

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Fisiología Vegetal

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN
Departamento de Microbiología



TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA RESISTENCIA
DE LAS PLANTAS A ESTRESOS OSMÓTICOS INDUCIDOS POR
MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS PROMOTORES DEL
CRECIMIENTO VEGETAL (HONGOS MICORRÍFICOS ARBUSCULARES
Y BACTERIAS)

ADRIANA MARULANDA AGUIRRE

Granada, 2006

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Fisiología Vegetal

ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA RESISTENCIA DE
LAS PLANTAS A ESTRESSES OSMÓTICOS INDUCIDOS POR
MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO
VEGETAL (HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES Y BACTERIAS)**

Memoria que presenta la Ingeniero Agrónomo
Adriana Marulanda Aguirre
para aspirar al Título de Doctor

Fdo.: Adriana Marulanda Aguirre

Vº Bº
Los Directores

Fdo.: Dr.Dª Rosario Azcón González de Aguilar
Profesora de Investigación
Estación Experimental del Zaidín
CSIC

Fdo.: Dr.Dº. José Miguel Barea Navarro
Profesor de Investigación
Estación Experimental del Zaidín
CSIC

Los trabajos de investigación que se exponen en la presente Memoria de Tesis Doctoral, fueron realizados en el grupo de Micorrizas del Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín, financiado la mayor parte por una beca predoctoral concedida por la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI).

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han sido publicados en las siguientes revistas internacionales:

Marulanda, A., Azcón, R., Ruiz-Lozano, J.M. Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* plants under drought stress. **Physiologia Plantarum** (2003) 119: 526-533

Marulanda-Aguirre A; Porcel R; Barea JM and Azcón R. Drought tolerance and antioxidant activities in lavender plants colonized by native drought-tolerant or drought-sensitive *Glomus* species. **Microbial Ecology** (2006). Enviado

Marulanda, A., Barea, J. M., Azcón, R. an indigenous drought-tolerant strain of *Glomus intraradices* associated with a native bacteria improves water transport and root development in *retama sphaerocarpa*. **Microbial Ecology** (2006). *En impresión*

Marulanda-Aguirre, A.; Azcón, R.; Ruiz-Lozano, J.M.; Aroca, R. Opposite effects a *Bacillus megaterium* on *Lactuca sativa* L. growth depending on the arbuscular mycorrhizal fungi co-inoculated: Physiological and biochemical traits. **Journal Plant Growth Regulation** (2006) Enviado

Marulanda-Aguirre, A.; Azcón, R.; Bago, A. Interactions between the arbuscular mycorrhizal (AM) fungus *Glomus intraradices* and two autochthonous bacteria from a isolates semiarid mediterranean ecosystem: A dixenic culture study. **New Phytol** (2006) Enviado

Así mismo, parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes Congresos y Reuniones Científicas:

-**COST 838** Praga (Abril, 2006).

-**Congreso Internacional de Micorrizas "Exploring and Exploiting the Natural AM Fungal Diversity in Stressed Soil-Plant Systems"**. Granada. España. (Julio, 2006)

A mis padres y hermana

Piensa, cree, sueña y atrevete

WALT DISNEY

AGRADECIMIENTOS

El camino no ha sido siempre fácil, sin embargo la esperanza, los sueños e ilusiones no han dejado nunca de estar presentes. Sueños de los cuales ustedes han sido cómplices incondicionales. Por eso, mil gracias.

No es fácil para mí escribir esta parte sin olvidar a alguien, y no aburrir al lector. Espero por tanto, que estos agradecimientos no sean un mero listado de nombres, sino que todos y cada uno de los que he enumerado han significado algo para mí durante estos cinco años que ha durado la realización de esta tesis doctoral.

Antes de nada, quiero agradecer a Pilar, Antonio y Pedro. Mi familia en Granada. Por estar siempre ahí...desde el principio hasta el final, día a día; apoyándome, animándome en los momentos difíciles que se pasan en cualquier tesis y en la vida. Agur.

Y a la familia Raya Garrido, por compartir sus ilusiones y alegrías.

Seguidamente, agradecer a mis directores de Tesis. Los doctores D^a Rosario Azcón González y D. José Miguel Barea Navarro, por haberme dado la oportunidad de estar en su grupo y poder realizar esta tesis doctoral. Quiero agradecerles además, su ayuda, apoyo y enseñanzas a lo largo de este periodo de mi vida, sin olvidar la amistad que me ha unido a ellos, no sólo en el plano profesional, sino también en el personal. Charo y José Miguel no han sido únicamente mis directores de Tesis, Han sido y son bastante más. También quiero agradecerles el haber intentado infundirme la comprensión, la paciencia, la sabiduría, el conocimiento y un espíritu de trabajo que daban continuamente, no con palabras, sino como debe de ser, con su ejemplo diario.

A la Dra. Concepción Azcón, que como subdirectora de la EEZ, siempre esta corriendo por los pasillos intentando que todo salga bien y a la Dra. Nuria Ferrol, siempre dispuesta a solucionar cualquier problema, que con su pregunta “que... como va todo” durante los paseos en el ascensor, me ha infundido ánimos para seguir adelante.

Al Dr. Juan Manuel Ruiz Lozano, por que durante el transcurso de esta tesis ha sido como un director más, siempre disponible para resolver cualquier duda y dar un consejo con una palabra cariñosa, muchas gracias “Juanma”. Al Dr. Albert Bago, por su simpatía al recibirme en su escritorio y tener un chiste para cualquier situación complicada.

Quiero agradecer a mis compañeros del laboratorio: Iván, siempre has estado para escucharme y ayudarme en los momentos que mas he necesitado un amigo, ya son tres años que llevamos juntos y espero que sean muchos más, eres el mejor, compi !!, Pablo y Carlos que aunque ya no están con nosotros siempre serán parte del 310.

A mis compañeros de grupo: Almudena, Astrid que estuvieron conmigo los primeros años, Carmen “la “carmela” la niña mas cariñosa y la mejor amiga,... te voy a extrañar para

comer, Custodia, Chon, Javier, José, Mari carmen, Ricardo, una persona encantadora, no tengo palabras para agradecerte lo mucho que me has ayudado al terminar, espero que todo te vaya muy bien, Rosita y Sonia, tu eres la siguiente!!

A los recién incorporados: Alía, Antonio, Jacob, Juan, Javier, Karim, Maria José, Paloma, Silvia, Vanessa, y Virginia... Animo!!!

A los de los otros departamentos por su ayuda

Y en general a todas las personas de la Estación Experimental del Zaidín, que de una u otra forma han contribuido al desarrollo de esta tesis: Germán, José Luis, Mari Pepa, Mosse, Salomé, Virginia, Yimi y el Sr. Ricardo, que con su alegría se hace el trabajo más agradable.

A mis amigos, a los que he podido conservar a lo largo de mi vida: Andrea, Robert, y Rafael, gracias por sus compañía durante el transcurso de esta tesis. A los que ya se fueron, pero siguen siendo amigos: Ana, Edson, Mayra, Jhon, Jacqueline, Andrea. A mis amigos de Colombia en Granada: Diana, Alejandro, Marcela, Paola y la última en llegar Carol, por esos momentos para añorar la comida, la música y el paisaje... Colombia, te quiero!. Al resto de mis amigos: Charo, Belén, Emilio, Gloria, Jesús, Laura, Miguel Teresa y por supuesto a los de la comida de los viernes que seguro me falta alguno por mencionar.

Por último, pero no por ser menos importante, a mis padres, Rosa M^o y Javier, si no fuera por ellos no estaría aquí escribiendo, gracias por intentar infundirme a lo largo de mi vida, la bondad, la honradez, la constancia y la dedicación, valores de los que siempre estaré muy orgullosa. A mi hermana, Carolina, por haberme soportado toda su vida y a mis primos, que con su ejemplo me animan a seguir adelante.

Muchas gracias a todos!!!

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

1. Naturaleza, interés y finalidad de la investigación	1
2. Objetivos	2
2.1. Objetivo general	2
2.2. Objetivos específicos	2
3. Antecedentes bibliográficos	3
3.1. El déficit hídrico	4
3.2. Características de los ecosistemas mediterráneos	6
3.3. Micorrizas arbusculares. Su importancia e implicación en el estrés hídrico de los vegetales	8
3.4. Bacterias PGPR. Características e identificación de aislados nativos y su capacidad protectora frente a condiciones adversas	12
3.4. Importancia de la interacción de los aislados hongos MA y bacterias PGPR en la protección a las plantas frente a condiciones adversas	14

II. MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES

1. Material biológico y condiciones de crecimiento	17
1.1. Material vegetal	17
1.1.1. Plantas utilizadas	17
1.1.2. Cultivo de plantas	17
1.1.2.1. Substrato utilizado	17
1.1.2.2. Esterilización, germinación y siembra de semillas	17
1.1.2.3. Solución nutritiva	18
1.1.2.4. Condiciones de cultivo	19
1.1.2.5. Determinación del estado hídrico del suelo	20
1.2. Material fúngico	20
1.2.1. Hongos MA utilizados	20
1.2.2. Producción y conservación de inoculo	20
1.2.3. Tinción de raíces micorrizadas	21
1.2.3.1. Tinción con Azul Tripán (TB)	21
1.2.3.2. Tinciones vitales	21
1.2.3.2.1. Succinato deshidrogenasa (SDH)	21
1.2.3.2.2. Fosfatasa alcalina (ALP)	21
1.2.4. Cuantificación de la colonización micorrícica	22
1.2.5. Longitud del micelio extraradical	22
1.2.6. Cultivo monoxénico	23
1.3. Material bacteriano	23
1.3.1. Aislamiento de bacterias a partir de suelo rizosférico	23
1.3.2. Identificación de bacterias	24

1.3.3. Inoculación de bacterias	25
1.3.4. Conservación de las cepas	26
2. Determinaciones fisiológicas	26
2.1. Producción de biomasa	26
2.2. Cuantificación de nódulos	26
2.3. Longitud de raíz	26
2.4. Contenido hídrico	26
3. Determinaciones bioquímicas y enzimáticas	27
3.1. Determinaciones bioquímicas	27
3.1.1. Abundancia natural de ¹³ C	27
3.1.2. Concentración de nutrientes	27
3.1.3. Determinación del AIA	27
3.1.4. Glomalina	27
3.2. Determinaciones enzimáticas en el suelo	28
3.2.1. Actividad deshidrogenasa	28
3.2.2. Actividad fosfatasa	28
3.2.3. Actividad glucosidasa	28
4. Análisis estadísticos	29
5. Presentación de los experimentos	29

III. CAPITULOS ESPECÍFICOS

Capítulo 1. Evaluación general de los aislados autóctonos (hongos AM y bacterias) de la Sierra de Baza “características y mecanismos de tolerancia a condiciones adversas ...	35
1.1. Evaluación de la actividad de los hongos MA autóctonos que resultan más eficientes en condiciones de limitada disponibilidad hídrica	36
1.1.1. Evaluación de la efectividad de los hongos MA autóctonos aislados a partir de suelo rizosférico de la Sierra de Baza	36
1.1.1.1. Material y Métodos	36
1.1.1.2. Determinaciones	36
1.1.1.3. Resultados	36
1.1.1.4. Conclusiones	37
1.2. Estudio de la capacidad de los microorganismos de vida libre autóctonos (bacterias) para la producción de metabolitos secundarios relacionados con su actividad bajo condiciones de estrés	38
1.2.1. Selección de las bacterias mas representativas en suelo (Baza) rizosférico, y evaluación de su vitalidad y actividad a niveles crecientes de estrés osmótico (inducido con PEG) ...	39
1.2.1.1. Material y Métodos	39
1.2.1.2. Determinaciones	39
1.2.1.3. Resultados	39
1.2.1.4. Conclusiones	41

1.2.2. Evaluación de la efectividad de los aislados bacterianos autóctonos, bajo condiciones de estrés hídrico: Ensayo en microcosmos sobre el desarrollo vegetal	41
1.2.2.1. Material y Métodos	41
1.2.2.2. Determinaciones	41
1.2.2.3. Resultados	42
1.2.2.4. Conclusiones	42
1.2.3. Determinación si las bacterias aisladas son exclusivamente rizosféricas o son capaces de desarrollarse endofíticamente	42
1.2.3.1. Material y Métodos	43
1.2.3.2. Determinaciones	43
1.2.3.3. Resultados	44
1.2.3.4. Conclusiones	44
1.2.4. Nivel de tolerancia y adaptación al estrés osmótico (valorado en términos de ufc ml ⁻¹ y prolina) de las especies autóctonas aisladas frente a una PGPR usada como de referencia (<i>B. thuringiensis</i>).....	44
1.2.4.1. Material y Métodos	44
1.2.4.2. Determinaciones	44
1.2.4.3. Resultados	45
1.2.4.4. Conclusiones	47
1.3. Evaluación de la interacción de los aislados autóctonos (hongos MA y bacterias) y estudio de los mecanismos fisiológicos y bioquímicos relacionados con su actividad de protección de las plantas bajo condiciones de limitación hídrica	49
1.3.1. Evaluación de la interacción hongos MA-bacterias autóctonos en microcosmos ...	50
1.3.1.1. Material y Métodos	51
1.3.1.2. Determinaciones	51
1.3.1.3. Resultados	51
1.3.1.4. Conclusiones	52
1.3.2. Evaluación de la dinámica de infección de los aislados MA autóctonos <i>G. constrictum</i> y de referencia, en presencia y ausencia de las bacterias <i>P. putida</i> y <i>B. megaterium</i> autóctonas seleccionadas	53
1.3.2.1. Material y Métodos	53
1.3.2.2. Determinaciones	53
1.3.2.3. Resultados	54
1.3.2.4. Conclusiones	56
1.3.3. Determinación de la interacción <i>G. intraradices</i> proveniente de cultivo monoxénico (de colección) con microorganismos aislados en la Sierra de Baza, en microcosmos	58
1.3.3.1. Material y Métodos	58
1.3.3.2. Determinaciones	59
1.3.3.3. Resultados	59
1.3.3.4. Conclusiones	60

1.3.4. Evaluación de la dinámica de infección de los aislados MA autóctonos <i>G. mosseae</i> y de referencia, en presencia y ausencia de las bacterias <i>P. putida</i> y <i>B. megaterium</i> autóctonas seleccionadas	61
1.3.4.1. Evaluación de la dinámica de la infección de los aislados AM, <i>G. mosseae</i> autóctono y de referencia, en presencia y ausencia de las bacterias <i>P. putida</i> y <i>B. megaterium</i> autóctonas seleccionadas	61
1.3.4.1.1 Material y Métodos	61
1.3.4.1.2. Determinaciones	62
1.3.4.1.3. Resultados	62
1.3.4.1.4. Conclusiones	64
1.3.4.2. Determinación de la capacidad colonizadora del micelio producido por <i>G. mosseae</i> (MA ó MR) y generado bajo la influencia del metabolismo microbiano <i>P. putida</i> o <i>B. megaterium</i>	64
1.3.4.2.1 Material y Métodos	64
1.3.4.2.2. Determinaciones	65
1.3.4.2.3. Resultados	65
1.3.4.2.4. Conclusiones	68
1.3.4.3. Determinación de la interacción directa (no mediada por la planta) entre los endófitos <i>G. mosseae</i> (autóctono o de referencia (BEG 119) con <i>B. megaterium</i> (la más tolerante al estrés osmótico y más eficiente (en términos de crecimiento)	68
1.3.4.3.1 Material y Métodos	68
1.3.4.3.2. Determinaciones	68
1.3.4.3.3. Resultados	68
1.3.4.3.4. Conclusiones	72

Capítulo 2. Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* L. plants under drought stress

Resumen	79
2.1.1. Material y Métodos	81
2.1.2. Determinaciones	83
2.1.3. Resultados	84
2.1.4. Discusión	89
2.1.5. Agradecimientos	92

Capítulo 3. Drought tolerance and antioxidant activities in lavender plants colonized by native drought-tolerant or drought-sensitive *Glomus* species

Resumen	97
3.2.1. Material y Métodos	100
3.2.2. Determinaciones	101
3.2.3. Resultados	103
3.2.4. Discusión	107
3.2.5. Agradecimientos	110

Capítulo 4. Un indigenous drought-tolerant strain of <i>Glomus intraradices</i> associated with a native bacteria improves water transport and root development in <i>Retama sphaerocarpa</i>	
Resumen	115
4.1.1. Material y Métodos	117
4.1.2. Determinaciones	119
4.1.3. Resultados	120
4.1.4. Discusión	124
Capítulo 5. Physiological and biochemical traits in the interaction between three strains of <i>Glomus</i> associated with a native bacteria in <i>Lactuca sativa</i> L. under nutritional stress conditions	
Resumen	133
5.2.1. Material y Métodos	135
5.2.2. Determinaciones	136
5.2.3. Resultados	137
5.2.4. Discusión	140
5.2.5. Agradecimientos	142
Capítulo 6. Interactions between the arbuscular mycorrhizal (AM) fungus <i>Glomus intraradices</i> and two autochthonous bacteria from a isolates semiarid mediterranean ecosystem: A dixenic culture study	
Resumen	148
6.1.1. Material y Métodos	150
6.1.2. Resultados	152
6.1.3. Discusión	154
6.1.4. Conclusión	154
6.1.5. Agradecimientos	155
V. CONCLUSIONES	157
VI. BIBLIOGRAFÍA	161

I. INTRODUCCIÓN

1. Naturaleza, interés y finalidad de la investigación

La escasez de agua se perfila como uno de los problemas más graves que va a abordar la humanidad este siglo. En España, las zonas áridas y semi-áridas constituyen casi la mitad del territorio nacional, lo que lo convierte en el país europeo con más extensión de zonas con riesgo de desertificación.

En el sur-este de España, concretamente en la provincia de Granada (Sierra de Baza), se encuentra un ecosistema mediterráneo caracterizado por una precipitación escasa y variable y un alto impacto humano.

La limitación hídrica, produce tierras secas con ecosistemas frágiles, altamente susceptibles de degradación, por lo cual se considera uno de los principales factores limitantes del crecimiento y la producción vegetal; que contribuye al deterioro del sistema suelo-planta, desencadenando un círculo de efectos negativos: **a.** La carencia de plantas degrada el suelo y la vida microbiana y **b.** La ausencia de propágulos microbianos, afecta a cualquier proceso natural inducido de revegetación, presentando problemas para prosperar adecuadamente.

El conocimiento de los mecanismos fisiológicos que las plantas desarrollan para tolerar un determinado tipo de estrés osmótico es de suma importancia para el éxito de su adaptación en este ambiente y su potencial uso en programas de reforestación.

La resistencia de las plantas a un estrés, se establece por la proporción entre el estrés externo y el cambio interno de estas; y el estrés, puede definirse como un factor externo que produce un efecto negativo sobre la fisiología de la planta. El nivel ó rango del estrés biológico se mide como una intensidad o una concentración.

Una de las estrategias que han desarrollado las plantas para tolerar el estrés hídrico, además de las estrictamente fisiológicas, como: reducción del área foliar y cambio en las relaciones hídricas, en algunos casos abscisión de hojas, etc., es la asociación con microorganismos rizosféricos (hongos y bacterias), con vistas a incrementar tanto el potencial exploratorio de sus raíces para aumentar, la disponibilidad de los nutrientes. Las raíces liberan al medio circundante pequeñas cantidades de compuestos orgánicos como azúcares o aminoácidos, que favorecen el crecimiento de diversos microorganismos a su alrededor, generándose una comunidad enormemente compleja por sus interacciones que se conoce como rizosfera.

Las interacciones en la rizosfera, pueden ser tanto positivas como negativas. Dependiendo de los microorganismos implicados, si la interacción es positiva, su efecto consiste en estimular el desarrollo de la planta y propician que se activen los mecanismos de defensa y se expresen respuestas bioquímicas, como son, entre otras, actividades fotosintéticas, actividades enzimáticas (metabolismos del amonio,

metabolismo oxidativo, proteínas, prolina, especies reactivas de oxígeno (ROS), etc.), en respuesta de defensa local.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Evaluar los efectos y los mecanismos implicados en la resistencia de las plantas a estreses generados por la falta de agua, inducidos por las interacciones de microorganismos promotores del crecimiento vegetal (hongos micorrízico arbusculares y bacterias) autóctonos de la zona mediterránea en el desarrollo de las plantas típicas de esta zona.

2.2. Objetivos específicos

1. Evaluación general de los aislados autóctonos (hongos AM y bacterias) de la Sierra de Baza “características y mecanismos de tolerancia a condiciones adversas”

- 1.1. Evaluar la actividad de los hongos MA autóctonos que resultan más eficientes en condiciones de limitada disponibilidad hídrica.
- 1.2. Estudiar la capacidad de los microorganismos de vida libre autóctonos (bacterias) para la producción de metabolitos secundarios relacionados con su actividad bajo condiciones de estrés.
- 1.3. Evaluar la interacción de los aislados autóctonos (hongos MA y bacterias) y estudiar los mecanismos fisiológicos y bioquímicos relacionados con su actividad de protección de las plantas bajo condiciones de limitación hídrica.

2. Analizar las diversas actividades que llevan a cabo los hongos MA del género *Glomus*, los más comunes en el contexto del desarrollo de las plantas en sistemas sostenibles en suelos neutro-alcalinos característicos del área mediterránea:

- 2.1. Evaluar las características diferenciales que presentan los hongos MA para ayudar a las plantas a prosperar en situaciones de sequía y limitación nutritiva.
- 2.2. Estudiar los mecanismos implicados en los hongos MA adaptados a condiciones de estrés frente a otros de referencia.

3. Evaluación de la compatibilidad y efectividad de aislados microbianos simbioses (hongos MA) y saprofitos (bacterias) y aquellos factores que rigen la adaptabilidad de los hongos MA, de los microorganismos promotores del crecimiento vegetal y de la asociación de estos bajo estrés osmótico en condiciones de invernadero:

3.1. Determinar los cambios en las características biológicas (actividades enzimáticas) y físico-químicas que se producen en la planta inoculada y que puedan estar relacionados con la tolerancia a las condiciones de estrés.

3.2. Determinar los mecanismos fisiológicos y bioquímicos que en el vegetal inoculado (hongo MA y bacteria) podrían estar implicados en la protección de las plantas frente al estrés.

4. Determinación de la interacción específica de los aislados autóctonos (hongos MA y bacterias) en cultivo dixénico, bajo condiciones de estrés osmótico mediante adición de NaCl.

3. Antecedentes bibliográficos

La información disponible se va a analizar sistematizadamente como sigue:

3.1. El déficit hídrico

3.2. Características de los ecosistemas mediterráneos

3.3. Micorrizas arbusculares. Su importancia e implicación en el estrés hídrico de los vegetales

3.4. Bacterias PGPR. Su capacidad protectora frente a condiciones adversas

3.5. Importancia en la interacción de hongos MA y bacterias PGPR en la protección a las plantas frente a condiciones de estrés

3.1. El déficit hídrico

3.1.1. El Estrés hídrico

El déficit hídrico es considerado uno de los factores abióticos más importantes y limitantes del crecimiento y desarrollo vegetal (Ruíz-Lozano, 2003). Aunque diversas especies de plantas pueden variar en su sensibilidad y respuesta a la disminución del potencial de agua causado por el déficit hídrico, puede ser asumido que todas las plantas tienen una capacidad innata para expresar respuestas al estrés (Bohnert *et al.*, 1995).

El déficit de agua ocurre cuando la tasa de transpiración excede la captación de agua, y este es un componente de diferentes estreses, incluyendo la sequía, la salinidad y la baja temperatura. La habilidad de toda planta para responder y sobrevivir al déficit hídrico depende completamente de los mecanismos de la planta que puedan integrar las respuestas celulares (Bray, 1997).

3.1.2. Efectos fisiológicos del déficit hídrico

El ajuste osmótico es uno de los mecanismos que utiliza la planta para mantener su turgencia celular a pesar de encontrarse en situaciones de disminución del potencial hídrico (Azcón-Bieto, 1993). El ajuste osmótico posibilita así el mantenimiento, en condiciones de sequía, de la turgencia y de los procesos dependientes de la misma.

Este ajuste osmótico se produce por una concentración activa de solutos en la célula. Al aumentar la osmolaridad, disminuye el potencial hídrico del citoplasma, haciéndole más fácil tomar agua y tolerar el estrés (Orcutt y Nielsen, 200). El ajuste osmótico es un mecanismo importante en la tolerancia a la sequía de las plantas.

Las plantas pueden responder a la tensión osmótica con modificaciones a niveles tanto morfológicos, anatómicos y celulares que permiten que las plantas eviten la tensión o incrementen su tolerancia (Bray, 1997). Las adaptaciones morfológicas y anatómicas pueden ser de vital importancia para ciertas especies de plantas, pero no son una respuesta general de todas las especies. En contraste, las respuestas celulares a la tensión osmótica parecen ser conservadas en el reino vegetal.

3.1.2.1. Metabolismo oxidativo en condiciones de sequía

La producción de especies activas de oxígeno es estimulada por factores adversos ambientales como la exposición a la elevada iluminación, la sequía. Las temperaturas extremas, la acumulación de metales pesados, la radiación UV, los contaminantes atmosféricos, incluidos el ozono, estreses mecánicos y físicos, y también se producen en respuesta a la invasión por patógenos (Foyer, 1997, Knigh y Knigh, 2001).

Cuando la producción de especies reactivas de oxígeno supera la capacidad del tejido para eliminarlas, la aparición de estrés oxidativo se ve favorecida. Los niveles de antioxidantes de bajo peso molecular como el glutatión y ascorbato, así como la actividad de enzimas antioxidantes aumentan generalmente en plantas en condiciones de estrés, y esta respuesta está correlacionada con un aumento de la tolerancia (Halliweel y Gutteridge, 2000)

3.1.2.2. Actividades enzimáticas metabólicas

Las raíces son los sensores primarios de los déficits hídricos, y las señales bioquímicas transportadas desde las raíces causan muchas de las perturbaciones fisiológicas que se observan en las partes aéreas de plantas sometidas a sequía. Se ha sugerido que, muy probablemente, dichas señales son cambios en el tipo y concentración de hormonas exportadoras a las partes aéreas, muy posiblemente con la corriente transpiratoria.

3.2. Características de los ecosistemas mediterráneos

Los ambientes mediterráneos se caracterizan por un mecanismo climático de alternancia regular de una estación cálida y seca, con una estación fría y húmeda, lo que condiciona una características ecológicas determinadas, comunes en varias áreas del planeta, a las que se consideran que poseen un “clima mediterráneo”. Son definitorias la sequía estival pronunciada, abundante radiación solar y precipitaciones irregulares y esporádicas, pero torrenciales, en otoño-invierno (López-Bermúdez & Albadalejo, 1990).

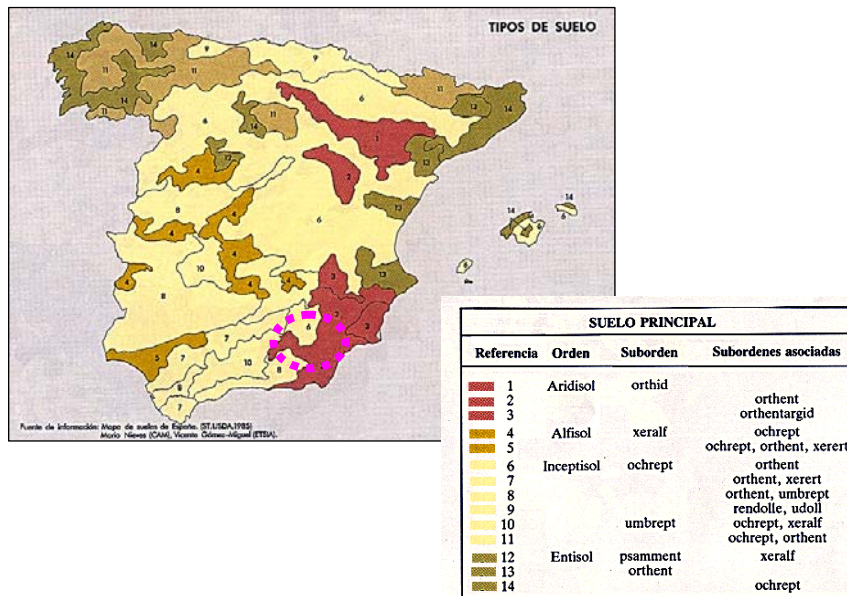


Fig 1. Ubicación y tipo de suelo de la Sierra de Baza (Granada)

En España, lo encontramos en el sur este de la península ibérica, más concretamente en la Sierra de Baza (Granada). Se ha seleccionado como zona de estudio.

La biomasa aérea de los ecosistemas mediterráneos áridos es pequeña, aunque la



proporción de biomasa subterránea, con respecto a la biomasa aérea, es más alta que en otros ecosistemas; La vegetación se distribuye desigualmente, lo que unido a un índice del área foliar bajo, ocasiona una cobertura escasa. El suelo aparece parcialmente desnudo y al recibir directamente la radiación solar se agudizan los efectos de la escasez de agua (Montalvo, 1992).

En los ecosistemas desarrollados en ambientes mediterráneos, como en cualquier otro ecosistema terrestre, el equilibrio natural que rige la estabilidad de los mismos puede ser perturbado por cambios en la actividad de agentes naturales (procesos climáticos, geomorfológicos o paleotectónicos, etc.), consecuentemente, la estructura, morfología y la diversidad de especies de la vegetación potencial se degrada, proceso

concomitante con un deterioro generalizado de las propiedades físico-químicas y biológicas del suelo (Requena *et al.*, 1996).

Se sabe que las distintas especies vegetales actúan de forma diferente y, de hecho, difieren en su grado de idoneidad en cuanto a su eficacia para la protección del suelo. Concretamente, los arbustos del matorral mediterráneo, con capacidad de enraizar profundamente, tienen un alto potencial en ese sentido, pero, precisamente, son dichas especies las que han sufrido más agresión antrópica (directa o indirectamente) en el sudeste ibérico. Ello, en unión de ciertas limitaciones ecofisiológicas inherentes a su reproducción, hace que la recuperación natural de estas especies sea muy lenta (Alvadalejo *et al.*, 1996).

3.2.1. Características de los Suelos Degradados

En suelos degradados, ocurre un descenso en el número de propágulos de la microbiota del suelo, su diversidad y/o de su actividad; Ello se debe a que la planta es la fuerza motriz de la vida microbiana en el suelo, lo cual es fundamental dado que los microorganismos, a su vez, van a compensar a la planta mediante acciones importantes para su crecimiento y nutrición. El deterioro de los sistemas suelo-planta, en cuanto que afecta a las relaciones planta-microorganismos, desencadena un círculo vicioso de efectos negativos. Si no hay plantas, se degrada la vida microbiana y si no hay propágulos microbianos, cualquier proceso natural o inducido de revegetación presenta problemas para prosperar adecuadamente.



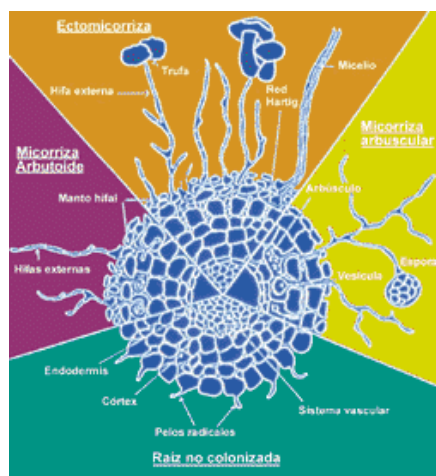
3.3. Micorrizas arbusculares y su importancia e implicación en el estrés hídrico de los vegetales

Además de los sistemas protectores intrínsecos de las plantas contra el estrés, la mayoría de las plantas crecen en asociación con numerosos microorganismos del suelo que puede aliviar los síntomas del estrés, como es el caso de la asociación con los hongos formadores de micorrizas arbusculares (MA).

El mutualismo supone una relación beneficiosa para los dos organismos implicados, y tanto el hongo como la planta se ven favorecidos por la asociación: Las plantas mejoran sus propiedades para la adquisición de nutrientes y su nivel de tolerancia a situaciones de estrés (sobre todo a la sequía) (Augé, 2001), mientras que el hongo adquiere un nicho ecológico protegido y los nutrientes fotosintéticos de la planta (Smith & Read, 1997).

3.3.1. Aspectos generales de los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA)

Se trata de una simbiosis prácticamente universal, no sólo porque casi todas las especies vegetales son susceptibles de ser micorrizadas sino también porque puede estar presente en la mayoría de los hábitats naturales. Las micorrizas son tan antiguas como las propias plantas y se conoce su existencia desde hace más de cien años; estimándose que aproximadamente el 95% de las especies vegetales conocidas estableces de forma natural y constante este tipo de simbiosis con hongos del suelo.



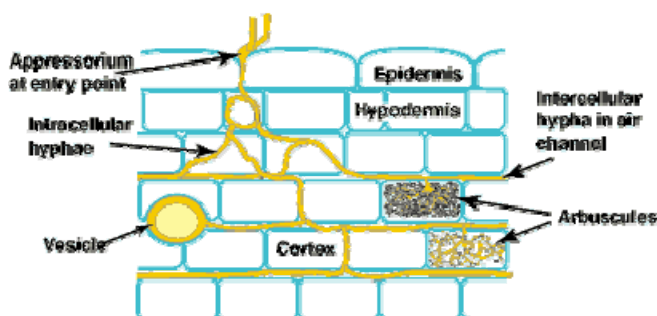
Existen siete tipos de micorriza que se han clasificado, siguiendo criterios estructurales, funcionales y taxonómicos, en: Arbutoides, Ectendomicorrizas, Ectomicorrizas, Endomicorrizas o Micorrizas Arbusculares (MA), Ericoides, Monotropoides y Orquidioides.

En cuanto a la estructura formada, al tipo de colonización y a la cantidad de especies vegetales y fúngicas implicadas, se puede decir que las micorrizas arbusculares son las de mayor importancia y las que más ampliamente se encuentran distribuidas (tanto a nivel geográfico como dentro del Reino Vegetal). Este tipo de micorriza se encuentra en condiciones naturales en la mayoría de los cultivos tropicales y subtropicales de interés agronómico (Sieverding, 1991) y está presente en la mayoría de las Angiospermas; siendo las familias *Chenopodiaceae* y *Cruciferae*, las excepciones de mayor importancia (Franci, 1993). La asociación simbiótica MA se forma en muchas especies perennes leñosas, incluyendo muchas Gimnospermas aparte de las Pináceas (Harley y Smith, 1983).

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares pertenecen a la clase Zigomicetes y se caracterizan porque producen, a lo largo de su ciclo de vida, unas estructuras conocidas como arbusculos (en todos los casos) y vesículas (en la mayoría de ellos). Las vesículas son estructuras globosas e irregulares que actúan como órganos de reserva de lípidos. Los arbusculos son las estructuras responsables de la transferencia bidireccional de nutrientes entre los simbioses, realizada en la interfase planta-hongo producida a este nivel (Franci, 1993).

3.3.2. Morfología y desarrollo de la simbiosis MA

La colonización del hongo se extiende por la epidermis y el parénquima cortical, nunca penetra en la endodermis ni en los tejidos vasculares y meristemáticos (Harley y Smith, 1983); estableciendo una marcada diferencia con las infecciones radicales de hongos patógenos que si penetran en los haces conductores y meristemas.



El proceso de formación de la simbiosis comienza con la germinación de las esporas de resistencia en el suelo, cuando las condiciones ambientales de temperatura y humedad son favorables (Bolan y Abbott, 1983). Tras la emisión del tubo o tubos germinativos, el micelio del hongo crece hasta encontrar una raíz hospedadora, donde forma entonces una estructura similar a un apresorio y penetra entre las células epidérmicas o a través de los pelos radicales. Después de la penetración comienza la colonización del tejido parenquimático de la raíz. En la capa interna de este tejido se forman los arbusculos, producidos por una ramificación masiva de la hifa después de penetrar la pared celular.

La hifa ramificada se encuentra rodeada por la membrana plasmática de las células del parénquima cortical, siendo el espacio apoplástico producido entre la membrana plasmática y el hongo la zona de intercambio de nutrientes. La vida de los arbusculos es muy corta, inferior a 15 días (David, 1994). Las vesículas se forman generalmente en los extremos de las hifas del hongo y pueden producirse a lo largo de todo el parénquima cortical colonizado; suelen aparecer más tarde que los arbusculos y son consideradas órganos de reserva, principalmente de lípidos (Beilby y Kidby, 1980; Cooper y Lösel, 1978).

La colonización del hongo puede extenderse también mediante hifas exteriores (runners) por las superficie de la raíz y penetrar en ésta a intervalos irregulares (Sieverding, 1991).

Cuando la infección interna está bien establecida, las hifas del hongo pueden crecer externamente desde la raíz de la planta hacia el suelo (micelio externo) y explorar un volumen de suelo inaccesible a las raíces; con ello la planta aumenta

considerablemente su superficie de absorción, de 100 a 1000 veces (Gil, 1995), y por tanto su capacidad de captación de nutrientes y de agua.

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares producen, normalmente, esporas a partir del micelio externo, y también en algunos casos, las forman en el interior de la raíz a partir de micelio interno. Las esporas de resistencia pueden permanecer inalteradas en el suelo por mucho tiempo, mientras que las hifas del hongo se colapsan tras una permanencia en suelo de 2 a 4 semanas si no encuentran una raíz hospedadora, (Bolan y Abbott, 1983).

3.3.3. Efecto de los hongos MA sobre el crecimiento de las plantas

Barea y Azcón-Aguilar (1982) demostraron que es capaz de producir compuestos de naturaleza hormonal, aunque se desconoce si estos compuestos son absorbidos por la planta hospedadora. La MA alteran el nivel de sustancias reguladoras del crecimiento en los tejidos de las plantas (Allen *et al.*, 1982) y su transporte de unos tejidos a otros (Dixon *et al.*, 1988). En la mayoría de los casos parece existir un efecto hormonal, pero resulta extremadamente difícil diferenciar los efectos producidos por las hormonas del hongo, los producidos por las hormonas vegetales y los producidos indirectamente por el estado nutricional de las plantas como consecuencia de la micorrización.

La citoquinina, además de promover la síntesis de proteínas (especialmente en los retoños), la división y la expansión celular (Van Staden y Davey, 1979), puede desempeñar un papel importante como mediador de la correlación entre las concentraciones de fósforo y las funciones de la planta como pueden ser: el desarrollo vegetativo, la fotosíntesis y el almacenamiento de almidón. Se dice que estas fitohormonas son las mediadoras más importantes de la infección con Endomicorrizas por ser sintetizadas primariamente en los meristemos radicales. Un aumento en el número y actividad de los primordios, puede inducir un aumento en la producción de citoquinina. La micorrización, al igual que la aplicación de fósforo al suelo, produce un aumento del crecimiento de la planta y de la raíz, y por tanto del número de extremos o primordios radicales.

Se plantea que los niveles de etileno que estimulan la formación y desarrollo de las MA pueden estar relacionados con la resistencia de la planta hospedadora a factores de estrés del suelo (Ishii y Kadoya, 1994). Bajos niveles de etileno producidos por estrés en la planta, parecen inhibir temporalmente el crecimiento de las raíces, pero al mismo tiempo se promueve la actividad del hongo micorrícico en la rizosfera, con lo que se minimiza el efecto estresante sobre la planta. La consecuencia de la acción del hongo es una alteración positiva del equilibrio hormonal de la planta que favorece su estado fisiológico y nutricional.

La dependencia de la micorrización es el grado hasta el cual una planta depende de la condición de estar micorrizada para obtener un crecimiento óptimo a un determinado nivel de fertilidad de suelo (Gerdermann, 1975). Se han realizado numerosos estudios en los que se demuestra que la inoculación artificial con hongos MA a especies de interés agrícola, incrementa la nutrición y el crecimiento de la planta, y le

permite a su vez superar situaciones de estrés biótico y abiótico (Calvet y Camprubi, 1996^a; Franci 1993; Perrin, 1991).

Los efectos beneficiosos de la introducción artificial de inóculo micorrícico resultan más evidentes en suelos donde las poblaciones de hongos MA nativos no existen, o han sido eliminadas por empleo de prácticas agrícolas desfavorables para su desarrollo como la fumigación del suelo y el cultivo intensivo. La micorrización temprana de las plantas puede ser también interesante en situaciones en que la cantidad de inóculo MA en el suelo agrícola sea muy baja o por la existencia de un cultivo anterior no hospedador, y/o donde las poblaciones autóctonas no sean lo suficientemente agresivas y eficaces (Rhodes, 1984; Sieverding, 1991).

Se ha demostrado un efecto beneficioso de la inoculación temprana para la mayoría de los cultivos hortícolas y para los cítricos (Camprubi *et al.*, 1995; Grandison y Cooper, 1986; Mac Guidwin, 1985; O'Bannon *et al.*, 1979; Smith y Kaplan, 1988). Los beneficios económicos se derivan de una mayor y más uniforme producción, una mayor rapidez de crecimiento y entrada en producción de las plantas, una mejor calidad de la cosecha y un ahorro en fertilizantes, riego y productos fitosanitarios.

3.4. Bacterias PGPR. Características e identificación de aislados nativos y su capacidad protectora frente a condiciones adversas

El nombre bacteria deriva del término genérico *Bacterium* (bastón), definido por el zoólogo alemán C.G. Eherenberg en 1932, como uno de los cuatro géneros de los Infusoria animalia. El nombre fue introducido como categoría general por Ferdinand Cohn en 1872, y posteriormente como uno de los grupos del reino Protista, por Ernst Haeckel, en 1894. En la taxonomía actual, el término bacteria no posee categoría taxonómica; esto es lógico, ya que desde el punto de vista biológico bacteria es sinónimo de procariota y desde el establecimiento como categoría taxonómica del Reino Procariota, existía una cierta redundancia al emplear el término bacteria en una categoría taxonómica de inferior rango. El término bacteria quedaría pues, como sinónimo de procariota y es en este sentido en el que va a ser utilizado en las páginas que siguen.

Las bacterias son organismos con organización celular, es decir, al igual que el resto de seres vivos conocidos, su unidad vital funcional es la célula. El tipo de organización celular es la procariótica, caracterizada porque su material genético (normalmente un solo cromosoma circular de ADN de doble hebra) no está recluido en un recinto rodeado de membrana, sino inmerso en el citoplasma; este cromosoma se replica de modo amitótico y la división celular suele ser por fisión binaria. Carecen de mitocondrias, plastos, retículo endoplasmático, etc. En realidad, la citología de los procariotas sigue utilizando la misma nomenclatura que la eucariota, aunque las homologías son más que dudosas. Existe adicionalmente un concepto que para nosotros es fundamental: bajo un punto de vista funcional, un procariota es una entidad biológica unicelular, de tamaño medio inferior a un eucariota y que es capaz de alcanzar densidades de población notablemente superior y, en general, en función de sus características de regulación, puede adaptarse con gran rapidez a ambientes muy fluctuantes. De lo anterior expuesto puede extraerse inmediatamente una consecuencia de gran repercusión e impacto en la biología de microorganismos: la rápida aparición de poblaciones bacterianas bajo condiciones de selección inéditas hasta el momento. Ello, debido tanto a la capacidad genética de expresar información presente en la célula pero no expresada anteriormente, o a la selección de mutantes espontáneo preexistentes en la población, o a una característica fundamental de los procariotas, como es la transmisión horizontal de la información génica.

3.4.1. Tamaño y morfología

La principal característica de las bacterias, como en todo microorganismo, es su reducido tamaño. Las bacterias miden generalmente entre 0,5 y 2 μm , y su volumen celular alcanza como máximo unos pocos μm^3 . Sin embargo las bacterias autóctonas en medios oligotróficos pueden tener menos de 0,5 μm . En sí mismas, ni las pequeñas dimensiones ni tampoco la metodología que caracteriza a la Microbiología constituyen únicamente el motivo de una separación taxonómica de los microorganismos. En cambio, juegan un papel esencial a efectos taxonómicos la morfología, fisiología y ecología de estos organismos.

En los organismos de tamaño bacteriano, la relación superficie/volumen es muy alta, lo que condiciona una alta tasa de interacción con el medio ambiente. Asimismo, el pequeño tamaño de las bacterias influye decisivamente en su flexibilidad metabólica, al exigir una economía de los sistemas enzimáticos activos presentes, en un momento determinado, en una célula del tamaño de una bacteria. Así, los mecanismos de regulación de la expresión génica y del metabolismo juegan en las bacterias un papel predominante. Desde el punto de vista ecológico, las bacterias se comportan como oportunistas, multiplicándose rápidamente cuando las condiciones de su ambiente son favorables. Aunque existen diferencias de una a otra especie, las bacterias, debido fundamentalmente a su pequeño tamaño, deben acomodarse a la estrategia evolutiva de tipo r.

3.4.2. Estructura de la célula bacteriana

Como se ha mencionado, una de las características más conspicuas de las células procariotas es la falta de compartimentación basada en un sistema de membranas unitarias. Esta ausencia casi generalizada de orgánulos de tipo membranoso, condiciona la adquisición por parte de la membrana plasmática de muchas funciones que en los eucariotas están confinadas en orgánulos específicos.

La membrana plasmática de los procariotas constituye una barrera de permeabilidad más estricta que la membrana eucariota. Los objetos de mayor tamaño capaces de atravesar esta barrera son siempre de dimensiones moleculares. Como consecuencia, la célula bacteriana carece en general de las propiedades de endocitosis y exocitosis, típicas de la célula eucariota, y de una propiedad quizás más importante: La capacidad de adquirir endosimbiontes celulares.

Consecuencia asimismo de las propiedades singulares de su membrana plasmática, las bacterias carecen de adaptaciones basadas en la exocitosis, capaces de regular la tensión osmótica interna. Como respuesta a esta característica de sus membranas y de su adaptación a un medio osmóticamente variable, las bacterias han desarrollado una pared celular capaz de contrarrestar las variaciones de la presión osmótica externa. Aunque la composición de las paredes celulares procarióticas es variable, uno de sus componentes, el glucopéptido, se presenta invariablemente, excepción hecha de las arqueobacterias, *Planctomyces* y formas relacionadas. Esta macromolécula es la responsable de las propiedades de rigidez de la pared celular bacteriana y de la morfología celular. La capacidad de sintetizar glucopéptidos es una característica de los procariotas que los distingue de los eucariotas.

Se sabe que la rizosfera de las plantas constituye un ecosistema complejo, donde el suplemento continuo de nutrientes a baja concentración vía exudados radiculares, estimula el crecimiento bacteriano.

3.5. Importancia e la interacción de los aislados hongos MA y bacterias PGPR en la protección a las plantas frente a condiciones de estrés

En general, se puede decir que el funcionamiento de un ecosistema edáfico depende en gran medida de la actividad microbiana del suelo, dado que los ciclos biogeoquímicos que ocurren en la naturaleza son propulsados por microorganismos que, además, protagonizan diversas acciones que producen beneficios para las plantas a la que se asocian (Barea & Jeffries 1995; Barea 2002).

En muchos casos las interacciones establecidas son de tipo positivo, llegándose a registrar un efecto de sinergismo, donde la presencia de la MA y del otro microorganismo produce un incremento del crecimiento, vigor y protección de la planta. Se han propuesto una serie de mecanismos a través de los cuales ocurre la interacción micorrizas/patógenos, ya que no se ha demostrado nunca que los hongos MA actúen directamente sobre éstos, ya sea por antagonismos, antibiosis, o por depredación, sino que su efecto es indirecto. Los mecanismos son los siguientes (Azcón-Aguilar y Barea 1996).

-Cambios en la nutrición de la planta hospedadora.

-Alteraciones en la exudación radicular. Un mejor estado nutricional de la planta puede variar sus exudados y alterar así las poblaciones de microorganismos, ya sea por alteraciones en la germinación de esporas de hongos patógenos y su penetración, que en la mayoría de los casos se produce por estímulos de las propias exudaciones radiculares.

-Activación de los mecanismos de defensa de las plantas mediante la inducción de la producción de determinados metabolitos secundarios en las raíces como ligninas, fenoles, fitoalexinas, etileno, quinaza y peroxidasa (Gianinazzi-Pearson *et al.* 1994; Morando 1996).

-Competencia por los sitios de infección en la raíz.

-Competencia por los fotosintatos del hospedador.

Con respecto a estos dos mecanismos, podemos decir que la inoculación temprana de las plantas puede garantizar una menor penetración de patógenos radiculares.

Incremento de la tolerancia de las plantas a patógenos del suelo. Esta puede estar dada por una compensación de los daños ocasionados por los mismos.

II. MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES

1. Material biológico y condiciones de crecimiento

1.1. Material vegetal

1.1.1. Plantas utilizadas

Las plantas utilizadas en este trabajo, en función de su origen se consideran como plantas autóctonas [Lavanda (*Lavandula spica*), Retama (*Retama sphaerocarpa*)] ó plantas de referencia [Lechuga (*Lactuca sativa* L. var. Romana), Trébol (*Trifolium repens* var. violeta), Maíz (*Zea mays* L. var. Gerona)] y Sorgo (*Sorghum bicolor*); estas últimas seleccionadas por su sensibilidad a las condiciones de estrés, crecimiento rápido y producción de biomasa.

1.1.2. Cultivo de plantas

1.1.2.1. Substrato utilizado

En todos los experimentos el substrato estaba compuesto por una mezcla de suelo:arena en proporción (v/v) dependiendo de la procedencia del suelo, el cual se explicará en cada uno de los experimentos planteados.

Los suelos utilizados eran procedentes de la Sierra de Baza y de la Estación Experimental de Zaidín (Granada). Presentaban las siguientes características físico-químicas:

Análisis de suelo	Sierra de Baza	EEZ
pH (agua)	7.2	8.1
M.O. (%)	1.6	1.8
N (mg.kg ⁻¹)	2.1	2.5
P (NaHCO ₃ -extractable P) (mg.kg ⁻¹)	1.7	6.2
K (mg.kg ⁻¹)	0.8	132
Arena/Limo/Arcilla (%)	57.8 / 19 / 23.2	35.8 / 43.6 / 20.5

Tabla. Características físico-químicas de los suelos utilizados

La arena de cuarzo (< 2 mm) era previamente lavada y esterilizada en autoclave 20 min. A 120°C. El suelo era tamizado (2 mm) y esterilizado por tindalización en autoclave a vapor fluente (100°C durante 1h, 3 días consecutivos). De esta forma, queda libre de propágulos de micorrizas y otros organismos que puedan interferir en el experimento.

1.1.2.2. Esterilización, germinación y siembra de semillas

Las semillas de Lechuga, Sorgo y Trébol, se esterilizaron en superficie con una solución de lejía comercial al 10% durante 15 min., tras lo cual se enjuagaron con abundante agua destilada estéril hasta remover cualquier traza de residuo que pueda

interferir con la germinación. Se colocaron directamente en las macetas definitivas para su germinación.

Las semillas de Maíz, se imbibieron durante 10 min., en etanol al 70%, se enjuagaron con abundante agua destilada estéril. Se cubrieron con lejía al 20% durante 15 min., a continuación se enjuagaron con abundante agua destilada estéril, se germinaron en condiciones de esterilidad en medio MS (Murashigue and Skoog, 1962) durante 48 horas y se seleccionaron las semillas homogéneas para realizar el experimento.

Las semillas de Lavanda, se imbibieron durante 8 min., en H₂O₂ al 15%, se enjuagaron con abundante agua destilada estéril y se colocaron en placas estériles, con papel mojado en las dos tapaderas, en oscuridad a 25°C hasta su germinación.

Las semillas de Retama, se imbibieron durante 30 min., en H₂SO₄ al 98%, se enjuagaron con abundante agua destilada estéril hasta la eliminación total del ácido. Se cubrieron con HCl al 5% durante 5min., a continuación se enjuagaron con agua destilada estéril (mínimo 5 veces cada 3 min.), se colocaron en vermiculita estéril, en oscuridad a 25°C hasta su germinación.

1.1.2.3. Solución nutritiva para las plantas

Las plantas de Maíz recibieron un aporte único en el momento de la siembra de 25 ml de solución nutritiva MS, sin sacarosa y sin fitagel (Murashigue and Skoog, 1962). La composición de la solución nutritiva es la siguiente:

Componentes	Concentración (mg/l) en MS	Solución madre (mg/l)	cantidad
MS Macro I		<i>usado como 10x stock</i>	<i>1 litro</i>
NH ₄ NO ₃	1650	16.500	16.5 g
KNO ₃	1900	19.000	19.0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	370.6	3706	3.706 g
KH ₂ PO ₄	170	1700	
100 ml/l			
MS Macro II		<i>usado como 10x stock</i>	<i>1 litro</i>
CaCl ₂ .H ₂ O	439.8	4398	4.398 g
(100 ml/l)			
FeNaEDTA		<i>usado como 100x stock</i>	<i>100 ml</i>
100 ml/l	36.7	3670	367 g
MS Micros		<i>usado como 1000x stock</i>	<i>100 ml</i>
H ₃ BO ₃	6.20	6200	620 mg
MnSO ₄ .2H ₂ O	13.2	13200	1320 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	8600	860 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	250	25 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	25	2.5 mg
CoCl ₂ .2H ₂ O	0.025	25	2.5 mg
KI	0.83	830	83 mg
1 ml/l			

Componentes	Concentración (mg/l) en MS	Solución madre (mg/l)	cantidad
Mio-inositol		<i>usado como 100x stock</i>	<i>100 ml</i>
	100	10000	1 g
10 ml/l			
MS Vitaminas		<i>usado como 1000x stock</i>	<i>100 ml</i>
Acido Nicotínico	0.5	500	50 mg
Pidoxina-HCl	0.5	500	50 mg
Tiamina-HCl	0.1	100	10 mg
Glicina	2	2000	200 mg
1 ml/L			

0,2% phytigel

0,5% glucosa

preparado en MS

Las plantas de Lechuga, utilizadas en el ensayo “Contribución de 6 aislados fúngicos en la captación de agua bajo condiciones de estrés”) (Ver capítulo X), recibieron 10 ml de solución nutritiva Hewitt, por semana, modificada para contener 4 mM N+1mM P ó 2 mM N+0.5 mM P (Hewitt, 1952 con el objetivo de conseguir plantas con tamaño y contenido en nutrientes similares en todos los tratamientos. La composición de la solución nutritiva es la siguiente:

Compuesto	Concentración (μM)	Solución madre (g/l)	1 litro (ml)
KNO_3	3×10^3	30,3	10
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	9×10^3	101,5	20
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	300	18,4	2,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	150	18,4	20
EDTA-Fe	67	2,45	10
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	13	1,5	1
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1	2,4	0,1
$\text{ZnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1	4,22	0,1
H_3BO_3	30	18,6	0,1
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,15	0,35	0,1

Ajustar a pH 7

Las plantas de Lavanda, Retama, Sorgo y Trébol no recibieron ningún tipo de solución nutritiva.

1.1.2.4. Condiciones de cultivo

El tamaño de los contenedores para el cultivo de las plantas nunca excedió de 1000c.c. En algunos casos las plantas crecieron bajo condiciones de invernadero: 70-90% de humedad relativa, temperaturas día/noche de 25-19 °C, fotoperiodo de 16h. En los ensayos en los que las plantas crecieron en cámara de cultivo, las condiciones de la cámara fueron: 70-80% de humedad relativa, temperaturas día/noche de 25-15°C, fotoperiodo de 16h. y una intensidad luminosa de $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Li-Cor, Lincoln, NE, USA, modelo LI-188B).

1.1.2.5. Determinación del estado hídrico del suelo

Las plantas fueron regadas diariamente según necesidades, a excepción de aquellos ensayos en los cuales se pretendió estudiar el efecto del estrés hídrico, en cuyo caso las macetas se pesaron y regaron diariamene ajustándose la cantidad de agua a la capacidad de campo según tratamientos.

Los tratamientos diseñados en contenedores de volumen mayor a 500 c.c., el contenido de agua en el suelo se controló mediante el ThetaProbe ML2 (AT-Delta-D Device, Ltd, UK), que mide el contenido volumétrico en agua del suelo en base a cambios en la constante dieléctrica del suelo cuando está húmedo. El contenido volumétrico de agua en el suelo es un cociente entre el volumen de agua presente en el suelo y el volumen total de la muestra de suelo, por lo que es un parámetro adimensional expresado como % vol (Roth *et al.*, 1992). El suministro de agua aportado en cada uno de los ensayos depende de la capacidad de campo planteada. Se midió diariamente al final de la mañana.

1.2. Material fúngico

1.2.1. Hongos MA utilizados

Se utilizaron como especies de hongos MA de referencia, aislados procedentes de dos áreas desérticas de las provincias de Alicante y Almería (España). Las especies fueron *Glomus coronatum* Giovannetti, aislado EEZ 17, BEG 49; *Glomus intraradices* (Schenck and Smith), aislado EEZ 6, BEG 121; *Glomus claroideum* Schenck and Smith, aislado EEZ 23; *Glomus constrictum* Trappe, aislado EEZ 22; *Glomus geosporum* (Nicol. y Gerd.) Walker, aislado EEZ 4 y *Glomus mosseae* (Nicol. and Gerd.) Gerd. y Trappe, aislado EEZ 7, BEG 122.

Y como especies de hongos MA autóctonos, aislados procedentes del parque natural de la Sierra de Baza (provincia de Granada, España), *Glomus mosseae*, *Glomus constrictum*, *Glomus claroideum*, *Glomus coronatum*, los más representativos de la zona.

1.2.2. Producción y conservación del inóculo

Para producir material de inóculo de las especies de hongos MA autóctonas, se utilizaron plantas de Sorgo (*Sorghum bicolor*) + Maíz (*Zea mays*) +Trébol (*Trifolium repens*), en macrocosmos de 6 L. El substrato era conformado por una mezcla de sepiolita, vermiculita y arena (1:1:1) (v/v). Se adicionó un fertilizante de liberación lenta (15:15:15) 0.5 g L⁻¹. A los 3 meses, ya sea ha desarrollado la micorrización, para utilizar el material como inóculo. Todos los inóculos mostraron una alta capacidad infectiva.

	F %	M%	m%	a%	A%
<i>G. mosseae</i>	94	84	90	87	73
<i>G. constrictum</i>	82	74	31	79	74
<i>G. coronatum</i>	100	26	74	100	20
<i>G. claroideum</i>	100	78	78	78	61

Tabla . Colonización del inóculo producido (%)

El inóculo obtenido, estaba formado por suelo, esporas, micelio y fragmentos de raíz micorrizadas. Se conserva en un lugar a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad.

1.2.3. Tinción de raíces micorrizadas

1.2.3.1. Tinción con Azul Tripán (TB)

Una vez obtenidas las raíces en el momento de la cosecha, fueron teñidas siguiendo el método de tinción de Phillips & Hayman (1970). El colorante azul tripán, tiñe las estructuras que contienen quitina, principal componente de las paredes celulares de algunos hongos, entre ellos los formadores de micorrizas arbusculares (Bartinicki-García, 1968). De esta forma se tiñen los componentes del hongo en el interior de la raíz, permaneciendo esta sin colorante. Este método, consiste en calentar las raíces en KOH 10% (p/v) durante 20 min., al baño maría, pasados los cuales se lavan con abundante agua y se acidifican con HCL 0.1N durante 5 min., con el fin de preparar las raíces para la entrada del colorante. Una vez eliminado el HCL, se adiciona una solución de 0.05% azul tripán en ácido láctico (p/v) y se mantienen nuevamente al baño maría durante 15-20 min. Una vez teñidas se elimina el exceso de colorante y las raíces se conservan en ácido láctico hasta posterior observación.

1.2.3.2. Tinciones vitales

1.2.3.2.1. Succinato deshidrogenasa (SDH)

Revela las estructuras fúngicas MA vivas (Smith & Gianinazzi Pearson, 1990). Las raíces cortadas y depositadas en baño de hielo, se dejaron incubando en solución incubadora (2.5 M sodium-succinate hexahydrate, 4 mg ml⁻¹ nitro blue tetrazolium, 5 mM MgCl₂ y 0.2 M Tris-HCl, pH 7.0) a 37°C durante 16-18 horas. Transcurrido este tiempo se eliminó la solución incubadora, la raíces se lavaron y se cubrieron con hipoclorito sódico de cloro activo 3% (v/v), a temperatura ambiente durante 15-20 min., pasados los cuales se eliminó el hipoclorito y se lavaron las raíces nuevamente. Las raíces se conservaron en ácido láctico durante no más de 2 semanas.

1.2.3.3.1. Fosfatasa alcalina (ALP)

Revela las estructuras fúngicas MA activas (Tisserant *et al.*, 1993). Las raíces recién cortadas y depositadas en baño de hielo, se dejaron incubando en solución

incubadora (1 mg ml^{-1} salt fast blue RR, 1 mg ml^{-1} α -naftil PO_4 , 0.5 mg ml^{-1} Cl_2Mg anhidro, 0.8 mg ml^{-1} $\text{Cl}_2\text{ Mn } 4\text{H}_2\text{O}$ y 0.05 M Tris ácido cítrico, pH 9.2) a 37°C durante 16-18 horas. Transcurrido este tiempo se eliminó la solución incubadora, se lavaron las raíces y se dejaron cubiertas con hipoclorito sódico de cloro activo 1% (v/v), a temperatura ambiente durante 15-20 min., pasados los cuales se eliminó el hipoclorito y se lavaron las raíces nuevamente. Las raíces se conservaron en ácido láctico durante no más de un par de semanas.

1.2.4. Cuantificación de la colonización micorrícica

El grado de colonización micorrícica se midió usando el método de Giovannetti y Mosse (1980). Cuando era necesaria una evaluación mas exhaustiva del desarrollo del hongo en la raíz de la planta se siguió el método de Trouvelot *et al* (1986). Para ello, se colocan en portaobjetos fragmentos elegidos al azar de aproximadamente 1 cm. de raíz y se cuantifican los parámetros de la micorrización, asignando a cada fragmento un número de 0 a 5 en función del nivel de infección por el hongo, así como un valor de A0 a A3 con base a la riqueza de arbusculos del fragmento estudiado. Con posterioridad, un programa informático calcula la frecuencia (F), intensidad en la raíz total (M), riqueza arbuscular en la raíz total (A), intensidad en el segmento evaluado (m) y riqueza arbuscular de la colonización en el segmento evaluado (a). Se expresa en %.

Además se cuantificó el número de vesículas en cada segmento evaluado.

1.2.5. Longitud del micelio extraradical

El micelio, se considera la estructura más importante para el cumplimiento de la función de la micorriza en cuanto a captación de nutrientes y agua. Para su determinación, se utilizó dos metodologías descritas en los ensayos correspondientes, una propuesta por Jones y Mollison (1948) y otra propuesta por Miller *et al.* (1992), con algunas modificaciones, se tomó 1 g de suelo, se agitó vigorosamente con agua durante 30 seg., se colocó inmediatamente en un matraz y se dejó sedimentar durante 1 min., posteriormente, se tomó una alícuota de 1 ml y se colocó en un filtro de nitrocelulosa con tamaño de poro de $0.2\ \mu\text{m}$, cuadrículado, situado en un equipo de filtración. Una vez secos los filtros se adicionó unas gotas de solución 0.05% azul tripán en ácido láctico (p/v) y se dejó 5 min. a temperatura ambiente. Los filtros se montaron sobre portaobjetos y se observaron al microscopio.

Para su cuantificación, uno de los oculares poseía una retícula de 10×10 líneas. Se colocó la cuadrícula de forma que la retícula se posicionara dentro de una de las áreas rectangulares definidas por la línea del filtro y se contaron las intersecciones entre hifas y la retícula del ocular, tanto en sentido horizontal como vertical. Este procedimiento se repite un mínimo de 2 veces por muestra.

Se calculó la longitud total del la retícula y el área total analizada, y se obtuvo la longitud de micelio presente en la superficie analizada del filtro, utilizando la fórmula de Newman (1966) para el cálculo de longitudes con base al número de intersecciones con

un sistema cualquiera de líneas de longitud conocida. La longitud viene definida por la siguiente ecuación:

$$\text{Longitud de hifas} = \frac{\pi \cdot A \cdot N}{2 H} \cdot \text{Factor de dilución} \cdot \text{Factor de peso seco}$$

Donde, π es 3.141592654, A el área de la circunferencia, N el número de intersecciones y H el largo de la retícula.

1.2.6. Cultivo monoxénico

Previamente, se realizó un ensayo en condiciones de invernadero para evaluar la interacción *G. intraradices* Smith & Schenck (DAOM 197198, Biosystematic Research Center, Ottawa, Canadá), desarrollado en condiciones *in vitro* (cultivo monoxénico), con aislados autóctonos de la Sierra de Baza.

Para el establecimiento del cultivo monoxénico en sistema bicompartimentado, se utilizó *Glomus intraradices* Smith & Schenck (DAOM 197198, Biosystematic Research Center, Ottawa, Canadá) crecido en raíces de zanahoria (*Daucus carota*).

El medio de cultivo se estableció en medio M con sacarosa (10 g L^{-1}) como fuente de carbono en un compartimiento y medio M sin fuente de carbono en el otro compartimiento (Bago y Cano, 2005). Su composición es la siguiente: 1.21 mM Ca $(\text{NO}_3)_2$, 21.8 mM Na-FeEDTA, 4.51 μM KI, 10% solución de macroelementos, 0.1% solución de microelementos, 1% vitaminas, 1% sacarosa y 0.35% phytigel. pH 5.5 con NaOH.

Solución de Macroelementos: 29.6 mM MgSO_4 , 7.9 mM KNO_3 , 8.7 mM KCl, 0.35 mM KH_2PO_4 , 1.4 NaH_2PO_4 y 14 mM NaSO_4 .

Solución de Microelementos: 30.3 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 9.2 mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 24.3 mM H_3BO_3 , 5 mM CuSO_4 , 10 μM Na_2MoO_4 .

Vitaminas: 4 mM glicina, 29.6 μM hidrocloreuro de tiamina, 49 μM hidrocloreuro de piridoxina, 0.4 mM ácido nicotínico y 27.7 mM mio-inositol. Se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 min.

1.3. Material bacteriano

1.3.1. Aislamiento de bacterias a partir de suelo rizosférico

Para el aislamiento de las bacteria, se siguió el método descrito por Ponchon & Tardieux (1962). Se procedió a tomar 1 gramo de suelo rizosférico, se seleccionó aquel que estaba asociado mas íntimamente a la raíz de la planta crecida en condiciones naturales, y se transfirió a tubos que contenían 9 ml de solución salina al 0,85% estéril. Los tubos se agitaron por un periodo de 2 min., tras el cual se realizaron dilusiones



seriadas en condiciones de esterilidad.

Se tomaron las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} y se sembraron 0.2 ml en medio de cultivo Agar-Agua (15 g L^{-1}) y NB (Nutrient Broth, Oxid, 8 g L^{-1} , suplementado con agar al 1.6%). Una vez sembradas las placas, se incubaron a 28°C durante dos días. Se seleccionaron en función de su abundancia relativa, 2 bacterias crecidas en el medio NB y 1 en medio Agar-Agua. La composición de los medios utilizados es la siguiente,

Composición			
NB		PD	
Extracto de carne	3 g	Extracto patata	4 g
Peptona de gelatina	5 g	Glucosa	20 g
pH: 6,8 +/- 2		pH: 7	
autoclavar 121°C durante 20 min.			

El número de unidades formadoras de colonia (ufc) presentes de forma natural, resultantes, se refirió a gramo de suelo seco. La bacteria crecida en Agar-Agua, fue crecida posteriormente en medio de cultivo PD (Potato dextrose, 24 g L^{-1} , suplementado con agar al 1.6%).

En los ensayos posteriores, las ufc se refirieron de acuerdo al substrato utilizado, se describió en cada uno de los ensayos.

1.3.2. Extracción de ácidos nucleicos, PCR y caracterización molecular (Identificación de bacterias)

Las 3 bacterias aisladas, fueron crecidas 2 en medio NB y 1 en PD, a 28°C por 24 horas. Para la extracción de ADN se utilizó el kit DNeasy plant Mini (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La identificación de los aislados bacterianos, se realizó mediante secuenciación del ADN que codifica la subunidad ribosómica 16S rDNA. La amplificación por PCR se llevó a cabo utilizando oligonucleótidos universales de bacterias GM3F y GM4R (Muyzer et al., 1995) que permite la amplificación de casi la totalidad del gen.

La amplificación se realizó mediante PCR, usando aproximadamente 10-20 ng de ADN bacteriano, en un volumen final de $30\text{ }\mu\text{l}$. La mezcla de reacción contenía: 0,2 M de cada primer, $200\text{ }\mu\text{M}$ dNTP's, Tampón de PCR 1X (Ephendorff, Hamburg Germany) suplementado con 1.5 mM MgCl_2 y 1U de Tag DNA Polymerase (Ephendorff).

Se incluyeron controles negativos en todas las amplificaciones de PCR para detectar la presencia de posibles contaminantes en los reactivos. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador (Pekín Elmer). Un gradiente de temperatura de la PCR entre 42 y 58°C fue realizado para determinar la temperatura óptima de unión (TGradient, BIOMETRA).

Se utilizó el siguiente programa: en primer lugar, la mezcla de reacción se incubó a 94°C por 5 min., para desnaturalizar el ADN molde. Posteriormente, se realizaron las

extensiones utilizando un programa que consistía en 35 ciclos de 94°C por 20s (desnaturalización), 46°C por 20s (unión), y 1 min. A 72°C (extensión), finalmente para completar la extensión, un ciclo de 72°C por 5 min.

Los productos de la PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa (0.8%) a 100V durante 1h, usando TAE 1X como tampón de electrodo. La purificación de las bandas cortadas fue hecha usando el Kit Gel Extraction (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los productos de la PCR 2.1 purificados, fueron clonados usando el kit TA Cloning (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Diez clones insertados dieron positivos (colonias blancas) y fueron analizados por ARDRA para determinar la pattern de la secuencia 16S rDNA usando las enzimas Alu I (Roche) and Rsa I (New England). Las pattern de restricción fueron separadas en un gel de agarosa (2%).

La secuenciación del ADNr 16S, se hizo usando los primers para PCR 2.1 vector M13 hacia adelante y M13 contrario. Se llevo a cabo por el servicio de secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra.

El análisis de la homología de las secuencia de ADNr 16S correspondiente a cada aislado bacteriano, se realizó mediante el programa CHROMAS, disponible universalmente en los servidores NCBI, encontrando:

Bacteria 1, crecida en medio NB:

Primer GM3F: *Pseudomonas plecoglossicida* strain S20, 98% identities

Primer GM4R: *Pseudomonas plecoglossicida* strain R18, 95% identities

Bacteria 2, crecida en medio NB:

Primer GM3F: *Pseudomonas putida* strain BCNU171, 97% identities

Primer GM4R: *Pseudomonas putida* strain S16, 96% identities

Bacteria 3, crecida en medio PD:

Primer GM3F: *Bacillus megaterium* strain MO31, 97% identities

Primer GM4R: *Bacillus megaterium* isolate CECRIbio 04, 98% identities

1.3.3. Inoculación de bacterias

Además de las inoculaciones realizadas con los aislados autóctonos, se realizaron inoculaciones con *Rhizobium* sp. (aislado autóctono de la Sierra de Baza, no identificado), su aplicación se indica en cada ensayo. Fue crecido en medio Ty (Beringer, 1974) medio rico en nitrógeno, su composición es la siguiente:

Triptona	5 g	Suplementado con agar 15 g
Extracto de levadura	3 g	Autoclavado a 120°C durante 20 min.
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,9 g	

Todas las inoculaciones realizaron aplicando 1 ml del inoculante sobre la radícula de cada planta, (en caso de que estuvieran germinadas) o directamente sobre la semilla, la densidad de cada inóculo aplicado se indica en cada ensayo.

1.3.4. Conservación de las cepas bacterianas

Las cepas descritas anteriormente, se conservaron a -80°C en glicerol al 15%. Para ello se cultivan en medio líquido selectivo hasta el final de la fase de crecimiento exponencial (cultivo 16h).

2. Determinaciones fisiológicas de las plantas

2.1. Producción de biomasa

En el momento de la cosecha, se determinó el peso fresco de parte aérea y raíz. El peso seco se midió después de secarlo en un horno a 75°C durante 48h.

2.2. Cuantificación de nódulos

En el momento de la cosecha, las raíces fueron lavadas y extendidas sobre una placa petri con agua para cuantificar el número de nódulos presentes en ellas.

2.3. Longitud de raíz

La longitud de la muestra de raíz teñida con azul tripán, se obtuvo utilizando el sistema DIAS DT de análisis digital de imágenes siguiendo las indicaciones del fabricante (Delta-T Devices 1991).

Para obtener la longitud total de la raíz, se tomó una submuestra y se realizó una ponderación con el peso total de raíz de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$L = \frac{L_p \times RT}{R_p} \cdot \frac{100}{PM} \cdot pfs$$

Donde, L es la longitud total de raíz por 100 g de sustrato, L_p es la longitud parcial de la raíz teñida, obtenida por el sistema DIAS DT, RT es el peso fresco de la raíz total, R_p es el peso fresco de la submuestra usada para la tinción, PM es el peso de la muestra de sustrato extraído y pfs es el factor de humedad de la muestra colectada.

2.4. Contenido hídrico

El contenido hídrico se usó para determinar el contenido de agua en la parte aérea de la planta en el momento de la cosecha. El contenido hídrico, fue calculado mediante la siguiente expresión:

$$CH = \frac{\text{peso fresco} - \text{peso seco}}{\text{peso seco}} \times 100$$

La concentración de nutrientes, fueron realizada por el laboratorio de análisis químico, de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC) Granada.

3. Determinaciones bioquímicas y enzimáticas

3.1. Determinaciones bioquímicas

3.1.1. Abundancia natural de ^{13}C

La determinación de ^{13}C fue realizado en un espectrofotómetro de masa, por el Servicio de Análisis de Isótopos Estables de La Estación Experimental del Zaidín (CSIC) Granada.

3.1.2. Concentración de nutrientes

Las concentraciones de N y P, fueron determinadas por colorimetría previo tratamiento de las muestras (digestión con ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno en microondas abierto), (Mingorance, 2002).

La concentración de K, fue determinada por fometria de llama previo tratamiento de las muestras (digestión con ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno en microondas abierto), (Lachica *et al.* 1973).

3.1.3. Determinación del AIA

Cada cultivo se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min. Se tomaron alícuotas de 3 ml del sobrenadante y se hicieron reaccionar con 2 ml del reactivo de Salper (2 ml cloruro férrico 0.5 M y 98 ml de ácido perclórico al 37%), se dejaron 30 min. de incubación en la oscuridad a t° ambiente. (Wöhler, 1997). La absorción de la mezcla de reacción fue medida posteriormente a 535 nm en un espectro Shimadzu UV-1603. La concentración de AIA se determinó a partir de una curva patrón elaborado con concentraciones conocidas de esta auxina y valoradas del mismo modo que las muestra problema, Se expresó en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

3.1.4. Glomalina

Se determinó la cantidad de glomalina fácilmente extractable de acuerdo con el procedimiento descrito por Wright y Upadhyaya (1996), con algunas modificaciones.

Se tamizó una muestra de suelo en tamices de serie Tyles de 2 y 1 mm de luz, y se tomaron 0.5 g de la fracción contenida sobre el tamiz de 1 mm de luz, la cual fue depositada en tubos de plástico de rosca de 15 ml de capacidad. Se añadieron 4 ml de solución extractable (20 mM citrato sódico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NaO}_7$), pH 7.0 y se agitó vigorosamente.

Seguidamente la muestra fue llevada al autoclave a 121°C durante 30 min. Posteriormente, se centrifugó a 10000g durante 5 min., se recogió el sobrenadante, al que se le determinó el volumen.

La cuantificación de la proteína extraída se realizó utilizando el método de Bradford (1976). Para esto, a 700 μl de agua se le agregaron 200 μl de reactivo BioRad Protein Assay (BioRad Laboratories), se agitó la mezcla y se dejó que desarrollara el color durante 10 min. La concentración de glomalina en la muestra se determinó en el espectro a una λ de 595 nm. se determinó a partir de una curva patrón elaborado con concentraciones conocidas de esta auxina y valoradas del mismo modo que las muestra problema. Se utilizó una curva patrón de albúmina bovina (BSA) para obtener un rango

de concentraciones comprendido entre 0 y 20 $\mu\text{g BSA ml}^{-1}$. El color desarrollado es estable durante una hora aproximadamente. Se expresó en $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

3.2. Actividades enzimáticas en el suelo

Los métodos de detección de las diferentes enzimas que se describen a continuación se realizaron sobre muestras de suelo rizosférico previamente aireado para eliminar el exceso de humedad si la hubiera y conservados a 4°C hasta su utilización. Para cada determinación se añadieron controles que permitieron deducir la descomposición no enzimática del suelo, valor que se le restará al obtenido para cada problema. La concentración del producto de la hidrólisis enzimática se determinó leyendo la densidad óptica, a la longitud de onda que posteriormente se señala para cada actividad, comparando los resultados con los obtenidos por una curva patrón de concentraciones conocidas. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Las unidades mediante las cuales se expresan los valores están referidas al peso seco de las muestras

3.2.1. Actividad deshidrogenasa

A 1 g de suelo se le adicionó 0.2 ml de INT (iodofenil-3-p-nitrofenil-5 tetrazolium cloruro) al 0.4% (p/v). Posteriormente se incubó durante 20 horas a 25°C en oscuridad. Transcurrido este tiempo el producto de la reacción INTF (Iodonitrotetrazolium formazán) se extrajo con una mezcla de acetona:tetracloroetileno (1:5) y se midió la absorbancia en espectrofotómetro a λ de 490 nm. Este método surge como una combinación de dos métodos anteriores (Benfield *et al.*, 1977; Trevors, 1984). Los resultados se expresan como $\mu\text{g INTF g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

3.2.2. Actividad fosfatasa

A 1 g de suelo se le adicionó 0.5 ml de p-nitrofenilfosfato 0.115 M y 2 ml de tampón maleato 0.1M pH 6.5. Posteriormente se incubó durante 2 horas a 37°C en oscuridad. Transcurrido este tiempo el producto de la reacción PNP (p-nitrofenol) con NaOH 0.5 M y CaCl_2 0.5M y se midió la absorbancia en espectrofotómetro a λ de 398 nm. Los resultados se expresan como $\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

3.2.3. Actividad glucosidasa

A 0.1 g de suelo se le adicionó 0.5 ml de sustrato PNG (4-nitrofenil β -glucopiranoside) 0.05M y 2 ml de tampón maleato 0.1M pH 6.5. Posteriormente se incubó durante 2 horas a 37°C en oscuridad. Transcurrido este tiempo el producto de la reacción PNP (p-nitrofenol) se extrajo con NaOH 0.5 M y CaCl_2 0.5M y se midió la absorbancia en espectrofotómetro a λ de 398 nm. Los resultados se expresan como $\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

4. Análisis estadísticos

Los resultados de todas las gráficas y tablas presentadas en esta Tesis Doctoral se sometieron a un ANOVA. Cuando se detectaron diferencias significativas como consecuencia de los tratamientos aplicados, se procedió a calcular estas mediante el test de rango múltiple de Duncan o Fisher a un nivel de significación $P < 0.05$. Especificando cual se ha usado en cada uno de los análisis realizados.

5. Presentación de los experimentos

Los capítulos específicos decididos fueron los siguientes,

1. Evaluación general de los aislados autóctonos (hongos AM y bacterias) de la Sierra de Baza “características y mecanismos de tolerancia a condiciones adversas”
2. Contribución de seis aislados de hongos formadores de micorrizas arbusculares (MA) a la captación de agua en plantas de *Lactuca sativa* L. bajo condiciones de estrés hídrico
3. Tolerancia a la sequía y actividades antioxidantes en plantas de lavanda colonizadas por especies de *Glomus* autóctonas tolerantes o sensibles a la sequía
4. Una cepa autóctona tolerante a la sequía de *Glomus intraradices* asociada con una bacteria autóctona en el mejoramiento del transporte de agua y desarrollo de la raíz en *Retama sphaerocarpa*
5. Efectos opuestos de una cepa de *Bacillus megaterium* en el crecimiento de las plantas de *Lactuca sativa* dependiendo del hongo micorrícico arbuscular co- inoculado: aspectos fisiológicos y bioquímicos
6. Interacciones entre el hongo MA *Glomus intraradices* y dos aislados bacterianos autóctonos de ecosistemas mediterráneos: un estudio en cultivo dixénico

Capítulo 1

Evaluación general de los aislados autóctonos (hongos AM y bacterias) de la Sierra de Baza “características y mecanismos de tolerancia a condiciones adversas

Este capítulo se divide en 3 subcapítulos, como sigue:

1.1. Evaluación de la actividad de los hongos MA autóctonos que resultan más eficientes en condiciones de limitada disponibilidad hídrica.

1.2. Estudio de la capacidad de los microorganismos de vida libre autóctonos (bacterias) para la producción de metabolitos secundarios relacionados con su actividad bajo condiciones de estrés.

1.3. Evaluación de la interacción de los aislados autóctonos (hongos MA y bacterias) y estudio de los mecanismos fisiológicos y bioquímicos relacionados con su actividad de protección de las plantas bajo condiciones de limitación hídrica.

Cada uno de estos tres subcapítulos, se irá desglosando en “**ensayos complementarios realizados**” para obtener una amplia información que clarifique los resultados obtenidos, pues el resultado de cada ensayo da pie a la ejecución del siguiente.

Además, la totalidad de estos resultados, justifica la ejecución de los ensayos que conforman los siguientes capítulos de la presente tesis doctoral, que han dado lugar a publicaciones científicas en revistas de carácter internacional.

1.1. Evaluación de la actividad de los hongos MA autóctonos que resultan más eficientes en condiciones de limitada disponibilidad hídrica

1.1.1. Evaluación de la efectividad de los hongos MA autóctonos aislados a partir de suelo rizosférico de la Sierra de Baza

1.1.1.1. Material y Métodos:

Se utilizaron plantas leguminosas (*Trifolium repens* L.), crecidas en microcosmos bajo condiciones de invernadero y nivel hídrico controlado al 75% c.c. El sustrato usado fue una mezcla de suelo:arena, en proporción de 5:2 (v/v). El suelo (de la Sierra de Baza) y la arena, recibieron el tratamiento indicado en M. y M., (1.1.2.1.).

Los hongos MA autóctonos, seleccionados como los más frecuentes y abundantes en la Sierra de Baza fueron: *G. constrictum*, *G. claroideum*, *G. coronatum* y *G. mosseae*. Para la inoculación, se utilizaron 10 g de inóculo de cada hongo MA (M. y M., 1.2.2.).

Todos los tratamientos, recibieron una inoculación de *Rhizobium* sp. (aislado autóctono de la Sierra de Baza, no identificado), (M. y M., 1.3.4.) se aplicó 1ml de la suspensión bacteriana (10^8 ufc planta⁻¹) en el momento de la siembra.

Los tratamientos no micorrizados recibieron 2 ml de un filtrado del inóculo, para reincorporar la microbiota exenta de propágulos de micorriza.

1.1.1.2. Determinaciones:

Mediante cortes sucesivos (4) a lo largo de 24 meses, se determinó la efectividad de estos aislados fúngicos sobre la producción de biomasa vegetal (M. y M., 2.1.).

1.1.1.3. Resultados:

Desde el 1º corte, hay efecto positivo de la colonización MA por cada una de estas especies fúngicas autóctonas. Es de destacar el distinto comportamiento de estos endofitos autóctonos a lo largo del tiempo.

G. claroideum disminuye su efectividad relativa en los sucesivos cortes (particularmente 3º y 4º) mientras que en el 1º fue el más efectivo.

Concomitantemente con *G. constrictum* resultó ser el endofito más efectivo, incrementó un 597% la biomasa vegetal

	corte 1	corte 2	corte 3	corte 4	Total (mg)	Δ%
Testigo	40	40	200	100	380	100
<i>G.constrictum</i>	150	370	1190	940	2650	697
<i>G.claroideum</i>	210	230	210	70	720	189
<i>G.coronatum</i>	170	330	800	600	1900	500
<i>G.mosseae</i>	70	160	110	100	440	116

Tabla 1. Cosechas sucesivas. Peso seco parte aérea de plantas de Trébol (mg)

1.1.1.4. Conclusiones generales del subcapítulo 1.1.:

▶ *Glomus constrictum*, se considera el hongo MA autóctono más eficiente en cuanto a la producción de biomasa.

▶ *G. mosseae*, se considera el hongo MA autóctono menos eficiente en cuanto a la producción de biomasa.

1.2. Estudio de la capacidad de los microorganismos de vida libre autóctonos (bacterias) para la producción de metabolitos secundarios relacionados con su actividad bajo condiciones de estrés

1.2.1. Selección de las bacterias mas representativas en suelo (Baza) rizosférico, y evaluación de su vitalidad y actividad a niveles crecientes de estrés osmótico (inducido con PEG).

1.2.2. Evaluación de la efectividad de los aislados bacterianos autóctonos, bajo condiciones de estrés hídrico: Ensayo en microcosmos sobre el desarrollo vegetal.

1.2.3. Determinación si las bacterias aisladas son exclusivamente rizosféricas o son capaces de desarrollarse endofíticamente.

1.2.4. Nivel de tolerancia y adaptación al estrés osmótico (valorado en términos de ufc ml⁻¹ y prolina) de las especies autóctonas aisladas frente a una PGPR usada como de referencia (*B. thuringiensis*).

1.2.1. Selección de las bacterias mas representativas en suelo (Baza) rizosférico, y evaluación de su vitalidad y actividad a niveles crecientes de estrés osmótico (inducido con PEG).

1.2.1.1. Material y Métodos:

Cada una de las cepas autóctonas aisladas, *P. plecoglossicida*, *P. putida* y *B. megaterium*, se crecieron en 150 ml de medio de cultivo (M. y M., 1.3.1.) líquido, bajo condiciones de esterilidad y concentraciones crecientes de PEG (0, 20, 40 y 60%), en agitación a 150 rpm y 28°C de temperatura por un periodo de 24 horas. Los cultivos se crecieron hasta alcanzar la fase estacionaria, a una densidad óptica de 4.5 (10^8 ufc ml⁻¹).

1.2.1.2. Determinaciones:

▣ Curvas de crecimiento a concentraciones crecientes de PEG:

Mediante diluciones seriadas, (M. y M., 1.3.5.). Se expresó como ufc ml⁻¹.

▣ Producción de proteínas:

Se determinó por el método de Bradford (1976), basado en la unión de azul brillante de Coomassie G-250 a las proteínas. El cálculo de la concentración de proteínas se realizó por comparación con una curva patrón de seroalbumina bovina (Sigma). Se expresó en ug ml⁻¹.

▣ Producción de Ácido Indol Acético (AIA):

Cada cultivo se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min. Se tomaron alícuotas de 3 ml del sobrenadante y se hicieron reaccionar con 2 ml del reactivo de Salper (M. y M., x.x). Se expresó en µg AIA µg proteína⁻¹.

1.2.1.3. Resultados:

P. plecoglossicida, disminuye su crecimiento a medida que aumenta la concentración de PEG en el medio, llegando a inhibirse (ver foto) en concentraciones de 40 y 60% de PEG,

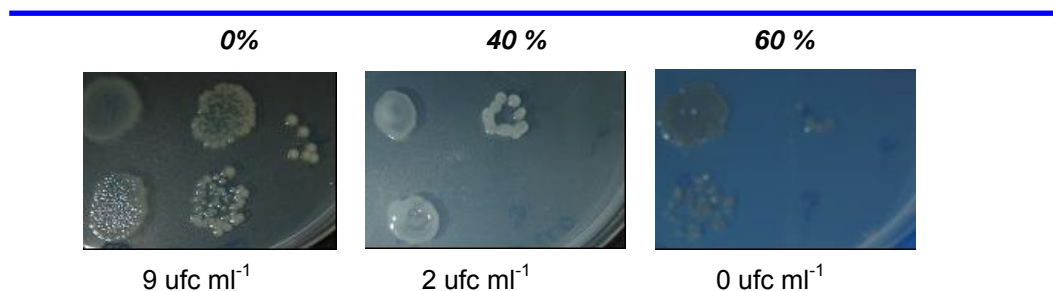
P. putida disminuye gradualmente (hasta un 50%) a medida que incrementa la concentración de PEG y *B. megaterium*, crece mejor en concentraciones crecientes de PEG (20 y 40%).

Así pues, *B. megaterium*, incrementa un 33% cuando crece con 20% PEG y es capaz de crecer a una concentración de 60% de PEG, inhibiéndose solo un 16.7% su crecimiento, a esta concentración de PEG.

- Curvas de crecimiento a concentraciones crecientes de PEG:

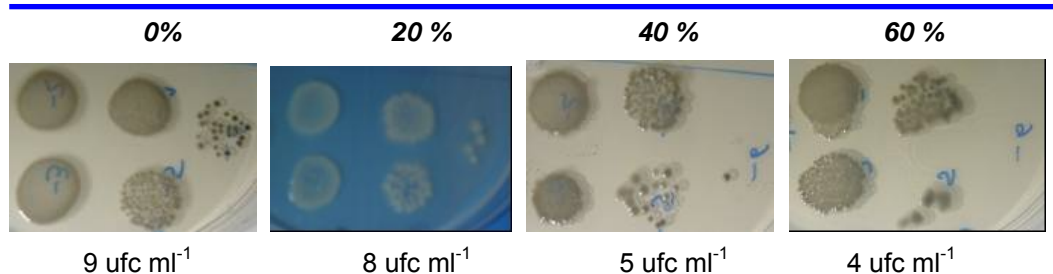
P. plecoglossida:

PEG



P. putida:

PEG



B. megaterium:

PEG

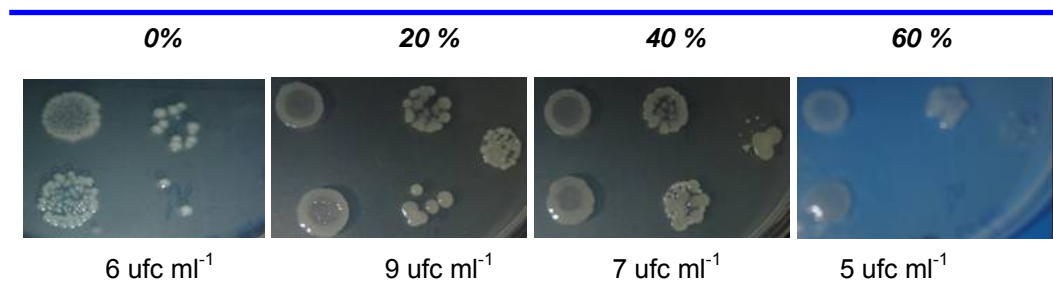


Foto. Número de colonias en placas mediante diluciones seriadas en concentraciones crecientes de PEG (0, 20, 40 y 60%) de los aislados autóctonos

En cuanto a la producción de AIA, *P. putida* y *B. megaterium* incrementan la secreción de AIA cuando están sometidas a un nivel bajo de PEG (20%), luego la secreción empieza a disminuir pero no se inhibe con las concentraciones altas (40, 60%).

Es de destacar que *B. megaterium* sintetiza mayor cantidad de proteínas a medida que la concentración de PEG aumenta.

% PEG	µg AIA µg proteína ⁻¹		
	<i>P.plecoglossicida</i>	<i>P. putida</i>	<i>B. megaterium</i>
0	0,5	0,4	1,4
20	0,4	0,6	1,2
40	0,4	0,9	1,5
60	0,2	1,4	1,8

Tabla 1.2. Efecto de concentraciones crecientes de PEG (0, 20, 40, 60%) sobre la producción de µg AIA µg proteína⁻¹ de los aislados bacterianos autóctonos

1.2.1.4. Conclusiones:

Los aislados autóctonos *Pseudomas putida* y *Bacillus megaterium*, en condiciones de estrés osmótico tienen capacidad de producir metabolitos secundarios estimuladores del desarrollo vegetal como es el AIA.

1.2.2. Evaluación de la efectividad de los aislados bacterianos autóctonos, bajo condiciones de estrés hídrico: Ensayo en microcosmos sobre el desarrollo vegetal.

1.2.2.1. Material y Métodos:

Se utilizaron plantas leguminosas (*Trifolium repens* L.), crecidas en microcosmos bajo condiciones de invernadero y nivel hídrico controlado al 75% c.c. El sustrato usado fue una mezcla de suelo:arena, en proporción de 5:2 (v/v). El suelo (de la Sierra de Baza) y la arena, recibieron el tratamiento indicado en M. y M. (1.1.2.1).

La inoculación de los aislados bacterianos autóctonos *P. plecoglossicida*, *P. putida* y *B. megaterium* fue hecha con 1ml de la suspensión bacteriana (10^8 ufc planta⁻¹) en el momento de la siembra y ocho días después.

Todos los tratamientos, recibieron una inoculación de *Rhizobium* sp. (aislado autóctono de la Sierra de Baza, no identificado), (M. y M., 1.3.4.) se aplicó 1ml de la suspensión bacteriana (10^8 ufc planta⁻¹) en el momento de la siembra.

Los tratamientos no inoculados recibieron 2 ml de un filtrado del inóculo de hongos MA para reincorporar la microbiota del suelo, y a su vez 2 ml de los inóculos bacterianos autoclavados.

1.2.2.2. Determinaciones:

Mediante cortes sucesivos a lo largo de 24 meses, se determinó la efectividad de estos aislados sobre la producción de biomasa (M. y M., 2.1.).

1.2.2.3. Resultados:

La inoculación de todos los microorganismos seleccionados ejerció un efecto positivo en el crecimiento de las plantas en condiciones de estrés hídrico.

El aislado más efectivo fue la bacteria *P. putida*, que incrementó en un 238% la producción de biomasa vegetal. Hasta el 2º corte (12 meses después de la siembra) no mostró su efectividad.

El efecto de cualquiera de los inóculos microbianos fue más pronunciado en la 4ª cosecha.

	corte 1	corte 2	corte 3	corte 4	Total (mg)	Δ%
Testigo	40	40	200	100	380	100
<i>P. plecoglossicida</i>	100	100	200	400	800	211
<i>P. putida</i>	35	130	580	540	1285	338
<i>B. megaterium</i>	60	75	480	440	1055	278

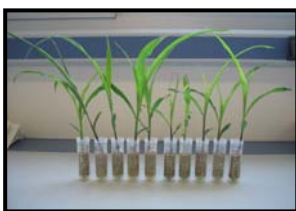
Tabla 1.3. Cosechas sucesivas. Peso seco parte aérea de plantas de Trébol (mg)

1.2.2.4. Conclusiones:

La bacteria autóctona *Pseudomas putida*, se considera el aislado mas eficiente respecto a la producción de biomasa.

1.2.3. Determinación si las bacterias aisladas son exclusivamente rizosféricas o son capaces de desarrollarse endofíticamente.

1.2.3.1. Material y Métodos:



Los inóculos bacterianos autóctonos (50 ml), *P. plecoglossicida*, *P. putida* y *B. megaterium*, se crecieron hasta alcanzar la fase estacionaria, a una densidad óptica de 4.5 (10^8 ufc ml^{-1}) para llevar a cabo la inoculación de maíz.

Las semillas de maíz, previamente germinado (M. y M. 1.1.2.2) se sumergieron (5 plantas, por cada bacteria) durante 1 hora en la respectiva suspensión bacteriana (*P. plecoglossicida*, *P. putida*, *B. megaterium* y medio MS sin bacteria).

Posteriormente, las semillas fueron colocadas en tubos FALCON conteniendo vermiculita fina (40 ml), donde se adicionaron 25 ml de MS (sin sacarosa y sin fitigel) bajo condiciones de esterilidad (M. y M. 1.1.2.3.). Los tubos se colocaron en una cámara a 24°C y con un fotoperiodo de luz, oscuridad de 16h/8h y se regaron periódicamente, hasta los 15 días que duró el ensayo.

1.2.3.2. Determinaciones:

- ▣ Peso fresco y seco de biomasa vegetal (M. y M., 2.1.)
- ▣ Contenido hídrico en parte aérea (M. y M., 2.2.)
- ▣ Crecimiento bacteriano (ufc ml⁻¹) en rizosfera y endorizosfera:

En la rizosfera, para separar las bacterias del material vegetal y del particulado se realizó un vortex de 2 min. a la raíz y se tomaron inmediatamente 100 µl para hacer diluciones seriadas. (M. y M., 1.3.5.). Se expresaron en ufc g raíz + vermiculita⁻¹.

Para determinar las bacterias presentes en la endorizosfera, las raíces se sumergieron en lejía 10% durante 5 min. Se hicieron varios enjuagues con agua destilada estéril, luego se maceraron en un mortero y se tomaron 100 µl para hacer diluciones seriadas. Se expresaron en ufc ml⁻¹.

1.2.3.3. Resultados:

La producción de biomasa de las plantas inoculadas en parte aérea, presentó un incremento significativo, respecto a las plantas no inoculadas

La producción de biomasa en raíz, presentó un incremento significativo en las plantas inoculadas con *P. putida* y *B. megaterium*.

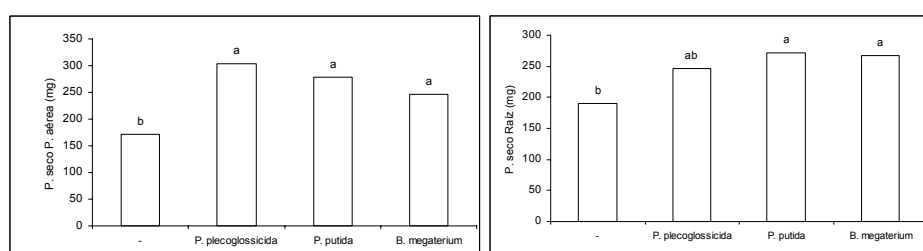


Fig 1.1. Producción de biomasa de plantas inoculadas con aislados autóctonos de la Sierra de Baza (Granada)

Respecto al contenido hídrico en parte aérea, todas las plantas inoculadas con las bacterias autóctonas presentan un incremento significativo respecto a las no inoculadas.

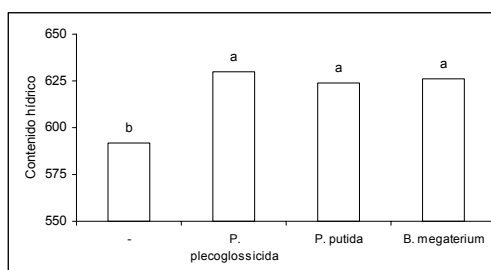


Fig 1.2. Contenido hídrico en parte aérea de plantas de maíz inoculado con aislados bacterianos autóctonos de la Sierra de Baza (Granada)

Al determinar el número de ufc g raíz+vermiculita⁻¹ en rizosfera y endorizosfera, las bacterias *Pseudomonas* se ubican en la parte superficial de la raíz; mientras que la bacteria *B. megaterium* se encuentra tanto por fuera de la raíz como en su interior. Dicha bacteria es rizosférica y endofítica.

	<i>P. plecoglossicida</i>	<i>P. putida</i>	<i>B. megaterium</i>
rizosfera	8,6	8,6	8,0
endorizosfera	0,0	0,0	6,0

Tabla1.4. Crecimiento bacteriano en rizosfera (ufc g raíz+vermiculita⁻¹) y en endorizosfera (ufc ml⁻¹) en plantas de maíz inoculado con aislados autóctonos de la Sierra de Baza (Granada)

1.2.3.4. Conclusiones:

Las plantas inoculadas con los aislados bacterianos autóctonos, especialmente con *P. putida* y *B. megaterium* producen una mayor biomasa de parte aérea y de raíz.

Todas las bacterias ensayadas aumentan en contenido hídrico en las plantas inoculadas en ausencia de limitación hídrica, lo que repercute en una mayor producción de biomasa y mejor estado fisiológico. Se puede considerar un mecanismo biológico de gran utilidad como estrategia de adaptación vegetal a las limitaciones hídricas propias de la zona semiárida seleccionada

Cada uno de los aislados presenta una estrategia de colonización diferente. Dos de ellos solo colonizan la rizosfera y uno es también colonizador de la endorizosfera.

1.2.4. Nivel de tolerancia y adaptación al estrés osmótico (valorado en términos de ufc ml⁻¹ y prolina) de las especies autóctonas aisladas frente a una PGPR usada como de referencia (*B. thuringiensis*).

1.2.4.1. Material y Métodos:

Se utilizó *B. thuringiensis* (bacteria aislada de una zona árida de la provincia de Alicante) como bacteria de referencia, por su comprobada actividad PGPR en ensayos previos y por tener un lugar de procedencia y adaptación a la limitación hídrica similar a los aislados autóctonos usados en este estudio). En condiciones *in vitro*, cada una de las bacterias, tanto autóctonas como de referencia, se crecieron en 150 ml de medio de cultivo (M. y M., 1.3.1.), bajo condiciones de esterilidad en agitación a 150 rpm, 28°C de temperatura y concentraciones crecientes de salinidad 0, 0.15, 0.3 y 0.6 M de NaCl, por un periodo de 24 horas. Cuando los cultivos alcanzaron un crecimiento mayor de 10⁸ ufc ml⁻¹.

1.2.4.2. Determinaciones:

Se hicieron las siguientes determinaciones:

⌘ Curvas de crecimiento:

Mediante diluciones seriadas, (M. y M., x.). Se determinan las ufc ml⁻¹ a las 12 y 24 h de crecimiento.

⌘ Determinación de Prolina:

Considerada como un aminoácido osmoprotector (Nolte *et al.*, 1997), se determinó por colorimetría (Bates *et al.*, 1973) en el extracto bacteriano obtenido.

Preparación del extracto bacteriano: Siguiendo el protocolo de Belgrader *et al.*, 1999. Con algunas modificaciones, Se centrifugó cada cultivo bacteriano a 10000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se elimina y el pellet se resuspendió en 4 ml de buffer de lisis (100 mM EDTA, 50 mM NaCl pH 6,9) y lisozima 1 mg m⁻¹l (Sigma), se dejó incubando a 30°C durante 90 min. A continuación se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. y el sobrenadante se centrifugó de nuevo a 14 rpm durante 25 min. El sobrenadante final obtenido se mantuvo en hielo o se conservó a -20°C hasta su utilización

Se tomaron alícuotas de 1 ml del extracto bacteriano correspondiente y se hizo reaccionar con 1 ml de ninhidrina ácida (se prepara calentando 1.25 g de ninhidrina en 20 ml de ácido fosfórico 6M y 30 ml de ácido acético glacial; la mezcla resultante, se conserva a 4°C durante no más de 24 horas) y 1 ml de acético glacial durante 1 hora a 100°C. La reacción se detuvo introduciendo los tubos en baño de hielo. La mezcla de reacción se extrae con 2 ml de tolueno, agitando vigorosamente durante 20 seg. El cromóforo obtenido, ahora en el tolueno, se deja a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 530 nm, utilizando tolueno como blanco.

La concentración de prolina se determina a partir de una curva patrón elaborada con concentraciones conocidas de este aminoácido y valoradas del mismo modo que las muestras problema.

1.2.4.3. Resultados:

La bacteria de referencia utilizada (*B. thuringiensis*) fue más sensible a las concentraciones crecientes de sal que las bacterias autóctonas.

La bacteria más tolerante a altas concentraciones de salinidad es *B. megaterium*.

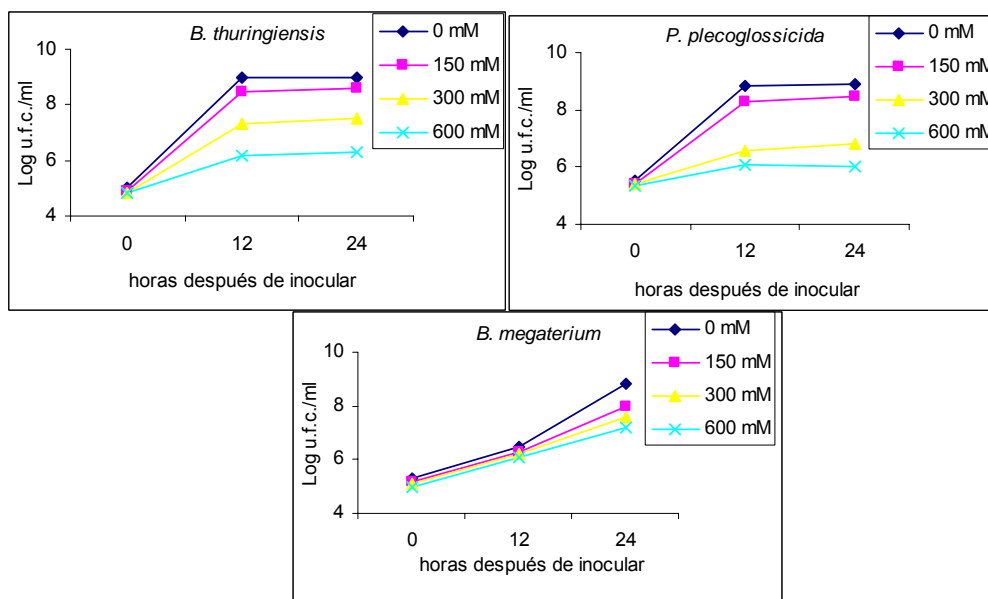


Fig. 1.3. Crecimiento (ufc ml⁻¹) de microorganismos (autóctonos y de referencia) a concentraciones crecientes de NaCl (mM)

Para determinar el límite de tolerancia al NaCl de la bacteria mas tolerante, se realizó la una cinética de crecimiento utilizando una concentración de 3 M (5 veces mas alta que la superior usada en el ensayo anterior)

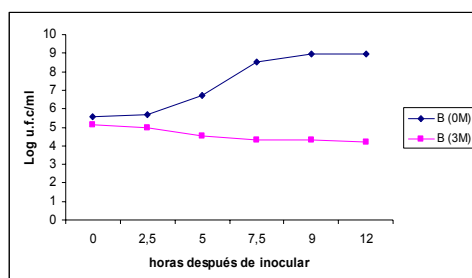


Fig. 1.4. Cinética de crecimiento (ufc ml⁻¹) de la bacteria *B. megaterium* sin y con 3M de NaCl

La bacteria *B. megaterium*, no es capaz de incrementar su crecimiento en 3M de NaCl. Pero lo mantiene. Ello sugiere que tolera esa concentración al menos durante 12 horas; Lo que representa una gran tolerancia a la salinidad (usado como índice de estrés osmótico), teniendo en cuenta que la salinidad del mar es de 0.6 M.

El incremento del estrés osmótico provoca un incremento en la síntesis de prolina en *P. putida* y *B. megaterium*. *B. megaterium*, produce la más alta y constante concentración de Prolina a medida que aumenta el estrés osmótico. Ello explica su alta tolerancia al estrés osmótico aplicado.

NaCl (mM)	<i>B. thuringiensis</i>	<i>P. plecoglossicida</i>	<i>P. putida</i>	<i>B. megaterium</i>
0	0,009	0,009	0,006	0,010
1,5	0,006	0,010	0,014	0,030
3	0,001	0,005	0,011	0,016

Tabla1.5. Producción de prolina ($\mu\text{g ml}^{-1}$) de cada uno de los aislados bacterianos

1.2.4.4. Conclusiones:

Las bacterias *P. putida* y *B. megaterium*, son los aislados que más toleran la salinidad, ello es posiblemente debido a que la producción de Prolina por dichos aislados bacterianos aumenta a medida que incrementa la concentración de NaCl.

Esto nos indica que ambos microorganismos presentan un adecuado potencial para resistir los estreses osmóticos ambientales de la zona de estudio y evitan el daño celular que ocasiona el agente estresante.

Conclusiones generales del apartado 1.2.:

► Pueden considerarse organismos PGPR, los aislados autóctonos *Pseudomas putida* y *Bacillus megaterium*, ya que en condiciones de estrés osmótico tienen capacidad de producir metabolitos secundarios estimuladores del desarrollo vegetal como es el AIA.

► *Bacillus megaterium*, posee una mayor capacidad de osmoadaptación que el resto de los aislados bacterianos. Ello permite su crecimiento a elevada osmolaridad en el medio posiblemente motivado por la síntesis de solutos compatibles, como la prolina.

Así mismo, al tener una colonización de tipo rizo y endorizosferica, supone un mecanismo biológico de gran utilidad como estrategia de preservación ante las limitaciones hídricas propias de la zona semiárida seleccionada.

Tales comportamientos y características sugieren que se trata de la bacteria más promisoría, a utilizar en los ensayos en los que se analiza las actividades fisiológicas y fisicoquímicas que presentan las plantas como respuesta a su inoculación (justificación para el Capítulo 4, de la presente tesis doctoral).

1.3. Evaluación de la interacción de los aislados autóctonos (hongos MA y bacterias) y estudio de los mecanismos fisiológicos y bioquímicos relacionados con su actividad de protección de las plantas bajo condiciones de limitación hídrica.

1.3.1. Evaluación de la interacción hongos MA-bacterias autóctonos en microcosmos.

Una vez obtenido los resultados del apartado 1.3.1, se realizó los siguientes ensayos:

1.3.2 Evaluación de la dinámica de infección de los aislados MA autóctonos *G. constrictum* y de referencia, en presencia y ausencia de las bacterias *P. putida* y *B. megaterium* autóctonas seleccionadas.

1.3.3. Determinación de la interacción *G. intraradices* proveniente de cultivo monoxénico (de colección) con microorganismos aislados en la Sierra de Baza, en microcosmos.

1.3.4. Evaluación de la dinámica de infección de los aislados MA autóctonos *G. mosseae* y de referencia, en presencia y ausencia de las bacterias *P. putida* y *B. megaterium* autóctonas seleccionadas.

1.3.4.1. Evaluación de la dinámica de la infección de los aislados AM *G. mosseae* autóctono y de referencia, en presencia y ausencia de las bacterias *P. putida* y *B. megaterium* autóctonas seleccionadas.

1.3.4.2. Determinación de la capacidad colonizadora del micelio producido por *G. mosseae* (MA ó MR) y generado bajo la influencia del metabolismo microbiano *P. putida* o *B. megaterium*.

1.3.4.3. Determinación de la interacción directa (no mediada por la planta) entre los endofitos *G. mosseae* (autéctono o de referencia (BEG 119) con *B. megaterium* (la más tolerante al estrés osmótico y más eficiente (en términos de crecimiento).

1.3. Evaluación de la dinámica de infección de los aislados MA autóctonos *G. constrictum* y de referencia, en presencia y ausencia de las bacterias *P. putida* y *B. megaterium* autóctonas seleccionadas.

1.3.1. Evaluación de la interacción hongos MA-bacterias autóctonos en microcosmos.

1.3.1.1. Material y Métodos:

Se utilizaron plantas leguminosas (*Trifolium repens* L.), crecidas en microcosmos bajo condiciones de invernadero y nivel hídrico controlado al 75% c.c. El sustrato usado fue una mezcla de suelo:arena, en proporción de 5:2 (v/v). El suelo (de la Sierra de Baza) y la arena, recibieron el tratamiento indicado en M. y M., (1.1.2.1.).

Los hongos MA autóctonos, seleccionados como los más frecuentes y abundantes en la Sierra de Baza fueron: *G. constrictum*, *G. claroideum*, *G. coronatum* y *G. mosseae*. Para la inoculación, se utilizaron 10 g de inóculo de cada hongo MA (M. y M., 1.2.2.).

La inoculación de los aislados bacterianos autóctonos *P. plecoglossicida*, *P. putida* y *B. megaterium* fue hecha con 1ml de la suspensión bacteriana (10^8 ufc planta⁻¹) en el momento de la siembra y ocho días después.

Todos los tratamientos, recibieron una inoculación de *Rhizobium* sp. (aislado autóctono de la Sierra de Baza, no identificado), (M. y M., 1.3.4.) se aplicó 1ml de la suspensión bacteriana (10^8 ufc planta⁻¹) en el momento de la siembra.

Los tratamientos no inoculados recibieron 2 ml de un filtrado del inóculo de hongos MA para reincorporar la microbiota del suelo, y a su vez 2 ml de los inóculos bacterianos autoclavados.

1.3.1.2. Determinaciones:

Mediante cortes sucesivos a lo largo de 24 meses, se determinó la efectividad de estos aislados sobre la producción de biomasa vegetal (M. y M., 2.1.).

1.3.1.3. Resultados:

La doble inoculación fue efectiva en todos los casos. Existen distintos rangos de compatibilidad funcional dependiendo de los microorganismos asociados:

- Las bacterias *P. plecoglossicida* y *P. putida* son más efectivas en asociación con *G. claroideum* (el hongo menos efectivo).
- *B. megaterium* fue el microorganismo que más eficiente interaccionó con cualquiera de los hongos AM asociados.

Se confirma que *G. constrictum* es el hongo más efectivo y *G. claroideum* el menos, la efectividad de *G. claroideum* (la mayor en el 1º corte) disminuye, comparativamente con los otros 2 aislados fúngicos, en el 3º y 4º corte.

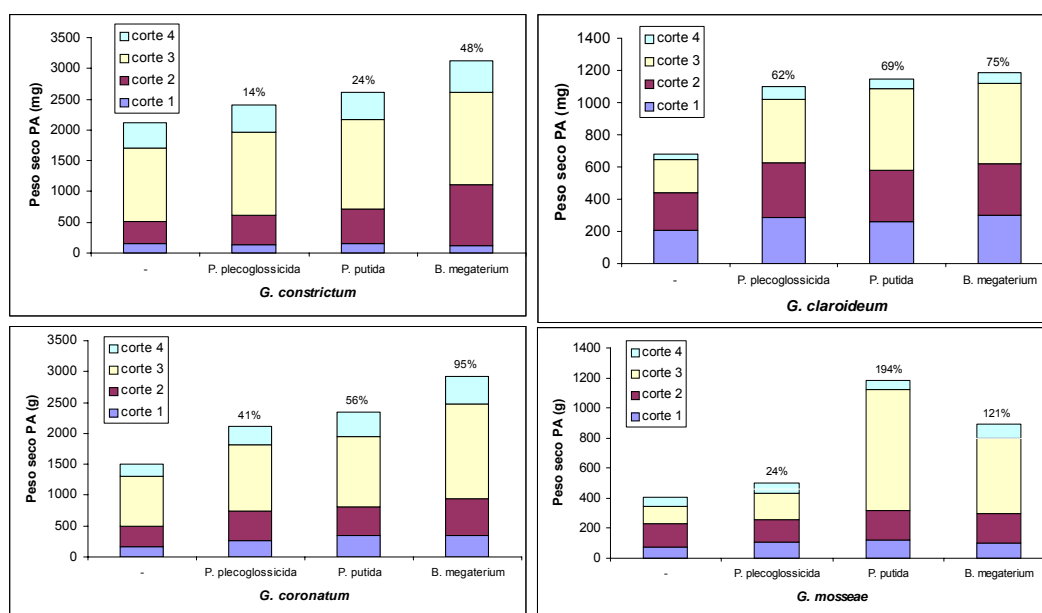


Fig. 1.5. Peso seco cortes sucesivos PA (mg)

1.3.1.4. Conclusiones:

Las interacciones de *G. constrictum* y *G. mosseae* con *B. megaterium*, son las más eficientes (95% y 121%, respectivamente) incrementando la producción de biomasa vegetal.

La interacción con *G. mosseae* con *P. putida*, es la más eficiente (194%) incrementando la producción de biomasa vegetal.

1.3.2. Evaluación de la dinámica de infección de los aislados MA autóctonos *G. constrictum* y de referencia, en presencia y ausencia de las bacterias *P. putida* y *B. megaterium* autóctonas seleccionadas

1.3.2.1. Material y Métodos: Se utilizó como planta modelo Lechuga (*Lactuca sativa* var.



Romana). La lechuga, creció en mesocosmos bajo condiciones controladas de esterilidad al 75% y 100% c.c, el sustrato usado fue una mezcla de suelo (Zaidín):arena, en proporción de 1:1 (v/v). El suelo y la arena recibieron el tratamiento indicado en el apartado Materiales y Métodos

generales.

La inoculación del hongo MA autóctono y de los aislados bacterianos (de referencia y autóctono) se efectuó como se describió en el apartado de Materiales y Métodos generales. Se utilizaron 8 repeticiones/ tratamiento. El ensayo tuvo una duración de 50 días (6 semanas) y un estrés de 14 días.

Análisis estadístico de Fisher's protected LSD.

1.3.2.2. Determinaciones:

- Relación R/PA
- Suministro de agua (Ver M. y M., apartado x.x.)
- Contenido hídrico relativo (CHR):

Debido a que el peso seco puede experimentar cambios diarios y estacionales, las determinaciones comparativas del contenido hídrico basadas en el peso seco no son satisfactorias. Una forma de eliminar estos problemas consiste en expresar el contenido hídrico sobre la base del contenido hídrico a plena turgencia, es decir, al peso turgente (Pt), pasando a denominarse CHR (Boyer, 1995). Se aplicó la siguiente fórmula, donde El Pt se obtiene tras incubar los tejidos de la planta en agua destilada y temperatura ambiente durante 2-3 horas.

$$\text{CHR (\%)} = \frac{\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}}{\text{Peso total} - \text{Peso seco}} * 100$$

- Transpiración estomática:

El día de la cosecha se cubrió la superficie de las macetas con papel aluminio al inicio del fotoperiodo para evitar la evaporación. Las macetas se pesaron al inicio del fotoperiodo (peso inicial, pi) y a las seis horas después (peso final, pf). Así, la transpiración total (E_T) se expresó como $\text{g H}_2\text{O planta}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y se calculó mediante la siguiente fórmula,

$$E_T = \frac{(pi - pf)}{6}$$

- Porcentaje de micorrización (M. y M., apartado x.x.)
- Unidades formadoras de colonia (ufc ml^{-1}) (M. y M., apartado x.x.)
- Abundancia natural del carbono (^{13}C) (M. y M., apartado x.x.)
- Contenido de N, P y K en parte aérea (M. y M., apartado x.x.)

1.3.2.3. Resultados:

• Relación R/PA:

Las plantas inoculadas con *G. constrictum* + *B. megaterium* bajo condiciones de sequía, presentan la mayor relación raíz/parte aérea, con diferencia significativa frente a los demás tratamientos.

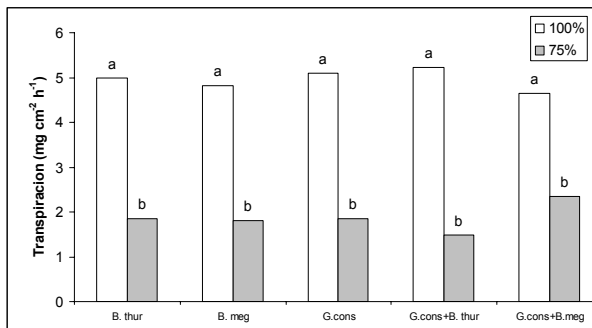


Fig. 1.6. Relación R/PA

• Suministro de agua:

En las plantas sin estrés hídrico, los tratamientos de las co-inoculaciones con *G. constrictum*+*B. thuringiensis* y *G. constrictum*+*B. megaterium*, necesitaron un menor suministro hídrico diario, con diferencia significativa frente a los demás tratamientos.

Bajo condiciones de estrés hídrico, las plantas inoculadas con *G. constrictum* solo o en interacción con *B. megaterium*, necesitaron un menor suministro de agua (ml) por día, con una diferencia significativa frente a los demás tratamientos.

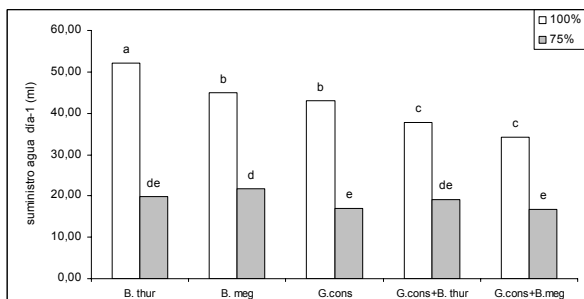


Fig. 1.7. Suministro de agua ml día⁻¹

•Contenido hídrico relativo:

Las plantas inoculadas con *B. megaterium* sin estrés hídrico, presentaron el mayor CHR, seguidas de los tratamientos inoculados con *G. constrictum* + *B. megaterium* respecto a los demás tratamientos bajo condiciones de estrés.

Las plantas inoculadas con *B. thuringiensis*, presentaron el menor CHR, ya sea solo en interacción con *G. constrictum* respecto a los demás tratamientos bajo condiciones de estrés.

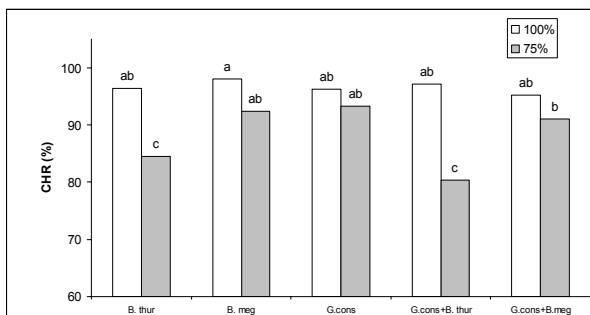


Fig. 1.8. Contenido hídrico relativo (%)

• Transpiración estomática:

No se observó diferencia significativa en cuanto a la transpiración estomática entre los tratamientos sin estrés y bajo estrés.

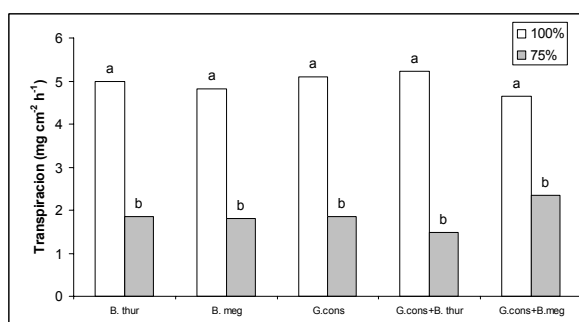


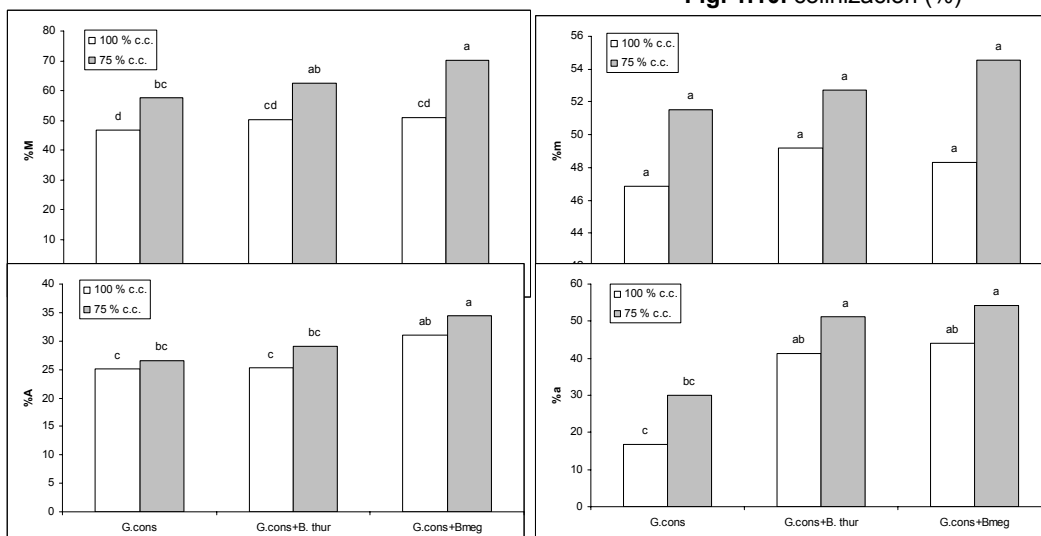
Fig. 1.9. Transpiración estomática

• Porcentaje de micorrización:

Las plantas inoculadas con *G. cons+B.meg* incrementaron de forma significativa la intensidad de micorrización (%M) y producción de arbusculos (%A) bajo condiciones de estrés hídrico, respecto a los demás tratamientos.

Así mismo, los tratamientos *G. cons+B.thur* y *G. cons+B.meg*, incrementaron significativamente la producción de arbusculos en el segmento evaluado (%a) bajo condiciones de estrés hídrico, frente a los demás tratamientos.

Fig. 1.10. colonización (%)



• ufc gss⁻¹:

Los tratamientos sometidos a sequía, pero inoculados con *B. megaterium* presentaron el mayor número de este microorganismos en suelo rizosférico (ufc gss⁻¹), seguido de las plantas inoculadas con *G. cons* + *B.thur*. La limitación hídrica en el medio favoreció, en todos los casos el mantenimiento del microorganismo inoculado.

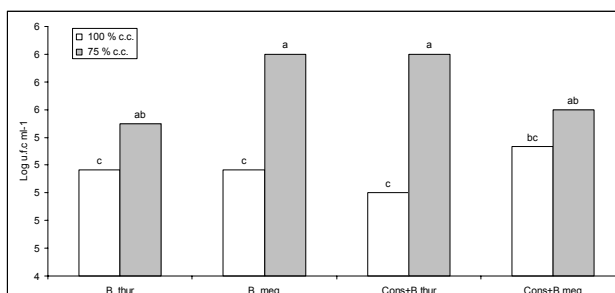


Fig. 1.11. ufc gss⁻¹

• Abundancia natural del carbono (¹³C):

Las plantas crecidas bajo sequía, pero inoculadas con *B. megaterium* solo o en interacción con *G. constrictum*, muestran mas contenidos de ¹³C que nos indican que son plantas menos estresadas.

Tratamientos	¹³ C	
	100 % c.c.	75 % c.c.
<i>B. thur</i>	-30,5 bcd	-29,9 ab
<i>B. meg</i>	-30,4 bcd	-29,5 a
<i>G.cons</i>	-30,7 d	-29,9 ab
<i>G.cons+B. thur</i>	-30,6 cd	-30,0 abc
<i>G.cons+B.meg</i>	-30,7 cd	-29,7 a

Tabla1.6. Abundancia natural de ¹³C

• Contenido de N, P y K en parte aérea:

Las plantas inoculadas con *B. thuringiensis*, y crecidas sin estrés hídrico, presentan incrementos significativos de la concentración de N (%) en parte aérea. Mientras que las plantas inoculadas con *G. constrictum*+*B. thuringiensis* en condiciones de sequía, son las que presentan una menor concentración de dicho elemento.

Las plantas inoculadas con *G. constrictum*+*B. megaterium* sin estrés hídrico, presentan un incremento significativo de la concentración de N (%) en parte aérea, respecto al valor obtenido en dicho tratamiento con limitación hidrica. Las plantas inoculadas con *B. thuringiensis* y *B. megaterium* sin estrés y *B. megaterium* con estrés son las que menos % N tienen. Curiosamente, las plantas inoculadas con *B. thuringiensis* y no sometidas a estrés hídrico son las que menos %N tienen.

La doble inoculación de *G. constrictum* + *B. megaterium* fue particularmente efectiva incrementando %P en situación de no limitación hídrica.

La inoculación de ambos *Bacillus* (*thuringiensis* y *megaterium*) fue muy efectiva incrementando la concentración de K en situación de sequía.

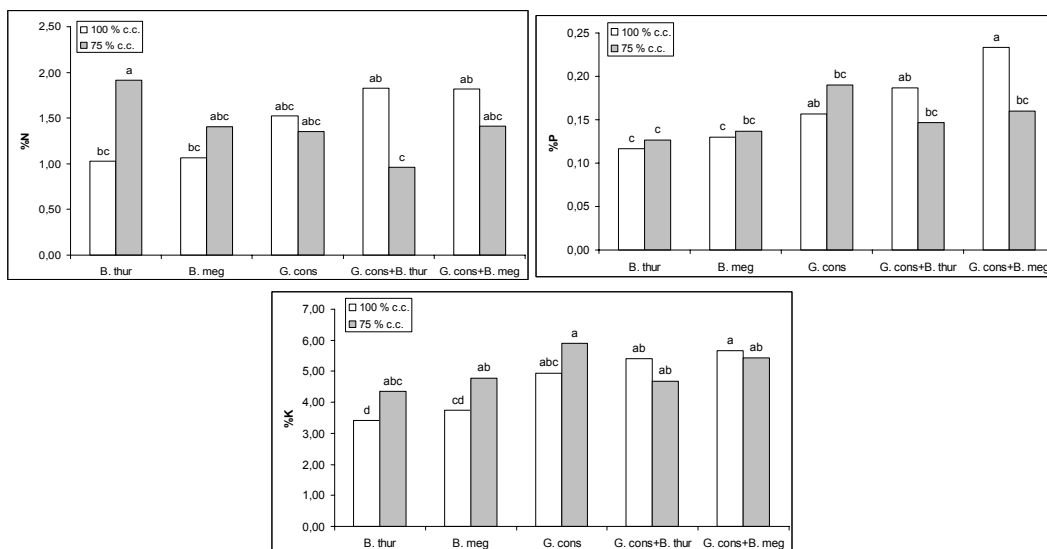


Fig. 1.12. Contenido de N, P y K en parte aérea (%)

1.3.2.4. Conclusiones:

Los aislados *G. constrictum* y *B. megaterium* contribuyen al uso más eficiente del agua en las plantas bajo condiciones de estrés hídrico.

El requerir menor suministro de agua a diario, incrementar el CHR en las plantas e incrementar la relación R/PA (forma parte de los mecanismos de resistencia de las plantas para contrarrestar las condiciones adversas), sin alterar la transpiración estomática, se ve reflejado en la abundancia natural de ^{13}C y el contenido de K en parte aérea de las plantas. Además, tal actividad se puede relacionar con el mayor porcentaje de micorrización en cuanto a la intensidad (%M) y la producción de arbusculos (%A), bajo condiciones de sequía; en cuanto a la alta capacidad colonizadora medida como ufc ml^{-1} , la interacción *G.cons+B.thur* puede estar haciendo un efecto de sumidero y tomando los nutrientes para la bacteria, lo que repercute en la baja concentración de nutrientes (N, P y K) en las plantas y menor protección contra el estrés hídrico en las plantas inoculadas con estos microorganismos.

Conclusiones generales del apartado 1.3.2.:

- ▶ La interacción *B. megaterium* que en ensayos anteriores era la mas efectiva (presenta mayor compatibilidad) en asociación con MA autóctona que con otra MA de referencia.
- ▶ Los aislados *G. constrictum* y *B. megaterium* contribuyen al uso más eficiente del agua en las plantas bajo condiciones de estrés hídrico.

- ▶ Se selecciona los aislados bacterianos *P. putida* y *B. megaterium* para continuar con el estudio de la interacción en la fase de cultivo *in vitro* de *G. intraradices*.

1.3.3. Determinación de la interacción *G. intraradices* proveniente de cultivo monoxénico (de colección) con microorganismos aislados en la Sierra de Baza, en microcosmos

Para analizar la interacción de los aislados autóctonos de forma directa se utilizó el sistema *in vitro*. Previamente, se realizó un ensayo en condiciones de invernadero para evaluar la interacción de dichos aislados con *G. intraradices* Smith & Schenck (DAOM 197198, Biosystematic Research Center, Ottawa, Canadá), desarrollado en condiciones *in vitro* (cultivo monoxénico).

1.3.3.1. Material y métodos:

Se utilizaron plantas leguminosas (*Trifolium repens* L.), crecidas en mesocosmos bajo condiciones de invernadero y nivel hídrico al 75% c.c. El sustrato usado fue una mezcla de suelo:arena, en proporción de 5/2 (v/v). El suelo (de la Sierra de Baza) y la arena, recibieron el tratamiento indicado en M. y M., (1.1.2.1.).

Como hongo MA, se utilizó *G. intraradices* Smith & Schenck (DAOM 197198, Biosystematic Research Center, Ottawa, Canadá), suministrado por el Dr. A. Bago de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC, Granada), desarrollado en condiciones *in vitro* (cultivo monoxénico), es decir, cultivo doble en placas de Petri de un hongo micorrízico y raíces en condiciones de completa esterilidad, usando como material vegetal raíces de zanahoria (*Daucus carota*) DC2 transformadas con *Agrobacterium rhizogenes*. El cultivo del hongo MA, se estableció en placas de Petri bi-compartimentadas, con el fin de obtener zonas en las que solamente creciera el hongo, para facilitar la obtención de cantidades suficientes de masa fúngica sin interferencia de las raíces hospedadoras. El establecimiento del cultivo se realizó siguiendo la metodología descrita por St-Arnaud *et al.* (1996), con algunas modificaciones (M. y M., x.x.), para ello se añadió en uno de los compartimientos de la placa medio M, denominado compartimiento de la raíz (CR) y en el otro compartimiento medio M sin sacarosa (M-C), denominado compartimiento de las hifas (CH), las placas se conservaron a 25 °C en oscuridad, hasta obtener un estado fisiológico óptimo para ser utilizado como inóculo.

El inóculo fúngico consistió en cubos (0.5 cm³) de medio, proveniente de el compartimiento (CH) de la placa de monoxénico, conteniendo aproximadamente 50 esporas e hifas externas, fue adicionado 1 cubo por plantas al momento de la siembra.

La inoculación de los aislados bacterianos autóctonos *P. plecoglossicida*, *P. putida* y *B. megaterium* fue hecha con 1ml de la suspensión bacteriana (10⁸ ufc planta⁻¹) en el momento de la siembra y ocho días después.

Los tratamientos no inoculados recibieron 2 ml de un filtrado del inóculo de hongos MA para reincorporar la microbiota del suelo, 2 ml de los inóculos bacterianos autoclavados.

Se prepararon 8 repeticiones por tratamiento. El ensayo tuvo una duración de 40 días y el estrés hídrico se inició a los 30 días después del establecimiento del ensayo.

1.3.3.2. Determinaciones:

- ▣ Producción biomasa vegetal (M. y M., apartado 2.1.)
- ▣ Contenido hídrico (M. y M., apartado x.x.)
- ▣ Porcentaje hoja hidratada/seca: La superficies de hoja seca se cuantifica en una escala subjetiva, donde **A**: menos del 10% de hoja seca, **B**: entre el 10 y el 30% de hoja seca, **C**: entre el 30 y 50% de hoja seca, **D**: entre el 51-80% de hoja seca y **E**: entre el 80-100% de hoja seca.

1.3.3.3. Resultados:

- Producción biomasa vegetal:

Se observa un incremento significativo en la producción de biomasa de parte aérea de las plantas inoculadas con *G. intraradices* solo no siendo modificado en interacción con los aislados bacterianos autóctonos *P. plecoglossicida* o *P. putida*.

En cuanto a la producción de biomasa de raíz, hay un efecto positivo de las plantas inoculadas con *G. intraradices* particularmente en asociación con *P. putida*. A su vez, se observa un efecto significativo de este valor en los tratamientos .

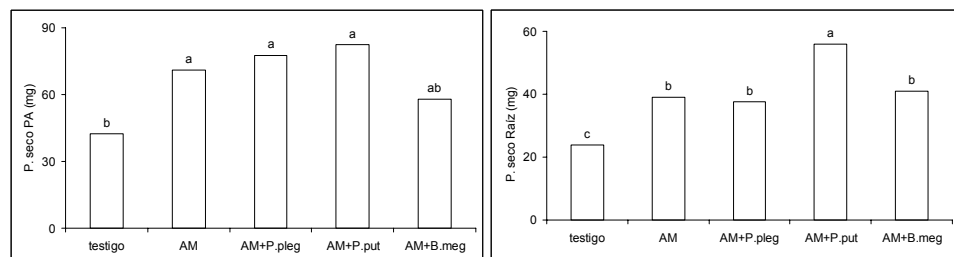


Fig. 1.13. Peso seco de Parte aérea y Raíz de plantas de *Trifolium repens* L. crecidas en condiciones de estrés hídrico (75% c.c.)

- Contenido hídrico:

Las plantas inoculadas con *G. intraradices* incrementan de forma notable el contenido hídrico, y en asociación con *B. megaterium*, presentaron la mayor diferencia en cuanto al contenido hídrico en parte aérea frente al control. El valor alcanzado en plantas doblemente inoculadas con *G. intraradices* + *B. megaterium* resultó ser mas de 4 veces al obtenido en plantas controles.

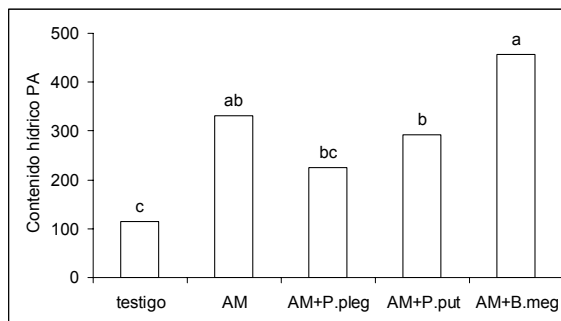


Fig. 1.14. Contenido hídrico en parte aérea

- Producción de hoja fresca/seca (%):



Las plantas inoculadas con *G. intraradices* y con *P. putida* o *B. megaterium* presentaron un incremento importante en cuanto a la producción de hojas frescas frente a los demás tratamientos.

Tratamientos	% hojas fresca	Superficie de hojas seca (escala subjetiva)					
		A	B	C	D	E	Total %
Testigo	44 b	0	8	8	9	31	56
AM	46 b	8	8	8	8	22	54
AM+ <i>P.pleg</i>	69 ab	0	0	0	12	19	31
AM+ <i>P.put</i>	80 a	0	0	0	0	20	20
AM+ <i>B.meg</i>	93 a	7	0	0	0	0	7

Tabla 1.7. Hojas frescas (%) en plantas de *Trifolium repens* bajo estrés hídrico al 75% c.c.

1.3.3.4. Conclusiones:

La interacción de *G. intraradices* con las bacterias autóctonas es positiva en cuanto al mantenimiento de un mayor porcentaje de hojas frescas. Tal efecto fué especialmente notable en las plantas inoculadas con *G. intraradices* + *B. megaterium*.

Esto nos demuestra que las interacciones microbianas afectan de forma diferente no solo la producción de biomasa, sino a otros valores fisiológicos vegetales que fueron potenciados por las interacciones *G. constrictum* + *B. megaterium* y *G. intraradices* + *P. putida*.

La interacción de *G. intraradices* + *B. megaterium* favoreció el contenido hídrico en la parte aérea de la planta, lo que puede relacionarse con la cantidad de hojas verdes cuantificadas en dicho tratamiento, asumiendo que esta interacción genera una protección a la planta frente al estrés hídrico aunque no se detecte una estimulación en la producción de biomasa.

En vista a estos resultados, seleccionamos los aislados bacterianos *P. putida* y *B. megaterium* para continuar con el estudio de la interacción en la fase de cultivo *in vitro* de *G. intraradices*.

Conclusiones generales del apartado 1.3.3.:

- Se selecciona los aislados bacterianos *P. putida* y *B. megaterium* para continuar con el estudio de la interacción en la fase de cultivo *in vitro* de *G. intraradices*.

1.3.4. Evaluación de la dinámica de infección de los aislados MA autóctonos *G. mosseae* y de referencia, en presencia y ausencia de las bacterias *P. putida* y *B. megaterium* autóctonas seleccionadas

1.3.4.1. Evaluación de la dinámica de la infección de los aislados AM, *G. mosseae* autóctono y de referencia, en presencia y ausencia de las bacterias *P. putida* y *B. megaterium* autóctonas seleccionadas

Teniendo en cuenta que el hongo MA, *G. mosseae*, es un hongo que se encuentra de forma natural abundantemente en el suelo de la Sierra de Baza, que ha sido usado como inóculo en ensayos anteriores (Marulanda *et al.* y otros) y resultó ser una especie más sensible al estrés osmótico que *G. intraradices* y otros aislados fúngicos ensayados y que siempre han sido usados para incrementar la tolerancia de las plantas al estrés osmótico, ha demostrado una baja eficiencia para tal fin.

Concordante con estas evidencias se ha demostrado que esta especie induce los mecanismos que evitan el daño oxidativo en menor nivel que *G. intraradices*.

Posiblemente, el menor desarrollo de su micelio extraradical no coopera tan eficientemente como el de *G. intraradices* a captar agua desde zonas no disponibles a la raíz (Ruiz-Lozano and Azcón, 1996), Por ello se decidió hacer un estudio adicional, donde se evaluó la dinámica de la infección de los aislados MA autóctonos *G. mosseae* y de referencia, en presencia y ausencia de las bacterias *P. putida* y *B. megaterium* autóctonas seleccionadas para constatar si tales bacterias lograban incrementar la eficiencia de dicho endofito en condiciones de limitación hídrica a la que siempre resultó ser más sensible que otros aislados.

1.3.4.1.1. Material y métodos:

Se utilizaron plantas leguminosas (*Trifolium repens* L.), crecidas en mesocosmos bajo condiciones de invernadero y nivel hídrico al 75% c.c. El sustrato usado fue una mezcla de suelo:arena, en proporción de 5/2 (v/v). El suelo (de la Sierra de Baza) y la arena, recibieron el tratamiento indicado en M. y M., (1.1.2.1.).

Para la inoculación de *G. mosseae* autóctono de la Sierra de Baza y *G. mosseae* de referencia, BEG 122-EE7 (Banco de Glomales de la Estación Experimental del Zaidín). Se aplicaron 10 g de inóculo de cada hongo MA, en el momento de la siembra. La inoculación de los aislados bacterianos autóctonos *P. putida* y *B. megaterium* fue hecha con 1ml de la suspensión bacteriana (10^8 ufc planta⁻¹) en el momento de la siembra y ocho días después.

Los tratamientos no inoculados recibieron 2 ml de un filtrado del inóculo de hongos MA para reincorporar la microbiota del suelo, y a su vez 2 ml de los inóculos bacterianos autoclavados.

Se prepararon 6 repeticiones por tratamiento y mediante cortes sucesivos a los 15, 30 y 60 días se evaluó el crecimiento vegetal.

1.3.4.1.2. Determinaciones:

α Curva de infección de los HMA en la raíz en las condiciones ambientales de la zona elegida y la efectividad de las bacterias en el proceso infectivo de colonización: Intensidad de colonización (M%), Producción de arbusculos (A%), Producción de vesículas, Arquitectura y Longitud de raíz (M. y M., apartado x.x.)

α Evolución de las u.f.c bacterianas en rizosfera/hifosfera (M. y M., apartado x.x.)

1.3.4.1.3. Resultados:

- Nivel de micorrización: Intensidad de colonización (M%) y arbuscular (A%)

Las plantas colonizadas *G. mosseae* autóctono, presentaron mayor %M y %A a los 60 d.d.s. tanto solo como en interacción con los aislados bacterianos autóctonos.

La interacción de MA y MR con cualquiera de los aislados bacterianos incrementa la colonización y el número de arbusculos. Siendo *B. megaterium* la bacteria más efectiva (llega a duplicar el desarrollo radicular a los 60 días y adelanta la presencia de los mismos a los 30 días).

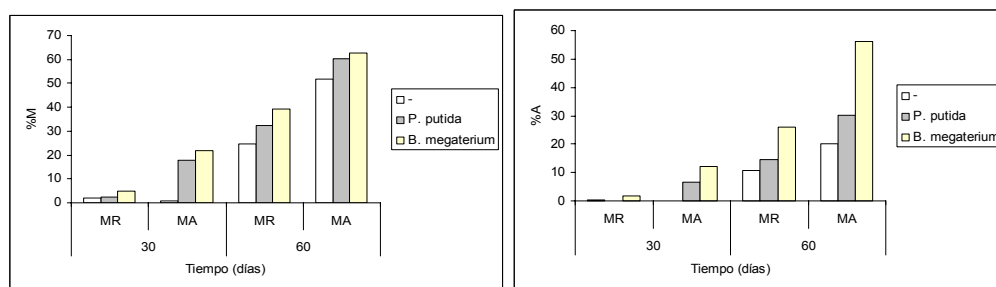


Fig. 1.15. Porcentaje de micorrización a los 30 y 60 días en plantas colonizadas por MR o MA en ausencia y presencia de bacterias autóctonas

- Producción de vesículas:

La producción de vesículas, es mayor también en las plantas colonizadas por MA+B. megaterium que incrementó en un 1500% este valor.

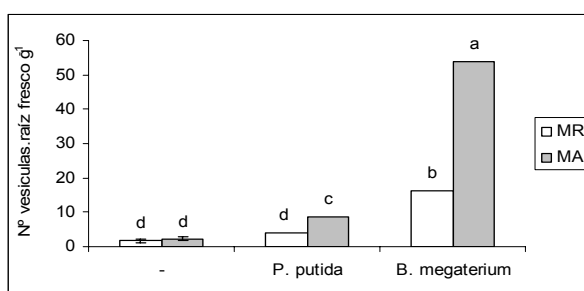


Fig. 1.16. Producción de vesículas (número) en raíces de trébol colonizado por MR o MA en ausencia y presencia de bacterias autóctonas

• Arquitectura de raíces:

Las plantas inoculadas con MA+*P. putida* presentan una mayor producción de raíces tanto secundarias como terciarias. Mientras que la inoculación con MR+*B. megaterium* incrementó principalmente la producción de raíces secundarias.

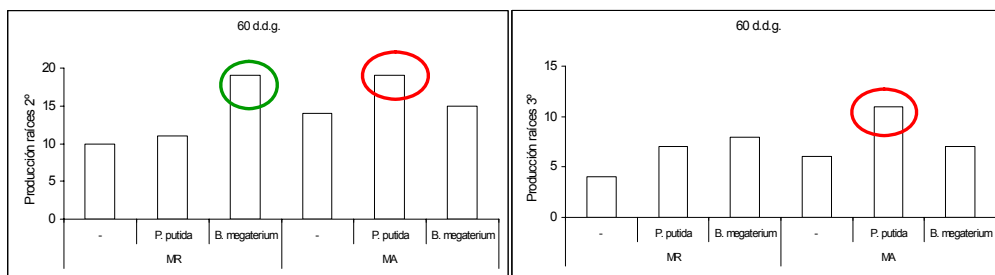


Fig. 1.17. Producción de raíces secundarias y terciarias en raíces inoculadas con MA y MR de trébol en ausencia y presencia de bacterias autóctonas

• Área radical:

El área radical, presenta un mayor desarrollo colonizada por *G. mosseae* autóctono que de *G. mosseae* de referencia.

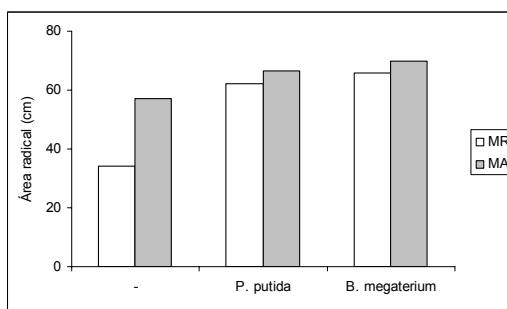


Fig. 1.18. Área radical de raíces de trébol en suelo de Baza (cm²)

• Evolución a lo largo del tiempo de las u.f.c. en suelo rizosférico:

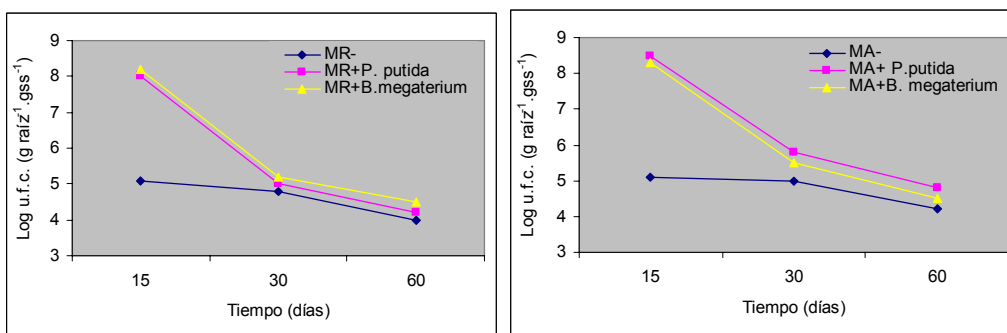


Fig. 1.19. Evolución de las poblaciones de (ufc) *P. putida* y *B. megaterium* inoculadas (*P. putida* y *B. megaterium*) en interacción con *G. mosseae* autóctono y/o de referencia en suelo de Baza natural

1.3.4.1.4. Conclusiones:

Se observa como a los 30 días de la inoculación, las poblaciones rizosférica de las plantas inoculadas con la MA presenta mayor numero de u.f.c. que las plantas inoculadas con MR, siendo MA+*P. putida* la que presenta mayor número de u.f.c. en el suelo

En las plantas inoculadas con MA+*P. putida* se incrementa la producción de raíces tanto secundarias como terciarias y también presentan un incremento en el área radicular

Las plantas inoculadas con MR+*B. megaterium* incrementaron la producción de raíces secundarias.

Las plantas inoculadas con MA, presentaron una mayor infección desde los 30 d.d.s.

Hay una mayor producción de arbusculos y vesículas en las plantas inoculadas con MA+*B. megaterium*, especialmente a los 60 d.d.s.

No se puede establecer correlación entre número de bacterias establecidas en la rizosfera y el nivel de colonización fúngica alcanzado.

1.3.4.2. Determinación de la capacidad colonizadora del micelio producido por *G. mosseae* (MA ó MR) y generado bajo la influencia del metabolismo microbiano *P. putida* o *B. megaterium*

1.3.4.2.1. Materiales y métodos:



El sistema experimental que utiliza las bolsas de maya (<50 μm), permite evaluar de forma directa la actividad colonizadora del micelio del hongo y el efecto de cualquier agente sobre dicho valor.

Se utilizó una leguminosa (*Trifolium repens* L) y un nivel hídrico en el medio de 75% c.c. a lo largo de todo el ensayo, para evaluar el efecto de la capacidad colonizadora del micelio de *G. mosseae autóctono* (MA) frente a uno de referencia (MR) (EEZ) en presencia o no de los aislados bacterianos: *P. putida* y *B. megaterium*. Todos los tratamientos, recibieron una inoculación de *Rhizobium* sp. (aislado autóctono de la Sierra de Baza, no identificado), (M. y M., 1.3.4.) se aplicó 1ml de la suspensión bacteriana (10^8 ufc planta⁻¹) en el momento de la siembra.

El sustrato fue suelo de la Sierra de Baza natural + arena (5/2 v/v) con 6 repeticiones por tratamiento. Duración, 12 meses.

Los tratamientos biológicos se aplicaron en el compartimiento exterior (rodeando a la bolsa) (HC) y pasado un tiempo. La posterior micorrización se verifica por los propágulos MA capaces de penetrar RC y conectar con la raíz.

1.3.4.2.2. Determinaciones:

- ▣ Producción de biomasa PA (M. y M., 2.1.)
- ▣ Area radical (M. y M., 2.1.)
- ▣ Producción de nódulos (nº) (M. y M.)
- ▣ Porcentaje de colonización (TB) (M. y M. x.x) y vitalidad (SDH) (M. y M. x.x)
- ▣ Producción de micelio total y vivo (M. y M., x.x.)
- ▣ Producción de Glomalina (M. y M., x.x.)

1.3.4.2.3. Resultados:

- Producción de biomasa PA:

Las plantas inoculadas con *G. mosseae* autóctono incrementaron de forma significativa la producción de área radical.

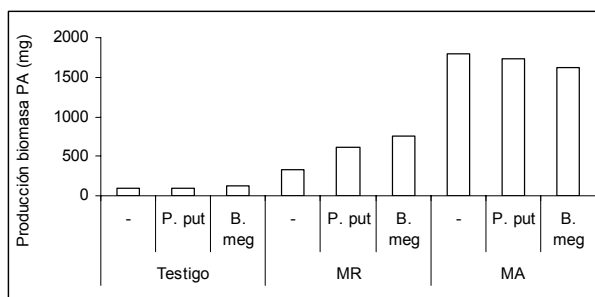


Fig. 1.20. Biomasa PA (mg)

- Area radical:

Las plantas inoculadas con *G. mosseae* autóctono incrementaron de forma significativa el área radical, especialmente las inoculadas con *B. megaterium*.

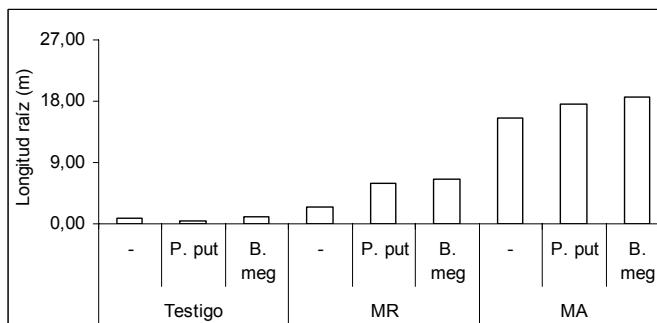


Fig. 1.21. Area radical (m)

- Número de nódulos:

Los tratamientos inoculados con *G. mosseae* (autóctono) + *B. megaterium*, incrementaron significativamente la producción de nódulos en la raíz.

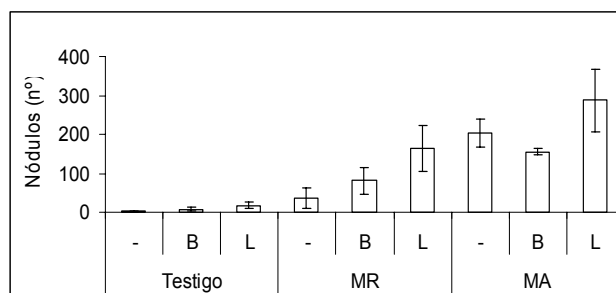


Fig. 1.22. Producción de nódulos (nº)

• Porcentaje de colonización (TB):

Los tratamientos inoculados con *G. mosseae* (referencia) incrementaron significativamente la intensidad de micorrización, (%M y %m) y la producción de arbusculos (%A y %a), tanto en la raíz completa como en el segmento evaluado, en interacción con los aislados autóctonos (*P. putida* o *B. megaterium*).

Los tratamientos inoculados con *G. mosseae* (autéctono) + *B. megaterium*, incrementaron significativamente la intensidad de micorrización, (%M y %m) y la producción de arbusculos (%A y %a).

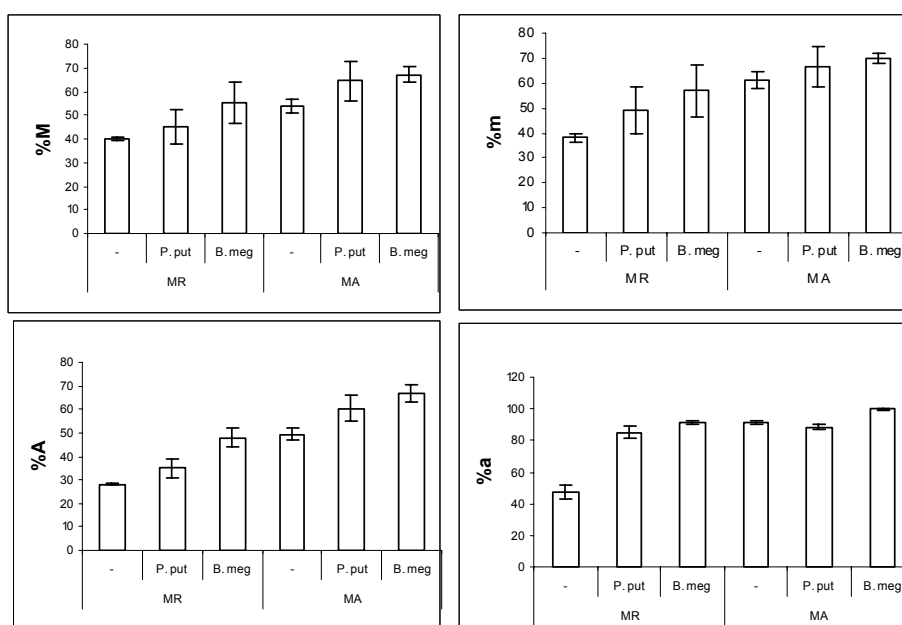


Fig. 1.23. Porcentaje de colonización (TB)

α Porcentaje de vitalidad (SDH):

En función de la longitud de raíz, la inoculación de las bacterias autóctonas *P. putida* o *B. megaterium*, incrementaron el porcentaje de vitalidad del hongo *G. mosseae* tanto autóctono como de referencia, significativamente frente a los demás tratamientos, especialmente en la producción de arbusculos del segmento evaluado (%m).

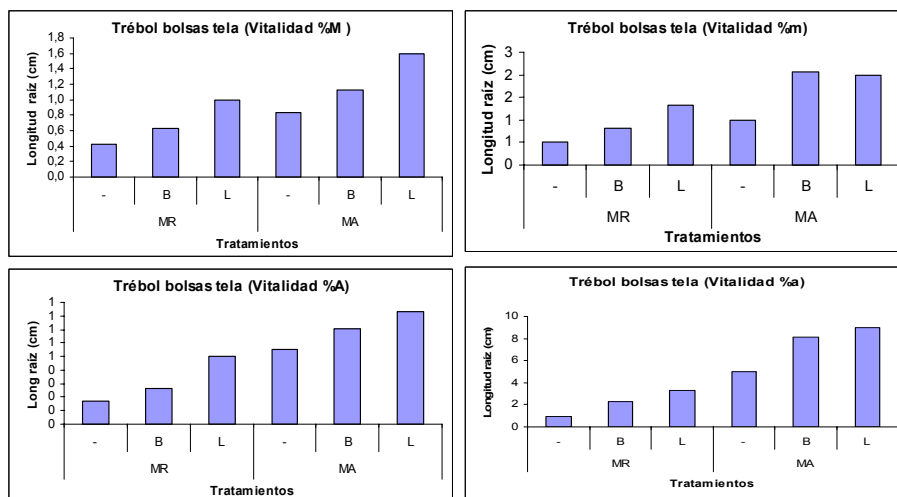


Fig. 1.24. Porcentaje de vitalidad (SDH)

- Producción de micelio total y vivo:

Las interacciones en los tratamientos inoculados con *G. mosseae* con *P. putida* y *B. megaterium* fue positiva, en cuanto a la cantidad de producción de micelio extraradical y la vitalidad del mismo.

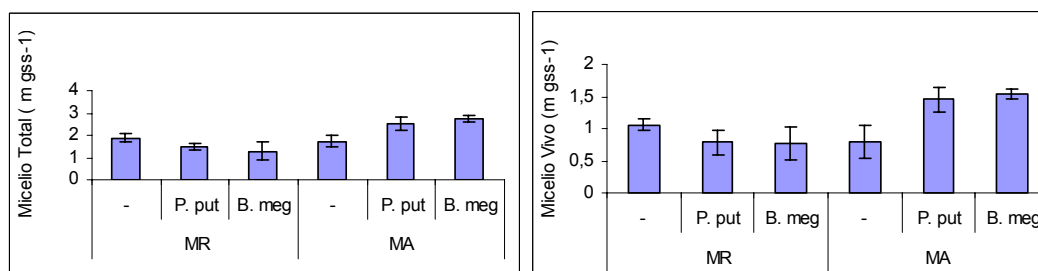


Fig. 1.25. Producción de micelio total

- Producción de Glomalina:

En los tratamientos inoculados con *G. mosseae* autóctono, ya sea solo o en interacción con los aislados bacterianos, la producción de glomalina se incrementó significativamente respecto a *G. mosseae* de referencia.

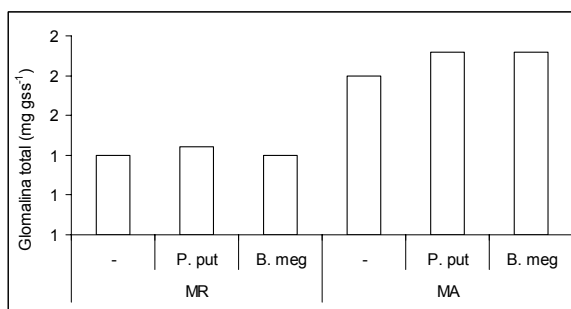


Fig. 1.26. Producción de Glomalina en el suelo (mg gss^{-1})

1.3.4.2.4. Conclusiones:

La interacción *G. mosseae* autóctono + *B. megaterium* es positiva, Estimula en el hongo su capacidad de infección, y efectividad como simbiote.

1.3.4.3. Determinación de la interacción directa (no mediada por la planta) entre los endofitos *G. mosseae* (autóctono o de referencia (BEG 119) con *B. megaterium* (la más tolerante al estrés osmótico y más eficiente (en términos de crecimiento)



1.3.4.3.1. Material y Métodos:

Se utilizaron 2 niveles hídricos en el medio (80% c.c. y 100% c.c.), para evaluar el posible efecto del nivel de agua en la interacción entre los microorganismos asociados.

El sistema experimental que utiliza las raíces procedentes de una planta similarmente distribuidas entre dos compartimentos. Ello permite determinar, la interacción de forma directa, entre GmA ó GmR con *B. megaterium* a dos potenciales hídricos.

1.3.4.3.2. Determinaciones:

- ▣ Producción de biomasa radicular (M. y M., apartado 2.1.)
- ▣ Porcentaje de micorrización (TB, SDH) (M. y M., apartado x.x.)
- ▣ Micelio extraradical Total y Glomalina (M. y M., apartado x.x.)
- ▣ Eficiencia Fotosintética:

Las medidas se realizaron usando un PEA (portable Plant Efficiency Analyzer (Hansatech Instruments, Norfolk, UK). Para ello, un día antes de cosechar, se midió la fluorescencia en la cara adaxial de la hoja correspondiente a la segunda hoja, siguiendo las instrucciones del equipo, recogándose la fluorescencia emitida durante un tiempo de 5 seg. Se expresa como la proporción de la fluorescencia variable a fluorescencia máxima (F_v / F_m), si es mayor a 0.738 no hay daño en el fotosistema II.

- ▣ Actividades enzimáticas rizosféricas (indicativos de la fertilidad del suelo) (M. y M., apartado x.x.)
- * Actividad Deshidrogenasa (Relacionada con la riqueza microbiana)
- * Actividad Fosfatasa (Relacionada con el ciclo de fósforo)
- * Actividad β -Glucosidasa (Relacionada con los contenidos de carbono orgánico)
- ▣ Producción de AIA (Auxina promotora del crecimiento) (M. y M., apartado x.x.)

1.3.4.3.3. Resultados:

- Producción de biomasa radicular:

La inoculación con *G. mosseae* autóctono incrementó, en mayor medida el desarrollo radicular, a ambos potenciales hídricos del medio.

B. megaterium, fue efectiva en su inoculación aislada y en interacción con ambos hongos, particularmente GmA.

El máximo desarrollo radicular se produjo con la inoculación de los microorganismos autóctonos (GmA+B), que incrementó la producción de biomasa un 28% (80% c.c. y 100% de c.c.), respecto a la inoculación aislada de GmA.

	80% c.c.		100% c.c.	
	Control	<i>B. megaterium</i>	Control	<i>B. megaterium</i>
Testigo	90	120	110	160
GmR	100	140	140	170
GmA	180	230	730	940

Tabla 1.8. Producción de biomasa radicular

• Colonización (%) TB:

G. mosseae autóctono fue mucho más infectivo que el de referencia.

La interacción con la bacteria estimula %F solo en GmR y %M, %m y %A y %a en ambos *G. mosseae* independiente de su origen (autóctono o referencia).

Estos comportamientos estimuladores de *B. megaterium*, se reproducen en los dos potenciales hídricos ensayados

%F	80%		100%		%M	80%		100%		%m	80%		100%	
	-	B	-	B		-	B	-	B		-	B	-	B
GmR	6	24	12	24	GmR	3	8	4	7	GmR	27	33	34	50
GmA	100	100	100	100	GmA	55	68	55	76	GmA	50	56	55	76

%A	80%		100%		%a	80%		100%	
	-	B	-	B		-	B	-	B
GmR	1	6	3	7	GmR	50	69	87	100
GmA	47	54	54	64	GmA	84	99	96	100

Tabla 1.9. Porcentaje de colonización (TB)

• Vitalidad (%) SDH:

G. mosseae autóctono también fue más activo que el de referencia en ambos niveles hídricos.

La interacción con la bacteria estimula los valores de la vitalidad de la colonización producida por ambos hongos, independientemente del contenido hídrico

%F	80%		100%		%M	80%		100%		%m	80%		100%	
	-	B	-	B		-	B	-	B		-	B	-	B
GmR	5	22	12	24	GmR	1	2	1	2	GmR	3	7	7	10
GmA	84	92	94	94	GmA	43	52	47	54	GmA	46	50	55	62

%A	80%		100%		%a	80%		100%	
	-	B	-	B		-	B	-	B
GmR	1	6	3	7	GmR	3	9	15	20
GmA	44	45	47	47	GmA	19	22	23	26

Tabla 1.10. Porcentaje de Vitalidad

• Micelio extraradical Total:

Se observa un mayor desarrollo micelial en los tratamientos inoculados con *G. mosseae* autóctono, particularmente al estar en interacción con *B. megaterium*

	80% c.c.		100% c.c.	
	Control	<i>B. megaterium</i>	Control	<i>B. megaterium</i>
GmR	5	8	7	9
GmA	11	17	11	24

Tabla 1.11. Producción de micelio extraradical (m gss⁻¹)

• Glomalina:

Se mantienen, en menor escala, las tendencias antes observadas (efectividad de los tratamientos aplicados sobre este valor) al evaluar el micelio extraradical pero.

	80% c.c.		100% c.c.	
	Control	<i>B. megaterium</i>	Control	<i>B. megaterium</i>
GmR	67	69	70	75
GmA	70	76	77	92

Tabla 1.12. Contenido de Glomalina (µg gss⁻¹)

• Fotosíntesis:

Esta medida permite explicar los distintos valores de colonización obtenidos según los tratamientos aplicados (GmR ó GmA) en presencia ó ausencia de *B. megaterium*.

Estos valores se correlacionaron con la mayor colonización de GmA.

La estabilidad de este valor a 80% Vs. 100% en plantas colonizadas por GmA sugiere una protección al fotosistema II.

Al comparar la actividad fotosíntesis con la producción de biomasa, vemos que están muy relacionadas, *G. mosseae* autóctono presentó mayor efectividad en ambos valores.

El efecto de los tratamientos aplicados sobre el porcentaje de micorrización, producción biomasa y producción de micelio extraradical, se detecta una relación entre ellos, (sobretudo a nivel de %m (intensidad de micorrización del fragmento micorrizado) y %a (del contenido de arbusculos del fragmento micorrizado) tanto estimando colonización (TB) como vitalidad (SDH)).

Todos estos valores determinantes de la infectividad y efectividad de la colonización fueron mayores con GmA asociado a *B. megaterium* particularmente cuando las condiciones hídricas eran mas limitantes (80% c.c.).

	80% c.c.	100% c.c.
Testigo	0,16	0,35
GmR	0,36	0,46
GmA	0,77	0,79

Tabla 1.13. Fotosíntesis

• Actividad Deshidrogenasa:

Incrementa más por la colonización AM que por la inoculación de la bacteria

La interacción de microorganismos autóctonos es levemente más efectiva, particularmente al 100% c.c.

El nivel hídrico del medio no influye grandemente (principalmente en el caso de la inoculación sencilla).

	80% c.c.		100% c.c.	
	Control	<i>B. megaterium</i>	Control	<i>B. megaterium</i>
Testigo	0,33	0,35	0,38	0,39
GmR	0,42	0,42	0,43	0,50
GmA	0,42	0,43	0,45	0,56

Tabla 1.14. Deshidrogenasa ($\mu\text{g INTF gss h}^{-1}$)

• Actividad Fosfatasa:

Fosfatasa decrece por la inoculación microbiana (más acusadamente por la micorrización)

La inoculación de microorganismos autóctonos decreció esta actividad en un 45% a 80% c.c.

	80% c.c.		100% c.c.	
	-	<i>B. megaterium</i>	-	<i>B. megaterium</i>
Testigo	4163	3764	3727	2513
GmR	3244	2729	3419	2155
GmA	3126	2277	3321	2153

Tabla 1.15. Fosfatasa ($\mu\text{g PNF gss h}^{-1}$)

• Actividad β -Glucosidasa:

La menor actividad enzimática detectada en este suelo es indicativa de un peor funcionamiento de los ciclos de nutrientes del mismo

Los hongos AM incrementaron más esta actividad que la bacteria.

La inoculación de microorganismos autóctonos incrementó en un 87% esta actividad a 100 % c.c.

	80% c.c.		100% c.c.	
	-	<i>B. megaterium</i>	-	<i>B. megaterium</i>
Testigo	4383	4963	4504	5395
GmR	5350	5939	5425	6192
GmA	5636	5771	5819	8411

Tabla 1.16. β -Glucosidasa ($\mu\text{g PNF gss h}^{-1}$)

• Producción de AIA:

Los tratamientos inoculados con *G. mosseae* autóctono producen mayores cantidades de esta fitohormona. La bacteria autóctona *B. megaterium*, parece ser productora de AIA y particularmente bajo 100 % c.c.

	80% c.c.		100% c.c.	
	-	<i>B. megaterium</i>	-	<i>B. megaterium</i>
GmR	0,31	1,05	1,81	3,46
GmA	3,55	4,04	4,80	5,56

Tabla 1.17. Producción de AIA (mg gss^{-1})

1.3.4.3.4. Conclusiones:

La producción de AIA se incrementa en micorrizosferas por la coinoculación de *B. megaterium*, en todos los casos.

La inoculación de microorganismos autóctonos es mucho más efectiva produciendo AIA en el medio rizosférico.

Conclusiones generales del capítulo 1,

Conclusiones generales del subcapítulo 1.1.:

▶ *Glomus constrictum*, se considera el hongo MA autóctono más eficiente en cuanto a la producción de biomasa.

▶ *G. mosseae*, se considera el hongo MA autóctono menos eficiente en cuanto a la producción de biomasa.

Conclusiones generales del apartado 1.2.:

▶ Pueden considerarse organismos PGPR, los aislados autóctonos *Pseudomas putida* y *Bacillus megaterium*, ya que en condiciones de estrés osmótico tienen capacidad de producir metabolitos secundarios estimuladores del desarrollo vegetal como es el AIA.

▶ *Bacillus megaterium*, posee una mayor capacidad de osmoadaptación que el resto de los aislados bacterianos. Ello permite su crecimiento a elevada osmolaridad en el medio posiblemente motivado por la síntesis de solutos compatibles, como la prolina.

Así mismo, al tener una colonización de tipo rizo y endorizosférica, supone un mecanismo biológico de gran utilidad como estrategia de preservación ante las limitaciones hídricas propias de la zona semiárida seleccionada.

Tales comportamientos y características sugieren que se trata de la bacteria más promisoría, a utilizar en los ensayos en los que se analiza las actividades fisiológicas y fisicoquímicas que presentan las plantas como respuesta a su inoculación (justificación para el Capítulo 4, de la presente tesis doctoral).

1.3.3.4. Conclusiones:

La interacción de *G. intraradices* con las bacterias autóctonas es positiva en cuanto al mantenimiento de un mayor porcentaje de hojas frescas. Tal efecto fue especialmente notable en las plantas inoculadas con *G. intraradices* + *B. megaterium*.

Esto nos demuestra que las interacciones microbianas afectan de forma diferente no solo la producción de biomasa, sino a otros valores fisiológicos vegetales que fueron potenciados por las interacciones *G. constrictum* + *B. megaterium* y *G. intraradices* + *P. putida*.

La interacción de *G. intraradices* + *B. megaterium* favoreció el contenido hídrico en la parte aérea de la planta, lo que puede relacionarse con la cantidad de hojas verdes cuantificadas en dicho tratamiento, asumiendo que esta interacción genera una

protección a la planta frente al estrés hídrico aunque no se detecte una estimulación en la producción de biomasa.

En vista a estos resultados, seleccionamos los aislados bacterianos *P. putida* y *B. megaterium* para continuar con el estudio de la interacción en la fase de cultivo *in vitro* de *G. intraradices*.

Conclusiones generales del apartado 1.3.3.:

- ▶ Se selecciona los aislados bacterianos *P. putida* y *B. megaterium* para continuar con el estudio de la interacción en la fase de cultivo *in vitro* de *G. intraradices*.
- ▶ La interacción *B. megaterium* que en ensayos anteriores era la mas efectiva (presenta mayor compatibilidad) en asociación con MA autóctona que con otra MA de referencia.

Conclusiones generales del apartado 1.3.4.:

- ▶ La interacción *B. megaterium* que en ensayos anteriores era la mas efectiva (presenta mayor compatibilidad) en asociación con MA autóctona que con otra MA de referencia.

Capítulo 2

CONTRIBUCIÓN DE SEIS AISLADOS DE HONGOS FORMADORES DE MICORRÍZAS ARBUSCULARES A LA CAPTACIÓN DE AGUA EN PLANTAS DE *Lactuca sativa* L. BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO**Resumen**

Está actualmente aceptado que, al mismo tiempo que los hongos formadores de micorriza arbuscular (AM) transportan nutrientes también transportan agua a su planta hospedera. Sin embargo, la cantidad de agua que proporciona y su trascendencia en la relación agua-planta se queda polémica. El objetivo de este trabajo fue valorar y comparar la habilidad de seis hongos de AM para modificar las tasas de consumo de agua bajo condiciones de sequía. Las tasas de secado del suelo de las plantas control no inoculadas, de tamaño y estado nutritivo comparable a las plantas micorrizadas fueron tomadas diariamente. Las plantas de *Lactuca sativa* colonizadas por *G. coronatum*, *G. intraradices*, *G. claroideum* y *G. mosseae*, redujeron el agua del suelo a un mayor alcance comparadas con las plantas control no inoculadas o con las plantas colonizadas por *G. constrictum* o *G. geosporum*. Los rangos de diferencia van de 0.6 % de humedad volumétrica en el suelo para las plantas colonizadas por *G. mosseae* a 0.95 % para plantas colonizadas por *G. intraradices*. Estas diferencias en la humedad del suelo fueron equivalentes a 3-4.75 ml planta⁻¹ día⁻¹, respectivamente, y no podrían ser atribuidas a las diferencias en el tamaño de planta, pero si a la actividad de hongos de AM. Los hongos de AM evaluados en este estudio diferían en su eficacia de aumentar la captación de agua de la planta del suelo. Esta habilidad parece estar relacionada con la cantidad de micelio externo producido por cada hongo de AM y la frecuencia de la colonización de raíz en relación con las estructuras fúngicas vivas y activas.

Palabras clave: Hongos MA, sequía, estrés.

Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* L. plants under drought stress

Abstract

It is currently accepted that, along with nutrients, arbuscular mycorrhizal (AM) fungi also transport water to their host plant. However, the quantity of water supplied and its significance for plant water relations remain controversial. The objective of this work was to evaluate and compare the ability of six AM fungi to alter rates of root water uptake under drought stress conditions. Soil drying rates of uninoculated control plants of comparable size and nutritional status and mycorrhizal plants were recorded daily. *Lactuca sativa* plants colonized by *G. coronatum*, *G. intraradices*, *G. claroideum* and *G. mosseae* depleted soil water to a higher extent than comparably-sized uninoculated control plants or plants colonized by *G. constrictum* or *G. geosporum*. The differences ranged from 0.6% volumetric soil moisture for *G. mosseae*-colonized plants to 0.95% volumetric soil moisture for *G. intraradices*-colonized plants. These differences in soil moisture were equivalent to 3 to 4.75 ml plant⁻¹ day⁻¹, respectively, and could not be ascribed to differences in plant size, but to the activity of AM fungi. The AM fungi tested in this study differed in their effectiveness to enhance plant water uptake from soil. This ability seems to be related to the amount of external mycelium produced by each AM fungus and to the frequency of root colonization in terms of live and active fungal structures.

2.1. Introduction

Drought stress is considered one of the most important abiotic factors limiting plant growth and yield (Kramer and Boyer 1997). Plants can respond to water deficit at morphological, anatomical and cellular levels with modifications that allow the plant to avoid the stress or to increase its tolerance (Bray 1997). Apart from the natural protection systems that plants possess against stress, plants grow in association with a number of soil microorganisms that can alleviate the stress symptoms. Among those, arbuscular mycorrhizal (AM) fungi are widespread microorganisms able to establish a symbiotic association with the roots of most terrestrial plants. The fungus gets a protected ecological niche and plant photosynthates whereas plants improve their ability for nutrient uptake and tolerance to biotic and abiotic stresses (Smith and Read 1997).

Several eco-physiological studies investigating the role of AM symbiosis in drought stress protection have demonstrated that the symbiosis often results in altered rates of water movement into, through and out of the host plants, with consequent effects on tissue hydration and plant physiology (Augé 2001). It is becoming accepted that the contribution of AM symbiosis to plant drought tolerance is the result of cumulative physical, nutritional, physiological and cellular effects. The studies carried out so far have suggested several mechanisms by which the AM symbiosis alleviates drought stress in host plants (for reviews see Augé 2001; Ruiz-Lozano 2003). One of these mechanisms is

the direct uptake and transfer of water through the fungal hyphae to the host plant. Pioneer studies carried out by Allen (1982) and Hardie (1985) suggested a possible role of AM hyphae in water uptake and transfer to the host plant. AM fungal hyphae, with a diameter of 2-5 μm , can penetrate soil pores inaccessible to root hairs (10-20 μm diameter) and absorb water that is not available to non mycorrhizal plants. Allen (1991) estimated that the rate of water transport from extraradical hyphae to the root was 100 ml $\text{H}_2\text{O h}^{-1}$ per hyphal infection point. This rate was considered enough to alter plant water relations (Allen 1991). Faber et al. (1991) measured rates of water transport in hyphae crossing air gaps between compartments, ranging from 375 to 760 ml $\text{H}_2\text{O h}^{-1}$ per hyphal section. Alternately, other authors have predicted rates of water uptake by hyphae on the basis of hyphal entry points per unit of root length, hyphal cross-sectional areas and water potential gradients. Their predictions suggested that hyphal water transport rates were negligible (Fitter 1988; George *et al.* 1992; Koide 1993). Since no clear conclusion could be drawn on that topic, new studies were developed. Ruiz-Lozano and Azcón (1995) designed an experiment with lettuce plants grown in containers with a compartment only accessible to hyphae. Despite the fact that the two AM species used in the experiment differed in their efficiency for hyphal water uptake and transport, the positive effect of AM fungi was enhanced by water addition to the hyphal compartment, and water uptake by the host plant increased due to the presence of the AM fungi (Ruiz-Lozano and Azcón 1995). Thus, it is currently accepted that mycorrhizal fungi also transport some water to the plant along with the nutrients. However, the quantity of water supplied to the host plant via mycelium is unknown and the possible significance of water transport by AM hyphae for plant water relations remains controversial (Bryla and Duniway 1997a).

The objective of this work was to evaluate and compare the ability of six AM fungi to increase rates of root water uptake under drought stress conditions. Uninoculated control lettuce plants of comparable size and nutritional status than mycorrhizal plants were established and the bulk soil water content was recorded daily. Soil drying rates in plant/soil systems colonized by each AM fungus were related to several parameters of fungal development in the plant and in the soil.

2.2. Materials and methods

2.2.1. Experimental design and statistical analysis

The experiment consisted of a randomized complete block design with an inoculation treatment consisting of (1) plants inoculated with one of six mycorrhizal fungi, and (2) uninoculated control plants fertilized with two levels of N and P. Five replicates of each treatment were done, totalling 40 pots (one plant per pot).

Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's multiple range test (Duncan 1955). Percentage values were arcsin transformed before statistical analysis. Correlations were calculated using SPSS software, version 11.0.1 (LEAD Technologies Inc., Chicago, IL, USA).

2.2.2. Soil and biological materials

Loamy soil was collected from the Zaidín Experimental Station (Granada, Spain), sieved (2 mm), diluted with quartz-sand (<1 mm) (1:1, soil:sand, v/v) and sterilized by steaming (100°C for 1 h per day on 3 consecutive days). The soil had a pH of 8.1 (water); 1.81% organic matter, and the following nutrient concentrations (mg kg⁻¹): N, 2.5; P, 6.2 (NaHCO₃-extractable P); K, 132.0. The soil texture was made up of 35.8% sand, 43.6% silt and 20.5% clay.

Three seeds of *Lactuca sativa* L. cv. Romana were sown in pots containing 500 g of the soil/sand mixture and thinned to one seedling per pot after emergence.

Mycorrhizal inoculum was bulked in an open-pot culture of *Zea mays* L. and consisted of soil, spores, mycelia and infected root fragments. The AM species were isolated from two desert areas in the Alicante and Almeria provinces (Southern Spain). The species were *Glomus coronatum* Giovannetti, isolate EEZ 17, BEG 49; *Glomus intraradices* Schenck and Smith, isolate EEZ 6, BEG 121; *Glomus claroideum* Schenck and Smith, isolate EEZ 23; *Glomus constrictum* Trappe, isolate EEZ 22; *Glomus geosporum* (Nicol. and Gerd.) Walker, isolate EEZ 4 and *Glomus mosseae* (Nicol. and Gerd.) Gerd. and Trappe, isolate EEZ 7, BEG 122. Ten grams of each inoculum, with similar colonization potential (an average of 50 propagules per gram according to the most probable number test) were placed below lettuce seeds. This amount of inoculum was selected in preliminary tests as the optimum to produce a good colonization level for the total amount of soil in the pot. Non-mycorrhizal treatments received the same quantity of autoclaved inoculum together with a 2-ml aliquot of a suspension filtrate (< 20 µm) of the AM inoculum to restore a general microbial population free of AM propagules.

2.2.3. Growth conditions

Plants were grown in a controlled environmental chamber with 70-80% RH, day/night temperatures of 25/15°C, and a photoperiod of 16 h at a photosynthetic photon flux density (PPFD) of 350 µmol m⁻² s⁻¹ as measured with a light meter (model LI-188B, Licor, Lincoln, NE, USA,).

Soil moisture was measured with a ML2 ThetaProbe (AT Delta-T Devices Ltd., Cambridge, UK), which measures volumetric soil moisture content by responding to changes in the apparent dielectric constant of moist soil. The probe generates a 100 MHz sinusoidal signal that is applied to a specially designed internal transmission line that extends into the soil by means of the array of four rods. The changes in the transmission line impedance are dependent almost solely on the soil's apparent dielectric constant. Because the dielectric constant of water (approximately 81) is very much higher than that of soil (typically 3 to 5) and air (1), the dielectric constant of soil is determined primarily by its water content (Roth *et al.* 1992; White *et al.* 1994). Volumetric soil water content is the ratio between the volume of water present and the total volume of the soil sample. It is a dimensionless parameter, expressed either as a percentage (% vol) or as a ratio (m³m⁻³).

Water was supplied daily to maintain constant soil water content close to field capacity (17% volumetric soil moisture) during the first 5 weeks of plant growth. At this time plants were allowed to dry until soil water content reached 80% field capacity (12% volumetric soil moisture) and maintained under such conditions for additional 12 days. In order to control the level of water stress, the soil water content was measured daily with the ThetaProbe ML2 (at the end of the afternoon) and the amount of water lost was added to each pot in order to maintain soil water content at the desired 12% volumetric soil moisture.

Each week throughout the experiment, uninoculated control plants received 10 ml of Hewitt's nutrient solution (Hewitt 1952), modified to contain either 4 mM N + 1 mM P (high nitrogen plus phosphorus treatment, HNP) or 2 mM N + 0.5 mM P (low nitrogen plus phosphorus treatment, LNP). Mycorrhizal plants did not receive nutrient solution. The use of two levels of fertilization for nonmycorrhizal plants was meant to obtain control plants of similar size and nutrient contents to the AM plants tested in this assay.

2.2.4. Parameters measured

2.2.4.1. Biomass production and nutrient concentrations

Two hours before harvesting (7 wk after planting) plants were watered to standardize their water content. The root system was separated from the shoot and its fresh weight recorded. N (micro-Kjeldahl) and P (Olsen and Dean 1965) concentrations in shoots were measured.

2.2.4.2. Water consumption

Daily water consumption was measured with the Thetaprobe ML2x by determining the volumetric soil moisture in each pot. To initiate the drought period, plants were allowed to dry until soil water content reached 80% field capacity (12% volumetric soil moisture) and maintained under such conditions for additional 12 days. The reading of the ThetaProbe ML2x before daily re-watering until 12% volumetric soil moisture during these 12 days was recorded to estimate the water consumption per plant and per day. The relative plant water uptake was calculated as the ratio between the decrease of volumetric soil moisture of each treatment and that of the nonmycorrhizal LNP treatment, which was set as 100%.

2.2.4.3. Symbiotic development

The roots were carefully washed and then divided into three batches: one was stained by the normal non-vital trypan blue (TB) staining of all fungal tissues (Phillips and Hayman 1970) and the other two were used for histochemical staining (succinate dehydrogenase, SDH or alkaline phosphatase, ALP activities) of roots. This method makes it possible to compare directly the total amount of fungal tissue in mycorrhizal root systems (TB staining) and the proportion which is alive (SDH staining) with that

associated to an active phosphate metabolism (ALP staining), as proposed by Tisserant *et al.* (1993).

SDH activity was measured according to the procedure described by Smith and Gianinazzi-Pearson (1990). Briefly, the roots were immersed in a freshly made solution containing 0.2 M Tris-HCl pH 7.0, 2.5 M sodium-succinate 6-hydrate, 4 mg/ml nitro blue tetrazolium, 5 mM MgCl₂. Root fragments were stained overnight at room temperature and then rinsed for 15-20 min in a 3% active chlorine solution of sodium hypochlorite.

ALP was determined according to the procedure described by Tisserant *et al.* (1993). The roots were immersed in a freshly made solution containing 50 mM Tris-citric acid, pH 9.2, 1 mg/ml alfa-naphthyl acid phosphate (monosodium salt), 0.05 % MgCl₂ anhydro, 0.05 % MnCl₂ tetrahydrate and 1 mg/ml Fast Blue RR salt. Root fragments were stained overnight at room temperature and then rinsed for 15-20 min in a 1% active chlorine solution of sodium hypochlorite.

Mycorrhizal development was evaluated after either non-vital or vital staining procedures by the method of Trouvelot *et al.* (1986) (for more information visit <http://www.dijon.inra.fr/bbceipm/Mychintec/Mycocalc-prg/>). The colonization frequency (F%) is a ratio between colonized root fragments and total number of root fragments observed. It gives an estimation of the root length colonized by the fungus. The colonization intensity (M%) is an estimation of the amount of cortical cells occupied by AM fungal structures. Finally, the arbuscule abundance A% gives an estimation of the arbuscule richness in root system. Four replicates per treatment were used.

2.2.4.4. Production of extraradical mycelium

The extraradical mycelium in the soil was determined as described by Jones and Mollison (1948) with slight modifications. Briefly, 1 g of dry soil was treated with sodium hexametaphosphate and stained with trypan blue (0.05%) in lactic acid. The sample was heated in a water bath at 90 °C for 30 min and then sieved through 50 µm-mesh. The remaining mycelium was mixed with bacteriological agar for quantification using a gridline intersection method as described by Newman (1966).

2.3. Results

2.3.1. Plant biomass production and nutrient contents

Control treatments fertilized with two different nutrients solutions (HNP or LNP) produced plants of different size (Fig. 1). HNP plants had similar shoot fresh weight as plants inoculated with *G. coronatum*, *G. intraradices*, *G. claroideum* and *G. constrictum*. LNP plants showed similar shoot and root fresh weights as plants inoculated with *G. geosporum*. Finally, plants inoculated with *G. mosseae* showed the maximum shoot fresh weight, whereas their root fresh weight was similar to that of HNP plants.

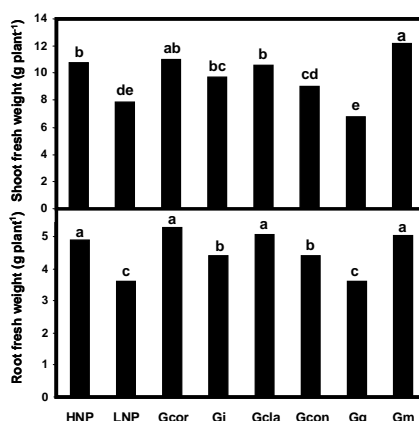


Fig. 2.1. Shoot and root fresh weight (g plant⁻¹) of uninoculated lettuce plants fertilized with two rates of N and P (4mM N + 1 mM P, HNP and 2mM N + 0.5 mM P, LNP) or mycorrhizal lettuce plants colonized by *G. coronatum* (Gcor), *G. intraradices* (Gi), *G. claroideum* (Gcla), *G. constrictum* (Gcon), *G. geosporum* (Gg) or *G. mosseae* (Gm). Means followed by the same letter are not significantly different (P <0.05) as determined by Duncan's multiple-range test (n = 5).

Shoot N concentration (Table 1) was higher in the two fertilized controls than in the six mycorrhizal treatments. The lowest N concentration was found in plants colonized by *G. coronatum* and *G. mosseae* (the biggest plants), probably due to a dilution effect. The highest N content was found in HNP plants and the lowest in *G. geosporum*-colonized plants.

Treatment	N	N	P	P
	(mg g ⁻¹)	(mg plant ⁻¹)	(mg g ⁻¹)	(mg plant ⁻¹)
HNP	25.0 a	34.2 a	1.8 a	2.3 ab
LNP	24.9 a	25.3 b	1.3 b	1.4 d
<i>G. coronatum</i>	11.3 d	22.0 bc	1.3 b	1.9 bc
<i>G. intraradices</i>	17.7 bc	24.3 b	1.6 a	2.5 a
<i>G. claroideum</i>	15.0 c	25.0 b	1.3 b	2.1 b
<i>G. constrictum</i>	18.1 b	24.1 b	1.3 b	1.7 cd
<i>G. geosporum</i>	20.0 b	19.0 c	1.1 bc	1.0 e
<i>G. mosseae</i>	9.2 d	23.0 b	1.0 c	2.2 ab

Table 2.1. Nitrogen and phosphorus concentration (mg g⁻¹) and content (mg plant⁻¹) in shoots of uninoculated lettuce plants fertilized with two rates of N and P (4mM N + 1 mM P, HNP and 2mM N + 0.5 mM P, LNP) or mycorrhizal lettuce plants colonized by *G. coronatum*, *G. intraradices*, *G. claroideum*, *G. constrictum*, *G. geosporum* or *G. mosseae*. Means followed by the same letter are not significantly different (P < 0.05) as determined by Duncan's multiple-range test (n = 5).

The highest P concentration was found in HNP and *G. intraradices*-colonized plants and, the lowest in *G. mosseae*-colonized plants. The P content was similar in HNP plants and most of the mycorrhizal treatments. Only plants colonized by *G. geosporum* had lower P content than LNP plants.

2.3.2. Daily water consumption

Figure 2 shows the volumetric soil moisture recorded before watering. Both control treatments exhibited the highest soil water content (an average of 8.9%), regardless of plant size. Plants colonized by *G. coronatum*, *G. intraradices* or *G. claroideum* showed the highest soil water depletion (average of 8% of volumetric soil moisture). *G. mosseae*-colonized plants also exhibited a significantly lower soil water content (8.2% of volumetric soil moisture) whereas plants colonized by *G. constrictum* and *G. geosporum* did not show significant differences in soil water depletion when compared to HNP control plants.

The relative plant water uptake was calculated as an index of pot water loss (Figure 2). Setting the water uptake of the LNP treatment as 100%, there were no significant differences with the HNP, *G. constrictum* or *G. geosporum* treatments. Plants colonized by *G. coronatum*, *G. intraradices*, *G. claroideum* and *G. mosseae* increased significantly the daily water loss, ranging from 22% of increase for *G. mosseae*- to 33% of increase for *G. intraradices*-colonized plants.

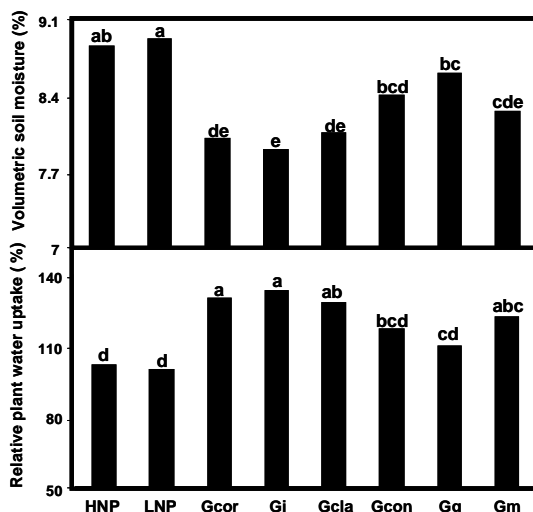


Fig. 2.2. Volumetric soil moisture (%) and relative plant water uptake in uninoculated lettuce plants fertilized with two rates of N and P (4mM N + 1 mM P, HNP and 2mM N + 0.5 mM P, LNP) or mycorrhizal lettuce plants colonized by *G. coronatum* (Gcor), *G. intraradices* (Gi), *G. claroideum* (Gcla), *G. constrictum* (Gcon), *G. geosporum* (Gg) or *G. mosseae* (Gm). Means followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple-range test ($n = 60$)

2.3.3. Symbiotic development

Fungal colonization was estimated after TB, SDH or ALP staining to measure total (TB), living (SDH) and functional (ALP) fungal development (Smith and Gianinazzi-Pearson

1990; Tisserant *et al.* 1993). No fungal development was found in any of the uninoculated control treatments. TB staining (Fig. 3) showed that colonization frequency (F) and arbuscule richness (A) were higher in plants colonized by *G. coronatum*, *G. intraradices*, *G. claroideum* and *G. mosseae* than in those colonized by *G. constrictum* and *G. geosporum*. The colonization intensity (M) was highest in plants inoculated with *G. claroideum* and *G. mosseae*, followed by those inoculated with *G. intraradices*, whereas plants inoculated with *G. coronatum*, *G. constrictum* and *G. geosporum* showed the lowest M values.

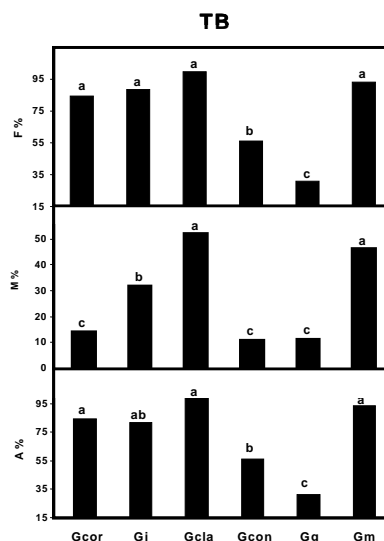


Fig.2.3. Colonization frequency (F), intensity (M) and arbuscule abundance (A) after TB staining of roots from mycorrhizal lettuce plants colonized by *G. coronatum* (Gcor), *G. intraradices* (Gi), *G. claroideum* (Gcla), *G. constrictum* (Gcon), *G. geosporum* (Gg) or *G. mosseae* (Gm). Means followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple-range test ($n = 4$).

The highest F value after SDH staining (Fig. 4) was observed in plants colonized by *G. coronatum* and *G. intraradices*. Plants colonized by *G. claroideum*, *G. constrictum* and *G. mosseae* had a medium F value, whereas those colonized by *G. geosporum* had the lowest F. M was highest in *G. intraradices*-colonized plants and there were no significant differences among the other fungal treatments. The A value reached the maximum value in *G. claroideum*-colonized plants, followed by those colonized by *G. intraradices* and *G. mosseae*. No significant differences were found among the other three fungal treatments.

The ALP staining (Fig. 5) indicated that F was similar in all treatments, except in plants colonized by *G. geosporum*, which exhibited a lower F value. No significant differences were found in M value among the different fungal treatments, except for a higher value in *G. intraradices*-colonized plants.

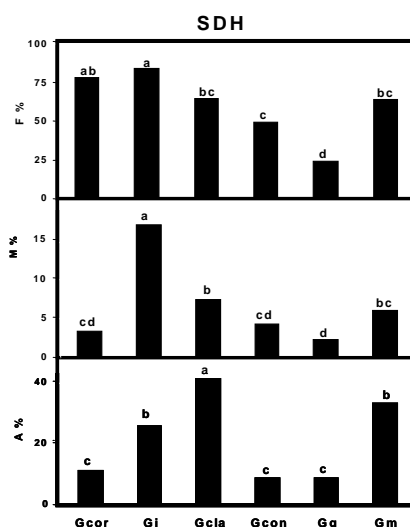


Fig.2.4. Colonization frequency (F), intensity (M) and arbuscule abundance (A) after SDH staining of roots from mycorrhizal lettuce plants colonized by *G. coronatum* (Gcor), *G. intradices* (Gi), *G. claroideum* (Gcla), *G. constrictum* (Gcon), *G. geosporum* (Gg) or *G. mosseae* (Gm). Means followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple-range test ($n = 4$).

Finally, A was higher in plants colonized by *G. intradices* and *G. claroideum* than in those colonized by *G. coronatum* and *G. mosseae*. The lowest A values were found in plants colonized by *G. constrictum* and *G. geosporum*.

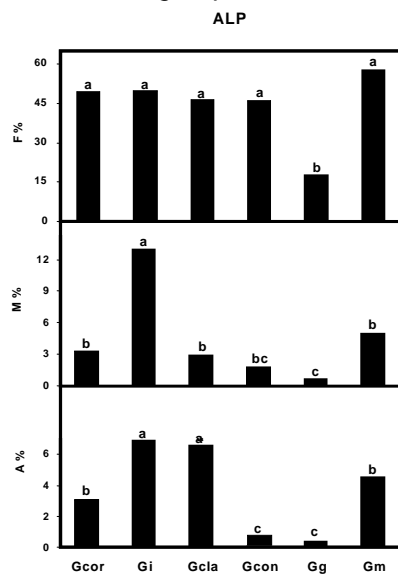


Fig. 2.5. Colonization frequency (F), intensity (M) and arbuscule abundance (A) after ALP staining of roots from mycorrhizal lettuce plants colonized by *G. coronatum* (Gcor), *G. intradices* (Gi), *G. claroideum* (Gcla), *G. constrictum* (Gcon), *G. geosporum* (Gg) or *G. mosseae* (Gm). Means followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple-range test ($n = 4$).

2.3.4. Production of mycelium

Figure 6 shows the amount of external mycelium produced by each AM fungus. *G. coronatum* and *G. claroideum* produced the highest amount of mycelium (about 50 cm g⁻¹) followed by *G. intraradices* (34 cm.g⁻¹). The lower amount of mycelium was produced by *G. constrictum*, *G. mosseae* and *G. geosporum*.

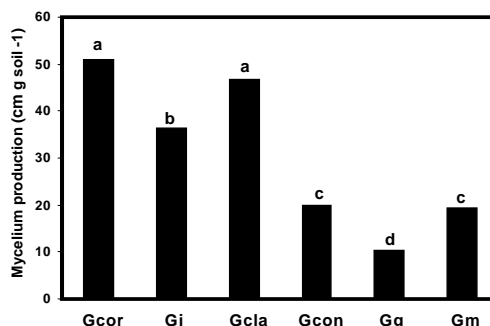


Fig. 2.6. Extraradical mycelium production (cm g soil⁻¹) by mycorrhizal lettuce plants colonized by *G. coronatum* (Gcor), *G. intraradices* (Gi), *G. claroideum* (Gcla), *G. constrictum* (Gcon), *G. geosporum* (Gg) or *G. mosseae* (Gm). Means followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple-range test ($n = 4$)

	Mycelium	TB staining			SDH staining			ALP staining			
		F (%)	M (%)	A (%)	F (%)	M (%)	A (%)	F (%)	M (%)	A (%)	
Pearson correlation coefficient	-0,87*	-0,84*	0,5	-0,54	-	-0,68	-0,53	-0,71	-0,7	-	0,85*
Significance level	0,02	0,03	0,31	0,27	0,00	0,13	0,28	0,11	0,13	0,03	

Table 2.2. Statistical correlation among volumetric soil moisture in mycorrhizal treatments and extraradical mycelium production and fungal development within roots (TB, SDH and ALP stainings).

2.4. Discussion

After nearly 25 years of research on the water relations of mycorrhizal plants, there is still considerable disagreement on the significance of the effect of arbuscular mycorrhizas on host water relations and on the mechanisms involved (Bryla and Duniway 1997b). Several studies have suggested that roots colonized by AM fungi can have higher specific water uptake rates (volume of water absorbed per unit root length) than noncolonized roots, independently from direct hyphal water transport (Koide 1993). The usual method to determine the influence of AM fungi on the specific root water uptake of a colonized plant is to measure changes in total weight of a potted plant resulting from

transpiration and divide that value by the total root length in the pot (Bryla and Duniway 1997a). In this study we have measured the daily water consumption of lettuce plants infected by six AM fungi or by two uninoculated control treatments, using a soil moisture sensor that responds to changes in the apparent dielectric constant (Roth *et al.* 1992; White *et al.* 1994). Read (1992) suggested that hyphal transport might supply adequate water to maintain physiological function when hydraulic conductivity of the soil begins to limit uptake at the root surface. Because of that, plants in our study were subjected to a moderate drought stress so that any increase in water uptake by fungal hyphae would be of greater importance for plant development.

The results showed that plants colonized by four AM fungi depleted soil water to a higher extent than uninoculated control plants (Fig. 2). The differences ranged from 0.6% volumetric soil moisture (22% increase in relative plant water uptake) for *G. mosseae*-colonized plants to 0.95% volumetric soil moisture (33% increase in relative plant water uptake) for *G. intraradices*-colonized plants. The other two AM fungi did not show significant differences when compared to the control plants. According to our calculations, the differences of 0.6-0.95% volumetric soil moisture between AM and control plants would represent 3 to 4.75 ml plant⁻¹ day⁻¹, respectively. Although this amount of water can be seen as small to explain the important differences in water relations between mycorrhizal and nonmycorrhizal plants, we agree with the conclusion of Augé (2001) that mycorrhizal effects on plant water relations are not as dramatic and consistent as those on P acquisition and host growth, but that modest changes, if sustained, can have meaningful effects on plant fitness.

Two main mechanisms have been put forward in literature to explain how AM fungi might increase root water uptake: (1) AM fungi might indirectly increase water uptake by improving root conductance to water flow (Koide 1993) and (2) extraradical mycorrhizal hyphae might transport water to colonized roots directly (Read 1992; Ruiz-Lozano and Azcón 1995; Bryla and Duniway 1997a). It has been proposed that AM symbiosis may affect root conductance through its effects on plant growth and development (Augé 2001). There are, however, other ways in which colonization of roots by AM fungi might affect root conductance. For example, by modifying the amount and distribution of aquaporins in root membranes. Aquaporins are water channel proteins that when opened facilitate the passive movement of water molecules down a water potential gradient (Tyerman *et al.* 2002). Studies on aquaporins have suggested that they are important for the bulk flow of water in whole plant (Johansson *et al.* 2000). It has been reported that AM symbiosis increases the expression of some aquaporin-encoding genes (Roussel *et al.* 1997; Krajinski *et al.* 2000). Hence, it has been recently proposed to investigate the contribution of aquaporins to the enhanced plant tolerance to osmotic stresses (Ruiz-Lozano 2003).

In relation to hyphal water transport, Bryla and Duniway (1997a) previously investigated the role of AM fungi in water uptake from well watered to severely droughted conditions. They concluded that mycorrhizal colonization did not affect the rates at which roots extracted water from soil. In contrast, Bethlenfalvay *et al.* (1987) found that mycorrhizal soybean plants depleted soil water to a greater extent than nonmycorrhizal

soybean. Faber *et al.* (1991) showed that when AM plants were grown in containers constructed with a barrier that excluded roots but not mycorrhizal hyphae from a portion of the soil volume, the soil containing only hyphae had a significant reduction in soil water content that could not be attributed solely to the evaporation. Furthermore, if the hyphae crossing the root barrier were severed, plant water uptake declined by 35% compared to intact mycorrhizal plants. Ruiz-Lozano and Azcón (1995) also showed that water uptake by host plants increased due to colonization by AM fungi.

In some of these studies, however, mycorrhizal plants were more intensely rooted and might have simply explored a greater soil volume than nonmycorrhizal plants. Alternatively, mycorrhizal plants were bigger than nonmycorrhizal ones. When large plants are constrained to the same restricted soil volume as small plants in potted experiments, the higher transpiration rates of the larger plants will result in a more intense soil drying (regardless of mycorrhizal symbiosis). However, in the present study, the two fertilized control treatments (HNP and LNP) matched the plant size (shoot and root) of the mycorrhizal treatments (Fig. 1), and still four of the mycorrhizal treatments depleted more soil water content than comparable nonmycorrhizal plants (Fig. 2). Moreover, the best treatment in terms of biomass production was inoculation with *G. mosseae*, and this treatment did not show the maximum soil water consumption. In addition, uninoculated control plants had similar or better nutritional status (N and P) than mycorrhizal plants (Table 1). The differences found between mycorrhizal and nonmycorrhizal plants in soil water depletion cannot be ascribed therefore to differences in plant size or in nutritional status. They should be attributed to the activity of the AM fungal mycelium.

Individual hyphae probably transport limited amounts of water. However, there is a prolific number of hyphae extending from mycorrhizal roots into the surrounding soil. For example, Miller *et al.* (1995) measured external hyphal lengths as high as 111 m cm⁻³ of soil in the tallgrass prairie community and 81 m cm⁻³ of soil in a cool-season pasture community. In our study, the most effective AM fungi for soil water depletion produced also higher amounts of mycelium than the other fungi that were less effective in water depletion (Fig. 6). There was a significant correlation between volumetric soil moisture and the amount of mycelium produced by each AM treatment (Table 2). It is known that mycelia of AM fungi increase soil aggregation (Miller and Jastrow 1990, Jastrow and Miller, 1991) and that hyphal aggregation binds soil to roots preventing air gaps and preserving hydraulic continuity as soil dries (Davies *et al.* 1992, 1993). The staining of roots with vital and non-vital techniques indicated that the higher colonization frequency (F), intensity (M) and arbuscule abundance (A) was reached by the four AM fungi (*G. coronatum*, *G. intraradices*, *G. claroideum* and *G. mosseae*) that depleted more soil water (Figs. 3, 4, 5). In contrast, the AM fungus less effective for water uptake (*G. geosporum*) showed also the lowest values of colonization (F, M and A). There was a significant correlation also (Table 2) between volumetric soil moisture and colonization frequency (F) after TB and SDH stainings, as well as with the A value after ALP staining (active fungal arbuscules).

In conclusion, this study shows that AM fungi increase the rate of plant water uptake from soil. The different fungal species differed in their effectiveness to enhance

plant water uptake from soil, and it seems that this ability is related to the amount of external mycelium produced by each AM fungus and to the frequency of root colonization in terms of alive and active fungal structures.

4.5. Acknowledgements

A. Marulanda is thankful to AECI for providing financial support. This work was financed by CICYT-FEDER (Project AGL2002-03952).

Capítulo 3

TOLERANCIA A LA SEQUÍA Y ACTIVIDADES ANTIOXIDANTES EN PLANTAS DE LAVANDA COLONIZADAS CON ESPECIES DE *GLOMUS* SENSIBLES Y RESISTENTES A LA SEQUÍA**Resumen**

El objetivo de este estudio fue comparar la eficacia de cuatro aislados fúngicos de micorrizas arbusculares (dos *Glomus sp.* autóctonos, tolerantes a la sequía y sus correspondientes no-autóctonos sensibles a la sequía) en una planta adaptada a la sequía (*Lavandula spica*) creciendo bajo condiciones de sequía. Fue determinada la relación entre las respuestas simbióticas a deficiencia de agua y el sistema antioxidante, en relación a diversas asociaciones simbióticas. La respuesta de las plantas a la colonización micorrícica bajo condiciones estrés (en términos de crecimiento y nutrición) también fue evaluada. Las micorrizas autóctonas bajo condiciones de estrés, produjeron mayor biomasa de lavanda, particularmente biomasa en raíz, y fueron más eficientes en la absorción de N y K que las micorrizas de referencia. Estos efectos positivos de hongos autóctonos en el incremento del crecimiento de la raíz por 35 % (*G. intraradices*) y por 100 % (*G. mosseae*), comparado con los hongos de referencia, fueron concomitantes con un decremento de los compuestos antioxidantes: Glutation 25 %, ascorbato 7 % y especies de oxígeno reactivo: H₂O₂ 15 % (*G. intraradices*) y glutacion 108 %, ascorbate 26 % y H₂O₂ 43 % (*G. mosseae*). Glutation y ascorbato tienen un papel importante en la protección y funcionamiento metabólico bajo condiciones de déficit hídrico. Por lo tanto, la baja acumulación de estos compuestos en plantas colonizadas por AM autóctonos sugiere una mayor tolerancia y al parecer esta relacionado con la efectividad simbiótica bajo tales condiciones de sequía. Bajas diferencias entre las actividades antioxidantes como glutacion reductasa (GR), catalase (CAT) y superoxidodismutasa (SOD) en plantas colonizadas fueron encontradas. Sin embargo, el valor de GR en plantas colonizadas por *G. mosseae* de referencia fue un 85 % más bajo que en plantas colonizadas por *G. intraradices* de referencia. Estas actividades antioxidantes no permiten la generalización de que GR, CAT y SOD fueran correlacionados con la eficiencia simbiótica de hongos de AM en la tolerancia de sequía de lavanda. Plantas colonizadas con *G. mosseae* de referencia (la menos eficiente bajo sequía) tenía uno 111 % menos (contenido de N) y 106 % menos (contenido de k) que aquellos colonizados por los AM autóctonos. Ambos iones tienen un papel clave en procesos de osmoregulation. La simbiosis AM implicando especies autóctonas adaptadas, produjo la mayor cantidad de micelio intra y extraradical, el mayor desarrollo arbuscular y también la mayor actividad SDH y ALP-ase en los sistemas raíz. La inoculación de hongos AM autóctonos, es una estrategia importante que garantiza la tolerancia de plantas más grandes y la defensa contra la sequía. El uso de los hongos AM, particularmente la colonización por hongos autóctonos, contribuye a un mejor crecimiento de la lavanda y a la tolerancia de la sequía.

DROUGHT TOLERANCE AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES IN LAVENDER PLANTS COLONIZED BY NATIVE DROUGHT-TOLERANT OR DROUGHT-SENSITIVE *GLOMUS* SPECIES

Abstract

The objective of this study was to compare the effectiveness of four arbuscular mycorrhizal AM fungal isolates (two autochthonous drought-tolerant *Glomus* sp and the corresponding non-autochthonous drought-sensitive) on a drought adapted plant (*Lavandula spica*) growing under drought conditions. The relationship between the AM symbiotic responses under water deficit and that antioxidant system in plants from different symbiotic associations were assessed. Plants response to AM-colonization under stress conditions (in terms of growth and nutrition) was also evaluated. Autochthonous AM fungal strains produced a higher lavender biomass, particularly root biomass, and a more efficient N and K absorption than the inoculation of the corresponding allochthonous strains under drought conditions. These positive effects of autochthonous fungal strains in increasing root growth by 35% (*G. intraradices*) and by 100% (*G. mosseae*), compared to allochthonous strains, were concomitant with a decrease of the antioxidant compounds: by 25% glutathione, 7% ascorbate and the reactive oxygen species: by 15% H₂O₂ (*G. intraradices*) and by 108% glutathione, 26% ascorbate and 43% H₂O₂ (*G. mosseae*). Glutathione and ascorbate have an important role in plant protection and metabolic functioning under water deficit. Thus, the lowest cell accumulation of these compounds in plants colonized by native AM fungal strains suggest a highest drought tolerance and it seems to be related with the symbiotic effectiveness under such drought conditions. Low differences between antioxidant activities such as glutathione reductase (GR) catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in colonized plants were found. Nevertheless, value of GR assessed in plants colonized by allochthonous *G. mosseae* was an 85% lower than in plants colonized by allochthonous *G. intraradices*. Such antioxidant activities do not allow the generalization that GR, CAT and SOD were correlated with the symbiotic efficiency of AM fungi on lavender drought tolerance. Plants colonized by allochthonous *G. mosseae* (the less efficient strain under drought) had a 111% less (N content) and 106% less (K content) than those colonized by the native fungus. Both ions play a key role in osmoregulation processes. AM symbiosis implicating autochthonous adapted strains produced the highest intraradical and extraradical mycelial and arbuscular development and also showed the greater SDH and ALP-ase activities in the root systems. The inoculation of native fungal strains is an important strategy that assured the greatest plant tolerance and defence against the water stress. The mycorrhizal performance, particularly the colonization by autochthonous fungi, contributes to a best lavender growth and drought tolerance.

3.1. Introduction

The decline of plant growth greatly due to water deficiency is considered one of the most important ecological factors limiting plant survival and establishment. This environmental stress affects most of the plants growing in the arid and semiarid regions. Nevertheless, autochthonous microbial communities are able to develop a range of activities that are very important in maintaining sustainability in these stressed soils (Barea 2002). Plants roots and soil constituent form an interface where symbiotic microorganisms as arbuscular-mycorrhizal (AM) fungi interact. In drought stressed areas, plants are highly dependent on microbial activity since beneficial microorganisms as AM fungi are able to enhance their metabolic activity to neutralize and to tolerate the stress (Porcel *et al.* 2003; Augé 2001). Plants possess natural protection systems against stresses but their interaction with soil microorganisms can alleviate the symptoms which are important in drought-stress protection (Vivas *et al.* 2003; Goicoechea *et al.* 1998) The role of AM symbiosis in growth, drought-tolerance and plant establishment under nutritional and water-stress conditions is based on summatory physiological and cellular mechanisms (Porcel *et al.*, 2003). There is evidence that AM fungi help plants to growth under arid conditions by reducing water stress (Ruíz-Lozano and Azcón 1996) and by increasing the supply of nutrients.

Naturally climatic or anthropically created conditions cause or accelerate desertification that drastically affects growth and survival of plants (Essington 2004). Lavender plants (*Lavandula* spp.) are small woody shrubs that belong to the natural succession in semiarid adapted communities of mediterranean ecosystems (Barea *et al.* 1992). Nevertheless, the successful re-establishment of native plants in degraded soils are normally limited in part due to the low density of AM propagules, since their represent an important biological factor governing the nutrients cycles and soil fertility in arid and semiarid ecosystems (Barea & Jeffries 1995). Because of native inoculum potential of AM fungi in the semiarid soils southeast of Spain is low (Requena *et al.* 1996; Caravaca *et al.* 2002), the selection of the most efficient and adapted AM fungi is an important concerns in inoculation programmes. There are a range of levels of compatibility and fungal abilities between AM fungi and host plant (Monzón & Azcón 1996).

The inoculation of lavender plants with drought-resistant-AM fungi prior to outplanting on drought- affected sites favoured plant growth and survival (Azcón & Barea 1997). A living organism is considered resistant by avoidance to a given physicochemical stress if it is able to exclude, either partially or completely, the intracellular penetration of the estressant agent. In these concerns, AM fungi help to improve host tolerance to water limitation, but little information has been done on the role of AM fungal ecotypes from drought environment. Marulanda *et al* (2003) and Ruíz-Lozano *et al.* (1995), suggested that *G. intraradices* was potential candidate species to use under conditions of water stress. Nevertheless, the AM species previously tested as the most effective in dry soils were selected from non-stressed sites. In our group, previous investigation in osmotic stress tolerance of AM colonized plants have shown inter and intra specific growth differences between AM fungal isolates from non-water stressed and stressed sites. Different isolates of AM fungi showed high variability in their tolerance to drought and

fungal isolates within one species may vary in their symbiotic effectiveness depending on the compatibility among fungus, soil conditions and plant in the rhizosphere niche. Autochthonous fungal isolates have potentially undergone selection for adaptation to water limitation and other stresses. It was hypothesized that these isolates are more resistant to water stress than the species from a non stressed site.

Regarding the particular role of AM fungi in increasing plant drought tolerance one logical next step is the selection of the most effective AM fungus. Water deficit affects plant metabolic activities and one of its earliest consequences is the production of reactive oxygen species that have deleterious effects on cell integrity and functioning (Ruiz-Lozano *et al.* 2003). This constraint includes biochemical adaptations like the modulation of antioxidant enzyme activities in cells. These antioxidant enzymes activities play crucial roles in plant protection against stresses. Plant cells contain an array of protective systems that reduce the oxidative damage. Some of these systems as superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and catalase that react with active forms of oxygen and are able to maintain them at a low level. This group of enzymes are involved in the detoxification of superoxide radical and H_2O_2 and thus, are able to prevent the formation of OH radicals. But glutathione reductase (GR) and ascorbate are able to regenerate antioxidants. These enzymes are components of the ascorbate glutathione pathway responsible for the removal of H_2O_2 in cellular compartments.

Based on the fact that natural revegetation is scarce in arid and semiarid environments since water scarcity limits plant growth, a low-growing shrub as lavender, well adapted to water stress conditions and belonging to the natural succession in certain plant communities of semiarid Mediterranean ecosystems, was used in this study.

In the present study we pretend to know the symbiotic effectiveness of four mycorrhizal strains (two autochthonous and two allochthonous strains of *G. mosseae* and *G. intraradices*) in *Lavandula spica* subjected to water deficit. The aim was to select the most effective AM association, under water stress conditions, to enhance the establishment and growth of lavender in water limited areas to be revegeted. Moreover, we investigated the physiological and biochemical basis of effective and tolerant symbiosis to asses the mechanisms involved in the variability of the symbiotic performance.

3.2.1. Materials and Methods

Experimental design

The experimental design consisted of a complete randomized factorial block with our mycorrhizal inoculation: Two fungal strains (*G. intraradices* or *G. mosseae*) autochthonous from mediterranean soils and two allochthonous *G. intraradices* (BEG 123) or *G. mosseae* (BEG 119) from EEZ collection. All treatments were replicated five times with a total of 20 pots.

Soil characteristics

A calcareous loamy soil was collected from a Mediterranean zone (Granada, province, Spain) was sieved (2mm), diluted with quartz-sand (<1mm) (5:2, soil:sand v/v)

and sterilized by steaming (100°C for 1h for 3 days). The soil had a pH of 7.2 (water); 1.6% organic matter, nutrient concentrations (g kg⁻¹) N, 2.1; P, 1.7 (NaHCO₃ extractable P); K, 0.8. The soil texture was made up of 57.8 % sand, 19% clay and 23.2% silt.

Biological materials

Lavandula spica seeds were sterilized in a 15% H₂O₂ solution for 8 min, then washed several times with sterile water to remove any trace of chemical that could interfere in seed germination, and placed on sterile vermiculite at 25°C to germinate. Seedlings were transferred to plastic pots containing 500 g of the sterilized soil/sand mixture.

Two predominant autochthonous fungi were isolated from the natural experimental soil by wet sieving and decanting (Vilariño and Arines 1990). They were morphologically identified as *G. intraradices* or *G. mosseae* strains and were cultivated for inocula production following conventional procedure Marulanda *et al.* (2003). Strains of *G. intraradices* (BEG 123) or *G. mosseae* (BEG 119) from our collection (EEZ) were used as allochthonous reference strains. Mycorrhizal inoculum was similarly prepared for each AM fungus. Mycorrhizal inoculum were bulked in an open pot culture of *Zea mays* plus red clover and consisted of soil, spores, mycelia and infected root fragments having on AM colonization of about 75%. Ten grams of inoculum were added to appropriate pots at transplanting time just below the lavender seedlings.

Growth conditions

Lavender plants were grown for six months in a greenhouse under controlled climatic conditions (18-24°C, with a 18/6 light/dark period and 50% of relative humidity). A photoperiod of 16h at a photosynthetic photon flux density (PPFD) of 350 μmol m⁻² s⁻¹ as measured with a light meter (model LI-188B; Licor Inc., Lincoln, NE, USA) was maintained along the experiment. Water was supplied daily to maintain constant soil water content close to field capacity during the first 6 weeks of plant growth. At this time plants were allowed to dry until soil water content was 75% of field capacity (13% volumetric soil moisture) and maintained under such these conditions for an additional 20 weeks. This volumetric soil moisture is considered to be a normal environmental condition in dry mediterranean areas. At the harvest, aerial and root parts were dried 48 hours in a forced drought oven at 70°C and then shoot and root dry biomass were weighted.

3.2.2. Measurements

Plants were harvested six months after transplanting. The dry biomass of shoot and root, roots length, glomaline, and symbiotic development were determined. Nutrients (N, K) shoot concentrations (mg g⁻¹) of N (micro-Kjeldahl) and K (Lachica *et al.* 1973) were, measured.

Roots were carefully washed and then divided into three batches: one was stained by the classical non-vital trypan blue (TB) staining (Phillips & Hayman 1970) and used for length measured with the Delta-T Image Analysis System (Cambridge, England). The

roots were scanned and analyzed using DIAS Root length software. And the others roots were used for histochemical vital staining succinate dehydrogenase (SDH) or alkaline phosphatase (ALP) activities in order to measure total (TB), living (SDH) or active (ALP) AM fungal development.

SDH and ALP activities were determined according to the procedure described (Tisserant *et al.* 1993; Smith & Gianinazzi-Pearson 1990). Root fragments were then stained overnight at room temperature and cleared for 15-20 min in 1% active chlorine solution in sodium hypochlorite.

Mycorrhizal development, was also evaluated (Trouvelot *et al.* 1986) and expressed as intensity of AM colonization “M”, gives an estimation of the amount of root cortex that became mycorrhiza and is referred to the whole root system. “A” is the arbuscule abundance and gives an estimation of the arbuscule richness in the whole root system.

Easily extractable glomalin (EEG) was extracted from 1g soil subsamples with citrate buffers using the methods of Wright *et al.* (1996, 1998). Extract from each replicate were pooled and centrifuged to remove soil particles, and protein in the supernatant was analyzed using a Bradford assay with bovine serum albumin as the standard (Wright *et al.* 1996)

Enzyme assays

Total Superoxide dismutase (SOD) activity (EC 1.15.1.1) was measured according to (Beyer and Fridovich 559-66) based on the ability of SOD to inhibit the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) by superoxide radicals generated photochemically. One unit of SOD was defined as the amount of enzyme required to inhibit the reduction rate of NBT by 50% at 25°C. CAT activity (EC 1.16.1.6) was measured by the disappearance of H₂O₂ (Aebi 1984). The reaction mixture (3ml) contained 10.6 mM H₂O₂. The reaction was initiated by adding 25 μ l of the extract and monitoring the change in absorbance at 240 nm and 25 °C for 3 min. APX activity (EC 1.11.1.11) was measured in a 1-ml reaction volume containing 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 0.1 mM hydrogen peroxide and 0.5 mM ascorbate. Adding the H₂O₂ started the reaction and the decrease in absorbance at 290 nm was recorded for 1 min to determine the oxidation rate of ascorbate (Amako *et al.* 1994). Finally, Glutathione reductase (GR) activity (EC 1.6.4.2) was determined by the procedure of Carlberg & Mannervik (1985). The reaction mixture (1 ml) contained 0.1 M HEPES pH 7.8, 1mM EDTA, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM oxidized glutathione, 0.2 mM NADPH and 150 μ l of the enzyme extract. The rate of NADPH oxidation was monitored by the decrease in absorbance at 340 nm for 2 min. Two blanks, one without the enzyme extract and the other without oxidized glutathione were used as controls.

3.2.3. Resultados

Mycorrhizal plants by *G. intraradices*, particularly those infected by autochthonous fungal strain, showed a root and shoot biomass enhancement in relation to plants colonized by reference strains or native *G. mosseae* (Fig 1). Irrespectively of fungal strain

used, the inoculations with autochthonous strains produced greater shoot and root biomass than the inoculation with the allochthonous strains. The magnitude of the growth response between plants colonized by autochthonous *G. mosseae* and allochthonous strains ranged from 62% (shoot) to 100% (root). Differences in plant biomass were lower in *G. intraradices* colonized plants as affected by the strain and the highest differences were found in root development (by 35% weight and by 87% length) (Figs 1).

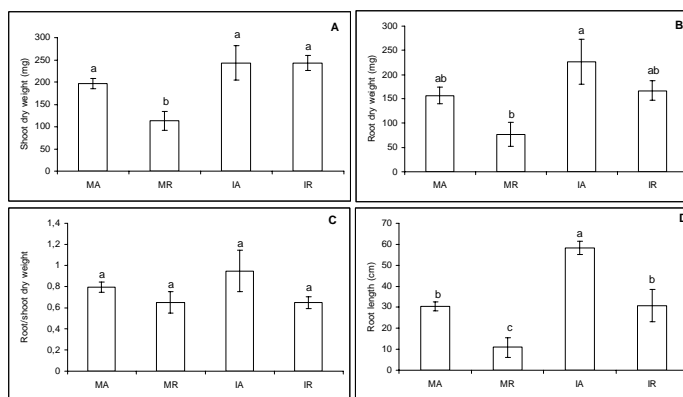


Fig 1. Shoot, root, shoot/root dry weight (mg) and root length (cm) of mycorrhizal lavender plant inoculated with reference allochthonous AM fungi [*G. mosseae* (RM) or *G. intraradices* (RI)] and with autochthonous *G. mosseae* (AM) or *G. intraradices* (AI) after 6 months under drought. Means followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple-range test ($n=5$)

Similarly, root/shoot ration was increase in plants colonized by autochthonous strains (Fig 1). Glomaline production in rhizosphere soil (used as index of extraradical mycelium production) were greater when autochthonous strains were the colonizing fungi. Autochthonous *G. intraradices* was the fungus that produced a highest quantity of this fungal glycoprotein. Differences in glomaline concentration ranged from 49% (between *G. intraradices* strains) to 18% (between *G. mosseae* strains) (Fig 2). Vesicles formation were lowest in AM roots colonized by the less drought adapted endophytes (Fig 2). Autochthonous strains formed 75% (*G. intraradices*) and 52% (*G. mosseae*) more vesicles than the corresponding allochthonous strains.

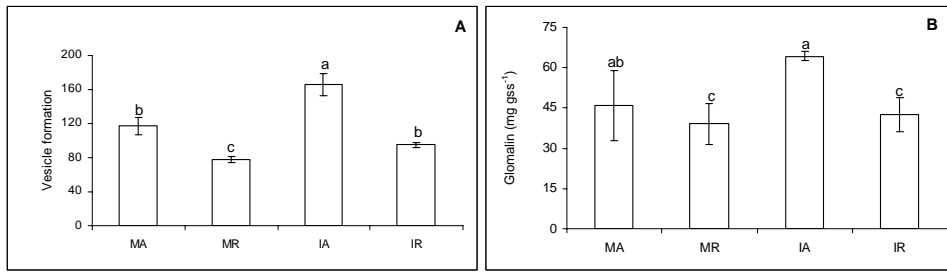


Fig 2. Glomalin and vesicle formation on mycorrhizal lavender plant inoculated with reference allochthonous AM fungi [*G. mosseae* (RM) or *G. intraradices* (RI)] and with autochthonous *G. mosseae* (AM) or *G. intraradices* (AI) after 6 months under drought. Means followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple-range test ($n=5$)

Shoot N and K content displayed similar trends than those described for plant growth (Fig 3). The content of these nutrients in shoot and root were enhanced by autochthonous strains but in a greatest extent in plants colonized by *G. intraradices* (Fig 3). The highest differences in N and K plant content were observed between lavender plants colonized by each one of the two *G. mosseae* strains (Fig 3).

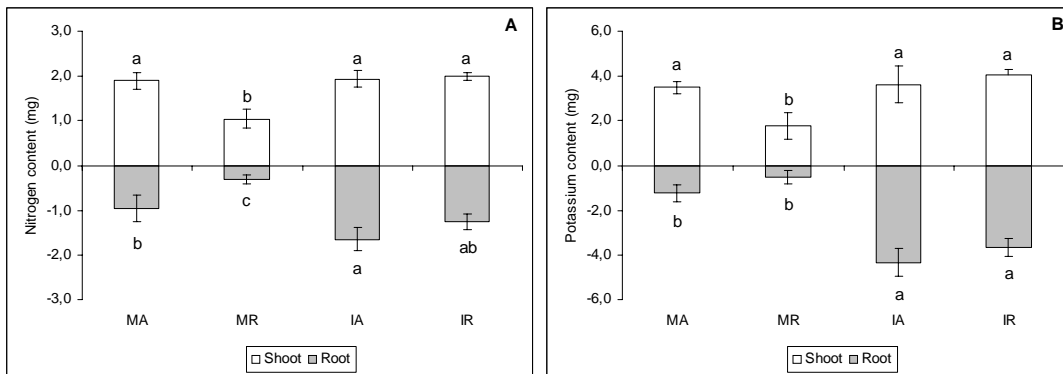


Fig 3. Nitrogen and potassium content on lavender plant inoculated with reference allochthonous AM fungi [*G. mosseae* (RM) or *G. intraradices* (RI)] and with autochthonous *G. mosseae* (AM) or *G. intraradices* (AI) after 6 months under drought. Means followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple-range test ($n=5$)

Mycorrhizal colonization (TB) and those showing SDH or ALP-ase activities produced by autochthonous strains had a higher development than those produced by the corresponding reference strains (Fig 4).

The arbuscular structures showing activity (SDH and ALP staining) were also increased in root colonized by autochthonous strains (Fig 5). Nevertheless, *G. intraradices* produced a higher colonization rate, vitality (SDH) and activity (ALP-ase) compared to *G. mosseae*.

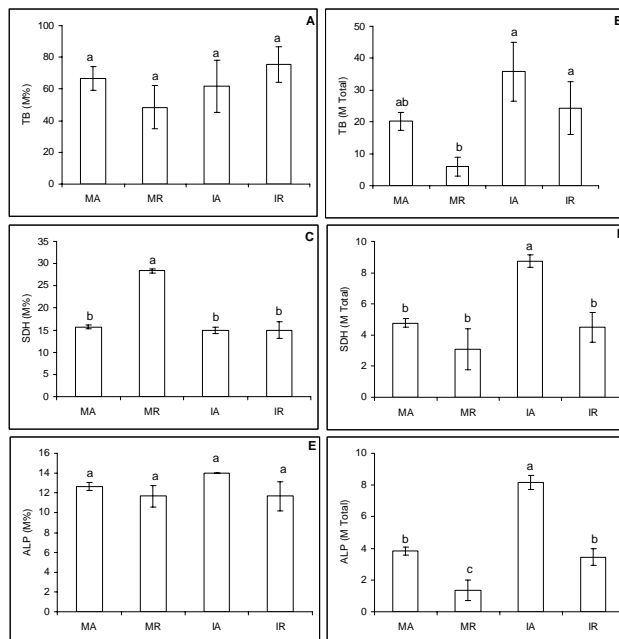


Fig 4. Root colonization in lavender plant inoculated with reference allochthonous AM fungi [*G. mosseae* (RM) or *G. intraradices* (RI)] and with autochthonous *G. mosseae* (AM) or *G. intraradices* (AI) after 6 months under drought stress. AM values measured (%) were: M (colonization intensity) in the whole root system after Trypan Blue (TB), Succinate dehydrogenase (SDH) or Alkaline phosphatase (ALP) staining. Means followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple-range test ($n=4$)

This higher colonizing ability of *G. intraradices* was simultaneously related to a greatest proportion of arbuscule (A) formed. Roots colonized by this fungus, particularly by the drought-adapted strain, showed the greatest proportion of AM intraradical structures (M and A) showing vitality and activity (Figs 4 and 5).

To assess the physiological mechanisms possibly involved in the variability of symbiotic effectiveness under drought, we analyse some antioxidant activities (SOD, CAT and GR) and compounds related to plant metabolism under drought stress. All of them have a crucial role in plant growth and metabolic functioning.

Results showed a high contribution of fungal partner in the variance of H_2O_2 glutathione and ascorbate production (Fig 6).

The lowest accumulation of such compounds was determined in plants colonized by autochthonous *G. intraradices* and the highest in those infected by reference *G. mosseae*. The highest differences in such compounds were found in colonized lavender by *G. mosseae* strains. The highest differences between strains were: 108% (glutathione), by 26% (ascorbate) and by 43% (hydrogen peroxide), (Fig 6).

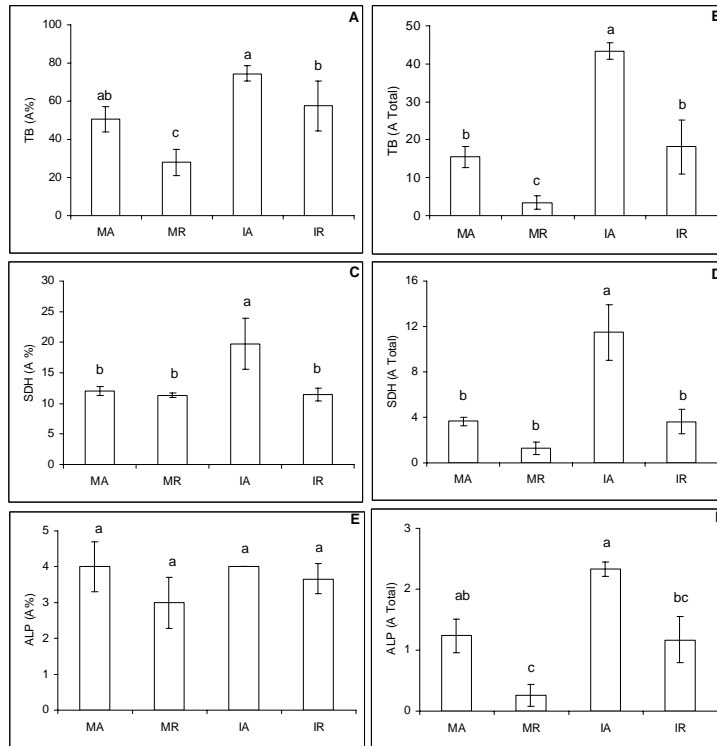


Fig 5. Root colonization in lavender plant inoculated with reference allochthonous AM fungi [*G. mosseae* (RM) or *G. intraradices* (RI)] and with autochthonous *G. mosseae* (AM) or *G. intraradices* (AI) after 6 months under drought stress. AM values measured (%) were: A (arbuscules abundance) in the whole root system after Trypan Blue (TB), Succinate dehydrogenase (SDH) or Alkaline phosphatase (ALP) staining. Means followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple-range test ($n=4$)

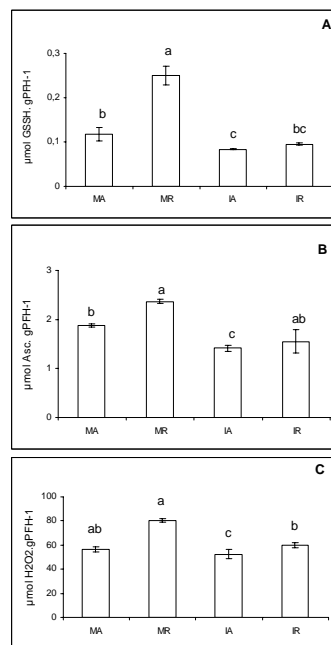


Fig 6. Glutathione, ascorbate and H_2O_2 in lavender plants inoculated with the reference allochthonous AM fungi [*G. mosseae* (RM) or *G. intraradices* (RI)] and with the autochthonous *G.*

mosseae (AM) or *G. intraradices* (AI) after 6 months under drought Means followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple-range test ($n=4$)

This variability was more evident for glutathione. It appeared to be particularly related to degree of drought stress tolerance. In fact, the accumulation of antioxidants varied according to the adaptation and origin of the colonizing fungus. The contribution of mycorrhizal partner resulted relevant into the variance of these metabolic compounds under water stress.

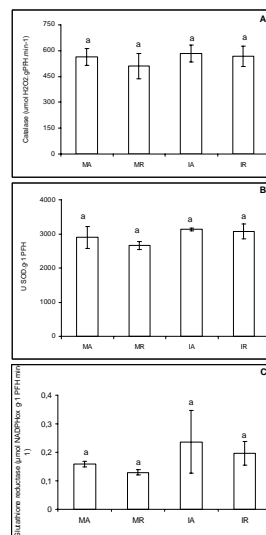


Fig 7. Catalase, superoxide dismutase and glutathione reductase in lavender plant inoculated with the reference allochthonous AM fungi [*G. mosseae* (RM) or *G. intraradices* (RI)] and with the autochthonous *G. mosseae* (AM) or *G. intraradices* (AI) after 6 months under drought Means followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multi

Nevertheless, differences were not so relevant regarding SOD and CAT antioxidant activities (Fig 7) that resulted similarly affected in plants colonized by whatever fungal strain (particularly CAT). Low differences were observed in SOD activity between colonized plants but a difference of 18% was found between autochthonous *G. intraradices* and reference *G. mosseae*. While differences in GR activity in these both treatments reached an 85% (Fig 7).

The effect of fungal colonization on antioxidant enzymes activities differed between analyzed enzymes (Fig 7). In plant colonized by autochthonous *G. intraradices* the increased GR and decreased glutathione might be related with the symbiotic effectiveness under such drought conditions.

3.2.4. Discussion

Mycorrhizal colonization by autochthonous *Glomus intraradices* was the most effective in terms of shoot and root growth and nutrients uptake by lavender plants in this drought stressed soil and several mechanisms can be involved in such mycorrhizal effect. As these results show, the symbiotic effectiveness changed depending on the ecological adaptation and origin of the AM fungi used. Both autochthonous strains resulted more

effectives than the corresponding less drought-adapted strains used as reference. These results suggest that the selection of effective strains could lead to the enhancement of lavender establishment in drought poor soils. An important differential mycorrhizal effect of autochthonous isolates is the highest stimulation of root biomass (weight) and length and the highest proportion of N and K allocated in root tissues than the allochthonous strains which is indicative of plant responses to drought tolerance. We previously tested that this fungal strain (*G. intraradices*) shows the highest shoot and root biomass under drought when associated with *Retama sphaerocarpe*, increasing water transport in terms of relative plant water uptake (%) and volumetric soil moisture (Marulanda *et al.* 2006). These results were concordant with those reported by (Koide 1993). Native *G. intraradices* might increase water uptake by an improvement of root conductance to water flow and also via extraradical mycelium able to transport water to mycorrhizal root (Bryla & Duniway 1997a; Bryla & Duniway 1997b; Ruíz-Lozano & Azcón 1995a). In concordance to these results, the highest amount of glomaline was observed in the rhizosphere of autochthonous *G. intraradices* colonized plants that increased by 49% the glomaline produced by the reference IR strain. Glomaline (as binding agents) seems to play a principal role in soil stabilization and it may increase the level of stable aggregate since this glycoprotein, acts as an insoluble glue to stabilise aggregates being effective in increasing soil structural stability (Wright 2006). Maintenance of these soil characteristics affecting soil quality (here not determined) can be considered as an integral part of sustainability since soil structure is crucial to the success of revegetation practices. Autochthonous *G. intraradices* seems to be the most suitable fungus in improving soil aggregation that facilitates water infiltration which is important to maintain soil porosity and to provide adequate oxygen supply to roots. But in the short period of this bioassay (six months) it is difficult to observe changes concerning structural stability. In such concern, may be essential to select and to apply the most appropriate microbial inoculants for a better lavender establishment. The two native AM species exhibited a significant greater intra and extraradical (glomaline) mycorrhizal development than the two AM isolates selected from collection.

Autochthonous AM fungi produced the greatest development of intraradical mycelium, fungal activity as well as vesicular-arbuscular formations. The arbuscular richness (A) shows the functioning of this symbiosis and it is considered the interactive structure links between the plant and the fungus. These values are related to the glomaline content in rhizosphere soil.

As for symbiotic effectiveness parameters, the contribution of fungal partner was evidenced on the variance of metabolic antioxidant compounds rate. Several possibilities can explain the lowest oxidative damage and the greatest plant biomass found in lavender plants colonized by autochthonous fungal strains. The alleviation of oxidative damage could be an important mechanism involved in the protective mechanisms of particular AM fungus against water limitation.

As results clearly show the autochthonous *G. mosseae*, isolates from the dry soil, was more efficient in increasing plant growth and nutrition under drought conditions than the two allochthonous fungus, less adapted and more sensitive to this stress. It suggest

that native AM strains, isolates from dry site, showed particular strategies of stress avoidance in colonized lavender plants when subjected to water limitation.

The highest K uptake by plants colonized by particular AM fungi may play a key role in the osmoregulation processes by lavender. K has an important role in controlling the water regime and as osmotic solute, is able to maintain a high tissue water level under drought conditions. The functions of K in osmotic processes are related to the K concentrations in plant tissue and as results show the reference; *G. mosseae*, were the strain more sensitive to this stress and exhibited different and the lowest tolerance mechanisms to drought. Nitrogen content was also higher in drought resistant AM colonized plants. It is well known that nitrogenous compounds (glicine, proline and betaines) are implicated in drought resistance of plants as osmotic constituents. Autochthonous *G. mosseae* leads to a lower drought-induced oxidative stress than the allochthonous strain due to the primary drought-avoidance mechanisms such as the higher N and K acquisition as well as to the ability of extraradical hyphae to take up water from sources less accessible (Ruíz-Lozano & Azcón 1996)

The inoculation with the native fungi *G. intraradices*, resulted in a stronger root than shoot enhancement compared to reference strain. As well, the fungal development of this fungus posses greater SDH or ALP-ase activities of AM mycelium and arbuscule production, which indicated a higher mycorrhizal vitality. Antioxidative plant defence was more assured by *G. intraradices* colonization as the reduced glutathione, catalase and H_2O_2 concentration in lavender tissues showed in the most efficient symbiosis indicating the relation between them and symbiosis tolerance. We assessed an important reduction of all these values in autochthonous *G. mosseae* colonized plants compared to reference strain.

Autochthonous *G. intraradices*, appears to offer the optimum for lavender growth and nutrition and consequently glutathione, ascorbate and H_2O_2 determined in shoot biomass were the lowest. In lavender plants, under these experimental conditions, the antioxidative response seem to be mainly assured by H_2O_2 , glutathione and ascorbate content than by antioxidative enzymatic activities SOD, CAT and GR here measured. Regarding, these values water stress seems not to be compensated in reference *G. mosseae*, and plant cells start using organic compounds, as osmotic, at the expense of growth (Niu *et al.* 1997).

Other mechanisms including ion transport, compartmentalization and oxidative protection may also explain the different resistance showed by more adapted and less-adapted AM fungi to drought.

When plants are suffering less stress due to a primary drought-avoidance effect caused by the specific symbiotic association, plants are protected against the generation of reactive oxygen species. Colonized plants increase the activities of enzymes involved in the elimination of active oxygen species. Nevertheless, the antioxidant activities assessed here (SOD, CAT and GR) did not change by the colonizing fungal strain. But, these antioxidants are synthesized in subcellular compartments in leaves and roots (Mittova *et al.* 2000) and determinations of these activities in the tissue homogenates

may not adequately reflect change in cell specific-compartments as reported Noctor & Foyer (1998).

Hydrogen peroxide, ascorbate and glutathione concentration measure were higher in allochthonous *G. intraradices* colonized plants. Hydrogen peroxide concentration is an important parameter index of many degenerative reactions associated with several stresses (Porcel *et al.* 2003). It has the ability to initiate reactions resulting in the production of hydroxyl radicals that provoke oxidative damage to biomolecules (Bowler *et al.* 1992). H_2O_2 is produced by several enzyme systems (Noctor & Foyer 1998). In some circumstances, the signalling potential and destructive power of reactive oxygen species (as H_2O_2) are used as defence mechanism (Foyer *et al.* 1997; Levine *et al.* 1994). H_2O_2 is a strong oxidant that oxidizes thiol groups. It is involved in the respiratory and photosynthetic electron transport. H_2O_2 is utilized as an effective means of defence and it could be of importance regarding alleviation of damage caused by drought stress. As well, glutathione reductase plays a relevant role in plant protection against biotic or abiotic stress (Aono *et al.* 1993). An enhancement in this enzymatic activity has been associated with increases in ascorbate contents, higher protection of ascorbate and glutathione pools against stress, lower sensitivity to photo inhibition and decreased foliar damage caused by the stress (Foyer *et al.* 1995).

Results from this study suggest that the consistently lower H_2O_2 , glutathione and ascorbate were indication of a lower oxidative damage to biomolecules. The induction of H_2O_2 , glutathione and ascorbate by water stress are biochemical marker of symbiotic tolerance and their protective role were widely reported. Their require to be induced in a lower amount when the microbial treatment selected caused a greater drought-tolerance and antioxidative defence against water stress. According to Burrit *et al.* (2002) plants prevent or reduce the production of reactive oxygen species by increasing the activity of enzymes required to generate ascorbate and glutathione. In this study, plants colonized by indigenous fungi have a lower amount of H_2O_2 , glutathione and ascorbate than the corresponding, drought sensitive fungal species, which is an indication of a drought-avoidance mechanisms by autochthonous species as expected.

Here, the antioxidative induction was negatively correlated with shoot and root biomass production and mycorrhizal development. The inoculation by autochthonous fungi caused not only a greater AM colonization but also the physiological and metabolic status of the symbiotic development. The inoculation by autochthonous fungi caused not only a greater AM colonization but also the physiological and metabolic status of the symbiotic development.

3.2.5. Acknowledgements

This study was supported by GLO FEDER-National Plan (REN2003-00968). A. M. acknowledges AEI for the financial support through a MAE Fellowship. We thank Dra. C. Lluch Plá and her group for the help in the determination of antioxidant activities, C. Cano for to give inoculants of fungi AM from de E.E.Z collection and R. Aroca for correcting english text.

Capítulo 4

UNA CEPA AUTÓCTONA TOLERANTE A LA SEQUIA DE *Glomus intraradices* ASOCIADA CON UNA BACTERIA AUTÓCTONA EN EL MEJORAMIENTO DEL TRANSPORTE DE AGUA Y DESARROLLO DE LA RAÍZ EN *Retama sphaerocarpa***Resumen**

Los efectos de las interacciones entre una bacteria (*Bacillus thuringiensis*) y dos aislados de hongos formadores de micorriza arbuscular (AM) de *Glomus intraradices*, como especies adaptadas a la sequía fueron evaluados en *Retama sphaerocarpa*, una leguminosa adaptada a la sequía. Los aislados fúngicos fueron uno autóctono tolerante a la sequía y uno no autóctono sensible a la sequía. Se evaluó el crecimiento de la planta, el desarrollo de la raíz, los parámetros simbióticos, el transporte de agua en relación con la respectiva captación de agua de la planta (%) y humedad volumétrica del suelo y las actividades enzimáticas del suelo en respuesta a las inoculaciones microbianas. Las plantas de retama colonizadas con *G. intraradices* más *B. thuringiensis* presentaron similar altura después de 30 días de siembra que las plantas de retama no inoculadas después de 150 días. La inoculación con la bacteria adaptada a la sequía incrementó el desarrollo de la raíz un 201%, pero el máximo crecimiento fue obtenido con la coinoculación de *B. thuringiensis* y el *G. intraradices* autóctono. Los nódulos fueron formados solamente en plantas colonizadas por el hongo de AM de autóctono. La captación de agua respectiva fue mayor en las plantas de retama inoculadas que en las plantas no inoculadas y concomitantemente estos inoculantes agotaron el contenido de agua del suelo. Las plantas colonizadas con *G. intraradices* obtuvieron similar altura independientemente del origen fúngico, pero había diferencias poderosas en la respectiva captación de agua por las plantas colonizadas por cada uno de los hongos. Las raíces colonizadas con *G. intraradices* autóctono [valorado como el más funcional con la tinsión ALP] mostraron mayor intensidad (M) y la riqueza arbuscular (A) cuando se asociaron con *B. thuringiensis*. Los efectos microbianos interactivos sobre plantas de retama fueron más relevantes cuando los microorganismos autóctonos estaban involucrados. La co-inoculación de microorganismos autóctonos redujo la cantidad de agua requerida para producir 1 mg de parte aérea un 42 %. Esta es la primera evidencia de la efectividad de la bacteria rizosférica sola o asociada con hongos AM, incrementando la captación de agua en la planta, el cual representa un efecto microbiano positivo en el crecimiento de las plantas crecidas bajo ambientes de sequía.

Palabras clave: Captación de agua, mejoramiento, hongos MA, bacteria, *G. intraradices*

**AN INDIGENOUS DROUGHT-TOLERANT STRAIN OF *Glomus intraradices*
ASSOCIATED WITH A NATIVE BACTERIA IMPROVES WATER TRANSPORT AND
ROOT DEVELOPMENT IN *Retama sphaerocarpa***

Abstract

The effects of interactions between a drought adapted bacterium (*Bacillus thuringiensis*) and two isolates of *Glomus intraradices*, as arbuscular mycorrhizal fungi (AM), were investigated on *Retame sphaerocarpa*, a drought-adapted legume. The fungal isolates were an indigenous drought-tolerant and a non-indigenous drought-sensitive. Shoot length and root growth, symbiotic parameters, water transport in terms of relative plant water uptake (%) and volumetric soil moisture and soil enzymatic activities in response to microbial inoculations were evaluated. Retame plants colonized by *G. intraradices* plus *Bacillus* possessed similar shoot length after 30 days from sowing than non-inoculated retame plants after 150 days. The inoculation with drought-adapted bacterium increased root growth by 201%, but the maximum root development was obtained by the coinoculation of *B. thuringiensis* and the indigenous *G. intraradices*. Nodules were formed only in plants colonized by autochthonous AM fungus. The relative water uptake was higher in inoculated than in non-inoculated retame plants and concomitantly these inoculants depleted soil water content. *G. intraradices*-colonized retame reached similar shoot length irrespectively of the fungal origin, but there were strong differences in relative water uptake by plants colonized by each one of the fungi. Indigenous *G. intraradices*-colonized roots [evaluated as functional ALP staining] showed the highest intensity (M) and arbuscule richness (A) when associated with *B. thuringiensis*. The interactive microbial effects on retame plants were more relevant when indigenous microorganisms were involved. Co-inoculation of autochthonous microorganisms reduced the water required to produce 1 mg of shoot biomass by 42%. This is the first evidence of the effectiveness of rhizosphere bacterium singly or associated with AM fungus in increasing plant water uptake which represent a positive microbial effect on plants grown under drought environments.

4.1. Introduction

Drought stress is considered one of the most important ecological factors limiting plant establishment and survival (20). Microbial communities are able to develop a range of activities which are very important in maintaining a biological balance and sustainability in soil particularly under stress conditions (6, 18). In stressed areas plants are more dependent on microbial activity and the microorganisms are able to enhance their metabolic activity to combat stress (29).

Apart from the natural protection system that plants possess against stresses, plants interact with a variety of soil microorganisms that can alleviate the stress symptoms (47).

The plant root and surrounding soil form an interface where plant root and soil

constituents interact with saprophytic and symbiotic microorganisms (4, 5). Ecophysiological studies demonstrated that arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis is important in drought stress protection.

It is accepted that the role of arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis in contributing to plant establishment, growth and drought-tolerance when growing under water-stress conditions is the results of the sum of nutritional, physiological and cellular effects (2, 36, 37).

Recent studies by our group investigated the effectiveness of bacterial inoculation (*Bacillus* sp.) on the development and physiology of the AM symbiosis (47). In AM colonized plants, grown under axenic conditions, the inoculation with *Bacillus* sp. enhanced fungal development and metabolism. Under stress conditions, the bacterium also had an important stimulatory effect on the development of *G. intraradices*. The plant-gas exchange and other plant physiological values were modulated by the bacterium. Changes in photosynthetic rate affect the translocation of soluble sugars to the root which can enhance the metabolic activity of the fungus in the root. The highest amount of active AM mycelium developed by this fungus was obtained after the co-inoculation with this bacterium. Nevertheless, this investigation was done under particular environmental conditions since plants were grown in a soilless medium and nutrients were sequentially supplied, in an available form, along the plant growth period (47).

Recent studies have reported that different AM fungi are highly variable in their tolerance to drought stress (23). But there is not information on improving plant water uptake.

Therefore the objectives of this study were a) to compare the effect of autochthonous microorganisms as *B. thuringiensis* and an *G. intraradices* strain, isolated from a dry Mediterranean area, with a non-autochthonous *G. intraradices* strain from collection (isolate BEG 123) not adapted to drought; b) to determine the effect of the interaction between *B. thuringiensis* with each one of the AM isolates on plant tolerance to drought stress. The comparative effects were measured in terms of plant growth, relative plant water uptake and volumetric soil moisture, symbiotic parameters and soil enzymatic activities.

4.2. Materials and Methods

4.2.1. Experimental design

The experiment consisted of non-mycorrhizal controls with or without inoculated with an autochthonous strain of *B. thuringiensis* and two arbuscular mycorrhizal fungi, which were assayed singly or in co-inoculation with *B. thuringiensis*. The two fungal strains were *G. intraradices* autochthonous from mediterranean soil and *G. intraradices* from collection (BEG 123). All treatments were replicated five times with a total of 30 pots and placed in a random complete block design.

4.2.2. Soil characteristics

A calcareous loamy soil from a Mediterranean zone (Spain) was sieved (2 mm), diluted with quartz-sand (<1 mm) (1:1 soil:sand v/v) and sterilized by steaming (100°C for 1 h along 3 days). The soil pH was 7.2 (water) and contained 1.6% organic matter. Nutrient concentrations were: 2.1 mg Kg⁻¹ N; 1.7 mg Kg⁻¹ P (NaHCO₃-extractable P); 0.8 mg Kg⁻¹ K. The soil texture was made up of: 57.8% sand, 19% clay and 23.2% silt.

4.2.4. Microbial selection and soil inoculation

The soil samples for microbial inocula production were taken from the described Mediterranean soil. The predominant bacterium and autochthonous AM fungus were isolated from this soil, and were cultivated for inocula production.

The bacterial isolation was carried out following the conventional procedure: briefly 1g of homogenized rhizosphere soil was suspended in 100 mL of sterile water (dilution 10²) and 1mL of this suspension was serially diluted to reach dilutions 10⁴ to 10⁷. These were plated in agar nutrient broth medium (8 g L⁻¹) and cultivated for 48 h at 28°C.

Once selected the most abundant bacterial type, it was independently grown in 250 mL flasks containing 50 mL of nutrient broth (8 g L⁻¹) medium in shake culture. The predominant indigenous mycorrhizal inoculum was isolated by wet sieving and decanting (45). It was morphologically identified as a *G. intraradices*. The mycorrhizal inoculum was bulked in an open-pot culture of red clover and consisted of soil, spores, mycelia and infected root fragments having a colonization of 70%. Ten grams of mycorrhizal inoculum were added to corresponding pots at transplanting time just below the root of clover seedlings.

A second strain of *G. intraradices* (isolate BEG 123) from our collection was used as a reference inoculum. It was also bulked in an open-pot culture of clover. The AM inoculum consisted of ten grams of soil, spores, mycelia and infected roots fragments with 80% of colonization. It was added to the appropriate pots at transplanting time just below the clover seedlings.

The bacterial strain was later identified as a *B. thuringiensis* (47) It was the most abundant cultivable bacterial type in such a soil. In the corresponding, pots seedlings were inoculated with 1 mL of bacterial culture (10⁸ cfu mL⁻¹) grown in nutrient broth medium for 24-48 h at 28° C of temperature. The bacterial culture was centrifuged at 4000 rpm for 5 min and the sediment was resuspended in sterilized tap water. The bacterial suspension contained 10⁸ cfu mL⁻¹. The bacterium was inoculated at transplanting time over the root of the root of the clover seedlings and 15 days later. A suspension of *Rhizobium* sp (non-identified autochthonous strain) was added to each pot (1 mL, 10⁸ cfu per pot). It was prepared following standard procedure (3).

Part of the pots having 500 g of sterilized soil/sand (mixture) were inoculated with the *G. intraradices* selected from the original mediterranean soil or with the reference *G. intraradices* (BEG 123, reference strain). Non mycorrhizal pots received the same amount of autoclaved inoculum. Together with a 2mL aliquot of a filtrate (<20 mm) of the AM inoculum to provide a general microbial population free of AM propagules.

4.2.5. Plant growth conditions

The test plant selected for the present study was *Retame sphaerocarpa*, which is a legume plant commonly used for re-vegetation purpose in Mediterranean areas characterized by infertile soils (low N, P, other nutrients and organic matter) (10).

Plants of *Retame sphaerocarpa* were grown for five months in the 500 mL pots in a greenhouse under controlled climatic conditions (18-24°C, with a 18/6 light/dark period and 50% of relative humidity). A photoperiod of 16h at a photosynthetic photon flux density (PPFD) of $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ as measured with a light meter (model LI-188B; Licor Inc., Lincoln, NE, USA) was maintained along the experiment by supplementary light to compensate natural illumination.

The seedling was grown during 4 weeks before transplanting under conditions of high humidity. Once transplanted, the water was supplied daily to maintain constant soil water close to field capacity (17% volumetric soil moisture) during the following 6 weeks. After this time, and during a period of 15 weeks, these plants were allowed to dry until the soil water content was 80% of field capacity (13% volumetric soil moisture).

4.2.6. Measurements

Plants were harvested five months after transplanting. The dry biomass of roots, nutrients related water parameters and symbiotic development (mycorrhizal infection and nodulation) were determined.

Soil moisture was measured with a ML2x ThetaProbe (AT Delta-T Devices Ltd, Cambridge, UK), which measures volumetric soil moisture content by responding to changes in the apparent dielectric constant of moist soil (1, 35, 48).

However, during the 24h-period comprised between each rewatering the soil water content was progressively decreasing until a minimum value of 70% of field capacity.

Water uptake by unit of shoot was calculated as the ratio between volumetric soil moisture and plant shoot yielded.

Shoot concentrations (mg g^{-1}) of N (micro-Kjeldahl) and K (21) were, measured.

Roots were carefully washed and then divided into three batches: one was stained by the classical non-vital trypan blue (TB) staining (31) and the others were used for histochemical vital staining succinate dehydrogenase (SDH) or alkaline phosphatase (ALP) activities in order to measure total (TB), living (SDH) or active (ALP) AM fungal development.

SDH and ALP activities were determined according to procedures described (38, 41). Root fragments were then stained overnight at room temperature and cleared for 15-20 min in 1% active chlorine solution in sodium hypochlorite.

Mycorrhizal development, was also evaluated (42) and expressed as intensity of AM colonization "M", gives an estimation of the amount of root cortex that became mycorrhiza and is referred to the whole root system. "A" is the arbuscule abundance and gives an estimation of the arbuscule richness in the whole root system.

In rhizospheric soil, acid phosphatase activity was determined using *p*-nitrophenyl phosphate disodium (PNPP, 0.115 M) as a substrate (30). The *p*-nitrophenol (PNP) formed was determined in a spectrophotometer at 398 nm (40). The amount of PNP was determined in a spectrophotometer at 398 nm (40).

Dehydrogenase activity was also determined (12) and INTF was measured spectrophotometrically at 490 nm.

The indole acetic acid (IAA) in rhizospheric soil was determined by a colorimetric method developed by (26) and (14). Then the absorbance of the red solution was measured with a spectrophotometer (Turner Model 350) adjusted to a wavelength of 535nm (49).

4.2.7. Molecular identification of the bacterial strain

Total DNA from bacterium was obtained as described (13, 46)

4.3. Results

The inoculation with *Bacillus thuringiensis* increased shoot length by 34% as compared to the control plants, and increased plant colonization by the reference and the autochthonous strains by 38% and 42%, respectively (Fig 1).

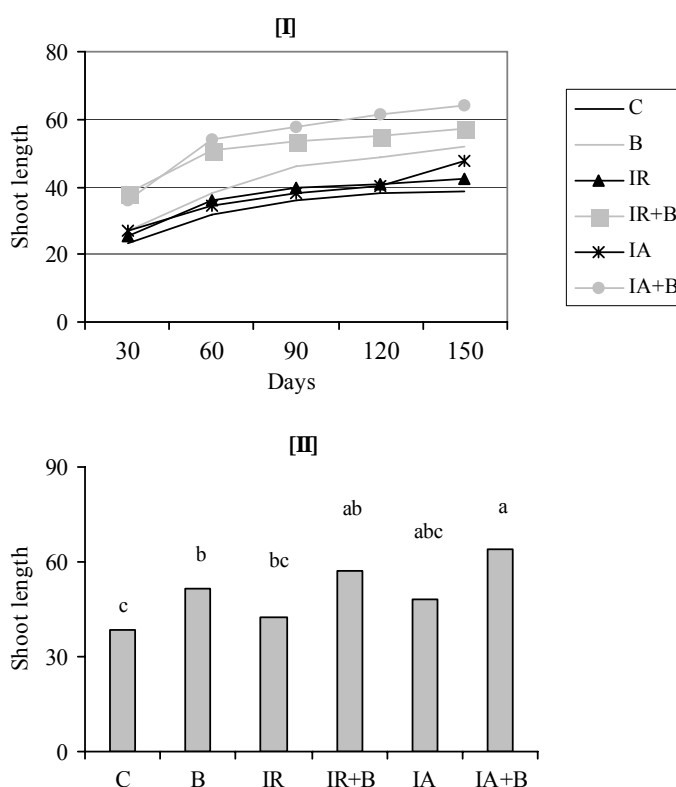


Fig. 4.1. Effect of *Bacillus* sp. (B) or *G. intraradices* [autochthonous (IA) or from collection (IR)] with or without B on retame shoot length (cm) in time-course after 30, 60, 90, 120 and 150 days of sowing [I] and at yield time [II] compared to non-inoculated control (C) plants.

Means followed by the same letter are not significant different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple

The bacterial effect was more evident regarding root improvement for the autochthonous strains (Table 1).

In non-mycorrhizal control plants, the bacterial strain increased root development by 101%. This effect of the bacterium in enhancing root development was similar to the effect of AM-colonization in single inoculated plants. Nevertheless, retame plants achieved further root development after co-inoculation with indigenous *G. intraradices* and *B. thuringiensis* that enhanced root biomass by 140% over non-inoculated plants (Table 1).

All retame plants were inoculated with the appropriate culture of *Rhizobium* sp. but non-mycorrhizal plants and plants colonized by reference *G. intraradices* did not form nodules under these experimental conditions (Table 1). In fact, nodulation was evident only in plants colonized by the indigenous *G. intraradices*. The coinoculation of this fungus with the bacterium did not affect the formation of this symbiotic structure (Table 1). Inocula clearly reduced water uptake by shoot unit (Table 2). This is a relevant microbial effect for plants growing in dry soils. The lowest amount of water required for producing 1 mg of shoot tissue was observed in plants colonized by autochthonous microorganisms (IA+B). This treatment reduced by 42% the water acquired in non-inoculated control plants (Table 2).

Time course measurements showed the effectiveness of dual inoculations in shortening the juvenile growth period of retame. In fact, after 30 days of transplanting the shoot length of dually-inoculated retame were similar to control plants after 150 days of transplanting (Fig 1).

In the comparative effect of both *G. intraradices*, the autochthonous isolate increased the relative plant water uptake, in a higher extend than the reference AM, while the increase in shoot lengths was similar for both fungi.

Nitrogen and K plant acquisition were increased by 61% (N) and by 48% (K) when the most effective microbial treatments (combination of indigenous microorganisms) were applied (Fig 2).

The relative plant water uptake was determined as an index of pot water loss (Fig 2). Setting the water uptake of control plants as 100% there were important differences when comparing non-treated with the inoculated plants. Differences in such values ranged from 101.8 % (single *B. thuringiensis* inoculated plants) to 113.8% (autochthonous *G. intraradices*-colonized plants).

Mycorrhizal plants increased the daily water loss and *B. thuringiensis* only changed this physiological process when it was applied together with the reference fungus. The volumetric soil moisture in non-mycorrhizal soil (and *B. thuringiensis* treatments) decreased in single or dually AM inoculated soil (Fig. 2).

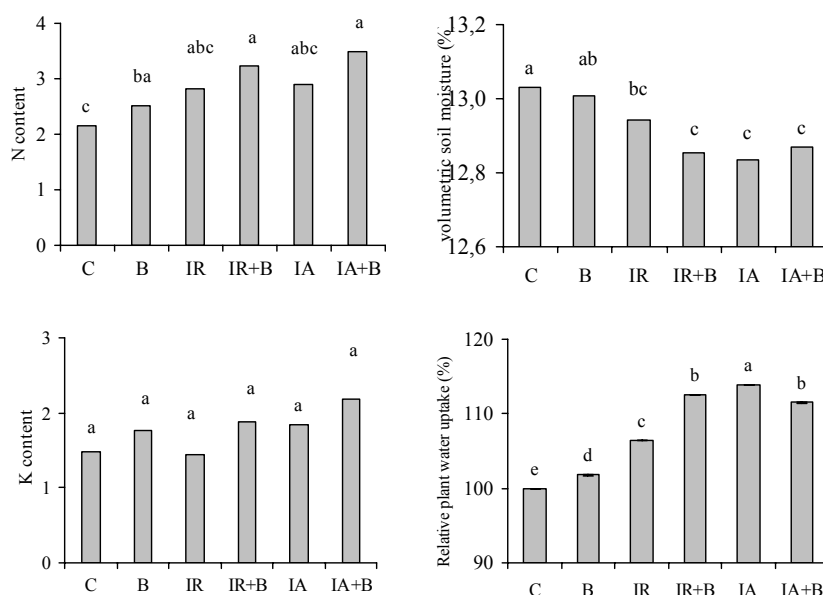


Fig 4.2. Effect of *Bacillus* sp. (B) or *G. intraradices* [autochthonous (IA) or from collection (IR)] with or without B compared to non-inoculated control (C) retame N on content (mg); K content (mg); percentages of volumetric soil moisture and relative plant water uptake in retame plants. Means followed by the same letter are not significant different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test ($n=5$).

Mycorrhizal colonization was tested after TB, SDH or ALP staining to estimate total (TB) living (SDH) and functional (ALP) fungal colonization (Fig 3).

Colonization intensity (M) and arbuscule richness (A) was similar in all TB stained root irrespective of the applied treatments. The highest arbuscular vitality (SDH staining) was observed in plants colonized by autochthonous *G. intraradices* in coinoculation with *B. thuringiensis*. Similarly, a greater hyphal (M) and arbuscular (A) activities (ALP staining) were observed in plants colonized by autochthonous *G. intraradices* than in those colonized by reference *G. intraradices* but in both mycorrhizal treatments *B. thuringiensis* maximized functionality of both fungal developments (M and A) (Fig 3).

Nevertheless, *B. thuringiensis* was only effective in increasing arbuscule richness and activity when associated with the autochthonous endophyte (Fig. 3).

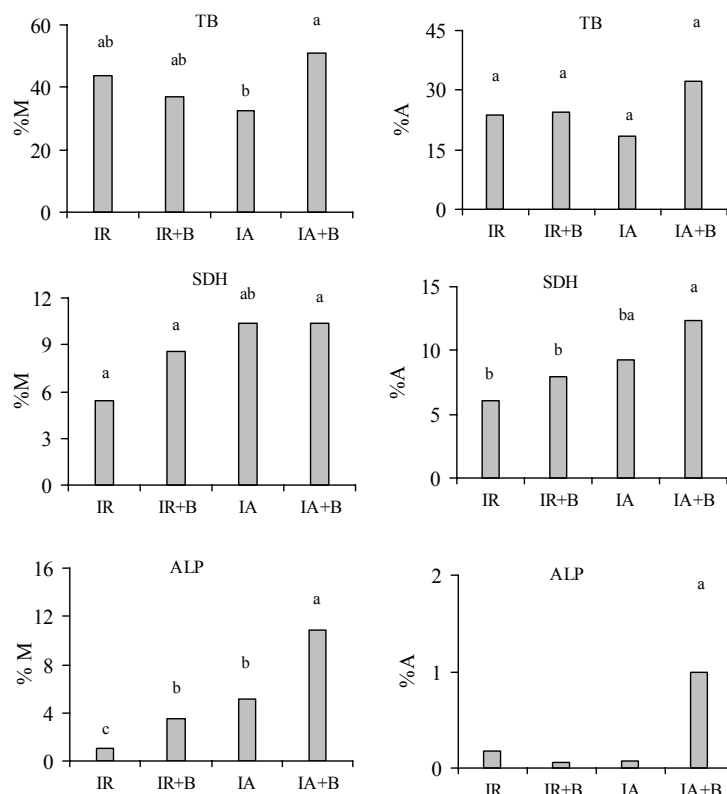


Fig.4.3. Effect of *Bacillus* sp. on retame AM colonization by *G. intraradices* [autochthonous (IA) or from collection (IR)] as measured by Trypan blue (TB), succinate dehydrogenase (SDH) or alkaline phosphatase (ALP) staining. % M is the colonization intensity and % A is arbuscule abundance both (M and A) relative to the whole root system. Means followed by the same letter are not significant different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test ($n=5$).

Regarding AM-colonizing processes, indigenous *G. intraradices*-colonized roots showed higher ALP functional activity than reference *G. intraradices* particularly when associated with *B. thuringiensis*.

No AM colonization was formed in non-inoculated plants.

No general trends were observed in soil enzymatic activities (phosphatase, -glucosidase and dehydrogenase) (Fig 4). The highest dehydrogenase activity was observed in the rhizosphere of (AM +B) inoculated plants with the indigenous. The inoculation with the *B. thuringiensis* increased this enzymatic activity in control and *G. intraradices*-colonized soil. In fact, all the treatments applied increased dehydrogenase activity in rhizosphere soil (Fig 4). On the contrary, -glucosidase as well as phosphatase activities were mainly increased by *G. intraradices* from collection while autochthonous *G. intraradices* was less effective than that of reference but the *B. thuringiensis* decreased both activities. Indol acetic acid (IAA) in the rhizosphere did not change by the treatments applied (Fig 4).

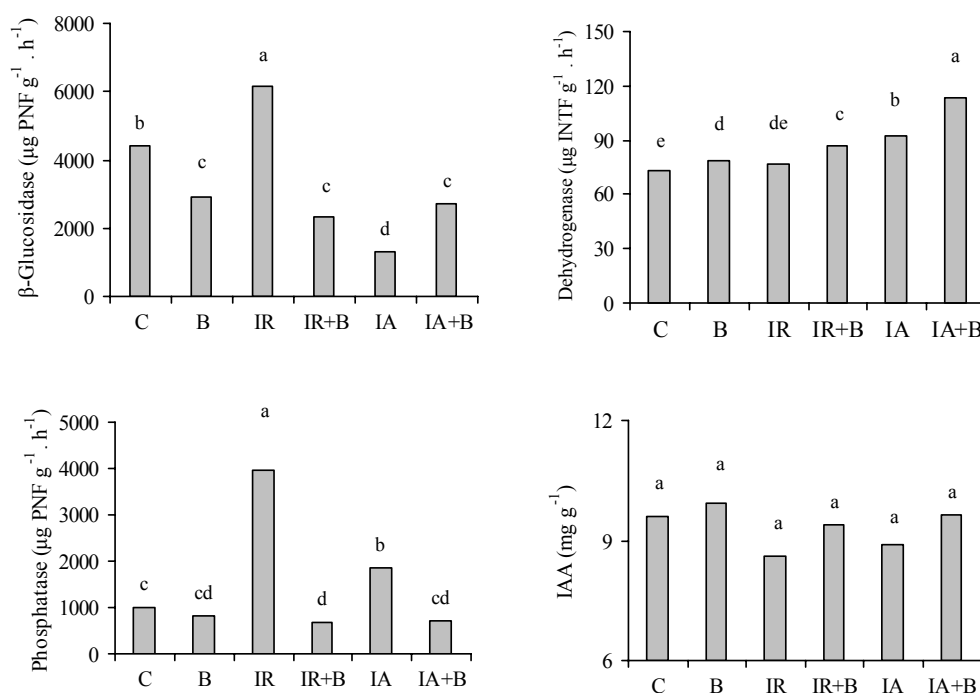


Fig 4.4. Effect of *Bacillus* sp (B) or *G. intraradices* [autochthonous (IA) or from collection (IR)] with or without B on b-glucosidase, Phosphatase, Dehydrogenase activity and Indol-acetic-acid (IAA) content in rhizosphere of retame compared to non-inoculated control (C) plants. Means followed by the same letter are not significant different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test ($n=5$)

4.4. Discussion

Retama sphaerocarpa is a key component for preventing the processes of erosion and desertification in semiarid and arid areas (10, 34). The root system of this plant has access to deep water sources and thus is able to support the typical droughts of arid and semiarid areas. In this study native *G. intraradices* was more effective in improving root growth and relative water uptake in retame plants than the reference fungus. Our results showed the range of plant responsiveness to AM colonization which varied according to the origin of AM fungus and associated microorganisms. Knowledge about characteristics of indigenous AM isolates to stresses adaptation and the improvement of plant drought tolerance (in terms of plant water uptake and growth) is of a great interest regarding the possible use of microbial inoculation for revegetation practices under drought conditions. The autochthonous *G. intraradices* was also more effective for active AM colonization and nodule development than the reference *G. intraradices*.

According to these and other reported results (22), it is important to know the particular effectiveness of microbial isolates and the intrinsic capacity to maintain plant stress tolerance and adaptation under a range of stress conditions. This fact could indicate a level of ecological adaptation of the microbial groups to the environment. The elimination of microbial populations leads to problems with plant establishment, survival and development (5, 32, 33, 34).

The rhizobial association in this legume plant is a source of N input in the soil and thus it can be considered as very important in revegetation strategies. In any way the limited water, nutrients and poor quality of soils in semiarid zones the reforestacion strategies involving this plant is scarce. Water is one of the main factors controlling the effectiveness of AM-colonization (1). In nodulating plants the highest growth as a result of symbiotic associations, must be taken into account in future re-vegetation of degraded soils.

Therefore, the application of the most effective microbial groups is recommended for a better plant establishment. But one important aspect for applying successfully microbial inoculants is the appropriate selection of effective isolates. Our results showed that the successful survival and development of retame plants in degraded dry soils are highly dependent upon the activity of autochthonous microbial populations. The improvement of retame establishment is achieved by microbial inoculants particularly those adapted to local conditions. Such microbial management can improve the biochemical soil properties in degraded areas. Root and associated microorganisms improved aggregates formation. Such improvement of structural stability of rhizosphere is very important in the recovery of soil in semiarid areas. The aggregate stabilization has a biological origin (9).

The presence of PGPR microorganisms (bacteria and/or AM fungi) antagonize the negative effect of detrimental factors caused by lack of nutrients, organic matter presence or drought, (17). Nevertheless, different isolates of the same *Glomus* sp. were found to show variability in their tolerance and adaptation to detrimental factors (28, 47). Inoculated plants responded better to native symbionts adapted to the environmental conditions, and showed the highest effectiveness in terms of root development and symbiotic parameters. Isolation of indigenous and presumably drought-stress-adapted microorganisms was able to increase the survival and to stimulate plant growth in a higher extent than non-indigenous, exotic, isolates as was determined in terms of relative plant water uptake. The results highlighted that fungal isolates within one species can vary in their symbiotic effectiveness (27) which is a function of the compatibility of the fungus and other soil microorganisms with plant in the mycorrhizosphere environment. Comparable shoot growth of AM colonized plants (by native or non-adapted fungus) did not result in a comparable volumetric soil moisture or relative plant water uptake. These results suggest that native drought adapted fungus can particularly affect physiological capacities in colonized plants. The adaptation to drought of AM plants may be caused by changes in transpiration and stomatal control (36, 37). Such effects could be due to a highest root and/or hyphal development.

According to Koide (19) mycorrhizal roots can have higher volume of water absorbed per unit of root length than non-mycorrhizal roots apart from a direct hyphal water uptake. Mycorrhizal colonization might indirectly increase water uptake by improving root conductance to water flow and directly via extraradical mycelium that might transport water to mycorrhizal roots (8, 36). According to the results, plants colonized by each one of the two AM fungus depleted soil water to a higher extent than non-mycorrhizal plants. The highest volumetric soil moisture was tested in soil colonized

by autochthonous *G. intraradices* and resulted in an increasing of (by 113,9%) relative plant water uptake. *B. thuringiensis* did not change the percentage of volumetric soil moisture.

Changes in the affinity of nutrients uptake and threshold concentration by AM colonization are also based on physiological and structural root characteristics.

The greatest shoot biomass production was reached in autochthonous *G. intraradices* plus *Bacillus thuringiensis* inoculated plants and this treatment did not show the maximum soil water consumption. The highest water use efficiency, not determined here, may probably be involved in this effect. In addition, it is known (16, 16, 25) that extraradical mycelium increases soil aggregation which is related to the hydraulic continuity in the soil. *B. thuringiensis* effectiveness in increasing root elongation in retame may be relevant on water uptake (15). In addition it may produce exocellular polysaccharides able to stabilize aggregates (7).

Here is demonstrated the ability of native-adapted microbial interactions to maintain and to enhance the proportion of AM intraradical active mycelium (ALP staining) throughout the experiment. The soil here used caused limited symbiotic developments (AM-colonization and nodulation) but the management of native microorganisms (AM fungus and the bacterium) resulted in a very efficient inocula for increasing nodulation, mycorrhization and consequently plant establishment. A close relationship seems to exist between the quality of AM colonization and the plant growth responses as in this study was observed.

Non-autochthonous *G. intraradices* was also able to colonize plant roots and to promote plant growth under dry conditions. It is assumed that any association between microbial population not inhabiting the same rhizospheres, as reference *G. intraradices* and *B. thuringiensis* are, may be functionally incompatible.

These results confirm the importance of some characteristics related to the effectiveness of autochthonous microorganisms in dry soils, which resulted in a greater nutrient acquisition and relative plant water uptake. In addition, they showed that the ability of autochthonous *G. intraradices* for increasing plant development is highly related to its effect to increase root biomass and its interaction with the autochthonous *B. thuringiensis*.

Differences between both *G. intraradices* in the development of mycelium (M) and arbuscules (A) were only observed in terms of activity (ALP staining) particularly M (intensity of infection) that was highest with the autochthonous AM strain. The highest development of arbuscule (A), in terms of activity and quantity, by autochthonous fungus, inoculated with *B. thuringiensis*, must account for a greatest nutrients transfer between symbionts (44). As soil inoculum potential depends on the number of active propagules, the stimulating effect of *B. thuringiensis* can be used for increasing such a potential as shown here.

The most important differences between the isolates of *G. intraradices* used were observed in terms of the relative plant water uptake (%) that was higher than the control by 106,4% in the case of the reference *G. intraradices*-colonized plants and by 113,9% in

autochthonous *G. intraradices*-colonized plants. The positive benefit from *B. thuringiensis* inoculation was particularly shown on root growth. Such effectiveness was stronger in single inoculation than in co-inoculation with either AM isolates. The bacterial effect may be attributed to several mechanisms other than the secretion of plant growth hormones, as indicated by indol-acetic-acid (IAA) determined in the rhizosphere. In fact, phytoactive substances can cause morphological and physiological changes in the root system (11). Biological changes in the rhizosphere soil promoted by the microbial inoculants, applied in this study, were evaluated as soil enzymatic activities (index of the soil/plant system functioning).

Soil microbial activities are required to assess soil quality. Soil enzymatic activities are sensitive indicators of changes produced in soil by environmental conditions as drought. Nevertheless, there are few studies which use these biological values to indicate soil quality in systems treated with microbial inoculants. These biological parameters related to soil microbial activity are used as indicators of changes produced by management practices as microbial inoculation (30). These activities are sufficiently sensitive to give an indication about ecosystem functioning. In fact, oxidoreductases as dehydrogenase are responsible of oxidative processes in soil. Regarding these results, except IR inoculation, all the microbial treatment applied increased this parameter. This enzymatic activity depends on the metabolic state of soil biota and microbial activity (12). The inoculation with IA+B was the most effective treatment in increasing dehydrogenase activity. On the contrary, phosphatase activity was particularly increased by this IR treatments. It was reported (30) that his hydrolase activity, albe of hydrolysing organic phosphate esters, decreased with the inoculation of *Pseudomonas fluorescens*.

Results indicate the positive effect and interaction on plant growth under drought conditions of adapted microorganisms (AM fungus and *B. thuringiensis*). Such effectiveness in increasing the potentiality of inocula is concomitant with a highest plant growth, N and K nutrition and values related to relative plant water uptake and volumetric a soil moisture. This study reinforces the benefit of manipulating autochthonous microorganisms.

Retame, as some other legume plants, can be used for re-vegetation of dry soils with low availability of nutrients (43). The mechanisms of stress tolerance may involve an increase in root development, promotion of mineral nutrition and water uptake (37). Thus, AM fungi and rhizosphere bacteria are considered as an alternative plant strategy for coping with environmental limitations. As it was shown here, the combination of microbial groups may be used to increase the plant growth stimulating effects and survival of retame plants used in re-vegetation programmes.

Capítulo 5

EFFECTOS OPUESTOS DE UNA CEPA DE *Bacillus megaterium* EN EL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS DE *Lactuca sativa* DEPENDIENDO DEL HONGO MICORRÍFICO ARBUSCULAR CO- INOCULADO: ASPECTOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS**Resumen**

La co-inoculación con Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) y de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) ha sido propuesta como biofertilizante para disminuir la incorporación de fertilizantes químicos al ambiente, y mejorar el crecimiento de las planta bajo condiciones adversas. Se utilizaron tres hongos MA diferentes en interacción con una cepa de *Bacillus megaterium* autóctona de zonas mediterráneas del sureste de la península ibérica (suelos calcáreos) en plantas de *Lactuca sativa* L. La inoculación con *B. megaterium* incrementó el crecimiento de las plantas en combinación con dos de los aislados fúngicos (*G. constrictum* autóctono, GcA y *G. intraradices* comercial, GiC), pero este parámetro decreció en combinación con *G. constrictum* de referencia, GiR). Al mismo tiempo, las plantas inoculadas con el hongo GcR sólo o en combinación con *B. megaterium* (GcR+Bm) mostraron síntomas de estrés (daño en hojas) como acumulación de prolina o reducción en el contenido de pigmentos fotosintéticos, mientras que lo contrario sucedió en las plantas co-inoculadas con el hongo GiC y *B. megaterium* (GiC+Bm).

Además, el tratamiento GcR+Bm presentó el nivel mas alto y mas bajo de las actividades enzimáticas glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G6PDH) y glutamina sintetasa (GS) respectivamente. Sin embargo, el tratamiento GiC+Bm presentó la actividad GS mas alta. Por lo tanto, proponemos el uso de estas dos actividades enzimáticas como marcadores de crecimiento saludable en las plantas de lechuga. También, destacamos la necesidad de verificar cada inóculos previamente a ser usados como biofertilizante en el campo, para ver las interacciones posibles con otros microorganismos del suelo.

Palabras clave: Hongos MA, Biofertilizantes, Asimilación de nitrógeno, Pigmentos fotosintéticos, Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), Prolina.

Opposite effects a *Bacillus megaterium* on *Lactuca sativa* L. growth depending on the arbuscular mycorrhizal fungi co-inoculated: Physiological and biochemical traits

Abstract

Co-inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) has been proposed as biofertilizers in order to diminish the release of chemical fertilizers to the environment, and to improve plant growth under adverse conditions. Here, we assayed how three different AMF isolates interacted with a *Bacillus megaterium* strain from a Mediterranean calcareous soil in *Lactuca sativa* L. plants growth. Inoculation with *B. megaterium* increased plant growth in combination with two of the AMF isolates (autochthonous *Glomus constrictum*; GcA; and commercial *G. intraradices*; GiC), but decreased it in combination with the other one (reference *G. constrictum*; GcR). At the same time, plants inoculated with GcR fungus alone or in combination with *B. megaterium* (GcR+Bm) showed leaf symptoms of stress injury as accumulation of proline or reduction in photosynthetic pigments amount, while the contrary happened in plants co-inoculated with GiC fungus and *B. megaterium* (GiC+Bm). Moreover, GcR+Bm leaves presented the highest and lowest glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and glutamine synthetase (GS) enzyme activities, respectively. On the contrary, GiC+Bm leaves showed the highest GS activity. Therefore, we propose the use of these two enzymes activities as markers of plant growth performance, at least in lettuce plants. Also, we raise the necessity of checking each inoculum previous to be used as biofertilizer in the field, to see the possible interactions with others soil microorganisms.

Key words: Arbuscular mycorrhizal fungi; Biofertilizers; Nitrogen assimilation; Photosynthetic pigments; Plant growth promoting rhizobacteria; Proline.

5.1. Introduction

Plants in nature need to cope with several adverse environmental conditions as are water deficit, high concentration of salts in the soil, extreme temperatures, nutrient deficiency, and pathological organisms (Bohnert *et al.*, 2006). However, plants interact with several soil microorganisms that make the plants more tolerant to such stresses (Selosse *et al.*, 2004; Barea *et al.*, 2005). Among soil microorganisms, plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are the most frequent and abundant in the rhizosphere (Barea *et al.*, 2002; Vessey, 2003). Thus, plants inoculated with PGPR or AMF usually grow better than non inoculated plants under conditions of nutrients limitation (Wu *et al.*, 2005; Canbolat *et al.*, 2006). Such beneficial effect is usually enhanced when both microorganisms are co-inoculated, although it depends on the bacteria-fungi pair inoculated (Galleguillos *et al.*, 2000;

Valdenegro *et al.*, 2001). Hence, the co-inoculation of both microorganisms has been postulated as an alternative method to keep soil fertility and plant health rather than agrochemicals in a sustainable agriculture (Artursson *et al.*, 2006).

Effects of co-inoculation of PGPR and AMF on plant growth and nutrients content have been largely studied (see Artursson *et al.*, 2006). At the same time, there are several mechanisms described by which PGPR can rise plant growth as are N₂ fixation, increasing availability of nutrients in the rhizosphere, enhancing beneficial effects of other symbionts, or diminishing plant ethylene production (Penrose and Glick, 2003; Vessey, 2003). However, as far as we know, there are no studies dealing with the effects of PGPR on plant primary carbon and nitrogen metabolisms, neither inoculated alone, nor co-inoculated with AMF.

Ammonium (NH₄⁺) is the only nitrogen inorganic compound that plants can assimilate into organic compounds via glutamine and glutamate (Lam *et al.*, 1996). Therefore, since nitrate (NO₃⁻) is the most nitrogen inorganic ion absorbed by roots, it needs to be reduced to NH₄⁺ before to be assimilated by the glutamine synthetase (GS)/glutamate synthase (GOGAT) cycle, which occurs predominantly in the leaves in most plant species (Andrews, 1986; Lam *et al.*, 1996; Hodges, 2002). The GS/GOGAT cycle needs carbon skeletons (essentially 2-oxoglutarate) to complete the cycle, which is provide among others by aspartate amino transferase enzyme (AsAT); Lam *et al.*, 1996; Hodges, 2002). Hence, there is a strong link between nitrogen and carbon metabolisms (Hodges, 2002; Stitt *et al.*, 2002).

The aim of the present research was to evaluate how different AMF isolates interacted with a PGPR (*Bacillus megaterium*) isolated from calcarean Mediterranean soil of the Southeastern Spain. For this purpose, *Lactuca sativa* plants were inoculated with three different AMF isolated from different soils, and co-inoculated or not with *B. megaterium*. Plants were then allowed to growth in the same soil from which the bacterium was isolated. In order to assay the interaction effects between bacterium and AMF, plant and fungi growth parameters, plant stress index traits, and some leaf nitrogen and carbon assimilatory enzymes activities were measured. Results indicated that the plant growth response to *B. megaterium* is depending on the AMF isolate that was co-inoculated, ranging from positive to negative effects.

5.2. Materials and methods

5.2.1. Biological Material and Experimental Design

Three seeds of *Lactuca sativa* L. cv. Romana were sown in pots containing 500g of 5:2 mixture of soil:sand y thinned to one seedling per pot after emergence. Soil was collected from Sierra de Baza, Granada, Spain, sieved (2 mm) and sterilized by steaming (100°C for 1h on 3 consecutive days). The soil had a pH of 7.2 (water); 1.6% organic matters, nutrient concentrations (mg Kg⁻¹): N, 2.1; P, 1.7 (NaHCO₃-extractable-P); K, 0.8. The soil texture was made up of 57.8% sand, 19.0% silt, and 23.2% clay.

Plants were divided in four groups and were no inoculated with any AMF or inoculated with one of the following AMF isolates: *Glomus constrictum* Trappe, isolate EEZ 22 (GcR); *G. constrictum* isolated from Sierra de Baza, Granada, Spain (GcA); and *G. intraradices* Shenk and Smith from a commercial company (GiC; MYCOSYM, Seville, Spain). Each AMF plant group was inoculated or not with a *Bacillus megaterium* strain isolated from a soil of the Sierra de Baza, Granada, Spain; the same soil used in the experiment and where the AMF GcA is from. For details of inoculum culture and application see Marulanda *et al.*, (2006).

Plants were irrigated daily with tap water to keep the soil at water capacity, and twice a week 10 ml of complete nutrient solution was added. Nutrient solution was as follow: 6 mM Ca(NO₃)₂, 6 mM CaCl₂, 3 mM KNO₃, 2.3 mM K₂SO₄, 1.5 mM MgSO₄, 1.3 mM NaH₂PO₄, 68 µM EDTA-Fe, 13 µM MnSO₄, 9 µM H₃BO₄, 1 µM CuSO₄, 1 µM ZnSO₄, 0.2 µM Na₂MoO₄. Plants were harvested 7 weeks after transplanting (56 days old plants). Some plants were used for growth and colonization porpoises, and others were immersed in liquid N₂ at harvest and stored at -80°C until used for biochemical determinations.

5.2.2. Plant and Fungal Growth Measurements

At harvest, plants were separated in shoots and roots and allowed to dry during 48 h at 75°C in an oven. Before that, all leaves of each plant were scanned (hp scanjet 5550c, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA), and the corresponding images were analyzed with Adobe Photoshop CS (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA). Root colonization by the mycorrhiza and extraradical mycelium growth were determined as described previously Marulanda *et al.*, (2003).

5.2.3. Proline and Photosynthetic Pigments Amount

Free proline was extracted from 0.3 g leaf tissue previously immersed in liquid N₂ and stored at -80°C. Proline amount was determined by spectrophotometric analysis at 515 nm of the ninhydrin reaction, according to Bates *et al.*, (1973). Photosynthetic pigments were extracted according to Aroca *et al.*, (2001), and extinction coefficients and equations reported by Lichtenthaler (1987) were used to calculate pigment concentrations.

5.2.4. Enzymes activities

Leaf tissues (300 mg fresh weight) were homogenized as described by Aroca *et al.*, (2003). Briefly, leaves were homogenized in a cold mortar with 4 ml 50 mM phosphate buffer (pH 7.8) containing 1 mM EDTA, 8 mM MgCl₂, 5 mM DTT, and 1% (w/v) PVPP. The homogenate was centrifuged at 27 000 g for 15 min at 4°C, and the supernatant was used for enzyme activity determination. Rubisco (EC 4.1.1.39) activity was determined as described by Lilley and Walker (1974). Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC, EC 4.1.1.31) activity was measured following the method of Usuda *et al.*, (1984). Aspartate aminotransferase (AsAT, EC 2.6.1.11) was assayed according to Hatch and Mau (1973). Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH, EC 1.1.1.49) was analyzed as described

by Fickenscher and Scheibe (1986). Finally, Nitrate reductase (NR, EC 1.6.6.1), glutamine synthetase (GS, EC 6.3.1.2), and glutamate synthase (GOGAT, EC 1.4.1.14) activities were assayed as described by Srivastava and Dwivedi (2003). Total soluble protein amount was determined using the Bradford method (Bradford 1976).

5.3. Results

5.3.1. Plant and Fungal Growth

We first investigated how the single or double inoculation had an effect on lettuce plant growth. Single inoculation with autochthonous *Glomus constrictum* (GcA) or commercial *G. intraradices* (GiC) increased shoot and total dry weights (DW) as well as leaf area in lettuce plants (Table 1). However, the increase in shoot DW and leaf area was higher in GiC plants than in GcA plants (Table 1). On the contrary, plants single inoculated with reference *G. constrictum* (GcR) did not show any increase in any of the plant growth parameters measured (Table 1). At the same time, neither GcA nor GiC inoculation had any effect on root DW (Table 1). On the other hand, inoculation with *Bacillus megaterium* (Bm) increased shoot DW and leaf area only in plants without mycorrhiza (NI) and in GiC plants (Table 1). At the same time, root DW only increased by Bm inoculation in GiC plants, although the total DW increased in NI, GcA and GiC plants (Table 1). On the contrary, lettuce plants co-inoculated with Bm and GcR were smaller than plants inoculated with GcR or Bm alone (Table 1). Hence, the tallest plants were those co-inoculated with GiC and Bm, and the smallest ones those co-inoculated with GcR and Bm (Table 1).

	Shoot DW (mg plant ⁻¹)	Root DW (mg plant ⁻¹)	Total DW (mg plant ⁻¹)	Leaf Area (cm ² plant ⁻¹)
NI	63 a	44 ab	107 ab	35 ab
Bm	96 bc	51 abc	147 de	53 cd
GcA	91 b	53 abc	144 cd	51 cd
GcA+Bm	108 bc	73 c	181 e	64 de
GcR	66 a	45 ab	111 bc	43 bc
GcR+Bm	48 a	26 a	74 a	27 a
GiC	112 c	65 bc	177 de	67 e
GiC+Bm	150 d	103 d	253 f	92 f

Table 5.1. Effects of Inoculation Treatments on Plant Growth Parameters. Different letters in each column indicate significant differences ($p < 0.05$) among inoculation treatments after ANOVA and Fisher LSD test. ($n=4$). NI: plants not inoculated; Bm: plants inoculated with *Bacillus megaterium*; GcA: plants inoculated with autochthonous *Glomus constrictum*; GcR: plants inoculated with reference *G. constrictum*; GiC: plants inoculated with commercial *G. intraradices*; +: co-inoculation; DW: dry weight

Later we analyzed some fungal growth parameters. No significant differences ($p > 0.05$) in the percentage of fungal colonized roots were found among single

mycorrhizal treatments (Figure 1A). Bm inoculation only raised percentage of colonized roots in GiC lettuce plants (Figure 1A).

Thus, GiC+Bm plants showed the highest percentage of root colonized by AMF, while GcR+Bm plants showed the lowest. Regarding extraradical mycelium growth, GcA fungi showed the highest growth, and GcR the lowest, showing GiC an intermediate growth (Figure 1B). Co-inoculation with Bm decreased the extraradical mycelium growth of the three fungi in approximately the same amount, although proportionally the descent was higher in GcR fungi (29%), and lowest in GcA one (15%), being in GiC of 17% (Figure 1B).

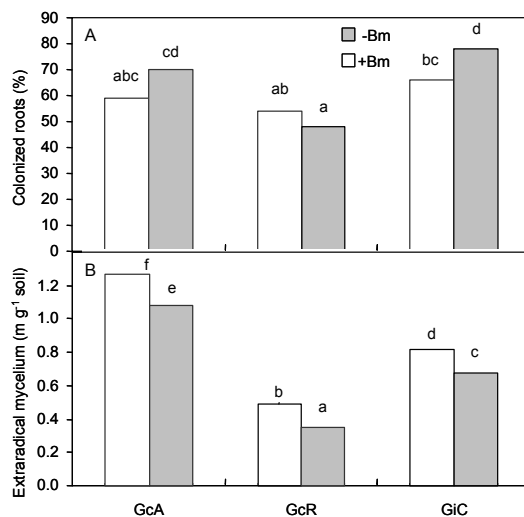


Fig 5.1. Percentage of colonized roots by arbuscular mycorrhizal fungi (A), and extraradical mycelium growth (B) of *Lactuca sativa* plants not inoculated (black columns) or inoculated with a *Bacillus megaterium* strain (white columns), and co-inoculated with an autochthonous *Glomus constrictum* fungus (GcA), or with a reference *G. constrictum* (GcR), or with a commercial *G. intraradices* (GiC). Columns with the same letter have not significant ($p > 0.05$) differences among them after ANOVA and Fisher LSD tests. Columns represent mean \pm SE ($n = 4$).

5.3.2. Proline and Photosynthetic Pigments Amounts

Since the growth parameters seemed to indicate that lettuce plants could be suffering from stress, we decided to measure the amount of shoot proline, a free amino acid that accumulates under stress conditions (Matysik Lam *et al.*, 2002; Rai Lam *et al.*, 2004). The shoots that showed higher values of proline amount were those inoculated with GcR fungi, especially those co-inoculated with Bm (Figure 2). The other group of plants did not showed any significant difference ($p > 0.05$) on shoot proline amount (Figure 2).

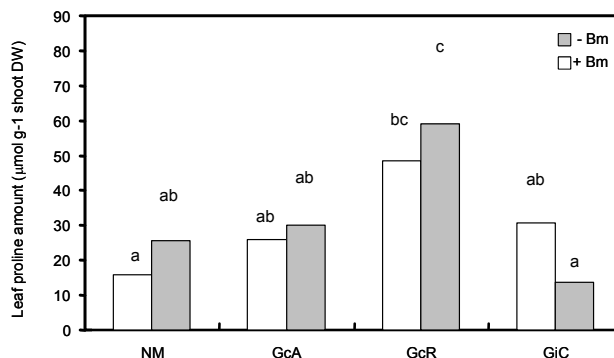


Fig 5.2. Leaf proline amount of *Lactuca sativa* plants not inoculated (black columns) or inoculated with a *Bacillus megaterium* strain (white columns), alone (NM) or in combination with an autochthonous *Glomus constrictum* fungus (GcA), or with a reference *G. constrictum* (GcR), or with a commercial *G. intraradices* (GiC). Otherwise as for Figure 1.

At the same time, it is known that photosynthetic pigments may be degraded under stress conditions (Rai Lam *et al.*, 2004; Kumar Lam *et al.*, 2006). Single inoculation with AMF GcA or GiC had no effect in either total chlorophylls or total carotenoids amount (Figure 3). However, single inoculation with AMF GcR diminished amount of both kind of pigments (Figure 3). Co-inoculation with Bm had no effect on pigments amount, except in plant inoculated with GiC, where a rise on total chlorophylls and carotenoids was observed (Figure 3). Thus, plants co inoculated with GiC fungus and Bm bacterium were the ones that had highest amount of photosynthetic pigments, while those inoculated with GcR had the lowest amount (Figure 3).

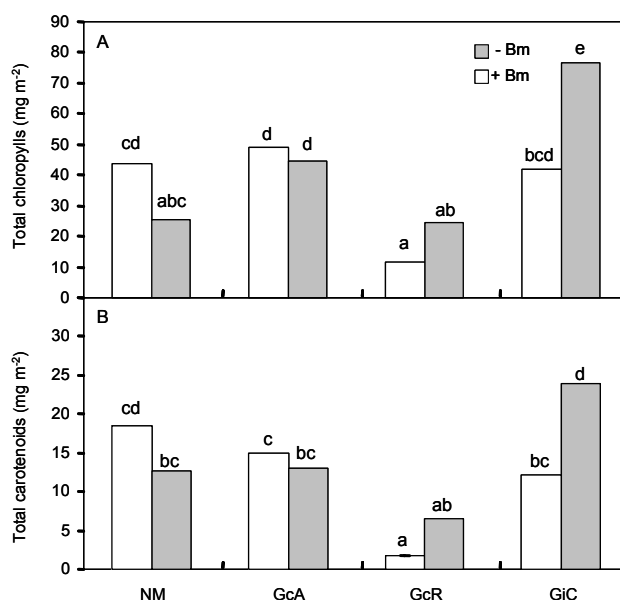


Fig 5.3. Total chlorophylls (A) and carotenoids (B) amount in leaves of *Lactuca sativa* plants not inoculated (black columns) or inoculated with a *Bacillus megaterium* strain (white columns), alone (NM) or in combination with an autochthonous *Glomus constrictum* fungus (GcA), or with a reference *G. constrictum* (GcR), or with a commercial *G. intraradices* (GiC). Otherwise as for Figure 1.

5.3.3. Carbon and Nitrogen Assimilatory Enzymes Activities

Finally, we measured some leaf carbon and nitrogen assimilatory enzymes activities in order to see some relationship with plant growth. No significant differences ($p>0.05$) among treatments in Rubisco, phosphoenol pyruvate carboxylase (PEPC), and glutamate synthase (GOGAT) were found (data not shown). Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity decreased by all of the fungal inoculants (Table 2). On the other hand, inoculation with Bm bacterium caused a diminution of G6PDH activity in NI leaves, no changes in GcA leaves, and an increase in GcR and GiC leaves (Table 2). Therefore, the highest G6PDH activity was recorded in GcR+Bm leaves and the lowest in GiC ones (Table 2). Aspartate aminotransferase (AsAT) and nitrate reductase (NR) activities showed similar trend. No significant differences ($p>0.05$) in their activity were found among treatments, except for plants inoculated with GcR fungus that had higher activities, being even higher in those co-inoculated with Bm (Table 2). Finally, no significant differences ($p>0.05$) among treatments was found for leaf glutamine synthetase (GS) activity, except for plants co-inoculated with GiC and Bm, that showed higher activity, and Bm and GcA+Bm plants that had higher activity than GcR+Bm ones (Table 2). Therefore, GiC+Bm leaves showed the highest activity of GS enzyme, and GcR+Bm ones the lowest (Table 2).

	G6PDH (nmol NADP ⁺ mg ⁻¹ protein min ⁻¹)	AsAT (nmol NADH mg ⁻¹ protein min ⁻¹)	NR (nmol NO ₃ mg ⁻¹ protein in ⁻¹)	GS (nmol ATP mg ⁻¹ protein min ⁻¹)
NI	14.2 d	139 a	51 a	378 ab
Bm	7.1 c	480 ab	62 a	407 b
GcA	6.3 bc	445 ab	361 abc	301 ab
GcA+Bm	4.0 ab	461 ab	367 abc	458 bc
GcR	3.1 a	517 b	541 bc	299 ab
GcR+Bm	18.8 e	847 c	747 c	209 a
GiC	2.9 a	378 ab	101 ab	375 ab
GiC+Bm	6.6 bc	259 ab	49 a	601 c

Table 5.2. Effects of Different Inoculation Treatments on some C and N Assimilatory Enzymes. Different letters in each column indicate significant differences ($p<0.05$) among inoculation treatments after ANOVA and Fisher LSD test. ($n=4$). G6PDH: glucose-6-phosphate dehydrogenase; AsAT: aspartate aminotransferase; NR: nitrate reductase; GS: glutamine synthetase. Otherwise as for Table 1.

5.4. Discussion

In the last past decades increasing amount of chemical fertilizers have been used, which in higher proportion has been lost by runoff water, polluting rivers and underground water (Hart *et al.*, 2004; Schröder *et al.*, 2004). Therefore, the use of biofertilizers as AMF

or PGPR inoculants have been proposed in order to diminish the environmental detrimental effect of conventional chemical fertilizers and the cost of production (Sturz *et al.*, 2000; Douds *et al.*, 2006). Moreover, when both microorganisms are co-inoculated there is usually a synergetic effect on plant growth under several environmental conditions (Artursson *et al.*, 2006). Here, co-inoculation of both microorganisms raised lettuce plant growth when the autochthonous (GcA) or commercial (GiC) fungi were involved, but decreased it when the reference fungus (GcR) was the partner. It is known that the effect of co-inoculation of PGPR and AMF on plant growth depend on the pair inoculated (Galleguillos *et al.*, 2000; Valdenegro *et al.*, 2001), although a positive effect have been seen when both partners have the same origin and they grow in the original soil (Vivas *et al.*, 2003). Here, we investigated some plant biochemical traits that could explain such different behavior found. At the same time, we confirmed that the *Bacillus megaterium* strain isolated here can act as PGPR, as have been found for other strains (de Freitas *et al.*, 1997; Kishore *et al.*, 2005).

First, we investigated how the bacterium could influence fungal growth and colonization. It was noticed that plants having the highest root fungal colonization (GiC) were the plants that also showed the maximal growth. On the contrary, plants that had the lowest fungal colonization (GcR) also had the lowest growth. This correlation between percentage of roots colonized and plant growth has not been seen always (Garcia-Garrido *et al.*, 2000; Galleguillos *et al.*, 2000; Marulanda *et al.*, 2003). On the other hand, GcR was the fungus with lowest extraradical mycelium production, that also was reduced by the Bm inoculation. Taking together the lowest values of percentage of roots colonized and extraradical mycelium growth in GcR+Bm treatment, it is not strange that these plants showed the lowest growth. However, no relationship between external mycelium growth and plant growth was found, as happened in other studies (Garcia-Garrido *et al.*, 2000; Marulanda *et al.*, 2003). This lack of relationship can be seen as that the microorganisms in the rhizosphere can act ranging from beneficial to detrimental partners, depending on the environmental conditions and the host plant (Kurek and Jaroszuk-Ścisel, 2003; Mehnaz and Lazarovits, 2006). Hence, the results show that the combination of GcR fungus and Bm bacterium has a deleterious effect on lettuce plant growth in the soil used. However the same bacterium alone or in combination with the other two fungi had a positive effect on lettuce plant growth. These results point out the necessity of checking the effect of each inoculum on plant growth before to be used in the field.

We analyzed shoot proline content, in order to see some stress symptoms in lettuce plants (Ruiz-Lozano *et al.*, 1995). It was found that plants inoculated with the GcR fungus, especially those co-inoculated with Bm bacterium, had the greatest amount of shoot proline. These data may indicate a greatest stress injury in those plants, since levels of proline can correlate with stress damage (Ruiz-Lozano *et al.*, 1995; Porcel *et al.*, 2004). At the same time, GcR and GcR+Bm plants had the lowest amount of photosynthetic pigments in their leaves, while GiC+Bm had the highest ones. Therefore, a correlation between levels of photosynthetic pigments and plant growth performance was found as in others researches (Kristjansdottir and Merker, 1993). These results are

not strange since photosynthetic pigments are the first molecules that safely converting light energy into reduced power and ATP in leaf tissues (Wollman, 2001).

The major amount of reduced power (NADPH) in healthy leaves comes from photosynthetic activity. However when photosynthesis is restricted NADPH comes predominantly from the oxidative pentose phosphate pathway, in which G6PDH is the main regulatory enzyme (Wakao and Benning, 2005). Here we found that plants that grew worst (GcR+Bm) had also the highest G6PDH activity. G6PDH activity has been seen to raise under oxidative stress conditions, when photosynthesis was inhibited (Hauschild and von Schaewen, 2003). Hence, since GcR+Bm plants presumably had low photosynthetic activity, it is not strange that also had higher G6PDH activity.

Aspartate aminotransferase enzyme (AsAT) catalyzed the transformation of glutamate and oxaloacetate into 2-oxoglutarate and aspartate (Hodges, 2002). The 2-oxoglutarate produced is later used by the GOGAT enzyme to synthesize two molecules of glutamate, which one of them is used by GS enzyme to incorporate NH_4^+ into it and form one molecule of glutamine, in the so called GS/GOGAT cycle (Hodges, 2002). AsAT activity has been seen to rise in conditions of nitrogen limitation (Bedell *et al.*, 1999), and here it increased in leaves of GcR plants, especially in those co-inoculated with Bm bacterium. Thus, it is possible that these plants were suffering from nitrogen limitation, since they were the smallest ones and had least amount of chlorophylls, a common symptoms of nitrogen starvation (Debouba *et al.*, 2006). At the same time, GcR and GcR+Bm plants had the highest NR activities. Therefore they would not be limited in this step on nitrogen assimilation. In fact, they could be accumulating NH_4^+ , the product of NR activity, since they had also the lowest GS activities, and would not be incorporating ammonium into amino acids via glutamine. Lettuce is part of the Asteraceae family, a family sensitive to accumulation of NH_4^+ (Britto and Kronzucker, 2002). Hence, lettuce plants usually grow much better when the nitrogen is supplied as nitrate than when it is supplied as ammonium (Demsar and Osvald, 2003). On the opposite, GiC+Bm plants showed the highest GS activity and were the tallest plants. Miflin and Habash (2002) proposed a strong correlation between GS activity and crop yield, in accordance with our results.

As summary, we point out the necessity to check each inoculum prior to be used as biofertilizer in the field, since the same bacterium had opposite effects on plant performance depending on the AMF involved. At the same time we found that G6PDH and GS activities were inversely and positively correlated to plant growth, respectively. Thus, these two enzymes activities could be used as markers of plant growth performance, at least in lettuce plants.

5.5. ACKNOWLEDGEMENTS

A. M. was supported by Agencia Española de Cooperación Internacional and R.A. by Juan de la Cierva Program (Ministerio de Educación y Ciencia).

Capítulo 6

INTERACCIONES ENTRE EL HONGO *Glomus intraradices* Y DOS AISLADOS BACTERIANOS AUTÓCTONOS DE ECOSISTEMAS MEDITERRÁNEOS: UN ESTUDIO EN CULTIVO DIXÉNICO**Resumen**

Este estudio investiga la interacción entre microorganismos bacterianos PGPR considerados moderadamente halófilos (*Pseudomonas putida* y *Bacillus megaterium*) aislados de un ecosistema de mediterranean semiárido y un hongo formador de MA *Glomus intraradices* proveniente de cultivo monoxénico. En cultivo monoxénico, se utilizaron dos concentraciones de NaCl (0 y 35 mM) una vez establecido *G. intraradices*, los pasos del ciclo de vida del hongo (esporas de HMA, hifas y producción de estructuras (BAS)) fueron analizados durante 12 semanas, hasta observar un estado fisiológico del hongo similar en los tratamientos con y sin NaCl en el compartimiento de raíz (CR). Posteriormente se inocularon las bacterias (20 µl) *P. putida* y *B. megaterium*, durante 12 semanas más, se dejaron incubando en oscuridad a 25°C. Los tratamientos obtenidos y analizados fueron *G. intraradices* en presencia o ausencia de NaCl y bacterias PGPR.

A las 24 semanas, los tratamientos bacteriales sin sal incrementaron la cantidad de esporas un 50 % (*P. putida*) y 123 % (*B. megaterium*), la cantidad de BAS un 28% (*P. putida*) y 91% (*B. megaterium*). Bajo condiciones salinas, *G. intraradices* no perdió su habilidad de crecer, pero las hifas y BAS producidos fueron altamente reducidos comparado con los producidos bajo condiciones no salinas. Sin embargo, bajo condiciones de salinidad, ambas bacterias incrementaron la producción de esporas y el crecimiento de hifas de *G. intraradices*; Bajo condiciones de estrés, la formación de BAS fue particularmente aumentada (306% *P. putida* y 477% *B. megaterium*).

Por lo tanto, podemos llegar a la conclusión de que el efecto directo de bacterias autóctonas adaptadas a condiciones de salinidad, particularmente *B. megaterium* producen mayor crecimiento, formación de propágulos y resistencia/tolerancia a la salinidad a *G. intraradices* en cultivo dixénico.

Palabras clave: Hongos MA - *G. intraradices* - *P. putida* - *B. megaterium* - estrés - NaCl - tolerancia- *In vitro*.

**Interactions between the arbuscular mycorrhizal (am) fungus *Glomus intraradices*
and two autochthonous bacteria from a isolates semiarid mediterranean
ecosystem: A dixenic culture study**

Abstract

This study investigates the interaction between drought adapted beneficial microorganisms such as autochthonous moderately halophyte bacterial strains (*Pseudomonas putida* and *Bacillus megaterium*) and the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*, both isolated from semiarid mediterranean ecosystem. All the *G. intraradices* life cycle steps (Spores, hyphae and branched absorbing structures (BAS) production) were analysed along 12 weeks, in dixenic culture, under two levels of NaCl concentrations (0 and 35 mM), in presence or absence of bacteria. Without salt, bacterial treatments increased spore number by 50% (*P. putida*) or by 123% (*B. megaterium*) and BAS by 28% (*P. putida*) and by 91% (*B. megaterium*). Under saline conditions, *G. intraradices* did not lose its ability to grow, but hyphae and BAS produced were highly reduced compared to those formed under non-saline conditions. However, under salinity, both bacteria increased spores production and hyphal growth by *G. intraradices*. Under such stress conditions, BAS formation was particularly enhanced as affected by the bacterial treatments being increased by 306% (*P. putida*) or by 477% (*B. megaterium*). The direct effect of autochthonous salt-adapted bacteria, particularly *B. megaterium*, produced greater growth, propagules formation and saline stress resistance/tolerance of *G. intraradices* under dixenic culture. The stimulating metabolic compounds produced by these bacteria, under such saline conditions, are now under evaluation.

Key words: AM fungi, *G. intraradices*, *P. putida*, *B. megaterium*, stress, NaCl, tolerance, *In vitro*.

6.1. Introduction

Drought stress and salinity are becoming particularly widespread in many regions, and may cause serious salinization of more than 50% of all arable lands by the year 2005 (Wang *et al.* 2001a). Salinity reduces soil fertility and that drastically affects growth and survival of microbiota activity (Jeffries *et al.* 1996). Arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis can confer increased host resistance to drought stress (Cho *et al.* 2006, Marulanda *et al.* 2006). Strategies conveying salt tolerance are thought to involve protection of cell metabolism functions by compartmentalization (e.g. vacuolization) of excess ions while using the available salts (in a controlled amount) and small organic solutes for osmotic adjustment (Clipson & Jennings 1992; Posas *et al.* 2000).

Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi living in symbiotic association with the roots of vascular plants have also been shown to host bacteria stimulated mycorrhizal infection

(Vancura *et al.* 1989). The co-use of free living bacteria isolated from adverse environments and AM fungi could improve the formation and function of the AM symbiosis, particularly when the conditions for plants growth are also adverse (Vivas *et al.* 2003, Marulanda *et al.*, 2006). However up to now little studies have been performed on the subject due to the difficulties of growing AMF under controlled conditions

The use of monoxenic culture system has opened new prospects in the study of the AM symbiosis (Bago, 2005). Research areas such as fungal colony architecture, physiology, biochemistry, cytology and molecular biology, traditionally affected by the intrinsic problems presented by culturing AM in soil, especially have benefited from this in vitro revolution (Fortin *et al.* 2002, Declerck *et al.* 2005 and Bago *et al.* 2005). This system allows the non-destructive study of hyphal development following establishment of the symbiosis (Bago *et al.* 1998).

Therefore, the necessity of fully understanding the biology of a given micro-organism, in order to obtain some indication for its subsequent manipulation and use in particular situations (Bago *et al.* 2005). The nutrient exchange and other benefits that AM fungi and host plants obtain from the AM association are beneficent to offset the investment in the maintenance of the symbiosis (Azcón-Aguilar *et al.* 1994).

In this study we aim to better understand the symbiotic effectiveness of the interaction between two drought adapted beneficial moderately-halophyte bacteria (*Pseudomonas putida* and *Bacillus megaterium*) isolated from semiarid mediterranean ecosystem and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in carrot roots (*Daucus carota* L.) in minimal M medium subjected to saline stress.

6.2. Materials and methods

6.2.1. Establishment of AM monoxenic cultures

Under sterile conditions bi-compartmented Petri plates were filled with 20 ml of sterilized (121°C, 20 min) medium, as described St-Arnaud *et al.*, 1996, with some modifications. The nutrients content of the minimal M medium used (Chabot *et al.*, 1992, Bago, 2005). Sal stress was applied by amending the culture medium with NaCl to reach a final concentration of 35 mM NaCl in the culture medium. Unamending Petri plates were used as control (0 mM NaCl).

The medium M, was added in one side of bi-compartment Petri plates (the root compartment, RC). The other compartment was filled with minimal M medium without sucrose (the hyphal compartment, HC). Monoxenic cultures were established between carrot (*Daucus carota*) roots obtained from a root organ culture, and *Glomus intraradices* Smith & Schenck (DAOM 197198, Biosystematic Research Center, Ottawa, Canada), as described by Chabot *et al.* (1992). Monoxenic cultures were started by placing a 5 cm-long root in the culture compartment. The inoculum consisted of small cubes of medium from a similar monoxenic culture, each containing approximately 250 spores of *G. intraradices*, as well as fragments of mycorrhizal roots and external hyphal, was placed

near the root apex. The plates were incubated in the dark at 25°C, among 7 to 12 weeks depending on the treatment, to obtain same phase of growth.

6.2.2. Establishment of dixenic cultures

Once the extraradical mycelium of *G. intraradices* grew over the plastic barrier of the hyphal compartment and developed extensively in both compartment, the Petri plates were added with a suspension of *Pseudomonas putida* or *Bacillus megaterium*. The bacteria were grown in a shaker at 150 rpm at 28°C for 24 h in 250 ml flasks containing 50 ml of LB medium for *P. putida* and LY medium for *B. megaterium* (pH 7.2) to a density of 10^6 cfu ml⁻¹. This culture was used to inoculate as free-suspension application (20 µl per compartment) (Fig. 1). Five replicates of each treatment were prepared. The plates were incubated in the dark at 25°C for 6 weeks. Therefore, six treatments were proposed: *G. intraradices* without or with salt and without or with bacteria *P. putida* or *B. megaterium*.

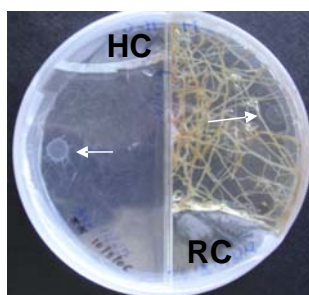


Fig.6.1. Inoculation system used: Culture bacteria strain in root compartment (RC) and hyphal compartment (HC) of *G. intraradices* dixenic culture

6.2.3. Measurements

In the presence or absence of bacteria under non saline and saline conditions for each of the treatments established the following measurements were taken:

6.2.3.1. Symbiotic development

6.2.3.1.1. Intraradical colonization

The roots were carefully washed and stained by the normal non-vital trypan blue (TB) staining of all fungal tissues (Phillips *et al.* 1970) of roots. This method allows to compare directly the total amount of fungal tissue in mycorrhizal root systems (TB staining).

Mycorrhizal development was evaluated by the method of Trouvelot *et al.* (1986). The colonization intensity (M%) is an estimation of the amount of cortical cells occupied by AM fungal structures. Finally, the arbuscule abundance A% gives an estimation of the arbuscule richness in root system. Beside was analysed the vesicles production. Four replicates per treatment were used.

6.2.3.1.2. Extraradical development

Photomicrographs of AMF spores, AMF runner Hyphal, Branched absorbing structures (BAS) root colonization, and external structures of AM dixenic cultures were taken using a microscope Eclipse E200 Nikon. Images were digitalized and assembled using Adobe Photoshop CS2 and Microsoft Power Point 5.5 software.

6.2.3.2. Molecular identification (PCR)

The amplification of ribosomal DNA, using bacteria-specific primers GM4r y GM3f was tested. PCR reaction was performed in a total volume of 50 µl vol., consisting of 2,5 µl of each primer, to concentration of 5 µl of 10xPCR buffer, 1.5mM MgCl₂ included (Ephendorff, Hamburg, Germany), 25 µl of DNA genomic and 5 unit of Taq DNA polymerase (Ephendorff). The program of amplification was 94° by 5 min, 35 cycles of 94°C by 30 s, 46°C by 30 s, 72°C by 2 min and finally 72°C by 7 min. The amplification of DNA was analyzed in agar gel 1.2 %(w/v).

6.2.3.3. Statistical analysis

The experiment consisted of a randomized complete block. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's multiple ranges test (Duncan, 1955). Percentage values were arcsin transformed before statistical analysis. Correlations were calculated using SPSS software, version 13 (LEAD Technologies Inc., Chicago, IL, USA).

6.3. Results

Treatment control took 7 week for to observe a 65% in HC growth, while was observed a slow growth in treatment with NaCl, taking 12 week for 75% in HC development (Table 1).

		Treatment							
		Control				NaCl			
Time (week)		5	7	9	12	5	7	9	12
Germination (%)		80	100	100	100	60	70	80	90
ERM growth (%)	RC	65	90	100	100	30	70	90	100
	HC	24	65	100	100	0	7	43	75

Table 6.1. Evolution of Inoculum germination (%) and development plates in which the extraradical mycelium (ERM) of the different treatments (%) in the root compartment (RC) and hyphal compartment (HC)

Without salt, bacterial treatments increased AMF spore production by 50% (*P. putida*) or by 123% (*B. megaterium*), BAS formation by 28% (*P. putida*) or by 91% (*B. megaterium*) and AMF Hyphae by 60% (*P. putida*) and by 70% (*B. megaterium*) of *G. intraradices* in dixenic culture (Fig 2).

Under saline conditions (35 mM), *G. intraradices* still grew normally. However hyphae and BAS production was highly reduced compared to those formed under non-saline conditions.

Under salinity, the presence of both bacterial strains increased spore production and hyphal growth by *G. intraradices*. Under such stress conditions, BAS formation was particularly enhanced being increased by 306% (*P. putida*) or by 477% (*B. megaterium*). *G. intraradices* in interaction with *B. megaterium* showed greater saline stress resistance and adaptation.

Extraradical structures	Control		<i>P. putida</i>		<i>B. megaterium</i>	
	-	NaCl	-	NaCl	-	NaCl
Length of runner hyphae (RH) (cm cm ²)	166b	88	260a	125	283a	176
Number of BAS.cm ²	298b	69	380ab	280	568a	329
Numer of spores.cm ²	257b	229	348ab	315	573a	500
Ratios:						
spores/RH	1,5a	2,6b	1,4a	1,8c	2a	4a
BAS/extraradical hyphae	1,8a	0,8c	1,5a	1,6b	2a	2,6a

Extraradical structures	Control		<i>P. putida</i>		<i>B. megaterium</i>	
	-	NaCl	-	NaCl	-	NaCl
Ratios:						
spores/RH	1,5a	2,6b	1,4a	1,8c	2a	4a
BAS/extraradical hyphae	1,8a	0,8c	1,5a	1,6b	2a	2,6a

Tabla 6.2. Comparison between the different extraradical morphological and cytological features of *G. intraradices* growing with or without NaCl and with or without *P. putida* or *B. megaterium* respectively. Means followed by the same letter are not significantly different (P<0.05) as determined by Duncan's multiple-range test (n=6)

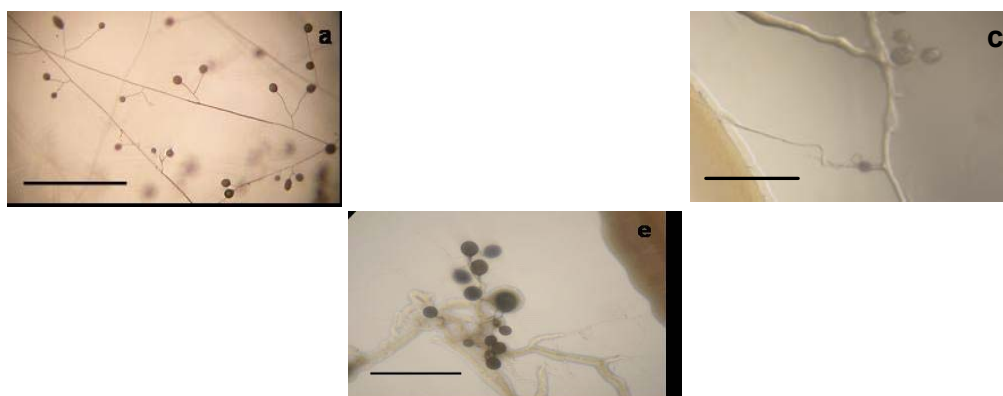


Fig.6.2. Extraradical structures produced by *G. intraradices* in medium M-C **a)** Control, 4x; **b)** Control-NaCl 35 mM, 4x; **c)** *P. putida*-control, 4x; **d)** *P. putida*-NaCl 35 mM, 4x; **e)** *B. megaterium*-control, 4x; **f)** *B. megaterium*-NaCl 35 mM, 4X. Bars: a and b= 500 µm; c and d=250 µm

	<i>P. putida</i>		<i>B. megaterium</i>	
	control	NaCl	control	NaCl
%F	98	80	93	75
%M	10	6	32	15
%m	10	6	35	20
%a	72	12	58	14
%A	7	1	19	2

Table 6.3. Colonization frequency (F), intensity (M) and arbuscule abundance (A) after trypan blue (TB) staining of roots from mycorrhizal root colonized by *G. intraradices*. Means followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple-range test ($n=6$)

6.4. Discussion

Without salt, bacterial treatments

In this case the direct effect of autochthonous salt-adapted bacteria produced greater development of structures all the life cycle steps, the interaction was positive, particularly *B. megaterium* increasing the number spores. The ratio spores/RH showed significant difference respectively another treatment.

With salt, bacterial treatments

The results of our work showed differences in effects NaCl concentration by *G. intraradices* under dixenic culture, as indicated above, was observed a retard of growth but not an inhibition development and structures formation; the fungi did not lose its ability to grow, but spores, hyphae and BAS produced were highly reduced compared to those formed under non-saline conditions.

However, significant results obtained when the effects of NaCl added, increased propagules formation of *G. intraradices* in interaction with autochthonous moderately halophytes bacteria strains isolated of semiarid mediterranean ecosystem. The results show that bacteria *B. megaterium* stimulated significantly the formation of spores, hyphae and BAS by *G. intraradices* in spite of saline stress indicating a resistance/tolerance.

The presence of both bacterial strains in the dixenic cultures importantly enhanced intraradical colonization by *G. intraradices*, and the presence of *B. megaterium* under salt conditions induced the production of intraradical vesicles. In salt treatments colonization figures were drastically reduced, which was correlated with the decrease in ERM development and BAS production. Interesting, spore production was maintained.

6.5. Conclusion

There is a direct effect of autochthonous salt-adapted bacteria, particularly of *B. megaterium*, on the AMF *G. intraradices*, under dixenic culture in terms of increased growth, propagule formation and saline stress resistance/tolerance.

AM fungi and rhizospheric bacteria might be well considered as an alternative management strategy for coping with environmental limitations.

6.6. Acknowledgements

The authors thank Cano C. and Valderas A. for technical support.

V. CONCLUSIONES

1. La captación de agua del suelo por la planta difiere con la especie de hongo MA utilizado, al igual, que esta habilidad es relacionada con la cantidad de micelio externo producido por cada hongo MA y la frecuencia de la colonización en la raíz tanto por estructuras fúngicas vivas y activas. Se seleccionan como hongos MA mas eficientes en la captación de agua: *G. intraradices*, *G. mosseae* y *Glomus coronatum*.
2. Es necesario tener en cuenta el origen del hongo MA, ya que la inoculación con hongos MA autóctonos produce no sólo una mayor colonización de MA sino también mejora el estado fisiológico y metabólico del desarrollo simbiótico.
3. Hay un efecto directo de bacterias autóctonas adaptadas a la salinidad, particularmente de *B. megaterium*, sobre el crecimiento de *G. Intraradices* bajo cultivo dixénico, en relación con el crecimiento, la formación de propágulos y resistencia/tolerancia a la tensión salina.
4. La combinación de grupos microbianos incrementan el crecimiento de las plantas. Los efectos estimulantes y supervivencia de plantas de *Retama sphaerocarpa* para usar en programas re- vegetación.
5. As summary, we point out the necessity to check each inoculum prior to be used as biofertilizer in the field, since the same bacterium had opposite effects on plant performance depending on the AMF involved. At the same time we found that G6PDH and GS activities were inversely and positively correlated to plant growth, respectively. Thus, these two enzymes activities could be used as markers of plant growth performance, at least in lettuce plants.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- E. B. Allen and M. F. Allen. Water relations of xeric grasses in the field: interactions of mycorrhizas and competition. *New Phytologist* 104:559-571, 1986.
- E. B. Allen and M. F. Allen. Water relations of xeric grasses in the field: interactions of mycorrhizas and competition. *New Phytologist* 104:559-571, 1986.
- M. F. Allen. Influence of vesicular arbuscular mycorrhizae on water-movement through *Bouteloua gracilis* (Hbk) Lag ex Steud. *New Phytologist* 91 (2):191-196, 1982.
- M. F. Allen. *The Ecology of Mycorrhizae*, Cambridge:University Press, 1991.
- E. Amora-Lazcano, M. M. Vazquez, and R. Azcon. Response of nitrogen-transforming microorganisms to arbuscular mycorrhizal fungi. *Biology and Fertility of Soils* 27 (1):65-70, 1998.
- R. M. Auge. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11 (1):3-42, 2001.
- C. Azcón-Aguilar and J. M. Barea. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: Significance and potentials. *Scientia Horticulturae* 68 (1-4):1-24, 1997.
- R. Azcón. Growth and nutrition of nodulated mycorrhizal and non-mycorrhizal *Hedysarum coronarium* as a result of treatments with fractions from a plant growth-promoting rhizobacteria. *Soil Biology & Biochemistry* 25:1037-1042, 1993.
- J. M. Barea. Mycorrhiza/bacteria interactions on plant growth promotion. In: *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, Present Status and Future Prospects*, edited by A Ogoshi, L Kobayashi, Y Homma, F Kodama, N Kondon, and S Akino, Paris:OCDE, 1997, p. 150-158.
- J. M. Barea. Rhizosphere and mycorrhiza of field crops. In: *Biological Resource Management: Connecting Science and Policy*, edited by Balázs E, Galante E, Lynch JM, Schepers JS, Toutant JP, Werner D, and Werry PA Th J, Berlin, Heidelberg, New York:Springer-Verlag, 2000, p. 110-125.
- G. J. Bethlenfalvay, M. S. Brown, and R. L. Franson. *Glycine-Glomus-Bradyrhizobium* symbiosis. 10. relationships between leaf gas-exchange and plant and soil-water status in nodulated, mycorrhizal soybean under drought stress. *Plant Physiology* 94 (2):723-728, 1990.
- E. A. Bray. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* 2 (2):48-54, 1997.
- D. R. Bryla and J. M. Duniway. Growth, phosphorus uptake, and water relations of safflower and wheat infected with an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* 136 (4):581-590, 1997.
- D. R. Bryla and J. M. Duniway. Water uptake by safflower and wheat roots infected with arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 136 (4):591-601, 1997.
- F. Caravaca, M. D. Alguacil, G. Diaz, and A. Roldan. Use of nitrate reductase activity for assessing effectiveness of mycorrhizal symbiosis in *Dorycnium pentaphyllum* under

- induced water deficit. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 34 (15-16):2291-2302, 2003.
- F. T. Davies, J. R. Potter, and R. G. Linderman. Mycorrhiza and repeated drought exposure affect drought resistance and extraradical hyphae development of Pepper plants independent of plant size and nutrient content. *Journal of Plant Physiology* 139 (3):289-294, 1992.
- F. T. Davies, J. R. Potter, and R. G. Linderman. Drought resistance of mycorrhizal pepper plants independent of leaf P-concentration - response in gas-exchange and water relations. *Physiologia Plantarum* 87 (1):45-53, 1993.
- D. B. Duncan. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11 (1):1-42, 1955.
- B. A. Faber, R. J. Zasoski, D. N. Munns, and K. Shackel. A method for measuring hyphal nutrient and water-uptake in mycorrhizal plants. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* 69 (1):87-94, 1991.
- A. H. Fitter. Water relations of red-clover *Trifolium pratense* L as affected by VA mycorrhizal infection and phosphorus supply before and during drought. *Journal of Experimental Botany* 39 (202):595-603, 1988.
- C. Galleguillos, C. Aguirre, J. M. Barea, and R. Azcón. Growth promoting effect of two *Sinorhizobium meliloti* strains (a wild type and its genetically modified derivative) on a non-legume plant species in specific interaction with two arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Science* 159:57-63, 2000.
- E. George, K. U. Haussler, D. Vetterlein, E. Gorgus, and H. Marschner. Water and nutrient translocation by hyphae of *Glomus mosseae*. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* 70 (11):2130-2137, 1992.
- K. Hardie. The effect of removal of extraradical hyphae on water uptake by vesicular arbuscular mycorrhizal plants. *New Phytologist* 101:677-685, 1985.
- E. J. Hewitt. *Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition*. Tech. Commun. n° 22, Farnham Royal. Commonwealth Agricultural Bureau, Bucks, U.K. 547 p., 1952.
- J. D. Jastrow and R. M. Miller. Methods for Assessing the Effects of Biota on Soil Structure. *Agriculture Ecosystems & Environment* 34 (1-4):279-303, 1991.
- P. Jeffries and J. M. Barea. Arbuscular Mycorrhiza - a key component of sustainable plant-soil ecosystems. In: *The Mycota. Vol. IX. Fungal Associations*, edited by B Hock, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 2001, p. 95-113.
- I. Johansson, M. Karlsson, U. Johanson, C. Larsson, and P. Kjellbom. The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 1465 (1-2):324-342, 2000.
- P. C. T. Jones and J. E. Mollinson. A technique for the quantitative estimation of soil micro-organisms. *J. Gen Microbiol.* 2:54-69, 1948.
- R. T. Koide. Physiology of the mycorrhizal plant. *Advances in Plant Pathology* 9:33-54, 1993.

- F. Krajinski, A. Biela, D. Schubert, V. Gianinazzi-Pearson, R. Kaldenhoff, and P. Franken. Arbuscular mycorrhiza development regulates the mRNA abundance of *Mtaqp1* encoding a mercury-insensitive aquaporin of *Medicago truncatula*. *Planta* 211 (1):85-90, 2000.
- P. J. Kramer and J. S. Boyer. *Water relations of plants and soils*, San Diego, CA, USA:Academic Press, 1993.
- P. J. Kramer and J. S. Boyer. *Water relations of plants and soils*, San Diego, CA, USA:Academic Press, 1997.
- M. Lachica, A. Aguilar, and J. Yañez. Análisis foliar, métodos utilizados en la Estación Experimental del Zaidín. *Anal Edafol Agrobiol* 32:1033-1047, 1973.
- R. G. Linderman and E. A. Davis. Comparative response of selected grapevine rootstocks and cultivars to inoculation with different mycorrhizal fungi. *American Journal of Enology and Viticulture* 52 (1):8-11, 2001.
- A. Marulanda, R. Azcón, and J. M. Ruíz-Lozano. Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* plants under drought stress. *Physiologia Plantarum* 119 (4):526-533, 2003.
- G. Masciandaro, B. Ceccanti, and C. García. Anaerobic digestion of straw and piggery wastewater: II. Optimization of the process. *Agrochimica* 3:195-203, 1994.
- R. M. Miller and J. D. Jastrow. Hierarchy of root and mycorrhizal fungi interactions with soil aggregation. *Soil Biology & Biochemistry* 22:579-584, 1990.
- A. Monzón and R. Azcón. Relevance of mycorrhizal fungal origin and host plant genotype to inducing growth and nutrient uptake in *Medicago* species. *Agriculture Ecosystems & Environment* 60 (1):9-15, 1996.
- A. Monzón and R. Azcón. Growth responses and N and P use efficiency of three *Alnus* species as affected by arbuscular-mycorrhizal colonisation. *Plant Growth Regulation* 35:97-104, 2001.
- D. C. Naseby and J. M. Lynch. Rhizosphere soil enzymes as indicators of perturbations caused by enzyme substrate addition and inoculation of a genetically modified strain of *Pseudomonas fluorescens* on wheat seed. *Soil Biology & Biochemistry* 29 (9-10):1353-1362, 1997.
- E. I. Newman. A method os estimating the total length of root in a sample. *J.Appl.Ecol.* 3:139-145, 1966.
- J. M. Phillips and D. S. Hayman. Improved procedure of clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55:159-161, 1970.
- D. J. Read. The mycorrhizal mycelium. In: *Mycorrhizal Functioning. An Integrative Plant-Fungal Process*, Anonymous New York:Chapman & Hall, 1992, p. 102-133.
- N. Requena, P. Jeffries, and J. M. Barea. Assessment of natural mycorrhizal potential in a desertified semiarid ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (3):842-847, 1996.

- N. Requena, I. Jiménez, and J. M. Barea. Bacteria-mycorrhiza interactions in land restoration. In: *Mycorrhizas in Integrated Systems. From Genes to Plant Development*, edited by C. Azcón-Aguilar and J. M. Barea, Bruselas: COST 821, 1996.
- N. Requena, I. Jimenez, M. Toro, and J. M. Barea. Interactions between plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR), arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* spp. in the rhizosphere of *Anthyllis cytisoides*, a model legume for revegetation in mediterranean semi-arid ecosystems. *New Phytologist* 136 (4):667-677, 1997.
- C. H. Roth, M. A. Malicki, and R. Plagge. Empirical evaluation of the relationship between soil dielectric constant and volumetric water content as the basis for calibrating soil moisture measurements. *Journal Soil Science* 43:1-13, 1992.
- H. Roussel, S. Bruns, V. GianinazziPearson, K. Hahlbrock, and P. Franken. Induction of a membrane intrinsic protein-encoding mRNA in arbuscular mycorrhiza and elicitor-stimulated cell suspension cultures of parsley. *Plant Science* 126 (2):203-210, 1997.
- J. M. Ruíz-Lozano and R. Azcón. Hyphal contribution to water uptake in mycorrhizal plants as affected by the fungal species and water status. *Physiologia Plantarum* 95 (3):472-478, 1995.
- J. M. Ruíz-Lozano, M. Gómez, and R. Azcón. Influence of different *Glomus* species on the time-course of physiological plant-responses of lettuce to progressive drought stress periods. *Plant Science* 110 (1):37-44, 1995.
- J. M. Ruíz-Lozano. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza* 13 (6):309-317, 2003.
- S. E. Smith and V. Gianinazzi-Pearson. Phosphate uptake and arbuscular activity in mycorrhizal *Allium cepa* L. Effects of photon irradiance and phosphate nutrition. *Aus J Plant Physiol* 17:177-188, 1990.
- S. E. Smith and D. J. Read. *Mycorrhizal Symbiosis*, San Diego:Academic Press, 1997.
- Tabatabai MA. Soil enzymes. In: *Methods of Soil Analysis. Part 2 2nd ed. Agron Monogr 9.*, edited by A. L. Page, E. M. Miller, and D. R. Keeney, Madison, Wisconsin:ASA and SSSA, 1982, p. 501-538.
- B. Tisserant, V. Gianinazzi-Pearson, S. Gianinazzi, and A. Gollotte. In planta histochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular mycorrhizal infections. *Mycological Resources* 97:245-250, 1993.
- A. Trouvelot, J. C. Fardeau, C. Plenchette, S. Gianinazzi, and V. Gianinazzi-Pearson. Nutritional balance and symbiotic expression in mycorrhizal wheat. *Physiologie Vegetale* 24 (2):300, 1986.
- S. D. Tyerman, C. M. Niemiets, and H. Bramley. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell and Environment* 25 (2):173-194, 2002.
- M. Valdenegro, J. M. Barea, and R. Azcón. Influence of arbuscular-mycorrhizal fungi, *Rhizobium meliloti* strains and PGPR inoculation on the growth of *Medicago arborea* used as model legume for re-vegetation and biological reactivation in a semi-arid mediterranean area. *Plant Growth Regulation* 34:233-240, 2001.

A. Varma and B. Hooek. *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology*, Berlin, Heidelberg, New York:Springer, 1998.

A. Vivas, A. Marulanda, J. M. Ruíz-Lozano, J. M. Barea, and R. Azcón. Influence of a *Bacillus* sp on physiological activities of two arbuscular mycorrhizal fungi and on plant responses to PEG-induced drought stress. *Mycorrhiza* 13 (5):249-256, 2003.

I. White, Knight J.H., S. J. Zegelin, and G. C. Topp. Comments to 'considerations on the use of time-domain reflectometry (TDR) for masuring soil water content' by WR Whalley. *Journal Soil Science* 45:503-508, 1994.

I. Wöhler. Auxin-indole derivatives in soils determined by a colorimetric method and by high performance liquid chromatography. *Microbiological Research* 152:399-405, 1997.