007 ±0.004	0.006 ±0.004	0.399 ±0.007	0.360 ±0.001
P <sub>3</sub>	0.096 ±0.001	0.025 ±0.001	0.412 ±0.002	0.349 ±0.001	0.021 ±0.004	0.005 ±0.001	0.317 ±0.001	0.351 ±0.005
X <sub>p</sub>	0.089	0.058	0.431	0.339	0.018	0.005	0.374	0.356

Bue con mucho superior al de alfalfa

el enriquecimiento en N<sup>15</sup> fue en gran medida mucho superior al alfalfa

TABLA 9

Efectos de la interacción entre nivel de P añadido al suelo (Pn), sistema de cultivo, inoculación con micorrizas (M) -frente a control no micorrizado (C)- sobre el % Npd Fij en plantas de alfalfa.

Nivel de Fósforo en suelo	MONOCULTIVOS				CULTIVOS MIXTOS			
	ALFALFA		LOLIUM		ALFALFA		LOLIUM	
	C	M	C	M	C	M	C	M
P <sub>0</sub>	67.18 ± 0.86	64.36 ± 1.66			93.14 ± 1.41	98.50 ± 0.62		
P <sub>1</sub>	87.86 ± 1.81	85.60 ± 1.58			95.06 ± 0.69	98.50 ± 0.31		
P <sub>2</sub>	85.96 ± 0.57	91.12 ± 0.22			98.20 ± 1.09	98.05 ± 1.56		
P <sub>3</sub>	76.72 ± 0.53	92.85 ± 0.29			93.14 ± 1.37	98.50 ± 0.34		
X <sub>P</sub>	79.43	83.48			94.88	98.58		

En cultivo mixto se ve un ~~amplio~~ ligero aumento de porcentaje de N procedente de la fijación

TABLA 10

Efectos de la interacción entre nivel de P añadido al suelo (Pn), sistema de cultivo, inoculación con micorrizas (M) -frente a control no micorrizado (C) sobre el Total de Npd Fij en plantas de alfalfa.

Nivel de Fósforo en suelo	MONOCULTIVOS				CULTIVOS MIXTOS			
	ALFALFA		LOLIUM		ALFALFA		LOLIUM	
	C	M	C	M	C	M	C	M
P <sub>0</sub>	3.76 ±0.76	11.38 ±0.81			0.40 ±0.13	12.66 ±2.10		
P <sub>1</sub>	7.62 ±0.74	19.64 ±0.42			1.41 ±0.07	9.35 ±0.86		
P <sub>2</sub>	19.61 ±0.74	23.94 ±2.23			6.13 ±1.36	7.77 ±0.57		
P <sub>3</sub>	5.35 ±0.74	22.44 ±2.48			2.54 ±0.37	5.18 ±0.78		
X̄ <sub>P</sub>	9.08	19.35			2.58	8.74		

### 1.6. Efectos sobre la captación de N del fertilizante o suelo (Técnica de N<sup>15</sup>)

Los datos correspondientes a % Npd Fert (Tabla 11) y Total Npd Fert (Tabla 12) indican que el sistema de cultivo cambió los modelos de captación de N<sup>15</sup> en ambas plantas. Concretamente el cultivo mixto favoreció a la gramínea con respecto a la leguminosa en cuanto a su capacidad competitiva para captar el fertilizante marcado (Tabla 12, considerando mitad de plantas en cultivo mixto). También es evidente la existencia de un efecto negativo de la micorrización sobre la captación de N por las plantas, tanto en lo que concierne al % que proviene del fertilizante (Tabla 11) como en el caso de alfalfa al que proviene del suelo (Tabla 13).

Resulta evidente que las interacciones investigadas en el presente estudio producen cambios en las capacidades de captación de N que merecen comentarios adicionales. De un lado, un parámetro clave a considerar es el valor A del suelo. Los cálculos de este parámetro se resumen en la Tabla 15. Es obvio que estos cálculos sólo deben efectuarse para suelos en donde no han crecido plantas fijadoras, por ello en la mencionada Tabla 15 se consignan los, valores correspondientes a **Lolium** aunque se exponen tanto los referentes al monocultivo (auténticamente válidos) como al cultivo mixto (dudosos por la presencia de leguminosa que puede alterar las estimaciones del valor A). Es evidente que los cálculos referidos al monocultivo de **Lolium** demuestran que el llamado valor A ó "pool" aparente de N en suelo es superior en macetas micorrizadas que en los controles correspondientes, para todos los niveles de P. Este hecho es una evidencia isotópica de que las MVA están implicadas en la captación de N del suelo. Los datos de la Tabla 14 referentes al total de N que las plantas captan del suelo (especialmente en monocultivos) apoya la anterior observación. Las formas de N sobre las cuales las MVA tienen una influencia particular merecen un análisis especial que se reserva para la DISCUSION GENERAL.

Volviendo a los aspectos de competencia por N del suelo entre gramíneas y leguminosas, hay que indicar que los resultados obtenidos en este ensayo (Tabla 14) concuerdan con las apreciaciones de Butler y Ladd (1985 b). No obstante, podría ser que, además de tal ventaja competitiva de **Lolium** para conseguir N del suelo, ocurriera transferencia de N desde la leguminosa. Para evaluar una posible transferencia de N hay que basarse en los datos de la Tabla 8, correspondientes al enriquecimiento de las plantas, y aplicar la fórmula en apartado 5.6 (INTRODUCCION). Estos cálculos se resumen como sigue. En plantas no micorrizadas  $P_0 = 18 \quad 1\%$ ;  $P_1 = 6.2 \quad 2\%$ ;  $P_2 = 5.2 \quad 3\%$  y  $P_3 = 23 \quad \%$ ; para plantas micorrizadas aparentemente sólo ocurrió transferencia en el tratamiento  $P_1$ , y esto significó un 8.5 2%. Los valores están de acuerdo con estimaciones efectuadas en estudios previos (Ta y Faris, 1987).

TABLA 11

Efectos de la interacción entre nivel de P añadido al suelo (Pn), sistema de cultivo, inoculación con micorrizas (M) -frente a control no micorrizado (C)- sobre el % Npd Fert en plantas de Lolium y alfalfa.

Nivel de Fósforo en suelo	MONOCULTIVOS				CULTIVOS MIXTOS			
	ALFALFA		LOLIUM		ALFALFA		LOLIUM	
	C	M	C	M	C	M	C	M
P <sub>0</sub>	1.41 ±0.25	1.30 ±0.05	4.30 ±0.02	3.70 ±0.02	0.26 ±0.05	0.06 ±0.01	3.78 ±0.01	4.08 ±0.01
P <sub>1</sub>	0.52 ±0.07	0.50 ±0.01	4.30 ±0.02	3.32 ±0.05	0.20 ±0.02	0.03 ±0.01	4.03 ±0.01	3.60 ±0.05
P <sub>2</sub>	0.59 ±0.01	0.27 ±0.01	4.21 ±0.07	3.06 ±0.02	0.07 ±0.04	0.06 ±0.04	3.99 ±0.07	3.06 ±0.01
P <sub>3</sub>	0.96 ±0.01	0.25 ±0.01	4.12 ±0.02	3.49 ±0.01	0.21 ±0.04	0.05 ±0.01	3.17 ±0.01	3.51 ±0.05
X <sub>P</sub>	0.87	0.58	4.23	3.39	0.18	0.05	3.74	3.56

TABLA 12

Efectos de la interacción entre nivel de P añadido al suelo (Pn), sistema de cultivo, inoculación con micorrizas (M) -frente a control no micorrizado (C). sobre el Total Npd Fert (mg/maceta) en plantas de Lolium y alfalfa.

Nivel de Fosfato en suelo ▼	MONOCULTIVOS				CULTIVOS MIXTOS					
	ALFALFA		LOLIUM		ALFALFA		LOLIUM		TOTAL	
	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M
P <sub>0</sub>	0.08 ±0.02	0.23 ±0.02	0.27 ±0.02	0.24 ±0.02	0.001 -	0.007 -	0.21 ±0.02	0.17 ±0.01	0.21 ±0.02	0.17 ±0.02
P <sub>1</sub>	0.04 ±0.01	0.11 ±0.01	0.28 ±0.02	0.24 ±0.09	0.003 -	0.003 ±0.001	0.24 ±0.02	0.23 ±0.04	0.25 ±0.02	0.23 ±0.04
P <sub>2</sub>	0.13 ±0.01	0.07 ±0.01	0.27 ±0.01	0.26 ±0.01	0.004 ±0.001	0.005 -	0.28 ±0.02	0.21 ±0.04	0.28 ±0.02	0.21 ±0.02
P <sub>3</sub>	0.06 -	0.06 -	0.26 ±0.07	0.28 ±0.02	0.005 ±0.001	0.003 ±0.001	0.25 ±0.01	0.28 ±0.02	0.25 ±0.01	0.28 ±0.02
X <sub>P</sub>	0.08	0.11	0.27	0.27	0.003	0.004	0.24	0.22	0.25	0.22

TABLA 13

Efectos de la interacción entre nivel de P añadido al suelo (Pn), sistema de cultivo, inoculación con micorrizas (M) -frente a control no micorrizado (C)- sobre el % Npd Suelo en plantas de Lolium y alfalfa.

Nivel de Fosfato en suelo	MONOCULTIVOS				CULTIVOS MIXTOS			
	ALFALFA		LOLIUM		ALFALFA		LOLIUM	
	C	M	C	M	C	M	C	M
P <sub>0</sub>	31.41 ±0.68	34.34 ±1.58	95.70 ±0.03	96.30 ±0.03	6.60 ±1.36	1.44 ±0.55	96.23 ±0.04	95.92 ±0.02
P <sub>1</sub>	11.62 ±1.72	13.90 ±1.48	95.70 ±0.03	96.68 ±0.06	4.74 ±0.67	0.69 ±0.29	95.96 ±0.02	96.39 ±0.05
P <sub>2</sub>	13.45 ±0.54	8.61 ±0.21	95.79 ±0.08	96.94 ±0.03	1.72 ±1.04	1.89 ±1.48	96.01 ±0.07	96.94 ±0.02
P <sub>3</sub>	22.32 ±0.51	6.90 ±0.03	95.88 ±0.02	96.51 ±0.01	6.35 ±1.33	1.36 ±0.31	96.83 ±0.01	96.47 ±0.06
X <sub>P</sub>	19.25	15.94	95.77	96.61	4.85	1.35	96.26	96.43



TABLA 14

Efectos de la interacción entre nivel de P añadido al suelo (Pn), sistema de cultivo, inoculación con micorrizas (M) -frente a control no micorrizado (C)- sobre el Total de NPd suelo (mg/maceta) en plantas de Lolium y alfalfa.

Nivel de Fosfato en suelo	MONOCULTIVOS				CULTIVOS MIXTOS					
	ALFALFA		LOLIUM		ALFALFA		LOLIUM		TOTAL	
	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M
$\sigma_0$	1.76 ± 0.34	6.07 ± 0.02	6.05 ± 0.53	6.09 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.18 -	5.40 ± 0.50	4.53 ± 0.02	5.43 ± 0.48	4.71 ± 0.02
$\sigma_1$	1.01 ± 0.01	3.19 ± 0.12	6.27 ± 0.60	7.02 ± 0.09	0.07 ± 0.01	0.06 -	5.80 ± 0.86	6.25 ± 0.04	5.86 ± 0.86	6.31 ± 0.04
$\sigma_2$	3.07 ± 0.25	2.27 ± 0.25	6.13 ± 0.37	8.41 ± 0.14	0.10 -	0.15 ± 0.12	6.77 ± 0.62	6.34 ± 1.11	6.87 ± 0.49	6.50 ± 0.99
$\sigma_3$	1.56 ± 0.25	1.67 ± 0.19	5.92 ± 0.07	7.73 ± 0.87	0.17 ± 0.04	0.07 ± 0.01	7.54 ± 0.62	7.74 ± 0.99	7.72 ± 0.62	7.81 ± 0.99
$\bar{X}_p$	1.85	3.30	6.09	7.31	0.09	0.12	6.38	6.21	6.39	6.33

las diferencia en un cultivo  
 es mayor que la del mixto.

TABLA 15

Efectos de la interacción entre nivel de P añadido al suelo (Pn), sistema de cultivo, inoculación con micorrizas (M) -frente a control no micorrizado (C)- sobre el valor  $A_N$  del suelo (mg/maceta).

Nivel de Fósforo en suelo	MONOCULTIVOS				CULTIVOS MIXTOS			
	ALFALFA		LOLIUM		ALFALFA		LOLIUM	
	C	M	C	M	C	M	C	M
$P_0$			22.25 ± 0.17	26.04 ± 0.21			25.42 ± 0.12	23.52 ± 0.12
$P_1$			22.45 ± 0.16	29.14 ± 0.53			23.77 ± 0.12	26.73 ± 0.42
$P_2$			22.70 ± 0.37	31.66 ± 0.35			23.60 ± 1.25	31.63 ± 0.23
$P_3$			23.78 ± 0.12	27.62 ± 0.11			30.54 ± 0.12	27.36 ± 0.47
$\bar{X}_P$			22.74	28.62			25.83	27.31

solamente en  $P_2$  y  
 menos  $P_3$

*Handwritten notes:*  
 - 2 1  
 - 2 1  
 - 2 1

## 2. EFECTO DEL N COMBINADO SOBRE FBN

### 2.1. Efectos sobre la micorrización, crecimiento de las plantas y nutrición fosforada

Los resultados que se resumen en Tabla 16 muestran, en primer lugar, que las plantas noduladas alcanzan un nivel de micorrización superior que los correspondientes controles, lo que apoya la existencia de un mutualismo entre microsimbios (Hayman, 1986; Barea y Azcón-Aguilar, 1983). Los niveles de micorrización son relativamente bajos, independiente de lo cual es de destacar que al incrementar la dosis de N en el medio no se producen interferencias drásticas de la micorrización, como se habían descrito en otros casos (Azcón et al., 1982; Smith, 1980). En cuanto al crecimiento de las plantas (Tabla 17) se aprecia un efecto beneficioso de la inoculación con *Rhizobium* a todos los niveles de N. Este hecho se discutirá más adelante en este apartado. Llegado a un nivel apropiado de N (8 mg N/maceta, en la situación utilizada) la aplicación de dosis superiores no produce cambios en el peso seco de las plantas. Sin embargo, la concentración de P en los tejidos de la planta desciende a medida que aumenta la dosis de N en plantas noduladas. Este hecho fué observado en otros estudios (Azcón et al., 1978). En el caso de plantas no noduladas no llegan a producirse tales fenómenos de interferencia por interacciones N x P. Los resultados en Tabla 19 son una mera consecuencia de los expuestos en Tabla 17 y 18, pero tienen el interés de corroborar la influencia negativa en la absorción de un nutriente (P) al aplicar cantidades crecientes de otro (N).

TABLA 16

Efecto del nivel de N en suelo sobre la formación de micorrizas (% de longitud de raíz micorrizada) por plantas de sulla noduladas (planta fijadora) y no noduladas (planta de referencia).

Planta fijadora : *Hedysarum coronarium*.

Planta no fijadora (referencia) : la misma en ausencia de su *Rhizobium* específico.

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ marcado			Datos análisis		
Nivel de N		Enriq.	Planta		
Kg N ha <sup>-1</sup>	mgN/mac.	% <sup>15</sup> N a. e.	Fijad.	Refer.	
10	1.98	10	43.80 ± 2.1	17.80 ± 2.8	
20	3.96	10	21.80 ± 3.1	15.00 ± 2.2	
40	7.98	2	22.40 ± 6.5	14.80 ± 2.5	
80	15.96	2	25.10 ± 3.7	10.80 ± 2.1	
120	23.94	2	24.60 ± 10.3	12.00 ± 2.2	

Suelo A: 4.5 ppm de P (Olsen)

TABLA 17

Efecto del nivel de N en suelo sobre el peso seco (mg/maceta) de plantas de sulla micorrizadas y noduladas (planta fijadora) y no noduladas (planta de referencia).

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ marcado			Datos análisis	
Nivel de N		Enriq.	Planta	
Kg N ha <sup>-1</sup>	mgN/mac.	% <sup>15</sup> N a. e.	Fijad.	Refer.
10	1.98	10	1.470 ± 380	720 ± 80
20	3.96	10	1.740 ± 380	830 ± 140
40	7.98	2	2.640 ± 405	1.016 ± 120
80	15.96	2	2.560 ± 300	1.140 ± 117
120	23.94	2	2.430 ± 324	1.090 ± 250

عند تلوام النبتة قليلة من

<sup>15</sup>N فصبعد النبتة

الفاصل

عند تلوام النبتة كثير

السود على الفاصل

TABLA 18

Efecto del nivel de N en suelo sobre la concentración de P (%) de plantas de sulla micorrizadas y noduladas (planta fijadora) y no noduladas (planta de referencia)..

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> marcado			Datos análisis	
Nivel de N		Enriq.	Planta	
Kg N ha <sup>-1</sup>	mgN/mac.	% <sup>15</sup> N a. e.	Fijad.	Refer.
10	1.98	10	0.22 ± 0.049	0.21 ± 0.015
20	3.96	10	0.17 ± 0.030	0.17 ± 0.017
40	7.98	2	0.14 ± 0.030	0.19 ± 0.030
80	15.96	2	0.10 ± 0.005	0.18 ± 0.058
120	23.94	2	0.09 ± 0.008	0.20 ± 0.050

TABLA 19

Efecto del nivel de N en suelo sobre el contenido de P (mg/maceta) de plantas de sulla micorrizadas y noduladas (planta fijadora) y no noduladas (planta de referencia).

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ marcado			Datos análisis	
Nivel de N		Enriq.	Planta	
Kg N ha <sup>-1</sup>	mgN/mac.	% <sup>15</sup> N a. e.	Fijad.	Refer.
10	1.98	10	3.07 ± 0.33	1.49 ± 0.25
20	3.96	10	2.98 ± 0.68	1.43 ± 0.37
40	7.98	2	3.97 ± 0.66	1.94 ± 0.32
80	15.96	2	2.47 ± 0.39	2.03 ± 0.46
120	23.94	2	2.26 ± 0.30	2.07 ± 0.40

## 2.2. Efectos sobre la nodulación y nutrición nitrogenada

Aunque se aprecia una tendencia a que descienda el número de nódulos al aplicar dosis crecientes de N, los efectos no son significativos (Tabla 20). Esto contrasta con estudios al respecto, revisados por Ligeró, (1984).

Como era de esperar la concentración de N en la parte aérea de las plantas noduladas era superior a las correspondientes no noduladas (Tabla 21). La interacción entre N combinado en el medio y el efecto de la nodulación no produjo cambios importantes en el % de N en planta. Los resultados correspondientes a contenido total de N (Tabla 22) corroboran la tendencia anterior de la compensación en el aporte de N entre dos sistemas, químico y biológico, a las plantas. Es evidente que este tipo de situaciones, en las que es preciso conocer la procedencia real del N que una planta posee, es cuando se hace necesario disponer de una metodología adecuada, y para ello, la única útil es la que utiliza trazadores isotópicos.

TABLA 20

Efecto del nivel de N en suelo sobre el número de nódulos formados por plantas de sulla micorrizadas e inoculadas con Rhizobium específico.

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ marcado			Datos análisis	
Nivel de N		Enriq.	Planta	
Kg N ha <sup>-1</sup>	mgN/mac.	% <sup>15</sup> N a. e.	Fijad.	Refer.
10	1.98	10	41.20 ± 11.8	-
20	3.96	10	35.80 ± 8.0	-
40	7.98	2	38.20 ± 6.0	-
80	15.96	2	32.60 ± 7.1	-
120	23.94	2	27.20 ± 5.7	-

*efecto secundario*

TABLA 21

Efecto del nivel de N en suelo sobre la concentración de N (%) de plantas de sulla micorrizadas y noduladas (planta fijadora) y no noduladas (planta de referencia).

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ marcado			Datos análisis	
Nivel de N		Enriq.	Planta	
Kg N ha <sup>-1</sup>	mgN/mac.	% <sup>15</sup> N a. e.	Fijad.	Refer.
10	1.98	10	4.56 ± 0.09	1.74 ± 0.49
20	3.96	10	3.90 ± 0.70	1.90 ± 0.50
40	7.98	2	4.19 ± 0.57	2.00 ± 0.90
80	15.96	2	3.39 ± 0.14	1.69 ± 0.12
120	23.94	2	3.65 ± 0.60	2.36 ± 0.59

### 2.3. Efectos sobre FBN

Los datos base para los cálculos inherentes a la metodología del  $N^{15}$  se resumen en Tabla 23. Es obvio que tanto la dosis como el enriquecimiento del fertilizante adicionado afectan la relación  $N^{15}/N^{14}$  en la planta. La existencia de fijación se aprecia claramente al comparar el exceso atómico en  $N^{15}$  en plantas fijadoras y en las de referencia correspondientes (Fried y Middleboe, 1977). Es evidente que siempre es más bajo en plantas noduladas, indicando "dilución" del  $N^{15}$  con  $N^{14}$  de la atmósfera (FBN).

Puesto que se adicionaron distintas cantidades y enriquecimientos de  $N^{15}$  al suelo, para calcular FBN hubo de aplicarse la metodología basada en el cálculo previo del valor A (Fried y Broeshart, 1975). Los resultados de las estimaciones correspondientes, que se recogen en la Tabla 24, corroboran una premisa importante que supone que el valor A del suelo calculado no debe cambiar al aplicar distintos niveles de N al suelo (Danso et al., 1983). Estos datos confirman la aseveración de tipo conceptual e indican que en el presente ensayo se trabajó correctamente, que la metodología basada en el "valor A" es adecuada y que las medidas de FBN, que se ofrecen en Tabla 25, son fiables. Si es así, dichos datos y, consecuentemente, los de la Tabla 26, muestran un hecho que contradice todas las conclusiones hasta ahora vertidas (ver revisión de Ligeró, 1984): la aplicación de N en cantidades equivalentes hasta  $120 \text{ kg ha}^{-1}$  no inhiben FBN. El hecho de que aquí se alcanza tal conclusión está avalada por el uso de  $N^{15}$ , pero no deja de ser sorprendente. Para discutir tal evidencia, para el sistema suelo-planta usado, conviene considerar previamente otros datos de la captación de N del suelo y fertilizante (marcado) que se exponen a continuación.

TABLA 22

Efecto del nivel de N en suelo sobre el contenido de N (mg/maceta) de plantas de sulla micorrizadas y noduladas (planta fijadora) y no noduladas (planta de referencia)..

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ marcado			Datos análisis	
Nivel de N		Enriq.	Planta	
Kg N ha <sup>-1</sup>	mgN/mac.	% <sup>15</sup> N a. e.	Fijad.	Refer.
10	1.98	10	67.30 ± 15.0	12.72 ± 4.6
20	3.96	10	66.29 ± 11.7	15.20 ± 3.3
40	7.98	2	111.56 ± 14.4	19.94 ± 9.3
80	15.96	2	87.08 ± 10.0	19.13 ± 2.4
120	23.94	2	91.85 ± 13.8	24.89 ± 5.1

TABLA 23

Efecto del nivel de N en suelo sobre el exceso atómico en  $N^{15}$  (%) de plantas de sulla micorrizadas y noduladas (planta fijadora) y no noduladas (planta de referencia).

$(NH_4)_2 SO_4$ marcado			Datos análisis	
Nivel de N		Enriq.	Planta	
Kg N ha <sup>-1</sup>	mgN/mac.	% $N^{15}$ a. e.	Fijad.	Refer.
10	1.98	10	0.164 ± 0.04	0.449 ± 0.07
20	3.96	10	0.337 ± 0.05	0.969 ± 0.19
40	7.98	2	0.081 ± 0.008	0.327 ± 0.03
80	15.96	2	0.192 ± 0.01	0.551 ± 0.02
120	23.94	2	0.213 ± 0.04	0.722 ± 0.04

*tanto la dosis  
como el enriquecimiento  
afectan la relación  $N^{15}/N_{ref}$   
es evidente que*

TABLA 24

Efecto del nivel de N en suelo sobre el valor A suelo referente al N, expresado como mg/maceta. Se usó como planta de referencia sulla no nodulada pero micorrizadas.

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ marcado			Datos análisis		
Nivel de N		Enriq.	Planta		
$\text{Kg N ha}^{-1}$	mgN/mac.	% $^{15}\text{N}$ a. e.	Fijad.	Refer.	
10	1.98	10	-	38.39 + 5.6	
20	3.96	10	-	38.23 + 7.6	
40	7.98	2	-	41.33 - 4.8	
80	15.96	2	-	42.10 + 2.3	
120	23.94	2	-	42.59 + 3.8	



TABLA 25

Efecto del nivel de N en suelo sobre el % NpdFij de plantas de sulla micorrizadas y noduladas (planta fijadora) y no noduladas (planta de referencia).

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ marcado			Datos análisis	
Nivel de N		Enriq.	Planta	
Kg N ha <sup>-1</sup>	mgN/mac.	% <sup>15</sup> N a. e.	Fijad.	Refer.
10	1.98	10	66.10 ± 12.3	-
20	3.96	10	64.32 ± 7.9	-
40	7.98	2	79.92 ± 3.0	-
80	15.96	2	65.10 ± 2.2	-
120	23.94	2	70.40 ± 7.5	-

La NpdFij  
Allega a su punto  
ideal en la concentración  
y de spores baja

#### 2.4. Efectos sobre la captación de N del suelo o fertilizante (técnica del N<sup>15</sup>)

El porcentaje de eficacia en el uso del fertilizante parece mantenerse en valores relativamente homogéneos para cada tipo de "planta", independientemente de la dosis y enriquecimiento del fertilizante añadido. Ello corrobora un desarrollo adecuado de la metodología (Urquiaga y Boddey, 1987). No obstante, cuando se analiza el % del N de la planta que procede del fertilizante (Tabla 28), se evidencia que la planta fijadora, cuando más, sólo derivó un 10% de su N del fertilizante. Esta baja cantidad (reafirmada en Tabla 29) puede explicar el porqué de la no inhibición de la FBN por dosis elevadas de fertilizante nitrogenado. La razón podría ser que la planta fijadora toma muy poco N combinado, lo cual podría explicarse sobre la base de las características físico-químicas del suelo. Por ejemplo, el suelo tiene un elevado contenido en arcilla (42%) por lo que puede retener considerables cantidades de amonio, la forma de N en el fertilizante adicionado, (Stevenson, 1986) y que luego se cede lentamente. Otra posibilidad es que ocurrieran pérdidas considerables por volatilización, pero esto no se puede defender ya que no se realizaron medidas oportunas por no sospecharse la situación que se iba a encontrar.

Las Tablas 30 y 31 aportan otros datos importantes como son los que indican que la planta nodulada apenas deriva un 25%, como media, del suelo.

TABLA 26

Efecto del nivel de N en suelo sobre el contenido de NpdFij de plantas de sulla micorrizadas e inoculadas con Rhizobium específico.

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ marcado			Datos análisis	
Nivel de N		Enriq.	Planta	
Kg N ha <sup>-1</sup>	mgN/mac.	% <sup>15</sup> N a. e.	Fijad.	Refer.
10	1.98	10	45.69 ± 17.0	-
20	3.96	10	42.38 ± 8.1	-
40	7.98	2	83.51 ± 9.1	-
80	15.96	2	56.78 ± 7.7	-
120	23.94	2	63.46 ± 12.2	-

TABLA 27

Efecto del nivel de N en suelo sobre el % Utilización del Fertilizante por plantas de sulla micorrizadas y noduladas (planta fijadora) y no noduladas (planta de referencia).

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ marcado			Datos análisis	
Nivel de N		Enriq.	Planta	
Kg N ha <sup>-1</sup>	mgN/mac.	% <sup>15</sup> N a. e.	Fijad.	Refer.
10	1.98	10	53.29 ± 5.5	31.60 ± 9.9
20	3.96	10	55.59 ± 8.5	37.79 ± 12.6
40	7.98	2	56.60 ± 4.3	41.15 ± 16.4
80	15.96	2	52.60 ± 6.0	33.25 ± 4.5
120	23.94	2	39.85 ± 10.8	37.55 ± 8.8

TABLA 28

Efecto del nivel de N en suelo sobre el % NpdFert de plantas de sulla micorrizadas y noduladas (planta fijadora) y no noduladas (planta de referencia).

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> marcado			Datos análisis	
Nivel de N		Enriq.	Planta	
Kg N ha <sup>-1</sup>	mgN/mac.	% <sup>15</sup> N a. e.	Fijad.	Refer.
10	1.98	10	1.64 ± 0.47	4.99 ± 0.74
20	3.96	10	3.37 ± 0.34	9.69 ± 1.90
40	7.98	2	4.07 ± 0.38	16.34 ± 1.79
80	15.96	2	9.60 ± 0.75	27.48 ± 1.18
120	23.94	2	10.67 ± 2.38	36.09 ± 2.20

TABLA 29

Efecto del nivel de N en suelo sobre el contenido de Npd Fert (mg/maceta) de plantas de sulla micorrizadas y noduladas (planta fijadora) y no noduladas (planta de referencia).

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ marcado			Datos análisis	
Nivel de N		Enriq.	Planta	
Kg N ha <sup>-1</sup>	mgN/mac.	% <sup>15</sup> N a. e.	Fijad.	Refer.
10	1.98	10	1.05 ± 0.10	0.62 ± 0.19
20	3.96	10	2.19 ± 0.34	1.49 ± 0.50
40	7.98	2	4.51 ± 0.35	3.19 ± 1.23
80	15.96	2	8.32 ± 0.90	5.26 ± 0.74
120	23.94	2	9.54 ± 2.60	8.99 ± 2.10

TABLA 30

Efecto del nivel de N en suelo sobre el % NpdSuelo de plantas de sulla micorrizadas y noduladas (planta fijadora) y no noduladas (planta de referencia).

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ marcado			Datos análisis	
Nivel de N		Enriq.	Planta	
Kg N ha <sup>-1</sup>	mgN/mac.	% <sup>15</sup> N a. e.	Fijad.	Refer.
10	1.98	10	32.91 ± 11.9	95.01 ± 0.7
20	3.96	10	32.31 ± 7.7	90.31 ± 1.9
40	7.98	2	21.01 ± 2.8	83.66 ± 1.8
80	15.96	2	25.03 ± 1.6	72.47 ± 1.2
120	23.94	2	18.95 ± 5.2	63.91 ± 2.2

NO Hay  
diferencia.

no hay  
diferencia.

### 3. EFECTOS DE LAS MICORRIZAS (vs FOSFATO SOLUBLE) SOBRE EL DESARROLLO Y FUNCIONAMIENTO DE LA SIMBIOSIS *R. meliloti*-*M. sativa* A DIFERENTES NIVELES DE POTENCIAL HIDRICO DEL SUELO

#### 3.1. Efectos sobre el crecimiento y nutrición de las plantas

Los datos que se recopilan en las Tablas 32, 33 y 34, correspondientes al peso seco, contenido en P y N, respectivamente, de las plantas, indican que las cosechas referidas a estos parámetros incrementan con la cantidad de P soluble añadida al medio, pero los efectos ejercidos sobre el crecimiento de las plantas y sobre la captación de nutrientes por esta, se atenúan al aumentar el estrés hídrico. El nivel de sequía afectó menos drásticamente los efectos de la inoculación de micorrizas sobre la producción de materia seca y cosecha de N y P. Realmente, sólo el nivel de sequía más fuerte (próximo al punto de marchitamiento) afectó significativamente los efectos de las MVA sobre el crecimiento y nutrición de las plantas. La micorrización fué el tratamiento más efectivo a los niveles más altos de estrés de agua aplicados. Este comportamiento de las MVA puede interpretarse asumiendo que las hifas del hongo continúan introduciendo nutrientes a unos niveles de sequía que impedirían tal absorción a una planta no micorrizada (Cooper, 1984; Peña et al., 1988). Sin embargo los resultados de las Tablas 35 y 36, referentes a % de N y P, respectivamente, muestran una situación reseñable. Mientras que los niveles más fuertes de estrés hídrico no afectan el efecto MVA sobre la concentración de N, si que afectan la acción de los MVA sobre el % de P. Este hecho encontrado también por Peña et al. (1988), sugiere que las MVA actuarían además por otros mecanismos distintos del aporte de P.

Es de interés el hecho de que el estrés hídrico no afecte el desarrollo de las MVA estimado como % de longitud de raíz colonizada (Tabla 37), situación similar a la encontrada por Peña et al.,

(1988), pero que contrasta con la descrita por Reid and Bowen (1979) y Mosse et al. (1981).

TABLA 31

Efecto del nivel de N en suelo sobre el contenido de NpdSuelo de plantas de sulla micorrizadas y noduladas (planta fijadora) y no noduladas (planta de referencia).

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ marcado			Datos análisis	
Nivel de N		Enriq.	Planta	
Kg N ha <sup>-1</sup>	mgN/mac.	% <sup>15</sup> N a. e.	Fijad.	Refer.
10	1.98	10	20.46 ± 3.7	11.99 ± 4.4
20	3.96	10	21.52 ± 7.4	13.64 ± 2.8
40	7.98	2	23.52 ± 4.7	16.77 ± 8.0
80	15.96	2	21.99 ± 2.6	13.86 ± 1.7
120	23.94	2	17.10 ± 5.9	15.81 ± 3.3

TABLA 32

Efectos de la interacción nivel de agua en suelo (% de la capacidad de campo - WHC -) y dosis de fosfato ( $P_n$ ) ó inoculación de micorrizas (M) sobre el peso seco (mg/maceta) de la parte aerea de plantas de alfalfa.

% WHC	Nivel de P en suelo				M	$\bar{X}$
	$P_0$	$P_1$	$P_2$	$P_3$		
100	100 ± 25	703 ± 25	788 ± 27	793 ± 51	563 ± 45	589
90	94 ± 15	534 ± 77	618 ± 16	723 ± 53	590 ± 55	512
825	51 ± 9	364 ± 39	456 ± 13	526 ± 18	537 ± 19	387
75	39 ± 11	290 ± 57	331 ± 45	398 ± 36	473 ± 35	306
$\bar{X}$	71	473	548	610	548	

TABLA 33

Efectos de la interacción nivel de agua en suelo (% de la capacidad de campo - WHC -) y dosis de fosfato ( $P_n$ ) ó inoculación de micorriza (M) sobre el contenido de N (mg/maceta) en parte aerea de plantas de alfalfa.

% WHC	Nivel de P en suelo				M	$\bar{X}$
	$P_0$	$P_1$	$P_2$	$P_3$		
100	1.93 ±0.40	16.65 ±1.80	17.34 ±2.10	18.96 ±1.47	14.54 ±2.70	13.88
90	2.51 ±0.40	10.87 ±1.69	16.56 ±0.77	16.63 ±1.16	14.38 ±0.79	12.19
825	1.40 ±0.34	8.97 ±1.05	12.39 ±0.75	12.34 ±0.42	14.02 ±0.85	9.82
75	0.89 ±0.25	7.36 ±1.20	8.68 ±1.03	8.18 ±0.60	11.50 ±0.93	7.32
$\bar{X}$	1.68	10.96	13.74	14.03	13.61	

TABLA 34

Efectos de la interacción nivel de agua en suelo (% de la capacidad de campo - WHC -) y dosis de fosfato (P<sub>i</sub>) ó inoculación de micorrizas (M) sobre el contenido de P (mg/maceta) en parte aerea de plantas de alfalfa.

% WHC	Nivel de P en suelo				M	$\bar{X}$
	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>		
100	0.09 ±0.01	0.63 ±0.08	0.95 ±0.09	1.14 ±0.10	0.90 ±0.10	0.74
90	0.07 ±0.01	0.46 ±0.04	0.87 ±0.09	0.98 ±0.10	0.88 ±0.10	0.65
825	0.04 ±0.01	0.39 ±0.04	0.67 ±0.08	0.71 ±0.09	0.75 ±0.06	0.51
75	0.03 ±0.01	0.32 ±0.03	0.37 ±0.05	0.40 ±0.06	0.59 ±0.05	0.34
$\bar{X}$	0.06	0.45	0.62	0.81	0.78	

TABLA 35

Efecto de la interacción entre el nivel de agua en suelo (% de la capacidad de campo -WHC-) y dosis de fosfato ( $P_0$ ), ó inoculación de micorrizas (M) sobre la concentración (%) de  $N$  en la parte aerea de plantas de alfalfa.

% WHC	Nivel de P en suelo				M	$\bar{X}$
	$P_0$	$P_1$	$P_2$	$P_3$		
100	1.93 +/- 0.26	2.37 +/-0.27	2.20 +/- 0.18	2.39 +/- 0.25	2.58 +/- 0.30	2.29
90	2.67 +/- 0.31	2.04 +/- 0.18	2.08 +/- 0.33	2.30 +/- 0.19	2.44 +/- 0.29	2.43
825	2.74 +/- 0.32	2.46 +/- 0.28	2.72 +/- 0.24	2.35 +/- 0.27	2.61 +/- 0.35	2.56
75	2.28 +/- 0.20	2.54 +/- 0.23	2.62 +/- 0.34	2.05 +/- 0.21	2.43 +/- 0.19	2.38
$\bar{X}$	2.40	2.35	2.55	2.27	2.51	

TABLA 36

Efectos de la interacción entre el nivel de agua en suelo (% de la capacidad de campo -WHC-) y dosis de fosfato ( $P_n$ ), ó inoculación de micorrizas (M) sobre la concentración (%) de  $P_n$  en la parte aérea de plantas de alfalfa.

% WHC	Nivel de P en suelo				M	$\bar{X}$
	$P_0$	$P_1$	$P_2$	$P_3$		
100	0.09 +/- 0.01	0.08 +/- 0.01	0.12 +/- 0.008	0.14 +/- 0.01	0.16 +/- 0.01	0.12
90	0.07 +/- 0.01	0.08 +/- 0.009	0.14 +/- 0.01	0.13 +/- 0.007	0.15 +/- 0.01	0.11
825	0.08 +/- 0.01	0.11 +/- 0.007	0.15 +/- 0.01	0.13 +/- 0.02	0.14 +/- 0.01	0.12
75	0.09 +/- 0.01	0.11 +/- 0.007	0.11 +/- 0.01	0.12 +/- 0.01	0.12 +/- 0.02	0.11
$\bar{X}$	0.08	0.10	0.13	0.13	0.14	

### 3.2. Efectos sobre FBN

Los resultados de la Tabla 38 confirman un hecho bien conocido: la nodulación es favorecida por la adición de P soluble al medio (Hayman, 1986) y es afectada negativamente por el estrés hídrico (Peña et al., 1988). La inoculación con MVA favoreció la nodulación, y el estrés hídrico sólo afectó tal influencia positiva al nivel más fuerte de sequía, al cual las MVA fueron el tratamiento más efectivo en cuanto a mejorar la nodulación.

Cuando se consideraron globalizados todos los niveles de agua, se obtuvo una estrecha correlación positiva entre cosecha de N y número de nódulos para los diferentes niveles de P o inoculación de MVA ( $P_0$ ;  $r = 0,996$ ;  $P_1$ ;  $r = 0,937$ ;  $P_2$ ;  $r = 0,967$ ; MVA;  $r = 0,945$ ).

El enriquecimiento en  $N^{15}$  de las plantas tiende a disminuir, lo cual indica que aumentan las tasas de fijación de  $N_2$  (Danso, 1986), al aumentar la dosis de P (Tabla 39). El hecho es bien conocido, pero aquí se contrasta con la metodología isotópica empleada, por lo que, de paso, se confirma la validez de la técnica. En lo que respecta a los tratamientos de P aplicados en este estudio se puede observar que cuanto más bajo es el nivel de agua en el suelo más alto es el enriquecimiento en  $N^{15}$  de las plantas. Es obvio que ésto es una evidencia isotópica de que existe una estrecha relación entre FBN y estrés hídrico. En efecto, se demostró una correlación negativa elevada entre N cosechado y exceso atómico en  $N^{15}$  en las plantas ( $P_0$ ;  $r = -0,795$ ;  $P_1$ ;  $r = -0,832$ ;  $P_2$ ;  $r = -0,864$ ), en cambio la correlación entre tales parámetros en el tratamiento de inoculación con MVA, fué baja ( $r = -0,460$ ). Sin embargo, se apreció una fuerte correlación ( $r = -0,934$ ) entre nodulación y exceso atómico en  $N^{15}$  en el tratamiento de micorrizas, lo que apoya la validez de la técnica analítica para medir FBN según Danso (1986).

Esto indica que las micorrizas podrían estar aportando, a las plantas otras fuentes de N, además de activar FBN, lo que confirma observaciones descritas en el ensayo 1 discutido en este capítulo, o

evidencias experimentales previas (Barea et al., 1987). Otro hecho a resaltar es que el nivel de agua en suelo no afectó el exceso atómico de  $N^{15}$  (%) en planta, o sea que la función de las MVA en FBN, cualquiera que sean los mecanismos implicados, parece mantenerse y operar en condiciones de déficit hídrico. Incluso la propia formación de la micorriza no es alterada por el nivel de agua. Lo más probable es que la MVA actúe por varios mecanismos. De un lado, facilitando la captación de P en condiciones de crisis en la movilidad de este nutriente agravada por la sequia, pero no se puede descartar las implicaciones de otros mecanismos, que serán tratados en DISCUSION GENERAL.

Suelo(A)  $P_0 = 4.5$  ppm

levels de P ( $PO_4 H_2K$   $mg\ kg^{-1}$ ) : 1 - 150; 2 - 200; 3 = 250  
10.3 15.6 21.8

TABLA 37

Efecto del nivel de agua en suelo (% de la capacidad de campo -WHC-) sobre la formación de micorrizas (% de longitud de raíz micorrizada) por plantas de alfalfa.

% WHC	Nivel de P en suelo				
	$P_0$ 10.3	$P_1$ 15.6	$P_2$	$P_3$	M
100					75 ±8
90					80 ±9
82.5					82 ±10
75					84 ±10



TABLA 38

Efectos de la interacción nivel de agua en suelo (% de la capacidad de campo - WHC -) y dosis de fosfato ( $P_n$ ) ó inoculación de micorriza (M) sobre el número de nódulos (datos por maceta) en raíces de plantas de alfalfa.

% WHC	Nivel de P en suelo				M	$\bar{X}$
	$P_0$	$P_1$	$P_2$	$P_3$		
100	21 ± 3	180 ±25	230 ±36	284 ±33	242 ±25	191
90	10 ±2	92 ±9	225 ±28	240 ±30	223 ±20	158
825	4 ±1	70 ±7	190 ±21	210 ±18	216 ±21	138
75	2 ±1	32 ±5	53 ±6	97 ±8	183 ±12	73
$\bar{X}$	9	93	174	208	216	

895  
195

esta firma  
que la M  
tiene otro  
micorizismo  
en su otro

#### 4. EFECTOS DE LAS MICORRIZAS (**vs** FOSFATO SOLUBLE) SOBRE EL DESARROLLO Y FUNCIONAMIENTO DE LA SIMBIOSIS *R. meliloti*-*M. sativa* A DIFERENTES NIVELES DE SALINIDAD

##### 4.1. Efectos sobre el crecimiento y nutrición de las plantas

Como ocurrió en el caso del ensayo anterior (efecto del estrés hídrico) se aprecia la tendencia de que la dosis de P soluble en suelo (beneficiando) y el nivel de salinidad (perjudicando) afectaron el crecimiento de las plantas (Tabla 40) y el contenido en la biomasa de P (Tabla 42) y de N (Tabla 44). Los efectos sobre las concentraciones de P (Tabla 41) y de N (Tabla 43) son menos generalizable pero siguen una tendencia general asimilable a lo dicho anteriormente. Estos efectos de la salinidad corresponden a los referidos por otros autores (Hafeez et al., 1988; Pfeiffer y Bloss, 1988).

El papel de las MVA, en este contexto merece comentarios particulares. En primer lugar, su formación es afectada negativamente a niveles altos de salinidad, lo que corrobora otras informaciones (Mosse et al., 1981). El hecho puede ser explicado en base a los efectos negativos de la salinidad sobre el desarrollo de macro y microbiota por mecanismos que fueron analizados en el apartado 3.4., capítulo de INTRODUCCION. A pesar del descenso en el nivel de micorrización, la simbiosis resultó beneficiosa para estimular el crecimiento y nutrición de las plantas (Tablas 40 a 44 inclusives). La inoculación de MVA fué el mejor tratamiento (**vs.** niveles de P) a los niveles más altos de salinidad para los distintos parámetros estudiados, siendo de destacar los referentes a cosecha de materia seca (Tabla 40), P (Tabla 44). Estas circunstancias podrían ser explicadas por el clásico efecto mediado por P, (Pond et al., 1984; Ojala et al., 1983) aunque puedan aducirse otras razones de tipo ecofisiológico que serán tratadas en la DISCUSION GENERAL.

TABLA 40

Efectos de la interacción entre el nivel de salinidad del suelo y dosis de fosfato (Pn), ó inoculación de micorrizas (M), sobre el peso seco (g/maceta) de la parte aérea de plantas de alfalfa.

Nivel de salinidad (d S m <sup>-1</sup> )	Nivel de P en suelo				M	$\bar{X}$
	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>		
2.5	1.04 ± 0.07	1.47 ± 0.10	1.46 ± 0.08	1.68 ± 0.22	1.52 ± 0.12	1.43
13.8	0.94 ± 0.14	0.97 ± 0.04	1.06 ± 0.09	1.12 ± 0.04	1.09 ± 0.10	1.04
22.2	0.72 ± 0.04	0.76 ± 0.04	0.78 ± 0.04	0.84 ± 0.01	0.91 ± 0.06	0.80
28.8	0.57 ± 0.03	0.61 ± 0.03	0.65 ± 0.04	0.64 ± 0.05	0.77 ± 0.06	0.65
43.5	0.45 ± 0.09	0.49 ± 0.11	0.55 ± 0.04	0.45 ± 0.03	0.68 ± 0.04	0.52
$\bar{X}$	0.74	0.86	0.90	0.95	0.99	

TABLA 41

Efectos de la interacción entre el nivel de salinidad del suelo y dosis de fosfato (Pn), ó inoculación de micorrizas (M), sobre la concentración de P (%) en la parte aérea de plantas de alfalfa.

Nivel de salinidad (d Sm <sup>-1</sup> )	Nivel de P en suelo				M	$\bar{X}$
	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>		
2.5	0.11 ± 0.010	0.12 ± 0.007	0.14 ± 0.015	0.15 ± 0.011	0.17 ± 0.010	0.14
13.8	0.13 ± 0.010	0.15 ± 0.013	0.18 ± 0.012	0.17 ± 0.011	0.22 ± 0.007	0.17
22.2	0.17 ± 0.005	0.13 ± 0.020	0.12 ± 0.007	0.13 ± 0.004	0.15 ± 0.011	0.14
28.8	0.09 ± 0.007	0.12 ± 0.010	0.12 ± 0.015	0.12 ± 0.005	0.15 ± 0.008	0.12
43.5	0.08 ± 0.014	0.11 ± 0.007	0.11 ± 0.019	0.12 ± 0.021	0.13 ± 0.008	0.11
$\bar{X}$	0.11	0.12	0.13	0.14	0.16	

TABLA 42

Efectos de la interacción entre el nivel de salinidad del suelo y dosis de fosfato (Pn), ó inoculación de micorrizas (M), sobre el contenido de P (mg/maceta) en la parte aérea de plantas de alfalfa.

Nivel de salinidad (dSm <sup>-1</sup> )	Nivel de P en suelo				M	$\bar{X}$
	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>		
2.5	1.16 ± 0.09	1.76 ± 0.20	2.04 ± 0.19	2.46 ± 0.20	2.59 ± 0.30	2.00
13.8	1.25 ± 0.22	1.43 ± 0.15	1.90 ± 0.24	1.95 ± 0.18	2.41 ± 0.28	1.79
22.2	1.25 ± 0.08	0.97 ± 0.22	0.94 ± 0.09	1.07 ± 0.03	1.40 ± 0.13	1.12
28.8	0.51 ± 0.02	0.74 ± 0.07	0.78 ± 0.13	0.80 ± 0.07	1.18 ± 0.11	0.80
43.5	0.36 ± 0.09	0.54 ± 0.11	0.61 ± 0.09	0.55 ± 0.09	0.91 ± 0.09	0.59
$\bar{X}$	0.90	1.09	1.25	1.36	1.70	

TABLA 43

Efectos de la interacción entre el nivel de salinidad del suelo y dosis de fósforo (Pn), ó inoculación de micorrizas (M), sobre la concentración de N (%) en la parte aérea de plantas de alfalfa.

Nivel de salinidad (d Sm <sup>-1</sup> )	Nivel de P en suelo				M	$\bar{X}$
	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>		
2.5	2.33 ± 0.20	2.62 ± 0.09	3.13 ± 0.24	3.50 ± 0.19	4.44 ± 0.07	3.20
13.8	2.86 ± 0.19	2.80 ± 0.20	3.19 ± 0.25	3.32 ± 0.23	4.38 ± 0.06	3.31
22.2	4.57 ± 0.14	2.70 ± 0.20	2.48 ± 0.20	2.42 ± 0.14	3.07 ± 0.22	3.05
28.8	3.77 ± 0.60	3.83 ± 0.42	2.54 ± 0.14	2.78 ± 0.32	2.58 ± 0.07	3.10
43.5	2.07 ± 0.38	2.55 ± 0.27	2.97 ± 0.44	2.81 ± 0.32	2.73 ± 0.30	2.83
$\bar{X}$	3.12	2.90	2.86	2.96	3.44	

TABLA 44

Efectos de la interacción entre el nivel de salinidad del suelo y dosis de fosfato (Pn), ó inoculación de micorrizas (M), sobre el contenido en N (mg/maceta) en la parte aérea de plantas de alfalfa.

Nivel de salinidad (dSm <sup>-1</sup> )	Nivel de P en suelo				M	$\bar{X}$
	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>		
2.5	24.34 ± 2.29	38.48 ± 2.44	45.99 ± 4.60	59.04 ± 3.30	67.75 ± 6.12	47.12
13.8	26.93 ± 4.84	27.17 ± 2.69	33.87 ± 4.65	37.29 ± 3.76	47.98 ± 4.38	34.65
22.2	32.93 ± 1.18	20.46 ± 1.90	19.52 ± 2.37	20.36 ± 1.14	28.10 ± 3.17	24.27
28.8	18.92 ± 3.06	23.29 ± 2.69	16.58 ± 1.29	17.90 ± 1.59	20.03 ± 1.50	19.34
43.5	9.18 ± 3.09	12.77 ± 3.49	16.43 ± 3.30	12.73 ± 1.40	18.54 ± 1.55	13.93
$\bar{X}$	22.46	24.43	26.48	29.46	36.48	

#### 4.2. Efectos sobre FBN

La nodulación fué drásticamente afectada, en forma negativa, por la salinidad del suelo a todos y cada uno de los niveles de fosfato aplicados (Tabla 46). Para cada nivel de salinidad, la inoculación de MVA indujo la formación de un mayor número de nódulos en comparación con los tratamientos de fosfato. Tal efecto fué estadísticamente significativo en los tres niveles superiores de salinidad. Aparentemente los efectos sobre la nodulación son, globalmente, paralelos a los ejercidos sobre la biomasa de N cosechada.

Las estimaciones cualitativas de FBN usando  $N^{15}$ , cuya validez como técnica discuten y apoyan los trabajos revisados por Danso (1986), corroboran que los efectos sobre cosecha de N atribuibles a la nodulación se deben realmente a FBN (Tabla 47). En efecto, a niveles más elevados de salinidad, la micorrización, en general, fué el mejor tratamiento, en cuanto a provocar tasas superiores de FBN, conclusión deducida porque los valores de enriquecimiento de la planta en  $N^{15}$  son inferiores, tal como se recoge en Tabla 47.

Las comparaciones entre los parámetros implicados permiten obtener los siguientes coeficientes de correlación (r):

Correlación entre e.a. de $N^{15}$ (%) y:	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	MVA
Contenido de N en planta (mg)	-0,705	-0,895	-0,977	-0,969	-0,997
Número de nódulos	-0,981	-0,937	-0,888	-0,729	-0,603

Estos datos apoyan la validez de las estimaciones de FBN cuando los tratamientos implicados son interacciones de salinidad x nivel de P (ó MVA).

TABLA 45

Efectos de la interacción entre el nivel de salinidad del suelo y la formación de micorrizas (% de longitud de raíz micorrizada) por plantas de alfalfa.

Nivel de salinidad (d S m <sup>-1</sup> )	Nivel de P en suelo				M
	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	
2.5					40.4 ± 2.7
13.8					51.0 ± 2.1
22.2					51.4 ± 5.1
28.8					37.0 ± 3.2
43.5					19.4 ± 2.3

5. EFECTOS DE LAS MICORRIZAS (vs. FOSFATO SOLUBLE) SOBRE EL DESARROLLO Y FUNCIONAMIENTO DE LA SIMBIOSIS *R. meliloti*-*M. sativa* A DIFERENTES NIVELES DE ZINC EN EL SUELO

5.1. Efectos sobre el crecimiento de las plantas y la micorrización

Los efectos beneficiosos del fosfato o micorriza sobre el crecimiento de las plantas tienden a ser deprimidos al aumentar la concentración de Zn en el medio (Tabla 48). Es de destacar que a pesar de la aplicación de niveles muy altos de Zn no se afectó al % de raíz que se micorriza (Tabla 49). La aplicación del micronutriente causó un efecto negativo en todos los casos menos en los 3 niveles más bajos de Zn en plantas micorrizadas. La explicación debe estar en el conocido papel de las MVA introduciendo Zn en la planta (Tinker y Gildon, 1983) lo cual agudiza los fenómenos de toxicidad a dosis elevadas del micronutriente en el suelo. En cuanto a la no interferencia del Zn en la proporción de MVA en el sistema radical hay que decir que en la literatura científica existe apoyo al respecto (Mosse et al., 1981).

TABLA 46

Efectos de la interacción entre el nivel de salinidad del suelo y dosis de fosfato (Pn), ó inoculación de micorrizas (M), sobre el número de nódulos formados en raíces de plantas de alfalfa.

Nivel de salinidad (d S m <sup>-1</sup> )	Nivel de P en suelo				M	$\bar{X}$
	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>		
2.5	88.0 ± 11.0	93.6 ± 11.9	110.6 ± 15.5	121.10 ± 15.1	153.0 ± 5.8	113.24
13.8	79.2 ± 12.0	107.2 ± 9.3	111.6 ± 7.2	159.2 ± 16.7	160.4 ± 9.8	123.52
22.2	58.6 ± 6.9	60.4 ± 7.6	65.8 ± 10.9	111.2 ± 10.8	153.0 ± 6.5	89.8
28.8	12.8 ± 3.4	18.6 ± 3.9	5.8 ± 3.5	8.8 ± 1.3	33.6 ± 8.3	15.92
43.5	1.2 ± 0.4	4.0 ± 2.8	6.6 ± 1.1	9.0 ± 2.2	16.4 ± 4.0	7.44
$\bar{X}$	47.96	56.76	60.08	85.84	99.28	

ris, ó, atenuado  
 la nodulación baja  
 mas atenuadamente en  
 la presencia de M

TABLA 47

Efectos de la interacción entre el nivel de salinidad del suelo y dosis de fosfato (Pn) ó inoculación de micorrizas (M), en el exceso atómico en N<sup>15</sup> (%) en la parte aérea de plantas de alfalfa.

Nivel de salinidad (d S m <sup>-1</sup> )	Nivel de P en suelo				M	$\bar{X}$
	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>		
2.5	0.050 ± 0.007	0.045 ± 0.002	0.035 ± 0.003	0.035 ± 0.001	0.044 ± 0.003	0.043
13.8	0.076 ± 0.005	0.069 ± 0.005	0.076 ± 0.007	0.070 ± 0.007	0.078 ± 0.005	0.074
22.2	0.096 ± 0.005	0.102 ± 0.016	0.101 ± 0.004	0.110 ± 0.010	0.106 ± 0.002	0.103
28.8	0.129 ± 0.006	0.129 ± 0.010	0.116 ± 0.009	0.142 ± 0.006	0.113 ± 0.004	0.126
43.5	0.151 ± 0.007	0.136 ± 0.012	0.130 ± 0.018	0.149 ± 0.006	0.117 ± 0.007	0.137
$\bar{X}$	0.100	0.096	0.091	0.101	0.093	

TABLA 48

Efectos de la interacción entre el nivel de Zn en el suelo y dosis de P (Pn), ó inoculación con micorrizas (M), sobre el peso seco (mg/maceta) de la parte aerea de plantas de alfalfa.

Nivel de Zn (ppm)	Nivel de P en suelo				M	$\bar{X}$
	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>		
	194 ± 80	748 ± 140	1.412 ± 90	1.300 ± 140	706 ± 100	872
5	124 ± 50	466 ± 100	808 ± 160	1.000 ± 110	816 ± 80	643
10	114 ± 20	490 ± 80	840 ± 170	1.086 ± 150	860 ± 100	678
400	114 ± 40	566 ± 70	940 ± 320	916 ± 110	600 ± 40	627
800	138 ± 50	628 ± 150	434 ± 150	730 ± 30	320 ± 170	450
$\bar{X}$	137	580	887	1,006	660	

$Z_m$  (Zn soil)

Suelo (B)  $P_0 = 3.8$  (olsew)  
niveles de P ( $P_0, P_1, P_2, P_3$  P.P.M)  
 $P_1 = 150$  ;  $P_2 = 200$  ;  $P_3 = 250$   
10.5                      12.22                      15.03

$Z_m = 0.44$  PPM

TABLA 49

Efecto del nivel de Zn en suelo sobre la formación de MVA en plantas de alfalfa (% de longitud total de raíz que es micorriza).

Nivel de Zn (ppm)	Nivel de P en suelo				M
	$P_0$ 10.5	$P_1$ 12.22	$P_2$	$P_3$	
0.5					35.4 ± 8
5					38.0 ± 10
10					42.6 ± 29
400					34.5 ± 6
800					40.5 ± 11

TABLA 50

Efectos de la interacción entre el nivel de Zn en el suelo y dosis de P (Pn), ó inoculación con micorrizas (M), sobre la concentración de Zn (ppm) en la parte aérea de plantas de alfalfa.

Nivel de Zn (ppm)	Nivel de P en suelo				M	$\bar{X}$
	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>		
		15.3	12.0	10.0	26.0	15.8
5		31.0	23.5	17.2	34.0	26.4
10		55.1	57.7	34.3	60.5	51.9
400		148.2	145.5	137.0	184.0	153.7
800		276	256	244	295	267.7
$\bar{X}$		105	98.9	88.5	119.9	

Coded as follows: (mg/kg)  
 P=0, 1, 2, 3  
 Zn=0, 5, 10, 400, 800  
 M=0, 1 (5%)

Greenhouse Exp. No.

test plant = Allia  
Efectos de la interacción entre el nivel de P en el suelo  
y dosis de inoculación de micorrizas (M), sobre  
el parámetro (ppm) en la parte aérea de plantas  
de Allia.

P level in soil

level  
in soil  
(ppm)

0.2

P added as  $PO_4 H_2K$  at (mg kg<sup>-1</sup>)

1 = 150; 2 = 200; 3 = 250

M = mycorrhizal inoculation

Mean values (5 rep.) ± S.E. (5%)

## 5.2. Efectos sobre la captación de P y Zn

Los resultados de la Tabla 50, aunque son valores medios de dos determinaciones, y por lo tanto no puede disponer de refrendo estadístico, tienen cierta validez, por la similitud de ambas determinaciones. Las tendencias de los efectos sobre la concentración de Zn en las plantas, son bastante elocuentes. Al aumentar la concentración de P en el medio se reduce la captación de Zn, como había sido descrito (Wallace et al., 1978). Para cada nivel de Zn, las plantas micorrizadas poseían la concentración más alta del elemento, lo que concuerda más con un mecanismo de introducción del nutriente que con un efecto "amortiguador" (Tinker y Gildon, 1983; Shuepp et al., 1987).

Es de hacer notar que a niveles bajos de Zn (0,5 y 5 ppm de elemento en suelo) las MVA aliviaron la deficiencia en Zn (Tabla 50). Importante reseñar que de acuerdo con Hale y Orcutt (1987) los márgenes de concentración en parte aérea de Zn (ppm) son los siguientes: Deficiencia, < 20; suficiencia, 25-150; toxicidad > 400. Así pues, las concentraciones de Zn alcanzadas no llegaron en ningún caso a nivel de toxicidad. Y las deficiencias encontradas en los niveles más bajos fueron superadas en el tratamiento micorrizado.

En lo referente al % de P, los resultados de la Tabla 51 ponen de manifiesto la continuidad de la actuación de las MVA a niveles más elevados de Zn, mediante su efecto más conocido (aporte de P). Los datos de Tabla 52, afectados por el peso seco de cosecha, son a su vez afectados por acciones complementarias de la MVA y demuestran un efecto detrimental de altas dosis de Zn sobre la cosecha de P en planta.

TABLA 50

Efectos de la interacción entre el nivel de Zn en el suelo y dosis de P (Pn), ó inoculación con micorrizas (M), sobre la concentración de Zn (ppm) en la parte aérea de plantas de alfalfa.

Nivel de Zn (ppm)	Nivel de P en suelo				M	$\bar{X}$
	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>		
0.5		15.3	12.0	10.0	26.0	15.8
5		31.0	23.5	17.2	34.0	26.4
10		55.1	57.7	34.3	60.5	51.9
400		148.2	145.5	137.0	184.0	153.7
800		276	256	244	295	267.7
$\bar{X}$		105	98.9	88.5	119.9	

TABLA 51

Efectos de la interacción entre el nivel de Zn en el suelo y dosis de P (Pn), ó inoculación con micorrizas (M), sobre la concentración de P (%) de la parte aerea de plantas de alfalfa.

Nivel de Zn (ppm)	Nivel de P en suelo				M	$\bar{X}$
	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>		
	0.10 ± 0.013	0.12 ± 0.010	0.11 ± 0.016	0.14 ± 0.008	0.16 ± 0.010	0.126
5	0.11 ± 0.014	0.11 ± 0.020	0.09 ± 0.016	0.10 ± 0.010	0.18 ± 0.020	0.118
10	0.11 ± 0.015	0.10 ± 0.008	0.10 ± 0.010	0.11 ± 0.010	0.18 ± 0.010	0.120
400	0.10 ± 0.020	0.10 ± 0.020	0.11 ± 0.007	0.10 ± 0.007	0.14 ± 0.010	0.110
800	0.10 ± 0.020	0.13 ± 0.008	0.10 ± 0.010	0.10 ± 0.008	0.13 ± 0.008	0.112
$\bar{X}$	0.104	0.112	0.102	0.110	0.158	

TABLA 52

Efectos de la interacción entre el nivel de Zn en el suelo y dosis de P (Pn), ó inoculación con micorrizas (M), sobre el contenido de P (mg/maceta) de la parte aerea de plantas de alfalfa.

Nivel de Zn (ppm)	Nivel de P en suelo				M	$\bar{X}$
	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>		
	0.18 ± 0.05	0.88 ± 0.21	1.53 ± 0.30	1.98 ± 0.21	1.13 ± 0.17	1.14
5	0.13 ± 0.03	0.51 ± 0.10	0.78 ± 0.19	1.10 ± 0.05	1.48 ± 0.20	0.80
10	0.12 ± 0.008	0.48 ± 0.09	0.83 ± 0.13	1.10 ± 0.11	1.55 ± 0.29	0.82
400	0.11 ± 0.02	0.55 ± 0.07	1.02 ± 0.31	0.92 ± 0.14	0.86 ± 0.10	0.69
800	0.14 ± 0.03	0.79 ± 0.19	0.43 ± 0.17	0.71 ± 0.06	0.42 ± 0.23	0.50
$\bar{X}$	0.14	0.64	0.92	1.17	1.09	

### 5.3 Efectos sobre la captación de N y FBN (N<sup>15</sup>)

El efecto de las MVA supera al del P, soluble añadido, en lo referente a incrementar la concentración de N en planta, a todos los niveles de Zn, adicionados (Tabla 53). La biomasa de N en las plantas (Tabla 54) fué similar o inferior en las inoculaciones con MVA, comparativamente con la aplicación de fosfato, a los niveles superiores de Zn. Los datos de nodulación (Tabla 55). Este proceso resultó más sensible a los niveles mas altos de Zn en plantas micorrizadas, precisamente por el papel de las MVA en el aporte del microelemento (Tinker y Gildon, 1983; Pacovsky, 1986). Es conocido que la nodulación es un proceso sensible tanto a niveles deficitarios como tóxicos de Zn (Munns y Mosse, 1980).

El proceso de FBN, dado su sensibilidad al Zn (Munns y Mosse, 1980) se efectuó por el efecto de las MVA acentuando la toxicidad al micronutriente (Tabla 56) ya que las MVA provocaban niveles de enriquecimiento en N<sup>15</sup> al menos similares, que el tratamiento de P que, a cada nivel de Zn, era menos efectivo en FBN. A grandes rasgos se aprecian paralelismos en la cosecha de N (Tabla 54), nodulación (Tabla 55) y estimaciones cualitativas de la FBN (Tabla 56), pero los coeficientes de correlación que permiten cargar de validez a dichas estimaciones solo fueron considerables al nivel P<sub>3</sub> y en el tratamiento con MVA.



TABLA 53

Efectos de la interacción entre el nivel de Zn en el suelo y dosis de P (Pn), ó inoculación con micorrizas (M), sobre la concentración de N (%) de la parte aerea de plantas de alafalfa.

Nivel de Zn (ppm)	Nivel de P en suelo				M	$\bar{X}$
	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>		
	2.53 ± 0.36	3.05 ± 0.25	3.08 ± 0.28	2.82 ± 0.45	4.60 ± 0.10	3.22
5	2.87 ± 0.27	3.18 ± 0.51	3.80 ± 0.68	2.88 ± 0.46	4.93 ± 0.51	3.53
10	2.90 ± 0.22	3.24 ± 0.43	3.32 ± 0.39	3.01 ± 0.31	5.02 ± 0.34	3.50
400	2.98 ± 0.35	3.81 ± 0.54	3.05 ± 0.53	3.49 ± 0.21	4.63 ± 0.10	3.59
800	2.88 ± 0.36	4.34 ± 0.09	3.32 ± 0.29	3.68 ± 0.99	4.05 ± 0.47	3.65
$\bar{X}$	2.83	3.52	3.31	3.18	4.65	

TABLA 54

Efectos de la interacción entre el nivel de Zn en el suelo y dosis de P (Pn), ó inoculación con micorrizas (M), sobre el contenido de N (mg/maceta) de la parte aerea de plantas de alfalfa.

Nivel de Zn (ppm)	Nivel de P en suelo				M	$\bar{X}$
	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>		
	4.7 ± 1.2	22.6 ± 2.7	43.5 ± 6.0	38.9 ± 6.8	32.4 ± 5.0	28.4
5	3.5 ± 1.1	14.8 ± 4.5	30.3 ± 6.0	30.2 ± 4.0	40.1 ± 4.5	23.8
10	3.3 ± 0.4	16.0 ± 4.5	27.4 ± 3.0	32.7 ± 5.8	43.3 ± 7.6	24.5
400	3.3 ± 0.8	21.3 ± 1.9	26.1 ± 8.3	32.1 ± 5.1	27.8 ± 2.0	22.1
800	3.8 ± 1.0	27.2 ± 7.0	14.5 ± 5.5	26.8 ± 4.2	13.5 ± 9.0	17.2
$\bar{X}$	3.7	20.4	28.4	32.1	31.4	

TABLA 55

Efectos de la interacción entre el nivel de Zn en el suelo y dosis de P (Pn), ó inoculación con micorrizas (M), sobre el número de nódulos formados en plantas de alfalfa (datos por maceta).

Nivel de Zn (ppm)	Nivel de P en suelo				M	$\bar{X}$
	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>		
0.5	15.4 ± 3.5	17.2 ± 10.3	24.2 ± 8.7	19.4 ± 2.0	16.4 ± 3.2	18.5
5	4.4 ± 0.2	13.6 ± 8.1	18.4 ± 6.1	14.8 ± 2.5	18.8 ± 7.6	14.0
10	5.2 ± 7.1	26.0 ± 4.4	12.0 ± 2.9	18.2 ± 3.5	15.0 ± 2.9	15.3
400	12.4 ± 7.0	18.6 ± 8.9	28.0 ± 10.0	21.0 ± 6.8	13.0 ± 3.3	18.6
800	7.2 ± 6.7	22.6 ± 5.5	17.4 ± 7.3	15.0 ± 2.9	6.2 ± 8.5	13.7
$\bar{X}$	8.9	19.6	20.0	17.7	13.9	

TABLA 56

Efectos de la interacción entre el nivel de Zn en el suelo y dosis de P (Pn), ó inoculación con micorrizas (M), sobre el exceso atómico de N-15 (%) de la parte aerea de plantas de alfalfa.

Nivel de Zn (ppm)	Nivel de P en suelo				M	$\bar{X}$
	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>		
	0.035 ± 0.011	0.023 ± 0.002	0.027 ± 0.009	0.022 ± 0.002	0.059 ± 0.020	0.033
5	0.067 ± 0.022	0.037 ± 0.007	0.040 ± 0.011	0.047 ± 0.019	0.052 ± 0.005	0.049
10	0.041 ± 0.011	0.055 ± 0.011	0.027 ± 0.012	0.023 ± 0.003	0.045 ± 0.013	0.038
400	0.070 ± 0.018	0.074 ± 0.003	0.041 ± 0.014	0.038 ± 0.012	0.060 ± 0.011	0.057
800	0.084 ± 0.012	0.068 ± 0.027	0.037 ± 0.010	0.063 ± 0.017	0.093 ± 0.045	0.069
$\bar{X}$	0.059	0.051	0.034	0.039	0.062	

## V. DISCUSION GENERAL

### 1. Aplicabilidad de las técnicas que usan N<sup>15</sup> para valorar FBN y otras estimaciones asociadas

Los diseños experimentales utilizados en el presente estudio han exigido aplicar, y por tanto permitido que se analizen, los tres modelos fundamentales en la metodología basada en aplicar fertilizantes inorgánicos enriquecidos con N<sup>15</sup>: Dos modelos cuantitativos como son: a) la técnica de la dilución isotópica (ensayo 1); b) la técnica del valor A (ensayo 2) y c) un modelo cualitativo (ensayos 3, 4 y 5).

La técnica de la dilución isotópica, propiamente dicha, se acepta como el método más fiable y, conceptualmente, fuera de discusión para medir FBN (Rennie, 1986a; Vose y Victoria, 1986; Danso, 1988). Así se corrobora en el presente estudio ya que, en primer lugar, los valores de FBN obtenidos están dentro de los márgenes normalmente descritos (Hardarson et al., 1987), pero fundamentalmente, porque los cambios cualitativos que cabría esperar, de acuerdo con la información descrita, sobre factores que alteran FBN, se detectan, en este caso cuantitativamente, al usar N<sup>15</sup>.

En el caso de calcular FBN por la técnica basada en la hipótesis del "valor A", el contraste de la bondad de la metodología es muy objetivo. En efecto la clave conceptual de esta hipótesis es asumir que el valor A del suelo calculado no debe variar al cambiar la dosis y/o enriquecimiento del fertilizante marcado (Danso et al., 1983) y que el % EUF (eficacia en el uso del fertilizante) sea parecido para la fijadora y no fijadora (Urquiaga y Boddey, 1987). La primera premisa se cumple exactamente en el presente estudio y la segunda se cumple en la tendencia general. Por todo ello, se puede decir que esta metodología es apropiada, y que las estimaciones de FBN en el presente estudio son correctas.

Con respecto a la metodología "cualitativa" conviene recordar

que la validez de las estimaciones depende de que los tratamientos a estudiar no induzcan cambios que afecten la proporción  $N^{15} / N^{14}$  del N que las plantas tomen del suelo (Danso, 1986).

En estos estudios, la información obtenida puede resumirse así:

a) El método es aplicable en los tratamientos que provocan interacciones entre el nivel de P (ó MVA) x el nivel de estrés hídrico, si bien en el caso de plantas micorrizadas hay que basarse en contrastar nodulación y %  $N^{15}$  e.a. en planta para juzgar la validez de las estimaciones, ya que las implicaciones de las MVA en la captación de N del suelo hace descender los niveles de correlación %  $N^{15}$  e.a. y biomasa de N en planta.

b) La técnica cualitativa también es aplicable cuando los tratamientos son los que provocan la interacciones de nivel de salinidad x nivel de P (o inoculación con micorrizas).

c) Sólo el nivel más alto de fósforo y la inoculación con MVA dieron correlaciones que permiten avalar las estimaciones de FBN en plantas afectadas por tratamientos con niveles crecientes de Zn.

## 2. Análisis general de los resultados más trascendentes obtenidos

En varias de las situaciones experimentales estudiadas se ha comprobado que las MVA mejoran la nutrición nitrogenada de las plantas. Este hecho venía siendo apuntado (Harley y Smith, 1983), pero su corroboración precisaba de un estudio más profundo, especialmente ayudado por técnicas isotópicas. El papel de las MVA en leguminosas, particularmente sus efectos en FBN, eran bien conocidos; el proceso es muy exigente en P (Munns y Mosse, 1980; Barea y Azcón-Aguilar, 1983; Hayman, 1986) y las micorrizas mejoran la captación de P del medio. Utilizando, de un lado, plantas no-micorrizadas comparables (dadas de fosfato) a las inoculadas con MVA; y de otro,  $N^{15}$ , se ha confirmado tal efecto.

Quizás la actividad más destacable de las MVA en este sentido pueda ser el incremento de la captación de N del suelo (ó fertilizantes) por las hifas de la MVA. El presente estudio presenta evidencia isotópica que, de un lado, confirma observaciones previas (Ames et al., 1983; Kessel et al., 1985; Kucey y Bonetti, 1988) , y de otro, demuestra una trascendencia del hecho en la nutrición de las plantas. Por primera vez se describe que los MVA en una planta no fijadora incrementan el valor A del suelo para el N, lo cual es una prueba definitiva de que las hifas MVA utilizan unas formas de N en el suelo que no son fácilmente disponibles a las plantas no micorrizadas (Danso, 1986). La duda está en cuales son esas fuentes, ya que tanto  $NH_4^+$  ó  $NO_3^-$  pueden ser usados por las MVA (Bowen y Smith, 1981). Puesto que el nitrato, presumiblemente la forma de N asimilable predominante en los suelos neutros objeto de estudio, es un ión que difunde muy rápidamente hacia la rizosfera, es improbable que las MVA mejoren su captación. En contraste, el amonio difunde lentamente (Chapin, 1980) de aquí que las MVA puedan ser importantes en el transporte de este nutriente hacia las raíces. Usualmente el amonio está en concentraciones bajas, pero se sabe que los hongos son

capaces de acumularlo a partir de soluciones muy diluidas así como de asimilarlo vía glutamina sintetasa (Smith et al., 1985).

Aparte de ello, el alto contenido en arcilla de los suelos estudiados puede retener amonio evitando su volatilización (Stevenson, 1986). Podría ocurrir que estos iones retenidos no estuvieran disponibles a raíces no simbióticas, y sí lo estuvieran a MVA; ésto había sido sugerido previamente (Ames et al., 1984), lo cual confirmaría en MVA hechos aceptados para otros tipos de micorrizas (Lundeberg, 1970; Stribley y Read, 1974).

Otro aspecto de interés es el papel de las MVA en comunidades mixtas de plantas. Los estudios aquí presentados muestran unas actividades de las MVA de importancia en la ecofisiología del sistema, tales como una mejora en el estado nutricional de las plantas y un equilibrio entre leguminosas (más micotróficas) y plantas no fijadoras. Ambos hechos son deseables en cultivos mixtos (Haynes, 1980; Heichel, 1987; Ofori y Stern, 1987). Quizás el aspecto más discutible sea el que concierne con el fenómeno de "Transferencia de N". Los ensayos desarrollados en el presente estudio ofrecen evidencias para apoyar las premisas que definen la existencia de tal transferencia, basada en el uso de  $N^{15}$  (Weaver, 1988). Más dudosa es la implicación de los MVA para activar la transferencia en virtud de los puentes que conexionan raíz de planta fijadora con raíz de no fijadora mediante hifas VA comunes (Newman, 1985). Es cierto que no se puede poner de manifiesto tal efecto de las MVA. Posiblemente sea difícil evidenciarlo ya que, si las MVA captan N de otras fuentes no disponibles a plantas no micorrizadas, es probable que la composición isotópica del N usado por MVA y raíces sea diferente en ciertos casos, con lo cual los apoyos conceptuales para deducir aritméticamente la existencia de transferencia, no pueden aplicarse. O sea que un efecto de las MVA en "Transferencia de N" quede enmascarado por la multiplicidad de efectos de las MVA en la nutrición nitrogenada de las plantas, algunos de ellos condicionantes de cambios en la relación  $N^{15} / N^{14}$  en el N asimilado.

La ausencia de efectos inhibidores de la FBN por N combinado, es un caso excepcional, ya discutido, tanto en lo que respecta a las razones que lo pueden justificar como al desarrollo de la metodología (N<sup>15</sup>) empleada. Por tanto nada especial que añadir en este apartado.

Con respecto a la incidencia de situaciones de estrés (hídrico, salinidad, Zn) en las relaciones *Rhizobium*-leguminosa-micorriza, algunas cuestiones merecen comentario adicional.

En relación al estrés hídrico, y aparte de lo expresado anteriormente (IV.3) sobre el papel de las MVA introduciendo nutrientes pocos móviles en situaciones de sequia, que aún dificultan más la difusión, conviene añadir las sugerencias que se discuten en el estudio de Peña et al., (1988) sobre las posibles implicaciones de compuestos tipo betaina en la osmorregulación de plantas sometidas a estrés hídrico, y el papel de las MVA incrementando la producción de tales solutos. En el diseño experimental aquí utilizado no se planearon análisis de este tipo, por no considerarlos dentro de los objetivos. Es evidente que esto abre unas ideas de trabajo futuro.

Iguales argumentos, sobre la posible implicación de las MVA en la producción de solutos osmorreguladores por las plantas son válidos para explicar el efecto de las MVA ayudando a las plantas a superar el estrés por salinidad.

Adicionalmente, puesto que este tipo de estrés dificulta la captación de P, Ca, K etc. (Pfeiffer y Bloss, 1988) es posible que las MVA basen parte de su efecto en el aporte de tales nutrientes. Así mismo, de acuerdo con Buwalda et al. (1983), las micorrizas actuarían tanto regulando el pH celular como el potencial eléctrico en las membranas del arbusculo, lo cual repercutiría en la transferencia de nutrientes. Teniendo en cuenta que estos procesos fisiológicos se alteran con el estrés salino, sería de esperar una acción de las MVA favoreciendo por este mecanismo a las plantas en tales situaciones de estrés. La producción de fitohormonas por *Glomus mosseae* (Barea y Azcón-Aguilar, 1982c) sería un mecanismo adicional en virtud de sus implicaciones en los cambios en la distribución de

fitomasa entre parte aérea y raíz debido a la micorrización. Tales cambios, que afectan y a su vez son afectados, por la fotosíntesis, podrían estar asociados a los reajustes adaptativos de las plantas al estrés.

La literatura científica sobre las interacciones Zn x MVA (Mosse et al., 1981) ofrece apoyos bibliográficos tanto a que las MVA ayuden a las plantas en condiciones de toxicidad al Zn como que las perjudiquen. Posiblemente se trate de adaptaciones de los diferentes hongos investigados. Es obvio que el hongo VA utilizado en este caso no "amotiguó" el aporte de Zn a parte aérea de las plantas.



### 3. Avances de los conocimientos en relación con el ecosistema suelo-planta-atmósfera derivados de los resultados obtenidos

Llegado este punto, más que una discusión, lo que se ofrece es un resumen de unos hechos ya discutidos anteriormente. Quizás se podría condensar la información obtenida en tres puntos: a) el efecto de las MVA en la nutrición nitrogenada de las plantas; b) el papel de las MVA en que se mantengan equilibradamente las relaciones de tipo ecofisiológico que rigen las interacciones entre plantas fijadoras y no fijadoras, que crecen en vecindad; y c) la influencia positiva de las MVA ayudando a las plantas a prosperar en situaciones de estrés hídrico o salino. En el caso de las leguminosas, el papel de las MVA, en estas situaciones de estrés se manifiesta prioritariamente por sus efectos positivos sobre FBN, ya esta se afecta considerablemente por tales tipos de estrés.

Los Resultados que se presentan en esta Memoria, tras la Discusión que se ha efectuado permiten establecer las Conclusiones que siguen en el próximo capítulo.

## VI. CONCLUSIONES

Se presenta evidencia isotópica ( $N^{15}$ ) de que:

1º Las micorrizas incrementan el % de N en planta (leguminosa) que procede de la fijación en simbiosis con **Rhizobium**.

2º Las micorrizas aumentan la capacidad de las plantas para captar N del suelo.

3º Las micorrizas inducen un incremento en el valor  $A_N$ .

4º Las micorrizas mejoran la capacidad para competir por nutrientes de una leguminosa cuando crece en mezcla con una gramínea.

5º Se detectó transferencia de N desde la leguminosa a la gramínea asociada. Aparentemente este efecto no fué mejorado por la micorrización.

6º La aplicación de dosis elevadas de N no produjo inhibición de la fijación simbiótica de  $N_2$ . Este hecho puede justificarse porque no más del 10% del N de la planta procedía del fertilizante, quizás debido a las características físico-químicas del suelo.

7º Al aumentar el estrés hídrico se atenúan los efectos beneficiosos ejercidos por fósforo sobre el crecimiento, nutrición, nodulación y fijación biológica de  $N_2$ .

8º Los efectos del estrés hídrico sobre tales parámetros fueron amortiguados por la micorrización; de forma tal, que la inoculación de micorrizas fué el único tratamiento efectivo (**vs.** P soluble) sobre nodulación y fijación de  $N_2$  a fuertes niveles de sequía.

9º Se interpreta que a niveles elevados de sequia la micorrización parece continuar introduciendo fosfato a las plantas, pero se comprueba que las plantas micorrizadas desarrollan otros mecanismos para prosperar en condiciones de estrés hídrico; uno de ellos esta probablemente basado en mejorar la nutrición nitrogenada del vegetal.

10º La inoculación con micorrizas fué el tratamiento más efectivo (**vs.** fosfato) para estimular el crecimiento, nutrición, nodulación y fijación biológica de N<sub>2</sub> a niveles altos de salinidad.

11º Las micorrizas estimulan la captación de Zn por las plantas; por ello, a niveles bajos del micronutriente en suelo, ejercen una ayuda importante, para el crecimiento, nodulación y fijación biológica de N<sub>2</sub>, pero a niveles elevados agudizan los efectos nocivos del Zn sobre dichos procesos.

A parte de estas conclusiones, basadas en el uso de un trazador isotópico, también se concluye que:

12º El porcentaje de raiz que resulta micorrizada fué escasamente afectado por la dosis de P adicionada o por el nivel de estrés inducido por Zn o sequia. Sólo niveles elevados de salinidad lo afectaron negativamente. La presencia de una leguminosa (más micotrófica) elevó el grado de micorrización de una gramínea (menos micotrófica).

## BIBLIOGRAFIA

- ABBOTT, L. K. Y ROBSON, A. D. (1984). *New Phytol.* 96: 275-281.
- AFZA, R., HARDARSON, G., ZAPATA, F. Y DANSO, S. K. A. (1987).  
*Plant and Soil.* 97: 361-368.
- AGUIRREOLEA, J. Y SANCHEZ-DIAZ, M. (1985). Tesis Doctoral, Univ.  
de Navarra.
- ALISON, I. E. (1973). *Soil Science* 116: 65-68.
- ALLEN, E. B. Y CUNNINGHAM, G. L. (1983). *New Phytol.* 93: 227-236.
- ALLEN, M. F. (1982). *New Phytol.* 91: 191-196.
- ALLEN, O. N. (1957). *Experiments in Soil Bacteriology.* Borgess  
N. N. Pub. C. O. Minneapolis. U. S. A.
- AMES, R. N. Y BETHLENFALVAY, G. J. (1987). *New Phytol.* 106: 207-  
215.
- AMES, R. N., REID, C. P. P, PORTER, L. K. Y CAMBARDELLA, C. (1983).  
*New Phytol.* 95: 381-396.
- AMES, R. N., LYNN, K., PORTER, T. V., ST. JOHN Y REID,  
C. P. P. (1984). *New Phytol.* 97: 269-276.
- ANDERSON, R. C., EBBERS, B. C. Y LIBERTA, A. E (1986). *New Phytol.*  
102: 523-527.

- APARICIO-TEJO, P.M. Y SANCHEZ-DIAZ, M.F. (1982). *Plant Physiol.*  
69: 479-482.
- APARICIO-TEJO, P.M., SANCHEZ-DIAZ, M.F. Y PEÑA, T.L. (1980).  
*Physiologia plantarum* 48: 1-4.
- ARINES, J. VILARINO, A. Y SANIZ, M.J. (1988). *Plant and Soil* in  
prensa.
- ASAI, T. (1944). *JAP. J. BOT.* 13: 463.
- ASIMI, S., GIANINAZZI-PEARSON, V. Y GIANINAZZI, S. (1980). *Can.*  
*J. Bot.* 58: 2200-2205.
- AUGE, R.M., SCHEKEL, K.A. Y WAMPLE, R.L. (1987). *Physiol. Plant*  
70: 175-182.
- AZCON-AGUILAR, C. (1980). Tesis Doctoral, UNV. de Granada.
- AZCON-AGUILAR, C. Y BAREA, J.M. (1985). *Trans Br. Mycol. Soc.*  
84: 536-537.
- AZCON-AGUILAR, C., AZCON, R. Y BAREA, J.M. (1987). III Reunion  
Nacional de Fijacion de Nitrogeno. Pamplona, pp. 92-93.
- AZCON-AGUILAR, C., BAREA, J.M. Y OLIVARES, J. (1980). *Trans.*  
*Int. Symp. Microbial.* ed. 2nd, pp. 129.
- AZCON-AGUILAR, C., BAREA, J.M. Y ROLDAN FAJARDO, B. (1984).  
*Anales de Edafología y Agrobiología* 43: 975-998.

- AZCON-AGUILAR, C., AZCON, R., DIAZ-RODRIGUEZ, R.M. Y BAREA, J.M. (1985). II Reunion Nacional de fijacion Nitrogeno. Granada, pp. 97-98.
- AZCON-AGUILAR, C., DIAZ-RODRIGUES, R.M. Y BAREA, J.M. (1986). Transaction of the British Mycological Society 91: 337-340.
- AZCON, R. (1987). Soil Biol. Biochem. 19: 417-419.
- AZCON, R. Y OCAMPO, J.A. (1984). Plant and Soil. 82: 133-138.
- AZCON, R., AZCON, -AGUILAR, C., BAREA, J. M. (1978). New Phytol. 80: 359-364.
- AZCON, R. BAREA, J.M. Y HAYMAN, D.S. (1976). Soil Biol. Biochem. 8: 135-138.
- AZCON, R., GOMEZ-ORTEGA, M. Y BAREA, J.M. (1982). New Phytol. 92: 553-559.
- BAGYARAJ, D.J. (1984). PLANT AND SOIL 77: 373-76.
- BAREA, J.M. (1986). En: Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae, (eds. V. Gianinazzi-Pearson, S. Gianinazzi), pp. 177- 187. Paris: INRA.
- BAREA, J.M. (1988). Conferencia En: 2nd European Symposium on Mycorrhizae. Praga.
- BAREA, J.M. Y AZCON-AGUILAR, C. (1982a). Anal. Edaf. Agrobiol. 41: 1517-1532.

- BAREA, J. M. Y AZCON-AGUILAR, C. (1982b). En: les Mycorrhizas  
Partie Intégrante de la Plante, pp. 181-193.
- BAREA, J. M. Y AZCON-AGUILAR, C. (1982c). En: Appl. Environ.  
Microbiol. 43: 810-813.
- BAREA, J. M. Y AZCON-AGUILAR, C. (1983). En: Advance in Agronomy,  
(ed. N. C. Brady.) 36: 1-54. New York Academic Press.
- BAREA, J. M. Y CONZALEZ, S. (1987). XIII Congress of the Intern  
ational Soc. of Soil Sci. Hamburgo, pp. 808-816.
- BAREA, J. M., AZCON-AGUILAR, C. Y AZCON, R. (1988). En: Nitrogen  
Fixation by Legumes in Mediterranean Agriculture. (eds.  
Beck & Materon), pp. 153-162.
- BAREA, J. M., AZCON-AGUILAR, C. Y AZCON, R. (1989). New Phytol.  
(106) en Prensa.
- BAREA, J. M., AZCON-AGUILAR, C. Y AZCON, R. (1987). New Phytol.  
106: 717-721.
- BAREA, J. M., AZCON-AGUILAR, C. Y ROLDAN-FAJARDO, B. E. (1984).  
Anales de Edafologia y Agrobiologia, XLIII, pp. 654-677.
- BECANA, M., APARICIO-TEJO, P. Y SANCHEZ DIAZ, M. (1984).  
Physiologia Plantarum 61: 653-657.
- BECANA, M., APARICIO-TEJO, P. Y SANCHEZ-DIAZ, M. (1986). J. of  
Experimental Botany 37: 798-806.

- BECK, D. P. Y MATERON, L. A. eds. (1988). En: Nitrogen Fixation by Legumes in Mediterranean Agriculture. Martinus Nijhoff Publishers.
- BEILBY, J. P., KIDBY, D. K. (1982). Can. J. Microbiol. 28: 623-628.
- BERNSTEIN, L. (1964). Plant Anal. Fert. Prob. IV, pp. 25-45.
- BERNSTEIN, L., FRANCOIS, L. E. Y CLARK, R. A. (1974). Agronomy Journal 66: 412-421.
- BETHLENFALVAY G. J., BROWEN, M. S., AMES, R. N. Y THOMAS R. S. (1988). Phys. Plant 72: 565-571.
- BILDUSAS, I. J., DIXON, R. K., PFLEGER, F. L. Y STEWART, E. L. (1986). New Phytol. 102: 303-311.
- BODDY, R. M., CHALK, P. M., VICTORIA, R. Y MATSUI, E. (1984). Soil Biology Biochem. 16: 583-588.
- BOLAN, N. S., ROBSON, A. D. Y BARROW, N. J. (1984). Soil Biol. Biochem. 16: 419-420. (otro) 16: 299-304.
- BOLAN, N. S., ROBSON, A. D. Y BARROW, N. J. (1987). Plant and Soil. 104: 294-298.
- BOLLER, B. C. Y NÖSBERGER, J. (1987). Plant and Soil. 104: 219-226.
- BONFANTE-FASOLO, P. (1984). In Mycorrhiza, eds. C. L. I. Powel & D. J. Bagyaraj, pp. 5-34. Florida: CRC Press.

- BONFANTE-FASOLO, P. Y GIANINAZZI-PEARSON, V. (1986). En: Physiological and Genetical Aspect of Mycorrhizal (ed. V. Gianinazzi-Pearson, S. Gianinazzi), pp. 65-73. PARIS, INRA.
- BOWEN, G.D. (1980). En: Contemporary Microbial Ecology, (eds. D.C. Ellwood, J.N. Hedger, M.J Latham, J.M. Lynch and J.H. Slaster). Academic Press, London, pp. 283-304.
- BOWEN, G.D. Y SMITH, S.E. (1981). En: Terrestrial Nitrogen Cycles (Ed. F.E. Clark y T. Rosswall), pp. 237-247. Ecol. Bull n<sup>o</sup> 33. Swedish Natural Science Research Council. Stocolmo.
- BRADLY, R., BURT, A.J. Y READ, D.J. (1981). Nature 292: 335-337.
- BUSS, M.D Y ELLIS, J. R. (1985). Can. J. 63 : 2290-2294
- BUTLER, J.H.A. (1987). Soil Biology and Bioch. 19: 273-279.
- BUTLER, J.H.A. Y LADD, J.N. (1985a). Soil Biology and Bioch. 17: 47-55.
- BUTLER, J.H.A. Y LADD, J.N. (1985b). Soil Biology and Bioch. 17: 455-361.
- BUWALDA, J.G., STRIBLY, D.P. Y TINKER, P.B. (1983). New Phytol. 93: 217-225.
- BUWALDA, J.G., STRIBLY, D.P. Y TINKER, P.B. (1984). New Phytol. 96: 411-427.

- CAPACIO, L. C. M. Y CALLOW, J. A. (1982). *New Phytol.* 91: 81-91.
- CHALK, P. M. (1985). *Soil Biol. Biochem.* 17: 389-410.
- CHAMPAGNOL, F. (1979). *Phosphorus Agric.* 76: 34-43.
- CHAPIN, F. S. (1980). *Annu. Rev Ecol. Syst.* 11: 263-260.
- CLARKSON, D. T. (1985). *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36: 77-115.
- CLUETT, M. C. Y BOUCHER, D. H. (1983). *Oecologia*, 59: 485-408.
- COOPER, K. M., (1984). En: VA Mycorrhiza ed. C. Li Powel, D. J. Bagyaraj, pp. 155-203. Florida: C. R. C. Press.
- COOPER, K. M. Y TINKER, P. B. (1978). *New Phytol.* 81: 43-52
- COX, G. Y TINKER, P. B. (1976). *New Phytol.* 77: 373-76.
- CRAIG, L. A., WIEBALH, W. J., Y McLINTOSH, S. M. (1981). *Agronomy J.* 73: 996-998.
- DAKESIAN, S., BROWN, M. S. Y BETHLENFALVAY, G. J. (1986). *Plant and Soil* 94: 439-433.
- DANIELS-HETRICK, B. A. Y BLOOM, J. (1986). *Mycologia.* 78: 32-36.
- DANIELS-HETRICK, B. A., GERSCHEFSKEKITT, D. Y THOMPSON WILSON, G. (1987). *New Phytol.* 105: 403-410.
- DANSO, S. K. A. (1986). Review, *Soil Biol. Biochem.* 18: 243-244.

- DANSO, S. K. A. (1988). En: Nitrogen fixation by Legumes in Mediterranean Agriculture. (eds. Beck and Materon), pp. 345-358.
- DANSO, S. K. A., HERA, C. Y DAUKA, C. (1987a). Plant and Soil. 99: 163-174.
- DANSO, S. K. A., BOLE, J. B. Y ZAPATA, F. (1983). IAEA-TECDOC. pp. 288.
- DANSO, S. K. A., LABANDERA, C., PASTARINI, C. Y CURBELO, S. (1988). Soil Biol. Biochem. 20: 261-262.
- DEHNE, H. W. (1987). En: Mycorrhiza and Soil Fertility (Ed. F. Schönbeck), pp. 817-825 ISSS Congress. Hamburg.
- DEXHEIMER, J., GIANINAZZI, S., GIANINAZZI-PEARSON, V., (1979). Z. Pflanzenphysiol. 92:191-206.
- DEXHEIMER, J., KREUTZ-JEANAIRE, C., GERARD, J., GIANINAZZI-PEARSON, V. Y GIANINAZZI, S. (1986). En: Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae. 1st European Symposium on Mycorrhizae, (eds. V. Gianinazzi-Pearson & S. Gianinazzi).
- DOMENACH, A. M. Y CORMAN, A. (1984). Plant and Soil. 78: 301-313.
- DOUDS D. I., JOHNSON, C. H. Y KOCH, K. E. (1988). Plant Physiol. 86: 491-96.
- DOUKA, C. E., NYCHAS, A. E. Y XENOULIS, A. C. (1986). Biol. Fertil. Soils. 2: 113-118.

- DUC, G., MARIOTTI, A. Y AMARGER, N. (1988). Plant and Soil. 106:  
269-276.
- DUECK, TH. A., VISSER, P., ERNST, W.H.O. Y SCHAT, H. (1986).  
Soil Biochem. 18: 331-333.
- DUKE, E.R., JOHNSON, C.R. Y KOCH K.E. (1986). New Phytol. 104:  
583-590.
- EL-ATRASH, F., AZCON, R. Y BARKUDE, Y. (1986). En: 26TH Scince  
Week, Latakia, Siria.
- EL-ATRASH, F., Y OCAMPO, J.A. (1985). En: 25TH Scince Week,  
Damasco, Siria.
- EL-ATRASH, F., BARKUDE, Y. Y AZCON, R. (1988). En: 2nd European  
Symposium on Mycorrhizae. Praga, pp. 32.
- FRANCIS, R., FINLEY, R.D Y READ, D.J. (1986). New Phytol. 102:  
102-11.
- FREITAS, J.R., VICTORIA, R.L., RUSCHEL, A.P. Y VOSE, P.B.  
(1984). Plant and Soil. 82: 257-261.
- FRIED, M. (1973). Pontificiae Academic Scientiarum Scripta  
Varia 38: 963-987.
- FRIED, M. (1985). Plant and Soil. 84: 139-141.
- FRIED, M. Y BROESHART, H. (1975). Plant and Soil 43: 707-711.
- FRIED, M. Y MIDDELBOE, V. (1977). Plant and soil. 47: 713-715.

- FRIED, M., DANSO, S.K.A. Y ZAPATA, F. (1983). Canadian Journal of Microbiology. 29: 1053-1062.
- FRIEDLER, R. Y PROKSCH, G. (1975). Analitical Chiminal Acta. 78: 1-62.
- GALE, J. Y ZERONI, M. (1985). Plant and Soil 89: 57-67.
- GAUTHIER, D., DIEM, H.G. Y DOMMERGUES, Y.R. (1985). Soil Biol. Biochem. 17: 375-379.
- GERDEMANN, J.W. Y TRAPPE, J.M. (1974). Mycolgia (Memori) 5: 1-76.
- GIANINAZZI-PEARSON, V. (1983). En: Genes Involved in Microbe-Plant Interactions (eds. Denes et al.), pp. 225-253. Vienna: Springer Verlag.
- GIANINAZZI-PEARSON, V. (1984). En: Plant Gene. Research. Genes Involved in Microbe-Plant Interactions, (D.P.S. Verma and T. Hohn, eds.), pp. 225-253, Springer-Verlag, Wien and New York.
- GIANINAZZI-PEARSON, V. (1986). En: Biology and Molicular Biology of Plant Pathogen Interactions. Nato Ast Series, (ed. Bailey, J.A. ) vol. H1, springer-verlag, Berlin, pp. 29-37.
- GIANINAZZI-PEARSON, V. Y GININAZZI, S. (1986). En: Physiol. and Gen. Aspects of Mycorrhizae, (eds. Gianinazzi-Pearson, V, and Gianinazzi, S.), pp. 101-109. Paris, INRA.
- GIANINAZZI-PEARSON, V., DEXHEIMER, J. ,GININAZZI, S. Y JEANMARY, G. (1984). J. PLANT PHISIOLOG. 114: 201-05.

- GIANINAZZI, S., GIANINAZZI-PEARSON, V., Y TRAUVELOT, A. (1988).  
2nd European Symposium on Mycorrhizae. Praga, pp. 39.
- GILDON, A. Y TINKER, P.B. (1981). Trans. Brit. Mycol. Soc. 77:  
648-649.
- GILLER, K.E., WANI, S.P. Y DAY, J.M. (1986). Plant and Soil. 90:  
255-263.
- GILLER, K.E., DAY, J.M., DART, P.J. Y WANI, S.P. (1984). J.  
Microbiology Methods. 2: 307-316.
- GILMOR, A. E. (1971). J. AMER. SOC. HORT. SCI. 96: 35-38.
- GIOVANNETTI, M. Y MOSSE, B. (1980). New phytologist 84: 489-  
500.
- GORHAN, j., WYNJONES, R.G. Y MacDONNEL, E. (1985). Plant and  
Soil 89: 15-40.
- GRAHAM, J.H. (1988). Phytopatol. 78: 365-366.
- GRAHAM, J.H. SYVERSTEN, J.P. Y SMITH, M.L. (1987). New phytol.  
105: 411-419.
- HALE, M.G. Y ORCUTT, D.M. (1987). En: "The Physiology of Plants  
Under Stess" J ohn Wiley and Sons. New York.
- HAFEEZ, F.Y., ASLAM, Z. Y MALIK, K.A. (1988). Plant and Soil  
106: 3-8.

- HARDARSON, G., DANSO, S.K.A Y ZAPATA, F. (1987). En: Biological Nitrogen Fixation Field Crops, pp. 165-192. CRC Hand book of Plant Science in Agriculture. Vols. I and II. CRC Press.
- HARDARSON, G., ZAPATA, F. Y DANSO, S.K.A. (1984). Plant and Soil. 82: 369-375.
- HARDIE, K. (1985). NEW PHYTOL. 101: 677-84.
- HARDIE, K. Y LEITON, L. (1981). NEW PHYTOL. 89: 599-608.
- HARLEY, J.L. Y SMITH, S.E. (1983). Mycorrhizal Symbiosis, pp. 1-483. London-NewYork: Academic Press.
- HARRIS, D., PACOVSKY, R.S. Y PAUL, E.A (1985). New Phytol. 101, 427-440.
- HARTMOND, U., SCHAESBERG, N.V., GRAHAM, J.H. Y SYVERSTEN, J.P. (1987). Plant and Soil 104:37-43.
- HASS, J.H. Y KRIKUM, J (1985). New Phytol. 100: 613-621.
- HASSAN, N.A.K., DREW, J.V., KNUDSEN, D. Y OLSEN, R. (1970a). Agro. J. 62: 43-45.
- HASSAN, N.A.K., DREW, J.V., KNUDSEN, D. Y OLSEN, R. (1970b). Agro. J. 62: 46-48.
- HAYMAN, D.S. (1980). Nature 287: 478-488.

- HAYMAN, D. S. (1982). En: Advances in Agricultural Microbiology, (ed. N. S. Subba Rao), pp. 325-73 Newdelhi: Oxford & IBH PUBL. CO.
- HAYMAN, D. S. (1983). CAN. J. BOT. 61: 944-963.
- HAYMAN, D. S. (1984). En: Microbiological Methods for Society for Applied Bacteriology Academic Press.
- HAYMAN, D. S. (1986). Mircen J. 2: 121-145.
- HAYNES, R. J. (1980). Adv. Agron. 33: 227-61.
- HAYSTEAD, A., MALAJCZUC, N. Y GROVE, T. S. (1988). New Phytol. 108: 417-423.
- HEICHEL, G. H. (1987). En: Energy in Plant nutrition and Pest. Control (ed. Z. R. Helsel), pp. 63-80. Elsevier Science Publishers B. V. Amestrדם.
- HEICHEL, G. H., VANCE, C. P., BARNES, D. K. Y HENJUM, K. I. (1985). Crop Sci. 25: 101-105.
- HENSON, R. A. Y HEICHEL, G. H. (1984). Crop Sci. 24: 986-990.
- HEPPER, C. M. (1979). Soil Biol. Biochem. 11: 269-77.
- HEPPER, C. M. Y O'SHEA, J. (1984). Plant and Soil 82: 61-68.
- HEPPER, C. M. Y SMITH, G. A. (1976). Trans. Br. Mycol. Soc. 66: 189-94.



- HEPPER C. M. L., SEN. R. Y MASKELL, C. S. (1986). *New Phytol.* 102:  
529-539.
- HEPPER C. M. L., SEN. R. Y AZCON-AGUILAR, C. Y GRACE, C. (1987).  
*Soil Biol. Biochem.* 20: 51-59.
- HERRERA, M. A., BEDMAR, E. Y OLIVARES J. (1987). *J. of Plant  
Physiology* 128: 467-472.
- HEWITT, E. J. (1952). *Technical Communication Agricultural  
Bureau*, nº 22.
- HIRREL, M. C. Y GERDEMANN, J. W. (1980). *J. Am. Soc. soil sci.* 44:  
654-655.
- ISMAILI, M. Y WEAVER, R. W. (1986). *Plant and Soil.* 96: 327-335.
- JEFFRIES, P. (1987). *En: CRS Critical Rev Biotechnol. Fda.* 5:  
319-357.
- KESSEL, V. CH., SINGLETON, P. W. Y HOBEN, T. S. (1985). *Plant  
Physiol.* 79: 562-563.
- KHAN, A. G. (1974). *J. GEN. MICROBIOL.* 81:7-14.
- KOSKE, R. E. (1981). *Trans. Br. Mycol.* 76: 411-416.
- KRAUS, M., FUSSEDER, A. Y BECK, E. (1987). *Plant and Soil* 97:  
407-418.
- KUCEY, R. M. N. Y BONETTE, R. (1988). *Can. J. Soil Sci.* 68: 143-  
149.

- KUCEY, R. M. N. Y JANSEN, H. H. (1987). Plant and Soil 104: 71-78.
- KUCEY, R. M. N. Y PAUL, E. A. (1982). Soil Biol. Biochem. 14: 407-412.
- KWAPATA, M. B. Y HALL, A. E. (1985). Vigna-Unquiculata (L) Wa (P) Field CR RE 12: 241-250.
- LA RUE, J. H., W. D. McCLELLAN, Y W. L. PEACOCK, (1975). Calif. Agric. 29: 6-7.
- LACHICA, M., AGUILAR, A. Y YANEZ, J. (1973). Anales de Edofologia y Agrobiologia 32: 1033-1047.
- LAMBERT, D. H. BAKER, D. E. Y COLE, H. J. (1979). Soil Sci. Soc. Am. 43: 976-986.
- LEDGARD, S. F., FRENEY, J. R. Y SIMPSON, J. R. (1985b). Soil Biol. Biochem. 17: 575-577.
- LEDGARD, S. F., MORTON, R., FRENEY, J. R., BERGERSEN, F. J. Y SIMPSON, J. R. (1985a). Soil Biol. Biochem. 17: 317-321.
- LEDGARD, S. F., SIMPSON, J. R., FRENEY, J. R., BERGERSEN, F. J. Y MORTON, R. (1985c). Soil Biol. Biochem. 17: 323-328.
- LIGERO, F. (1984). Tesis Doctoral de la Univ. de Granada.
- LIGERO, F., LLUCH, C. Y OLIVARES, J. (1987). J. Plant Physiology 129: 461-467.
- LINDSAY, W. L. Y NORWELL, W. A. (1978). Soil Sci. Soc. Amer. J. 42: 421-428.

- LOPEZ-AGUILLON, R. Y MOSSE, B. (1987). *Plant and Soil* 79: 155-170.
- LUNDEBERG, G. (1970). *Studia Forestalia Suecica* 79: 1-96.
- MacDONALD, R.M. Y LEWIS, M. (1978). *New Phytol.* 80: 135-140.
- MARUMOTO, T. (1986). *Jara* 20: 108-114.
- MARX, C., DEXHEIMER, J., GIANINAZZI-PEARSON, V. Y GIANINAZZI, S.  
(1982) *New Phytol.* 90: 37-43.
- MASON, E. (1928). *New Phytol.* 27:193-95.
- MASS, E.V. Y NIEMAN, R.H. (1978). En: G.A. Jung (ed.) *Crop Tolerance to Suboptimal Land Conditions* *Asa. Spec. pub.* 32: 343.
- MENGE, J.A. (1983). *Canadian J. of Bo.* 61: 1015-1024.
- MENGE, J.A. (1984). En: *VA Mycorrhizae* ed. C.L.I. Powell, D.J. Bagyaraj, pp. 187-203. Florida: CRC Press.
- MORRIS, D.R. Y WEAVER, R.W. (1987). *Soil Sci. Soc. Am. J.* 51: 115-119.
- MORRIS, D.R., ZUBERER, D.A. Y WEAVER, R.W. (1985). *Soil Biol. Biochem.* 17: 87-91.
- MÜLLER, M.M. Y SUNDMAN, V. (1988). *Plant and Soil.* 105: 133-139.
- MOSSE, B. (1962). *J. Gen. Microbial.* 27: 509-20.
- MOSSE, B. (1972). *Soils Rev. Ecol. Biol. Sol* 9: 529-537.

- MOSSE, B. (1986). *Biological Agriculture and Horticulture* 3: 191-209.
- MOSSE, B., HEPPER, C.M. (1975). *PHYSIOL. Plant Pathol.* 5: 215-223.
- MOSSE, B., POWEL, C.L. Y HAYMAN, D.S. (1976). *New Phytol.* 76: 331-342.
- MOSSE, B., STRIBLY, D.P. Y LETACON, F. (1981). *Adv. Microb. Ecol.* 5: 137-218.
- MUNNS, D.N. Y MOSSE, B. (1980). (eds. by R.J. Summer Field and A. H. Bunting), pp. 115-125. H.M. Stationary Office London.
- NDOYE, I. Y DREYFUS, B. (1988). *Soil Biol. Biocchem.* 20: 209-213.
- NEWMAN, S.E. (1985). Ph. D. Diss. Texas A & M Univ., College Station.
- NEWMAN, E. Y RITZ, K. (1986). *New Phytol.* 104: 77-87.
- NICOLSON. T.H. (1960). *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 43: 132-145.
- OCAMPO, J.A., CARDONA, F.L. Y EL-ATRASH, F. (1986). *En: Physiol. and Gen. Aspects of Mycorrhizae*, (eds. Gianinazzi-Pearson, V, and Gianinazzi, S.), pp. 721-724.
- OCAMPO, J.A., MARTIN, J., HAYMAN, D.S. (1980). *New Phytol.* 84: 27-35.
- OFORI, F. Y STERN, W.R. (1987). *Advances in Agronomy* 41: 41-48.

- OJALA, J. C. JARREL, W. M., MENGE, J. A. Y JHONSON, E. L. V. (1983).  
Agronomy J. 75: 255-59.
- OLIVARES, J., CASADESUS, J. Y BEDMAR, E. (1977). Appl. Environ.  
Microbiol. 39: 967-970.
- OLSEN, R. S., COLE, C. V., WATANABE, F. S. Y DEAM, L. A. (1954).  
Circular nº 939 U.S. Dep. Agric. Washington D.C. pp. 19.
- PACOVSKY, R. S. (1986). Plant and Soil 95: 379-388.
- PACOVSKY, R. S., FULLER, G., Y STAFFORD, A. E. (1986). Plant and  
Soil 92: 37-45.
- PALEG, I. G., STEWART, G. R. Y STARR, R. (1985). Plant and Soil  
89: 83-94.
- PANG, P. C. Y PAUL, E. A. (1980). Can. J. Soil Sci. 60: 241-251.
- PAPASTYLIANAU, I. (1987). Plant and Soil. 100: 213-223.
- PEÑA, J. I. Y SANCHEZ- DIAZ, M. (1983). Tesis Doctoral, UNV. de  
Navarra.
- PEÑA, J. I., SANCHEZ-DIAZ, AGUIRREOLEA, J. Y BECANA M. (1988). J.  
Plant Physiology 133: 79-83.
- PFEIFFER, C. M. Y BLOSS, H. E. (1988). New Phytol. 108: 315-321.
- PHILLIPS, D. A., MILTON, B. J. Y FOSTER, K. W. (1986). En: Field  
Measurement of Dinitrogen Fixation and Denitrification. R. D.  
Hauck and R. W. Weaver. (eds.) , pp. 11-21. Spec pub. 18. SSSA,  
Madison, WI.

- PHILLIPS, J.M. Y HAYMAN, D.S. (1970). *Trans. Brit. Mycolo. Soc.* 55: 159-161.
- PLAUT, Z. Y GRIEV, C.M. (1988). *Plant and Soil* 105: 283-286.
- POND, E.C., MENGE, J.A., Y JARRELL, W.N. (1984). *Mycologia* 76: 74-84.
- POSS, J.A., POND, E. MENGE, J.A. Y JARRELL, W.M. (1985). *Plant and Soil* 88: 307-19.
- POWEL, C.LI. (1976). *Trans. Br. Mycol. Soc.* 66: 439-445.
- POWEL, C.LI. (1979). *New Phytol.* 83: 681-694.
- RAO, M.R., REGO, T.J. Y WILLEY, R.W. (1987). *Plant and Soil* 101: 167-177.
- RAVEN, J.A. (1988). *New Phytol.* 109: 1-20.
- READ, D.J., KOUCHEKI, H.K. Y HODGSON, J. (1976). *New Phtol.* 77: 641-653.
- REICHARDT, K., HARDARSON, G., ZAPATA, F., KIRDA, C. Y DANSO, S.K.A. (1987). *Plant and Soil.* 103: 45-50.
- REID, C.P.P. Y BOWEN, G.D. (1979). *En: The Soil-Root Interface*, (eds. J.L. Harley and R.S. Russell), pp. 211-219. Academic Press London.
- RENNIE, R.J. (1986a). *En: Field Measurment of Dinitrogen Fixation and dinitrification*, (eds. R. D. Hauck and R.W. Weaver), pp. 43-58.

- RENNIE, R. J., (1986b). *Agronomy Journal* 78: 158-163.
- RENNIE, R. J. Y THOMAS, J. B. (1987). *Plant and Soil*. 100: 213-223.
- RERKASEM, B., RERKASEN, K., PEOPLES, M. B., HERRIDGE, D. F. Y  
BERGERSON, F. J. (1988). *Plant and Soil* 108: 125-135.
- RHODES, I. (1981). En: *Plant Physiology and Herbage Production*  
(ed. C. E. Wright), pp. 149-161. British Grassland Society.
- RHODES, L. H., GREDEMANN, J. W. (1975). *New Phytol.* 75: 555-561.
- ROLDAN-FAJARDO, (1985). Tesis Doctoral, Facultad de Ciencia,  
Unv. de Granada.
- ROLDAN-FAJARDO, B. Y BAREA, J. M. (1986). En: 26TH Science Week,  
Latakia, Siria.
- ROZEMA, J., ARP, W., VAN DIGGELEN, J., VAN ESBROEK, M.,  
BROEKMAN, R. Y PUNTE, H. (1986). *Acta. Bot. Neerl.* 35: 457-  
467.
- SAFIR, G. R. (1985). IAEA TECDOC- 288.
- SAFIR, G. R., BOYER, J. S. Y GERDEMANN, J. W. (1972). *Plant Phisiol.*  
49: 700-703.
- SAINZ, M. J. Y ARINES, J. (1988a). *Biology and Fertility of*  
*Soils.* 6: 55-60.
- SAINZ, M. J. Y ARINES, J. (1988b). *J. Agric. Camb.* 111: 67-73.

- SANDERS, F. E. (1986). En: Physiological and Genetical Aspect of Mycorrhizae, (eds. V. Gianinazzi-Pearson, S. Gianinazzi), pp. 209-216, Paris: Inra.
- SANDERS, F. E. SHEIKH, N. A. (1983). Plant and Soil 71: 223-46.
- SCHNÜRER, J. Y ROSSWALL, T. (1987). Plant and Soil. 102: 71-78.
- SCHWAB, S. M., LEONARD, R. T., MENGE, J. A. (1984). Can. J. BOT. 62: 1227-1231.
- SCHWAB, S. M., MENGE, J. A., LEONARD, R. T. (1983). Amer. J. BOT. 70: 1225-1232.
- SENARATNE, R., AMORNPIMOL, C. Y HARDARSON, G. (1987). Plant and Soil. 103: 45-50.
- SHOCK, C. C., WILLIAM, W. A., JONES, M. B., CENTER, D. M. Y PHILLIPS, D. A. (1984). Plant and Soil. 81: 323-332.
- SHUBERT, A. V. Y HAYMAN, D. S. (1986). New Phytol. 103: 79-90.
- SHUEPP, M., DEHN, B. Y STICHER, H. (1987). Angew Botanik 61: 5-96.
- SING, M. V. Y ABROL, I. P. (1986). Plant and Soil 94: 445-449.
- SIQUEIRA, J. O. (1987). II Reuniao Brasileira Sobre Micorrizas, pp. 44-70. Sao Paulo. Brasil.
- SMITH, S. E. (1980). Biol. Rev. 55: 475-510.
- SMITH, S. E. Y BOWEN, G. D. (1979). Soil Biology and Biochemistry 11: 469-473.

- SMITH, S.E. Y DAFT, M. J. (1977). AUST. J. Plant Phisiol. 4: 403-413.
- SMITH, S.E. Y GIANINAZZI-PEARSON, V. (1988). Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39: 221-244.
- SMITH, S.E. Y WALKER, N.A. (1981). New Phytol. 89: 225-40.
- SMITH, S.E., St JOHN, B. J., SMITH, F.A. Y NICHOLAS, D. J. D. (1985). New Phytol. 99: 211-227.
- SPRENT, J. I. (1976). En: Water Deficits and Plant Growth Vol. IV. T. T. Kozlowski, Academic Press, New York, pp. 291-315.
- SPRENT, J. I. (1981). En: Physiology and Biochemistry of Drough Resistence in Plants. (eds. L. G. Paleg Y D. Aspinal) Academic Press, London, PP. 131-143.
- STEELE, K.W. Y LITTLER, R.A. (1987). Australian J. Agricult. Research. 38: 153-161.
- STEVENSON, F. J. (1986). En: Cycles of Soil, (ed. John Wiley), New York.
- STRIBLEY, D. P. Y READ, D. J. (1974). New Phytologist 99: 211-227.
- STRIBLEY, D. P., TINKER, P. B. Y SNELLGROVE, R. C. (1980). J. of Soil Sci. 31: 655-672.
- TA, T. C. Y FARIS, M. A. (1987). Plant and Soil 98: 265-274.
- TA, T. C. Y FARIS, M. A. (1988). Plant and Soil 107: 25-30.

- TINKER, P.B. (1980). In the Role of Phosphorus in Agriculture (eds. F.E. Kwasahneh, E.C. Sample & E.J. Kamprath), pp. 617-654. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.
- TINKER, P.B. Y GILDON, A. (1983). En: Metales and Micronutrients. Uptake and Utilization by Plants. (eds. D.A. Robb and W.S. Pierpoint, pp. 21-32. Academic Press London.
- TISDALL, J.M., OADES, J.M. (1979). Austr. J. Soil Res. 17: 429-441.
- TOMMERUP, IC. (1983). Trans. Br. Mycol. Soc. 81: 37-45.
- URQUIAGA, S.S. Y BODDEY, R.M. (1987). Plant and Soil 102: 291-294.
- VASILAS, B.L. Y HAM, J.E. (1984). Agronomy J. 76: 759-764.
- VOSE, P.B. Y VICTORIA, R.L. (1986). En: Field Measurement of Dinitrogen Fixation and Dinitrification. pp. 23-42.
- WADA, E., IMAIZUMI, R., KABAYA, Y., YASUDA, T., KANAMORI, T., SAITO, G.Y. Y NISHIMUNE, A. (1986). Plant and Soil 39: 268-286.
- WALKER, C. (1987). II Reniao Brasileira Sobre Micorrizas, pp. 83-97, Sao Paulo, Brasil.
- WALLACE, A., MUELLER, R.T. Y ALEXANDER, G.V. (1978). Soil Sci. 126: 336-341.
- WARNER, A. Y MOSSE, B. (1982). New Phytol. 90: 529-536.

- WEAVER, R.W. (1986). En: Field Measurement of Dinitrogn Fixation and denitrification. (eds. R.D. Hauk and R.W. Weaver), pp. 1-10.
- WEAVER, R.W. (1988). En: Nitrogen Fixation by Legumes in Mediterranean Agriculture. (eds. Beck & Materon), pp. 359-365.
- WHITTINGHAM, J. Y READ, D.J. (1982). New Phytol. 90: 277-284.
- WILKINSON, H.F., LONERAGAN, J.F. Y QUIRK, J.P. (1968). Soil Sci. Amer. Proc. 32: 831-833.
- WILSON J.M. (1984 a). New phytol. 97: 413-426.
- WILSON J.M. (1984 b). New Phytol. 97: 427-435.
- WITTY, J.F. (1983). Soil Biol. Biochem. 15: 631-639.
- WITTY, J.F. Y MICHEN F.R. (1988). En: Nitrogen Fixation by Legumes in Mediterranean Agriculture, pp. 331-334. (eds. D.P. Beck & Materon).
- WITTY, J.F. Y RITZ, K. (1984). Soil Biol. Biochem. 16: 657-661.
- YONEYAMA, T. FUJITA, K., YOSHIDA, T., MATSUMOTO, T., KAMBAYASHI, I. Y YAZAKI, J. (1986). Plant Cell Physiol. 27: 791-799.
- YONEYAMA, T., YAMADA, N., KOJIMA, H. Y YAZAKI, J. (1984). Plant Cell Physiol. 25: 1561-1565.
- ZAHARAH, A.R. (1987). En: III Meeting FAO/IAEA, (Pasture Management) Viena.

ZAJICEK, J.M., HETRICK, B.A.D. Y ALBRECHT, M.L. (1987). Amer.  
Soc. J. Hort. Sci. 112: 454-459.

ZAPATA, F., DANSO, S.K.A., HARDARSON, G. Y FRIED, M. (1987).  
Agron. j. 79: 172-176.

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA DE GRANADA



800026954