

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS



**ESTUDIO SOBRE LAS SIMBIOSIS MICROBIO-PLANTA  
(MICORRIZAS Y *RHIZOBIUM*-LEGUMINOSAS) EN LA  
REVEGETACIÓN DE SUELOS EN ZONAS ÁRIDAS**

PATRICIA SALAMANCA BALLESTEROS

TESIS DOCTORAL

1991

conchi Azcón

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO SOBRE LAS SIMBIOSIS MICROBIO-PLANTA (MICORRIZAS Y *RHIZOBIUM*-  
LEGUMINOSAS) EN LA REVEGETACION DE SUELOS EN ZONAS ARIDAS.

PATRICIA SALAMANCA BALLESTEROS

TESIS DOCTORAL

1991

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO SOBRE LAS SIMBIOSIS MICROBIO-PLANTA (MICORRIZAS Y *RHIZOBIUM*-  
LEGUMINOSAS) EN LA REVEGETACION DE SUELOS EN ZONAS ARIDAS.

Patricia Salamanca

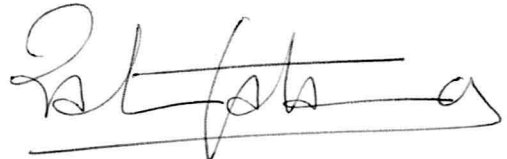
Tesis Doctoral

Universidad de Granada

1991

ESTUDIO SOBRE LAS SIMBIOSIS MICROBIO-PLANTA (MICORRIZAS Y RHIZOBIUM-  
LEGUMINOSAS) EN LA REVEGETACION DE SUELOS EN ZONAS ARIDAS.

MEMORIA presentada por la  
Licenciada en Ciencias Biológicas  
D<sup>a</sup> Patricia Salamanca Ballesteros  
para aspirar al grado de Doctor



Fdo: Patricia Salamanca Ballesteros

Directores de Tesis



Fdo: Dr. Jose Miguel Barea  
Profesor de Investigación  
C.S.I.C.



Fdo: Dr. Miguel Angel Herrera

Granada Abril de 1991

Al finalizar este trabajo doctoral, quisiera que en él quedara recogida la labor de todas aquellas personas que, de alguna manera, han contribuido a su realización.

Destaco mi agradecimiento

A mis directores: Jose Miguel Barea en su actividad y por su apoyo. Miguel Angel Herrera por su previsión y compañerismo.

A mi tutor Luis García del Moral que con su amistad y responsabilidad ha facilitado la gestión administrativa.

A todas aquellas personas de la Unidad Estructural de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín que han vivido el día a día del trabajo.

A Francisca González y Rafael Bellver por su ayuda en el ordenador y a Teresa y Pilar Medina por el análisis químico de las muestras.

Además este trabajo no se hubiera podido realizar sin la colaboración de:

La Estación Experimental del CIDA (Granada), en la que Simón Cuadros y Ramón Francia en el ámbito del proyecto LUCDEME han sido de gran ayuda en los ensayos de campo.

La Estación Experimental de Churriana del CIDA (Málaga) en la que Fernando Pliego y su equipo, con sus consejos y hospitalidad me han ayudado en la producción de plantas por cultivo "in vitro".

El Laboratorio de Suelos de Seibersdorf, Viena. IAEA. en el que Aldo Sebastianelli y Jose Luis Arrillaga han contribuido a mi formación y ayudado en el análisis isotópico.

Por último y, no menos importante, quiero agradecer a mi familia y amigos todo lo que siempre han hecho por mí, sus consejos y preocupación me han animado y estimulado constantemente. A todos y a Paco, especialmente, GRACIAS.

Este trabajo de Investigación se ha realizado en la Estación Experimental del Zaidín C.S.I.C. gracias a la Beca del Plan de Formación de Personal Investigador de la Junta de Andalucía y bajo el ámbito del Proyecto Lucdeme en el convenio CSIC-ICONA.

Los suelos experimentales pertenecen a la Finca Experimental que el CIDA de Granada posee en Lanjarón (Granada). Agradecemos al director de dicha Institución Dr. A. Martínez Raya las facilidades y puesta a disposición de aquellas instalaciones.



**INDICE**

## INDICE

I. OBJETIVOS E INTERES DEL TRABAJO.....	1
II. INTRODUCCION.....	3
1. Biotecnología en programas de reforestación en zonas áridas y semiáridas.....	3
1.1. Características de estas zonas .....	3
1.2. Especies leñosas en zonas áridas y semiáridas.....	4
1.3. Técnicas de propagación vegetal.....	5
1.4. Micorrizas asociadas a plantas leñosas en zonas áridas y semiáridas.....	8
1.5. Fijación de N <sub>2</sub> por leguminosas leñosas.....	9
2. Micorrizas.....	10
2.1. Aspectos generales.....	10
2.2. Características diferenciales de los géneros formadores de MVA.....	13
2.3. Formación MVA.....	14
2.3.1. Fases de la colonización.....	14
2.3.2. Morfología de las MVA.....	17
2.3.3. Factores que afectan la formación de las MVA.....	18
2.3.3.1. Grado de dependencia de la planta.....	18
2.3.3.2. Especificidad en las MVA.....	19
2.3.3.3. Efectividad de las MVA.....	19
2.3.3.4. Condiciones físico-químicas del medio.....	20
2.3.3.5. Condiciones biológicas del medio.....	20
3. <i>Rhizobium</i> .....	21
3.1. Aspectos generales.....	21
3.1.1. Clasificación.....	23
3.2. Formación de los nódulos.....	26
3.2.1. Fases de infección.....	26
3.2.2. Factores que afectan a la simbiosis.....	27
3.2.2.1. Condiciones químicas del medio.....	27
3.2.2.2. Condiciones físicas.....	28
3.2.2.3. Condiciones biológicas.....	29
4. Doble simbiosis en leguminosas: micorrizas y nódulos.....	29
4.1. Fisiología de la doble simbiosis.....	29
4.2. Transporte de nutrientes.....	33
4.3. Trazadores isotópicos.....	36
4.4. Análisis de ureidos.....	39
4.5. Doble simbiosis en leguminosas leñosas y su desarrollo en zonas áridas.....	40
4.6. Ecología de la doble simbiosis.....	43

III. MATERIALES Y METODOS.....	48
A. PARTE GENERAL.	
1. Suelos.....	48
2. Material vegetal.....	48
3. Microorganismos.....	50
4. Aislamiento de endofitos.....	53
5. Esterilización de esporas en superficie. Estudio de la germinación de esporas de HMVA.....	54
6. Medios de cultivo.....	54
7. Cultivo axénico de plantas.....	56
7.1. Esterilización en superficie de semillas.....	56
7.2. Germinación de las semillas.....	56
7.3. Solución nutritiva.....	57
7.4. Cultivo de plantas.....	59
8. Medida de la efectividad de la simbiosis.....	60
B. ENSAYOS ESPECIFICOS.	
9. Ensayo de inoculación cruzada.....	60
10. Determinación de razas de <i>Rhizobium</i> y afines presentes en suelo de "launa".....	61
11. Curva de crecimiento de los endofitos aislados en la zona de estudio.....	61
12. Estudio de la supervivencia de <i>Bradyrhizobium</i> sp (Vigna) 3824 en condiciones variables de suelo de "launa" o "calcareo", y en simbiosis con <i>Spartium junceum</i> .....	62
13. Estudio del efecto de nitrógeno combinado (NO <sub>3</sub> K) sobre la nodulación y la actividad fijadora de nitrógeno en plantas de <i>S. junceum</i> inoculadas con <i>Rhizobium</i> .....	63
14. Caracterización <i>in vitro</i> de microsimbiontes MVA.....	64
15. Evolución de los propágulos de <i>Scutellospora pérsica</i> .....	65
16. Multiplicación por cultivo de tejidos.....	65
16.1. Procedencia del material para propagar por cultivo de tejidos.....	65
16.2. Esterilización en superficie y germinación de las semillas.....	65
16.3. Esterilización superficial de explantos.....	66
16.4. Técnicas de micropropagación.....	67
17. Incidencia de la micorrización en parámetros fisiológicos vegetales con hongos MVA de colección.....	67
18. Estudio preliminar de la doble simbiosis <i>Rhizobium</i> -MVA leguminosa por medio de N <sup>15</sup> .....	67

18.1. Plantas seleccionadas y condiciones de cultivo.....	67
18.2. Preparación de la muestra y cálculos.....	68
19. Transporte de nutrientes.....	70
20. Estudio de la colonización en la doble simbiosis en leguminosas leñosas.....	70
21. Medida de ureidos totales.....	71
22. Instalación de parcelas permanentes.....	72
23. Analisis estadístico.....	73
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>74</b>
1. Características del suelo.....	74
2. Ensayos de inoculación curzada.....	74
3. Determinación de las razas de <i>Rhizobium</i> y afines presentes en suelo de "launa".....	80
4. Curva de crecimiento de los endofitos aislados en la zona de estudio.....	81
5. Estudio de la supervivencia de <i>Bradyrhizobium</i> sp (Vigna)3824 en condiciones variables de suelo de "launa" o "calcareo", y en simbiosis con <i>Spartium junceum</i> .....	84
6. Estudio del efecto del nitrógeno combinado (NO <sub>3</sub> K) sobre la nodulación y la actividad fijadora de nitrógeno en plantas de <i>S. junceum</i> inoculadas con <i>Rhizobium</i> .....	88
7. Caracterización <i>in vitro</i> de MVA.....	91
8. Evolución de los propágulos de <i>S.pérsica</i> .....	99
9. Propagación <i>in vitro</i> de las plantas objeto de estudio.....	101
9.1. Influencia hormonal en la germinación de semillas.....	101
9.2. Inicio del cultivo <i>in vitro</i> .....	101
9.3. Multiplicación vegetativa.....	103
9.4. Enraizamiento.....	104
9.5. Aclimatación.....	104
10. Incidencia de la micorrización en parámetros fisiológicos vegetales .....	116
11. Estudio sobre la doble simbiosis <i>Rhizobium</i> -MVA en leguminosas leñosas utilizando trazadores isotópicos.....	123
12. Transporte de nutrientes.....	126
13. Doble colonización por microsimbiontes en leguminosas leñosas.....	129
14. Determinación de ureidos (alantoina).....	138
15. Establecimiento y supervivencia de las plantas en las "parcelas permanentes".....	140
<b>V. DISCUSION.....</b>	<b>145</b>

VI. CONCLUSIONES.....	152
VII. BIBLIOGRAFIA.....	153

## OBJETIVOS

## I. OBJETIVOS E INTERES DEL TRABAJO

El establecimiento de una cubierta vegetal, por su interés "per se" y por su repercusión en la retención de procesos erosivos del suelo, es un aspecto crucial en la lucha contra la desertificación. Por esta razón, los programas de revegetación son de interés prioritario en muchos países. El éxito de los mismos depende de diversos factores, muchos de los cuales están bajo el ámbito de la Biotecnología Vegetal.

Para mejorar el sistema de desarrollo e implantación de una cobertura vegetal en zonas degradadas, se dispone, por un lado de los métodos de propagación vegetal, mediante técnicas de cultivo "in vitro"; de otro lado se sabe que en condiciones de precariedad en agua y/o nutrientes, y de adversidad de los factores ambientales, el establecimiento de las plantas, y su desarrollo subsiguiente, depende en gran medida de que éstas formen simbiosis con microorganismos del suelo implicados en la fijación y movilización biológica de nutrientes. Así, la formación de micorrizas es crítica para el enraizamiento de las plantas y para que éstas capten, P, N, micronutrientes y, posiblemente, agua; al igual que la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, responsable de la fijación de N<sub>2</sub> atmosférico, proceso clave para la entrada de este nutriente indispensable en la biosfera.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, en este trabajo doctoral se proponen los siguientes Objetivos Generales:

- 1º Selección de plantas leñosas propias de zonas áridas y semiáridas, siguiendo criterios ecológicos y económicos, y análisis de los microsimbiontes presentes naturalmente en la rizosfera de las mismas.
- 2º Producción de plantas con micorrización y nodulación optimizada.
- 3º Proponer una metodología, extrapolable, para la implantación de una cubierta vegetal, en parcelas piloto, en un área degradada del sudeste semiárido de la Península.

Para el logro de los tres Objetivos Generales antes detallados se proponen los siguientes Objetivos Específicos:

- 1º Aislamiento y caracterización de los ecotipos de microorganismos simbióticos del área de estudio.
- 2º Producción masiva de material vegetal homogéneo mediante técnicas de macro o micropropagación adecuadas.
- 3º Selección de los microorganismos más efectivos para cada especie vegetal en doble simbiosis, según criterios de compatibilidad funcional y coexistencia.
- 4º Obtención de material vegetal inoculado con sus microsimbiontes.
- 5º Investigar el papel de la doble simbiosis en la fijación y movilización biológica de nutrientes, así como en el transporte de éstos; sentido en que se distribuyen, lugares de distribución y forma orgánica en que se realiza.
- 6º Determinar el potencial de dicho material para establecerse en la zona de estudio.



## **INTRODUCCION**

## **II. INTRODUCCION**

### **1. Biotecnología en programas de reforestación en zonas áridas y semiáridas**

#### **1.1. Características de estas zonas**

Las zonas áridas y semiáridas constituyen aproximadamente cuatro décimas partes de la superficie terrestre siendo de destacar el incremento considerable de la desertización en diversas áreas. Concretamente, Naciones Unidas (1977) en la pasada década estimaba en 6 millones de Ha la superficie que se desertiza anualmente, en la actualidad no hay ninguna razón para pensar que dicha cifra no se haya incrementado. En estos lugares el principal factor limitante es el agua, aunque para algunos autores (Felker y Bandurski, 1979), en ambientes semiáridos, la baja disponibilidad de nitrógeno y materia orgánica en el suelo pueden ser incluso más importantes como factores determinantes de una baja productividad.

Los ecosistemas xerofíticos se caracterizan por ser especialmente frágiles, de tal forma, que si se traspasa su umbral de tolerancia, pueden degradarse tanto física como biológicamente en un corto periodo (López Bermudez y Albaladejo, 1990). Esto es de especial importancia si se considera que en los últimos 25 años la población en dichas áreas se ha más que duplicado, lo que supone un continuo incremento en la presión antropogénica.

La desertización asociada a condiciones xerofíticas no es una situación extraña a España. Se puede indicar que la deforestación es uno de los principales problemas ambientales que existen en el país. En algunos casos, como en sectores de Andalucía, este problema es de mayor importancia porque va unido al proceso de desertización, lo que se traduce en un rápido deterioro ambiental y económico.

De los 8,7 millones de hectáreas que constituyen el territorio de

la Comunidad Autónoma Andaluza, algo más del 50% (4,6 millones), corresponden a terrenos rústicos que, por sus características, no son susceptibles de un cultivo agrícola permanente e intensivo y se conocen como terrenos de vocación forestal o de montes (Junta de Andalucía, 1989). De éstos, alrededor de 2,4 millones de Ha, están arbolados, mientras que los 2,2 millones restantes tienen escasa o nula vegetación arbórea, dominando los matorrales o herbazales más o menos degradados sobre terrenos con frecuencia de grandes pendientes, lo que aumenta los problemas de erosión.

Los ambientes xerofíticos frecuentemente traen asociados a las limitaciones anteriores problemas de salinidad, temperaturas extremas y bajo nivel general de nutrientes en el suelo, también condiciones topográficas adversas pueden limitar el cultivo en estos sectores (Herrera, 1984; Ortiz Silla, 1990).

#### **1.2. Especies leñosas en zonas áridas y semiáridas**

El aumento de las zonas erosionadas va unido a la pérdida de fertilidad de las tierras agrícolas (Bainbridge 1990). La recuperación de los suelos áridos degradados es un proceso lento, que requiere la instalación de una cubierta vegetal resistente a estas condiciones adversas, al mismo tiempo que se debe producir un acercamiento a la situación de máximo equilibrio y desarrollo vegetal; en este sentido cabe destacar el reciente desarrollo de la "Ecología de Restauración", como una disciplina que incorpora tanto la investigación básica como la aplicada y que constituye una herramienta de gran utilidad.

Las plantas más adecuadas para el desarrollo de estas áreas deben presentar una serie de condiciones, entre ellas, que produzcan una alteración mínima del suelo, que requieran poca o ninguna irrigación, que tengan una alta productividad, que sean capaces de fijar  $N_2$  y que produzcan proteínas de alta calidad. En este sentido las leguminosas leñosas poseen especies que cumplen ampliamente estos requisitos (Felker y Bandurski, 1979). Puesto que incrementan el contenido de N en suelo por su fijación de  $N_2$  simbiótica, deberían ser parte de los planes de

revegetación ya que pueden crecer en suelos con bajo contenido en N y producen una mejora en algunas propiedades del suelo críticas para el crecimiento de las plantas (Virginia, 1990).

A pesar del interés que estas plantas puedan tener en la reforestación de zonas áridas y del conocimiento que de ellas se posee respecto a su reproducción por semillas o de las técnicas más adecuadas de plantación, en la actualidad se dispone de muy poca información acerca del manejo de sus posibilidades de formar asociaciones simbióticas radicales, aunque de hecho, éstas son las responsables de algunas de las ventajas comparativas que tienen dichas plantas, en especial en lo que a fijación de nitrógeno atmosférico y captación de P se refiere, por métodos biológicos (Herrera, 1984).

Hoy día está fuera de duda el interés, tanto desde un punto de vista práctico como aplicado, del estudio de las asociaciones simbióticas entre microorganismos y plantas (raíz) fijadoras de nitrógeno o potenciadoras de la captación de nutrientes, especialmente fósforo, por micorrizas. Afortunadamente las plantas leñosas más indicadas para las acciones de revegetación en suelos degradados, son susceptibles de formar nódulos fijadores de N<sub>2</sub> y micorrizas, con lo que podrían superar deficiencias en los dos principales nutrientes limitantes del crecimiento, N y P (Barea et al., 1990a).

### **1.3. Técnicas de propagación vegetal**

Otra etapa, fundamental en la planificación de ensayos con plantas, es la obtención de una cantidad adecuada de ejemplares en un periodo de tiempo relativamente corto. Lo ideal es trabajar con material homogéneo y en lo posible de alta calidad respecto a condiciones de adaptación al medio, de producción de biomasa y de compatibilidad respecto a los microorganismos simbióticos que se desean ensayar.

Tradicionalmente, al multiplicar plantas por semillas, se espera que éstas tengan una baja variabilidad, lo que se consigue en parte, obteniendo las semillas de plantas seleccionadas. A pesar de ello, en

este material siempre existe cierta variabilidad genética, que muchas veces puede encubrir los resultados de los tratamientos si no se ha tomado la precaución de disponer de un amplio número de repeticiones.

Una forma alternativa de eliminar los problemas antes descritos se basa en la propagación *in vitro*, mediante esta técnica, en la que puede obtenerse la regeneración de plantas a partir de fragmentos de tejidos u órganos, la variabilidad genética se reduce enormemente.

El uso de la propagación vegetal por medio del cultivo de tejidos no sólo se debe de analizar desde la perspectiva de producción de plantas para ensayos de investigación científica, sino que es además, un elemento de gran valor en la generación masiva de material vegetal, tanto para silvicultura clásica, como en aquellos casos en que por condiciones de estrés ambiental o antropogénico la población vegetal productora de semillas es escasa o prácticamente nula, situación que no es rara de encontrar en zonas xerofíticas.

A pesar de que el establecimiento de las simbiosis radicales es la culminación de un complejo sistema de interacciones entre la planta hospedadora, los endofitos y el medio ambiente, es el hospedador, el que controla diferentes aspectos de la simbiosis. De esta forma, dentro de variedades de una especie, se pueden encontrar diferencias significativas en distintos parámetros simbióticos (Will y Silvia, 1990).

La multiplicación mediante cultivo de tejidos, que permite la propagación clonal, se consigue a través de modificaciones sucesivas de la fuente de nutrientes, de los reguladores del crecimiento o de las condiciones ambientales (luz y temperatura). De esta manera se puede inducir la secuencia de diferenciación celular que conduce a la formación de órganos aéreos y radicales, esta técnica es un medio muy recomendable para realizar estudios metabólicos y fisiológicos de simbiosis en los que se desea determinar el papel específico del vegetal (Vieitez *et al.*, 1987).

En el proceso de multiplicación vegetal *in vitro* se pueden reconocer diferentes etapas (Murashige, 1974): La primera de ellas es el establecimiento de un cultivo aséptico, en segundo lugar, se debe obtener la producción de propágulos adecuados, que posteriormente se preparan para su transferencia a suelo. Debergh y Maene (1981) dividen esta tercera etapa en elongación de las yemas formadas previamente y en el enraizamiento *in vitro* o *extra vitrum* de los explantos.

En la actualidad y por el especial cuidado que se debe de observar en la transferencia de las plantas regeneradas a las condiciones ambientales de campo, se incluye una cuarta etapa en el proceso de micropropagación. En esta fase, se puede originar una gran mortalidad de plantas si no se realiza cuidadosamente; ello se debe, principalmente, a la baja formación de ceras epicuticulares en el vegetal de cultivo *in vitro* que lo hace ser muy susceptible a la deshidratación y a su necesidad de algunos días para ser independiente nutritivamente y poder ajustar el metabolismo a su capacidad fotosintética (Vieitez et al., 1987).

La propagación vegetal por cultivo de tejidos de especies leñosas no suele ser problemática cuando el material se encuentra en fase juvenil. Los tejidos u órganos envejecidos de árboles adultos son, por lo general, insensibles a los tratamientos de regeneración *in vitro* y requieren de un tratamiento previo en el que se someten a la inducción de tejido juvenil. La obtención de explantos adecuados debe proceder de plantas fuertes y sanas, teniendo en cuenta su origen, las aplicaciones de fertilizantes químicos o naturales y las condiciones ambientales de crecimiento (Tisserat, 1985).

La elección del método de multiplicación vegetal es importante, ya que afecta a la estabilidad genética de la planta producida. En la propagación mediante yemas axilares se parte de meristemas y únicamente es necesario provocar el desarrollo de las yemas ya existentes (Hu y Wang, 1983). Aunque éste es el sistema más lento, es el único método en el que las alteraciones genéticas están ausentes (Debergh y Maene, 1983).

El factor de mayor valor en relación con el enraizamiento es la presencia y balance de auxinas que pueden aumentar su porcentaje, así como el número de raíces formadas, tanto en material juvenil como adulto (Nemeth, 1986). El material juvenil responde mejor a los reguladores de crecimiento que los tejidos adultos y en el enraizamiento se ha observado la utilidad del uso de hongos micorrícicos que, al parecer, facilitarían la aclimatación (Barceló et al., 1989)

Un gran número de especies leñosas se han multiplicado *in vitro* tras la inclusión de BA (6-benziladenina) en el medio de cultivo. Esta citoquinina es la más usada para inducir desarrollo aéreo (Batchelor et al., 1989) ya que presenta ventajas económicas y de manipulación, al ser estable y de gran eficiencia (Hu y Wang, 1983).

#### **1.4. Micorrizas asociadas a plantas leñosas en zonas áridas y semiáridas**

La restauración de un ecosistema degradado no consiste únicamente en el establecimiento de plantas, sino que requiere una adecuada difusión de nutrientes, tanto horizontalmente, por influencia de las raíces superficiales, micorrizas y deposiciones eólicas, como en sentido vertical, por acción de especies vegetales de raíz profunda con sus respectivas asociaciones microbianas (Allen y Allen, 1988).

En la recuperación de ambientes xéricos los microorganismos formadores de micorrizas pueden ser de mucho interés, así Boerner (1986), destaca la importancia que tienen en el ciclado de nutrientes y captación de agua por las plantas. Trappe (1981) y Skujins y Allen (1986) describen la presencia de micorrizas asociadas a leñosas presentes en estos ecosistemas.

No se debe olvidar que la gran mayoría de las plantas vasculares han evolucionado hacia una dependencia a las micorrizas que constituyen la parte de la raíz de mayor actividad metabólica, y que en el caso de las plantas leñosas, la presencia de esta simbiosis es fundamental para su sobrevivencia (Trappe y Fogel, 1977).

En este sentido diferentes autores (Trappe, 1981; Barea y Azcón-Aguilar, 1983; Harley y Smith, 1983) indican que gran número de especies leñosas forman ecto o endomicorrizas (de tipo vesículo-arbuscular -MVA-) e incluso algunos géneros como, *Acacia*, *Alnus*, *Casuarina*, *Eucalyptus*, *Populus* y *Salix* entre otros, forman ambos tipos. El interés del estudio de MVA en leñosas surge por el gran número de especies que las poseen, por ser estas plantas, considerablemente dependientes de la simbiosis y por representar una buena fuente de inóculo gracias a su carácter perenne con lo que mantienen un potencial de micorrización permanentemente activo en el suelo (Hayman, 1983).

Los procesos de erosión conllevan la pérdida de propágulos de micorrizas. Este hecho en suelos áridos y semiáridos es un problema de gran magnitud, sobre todo, cuando las especies colonizadoras no son micotróficas, ya que no es posible, en ese caso, restaurar el sistema (Bagyaraj, 1989). De esta forma, a nivel de microorganismos, puede ser cierta la frase acerca de que "la desertificación genera desertificación" (Allen, 1989).

Las micorrizas tienen la máxima potencialidad en plantas con producción en vivero o en contenedores como fase previa al subsiguiente transplante, entre ellas se encuentran los árboles frutales y la mayoría de las especies forestales, en las que se incluyen las leguminosas leñosas (Graham, 1986).

#### **1.5. Fijación de N<sub>2</sub> por leguminosas-leñosas**

Para Felker (1981) la capacidad de fijar N<sub>2</sub> ha sido de tal trascendencia para las leguminosas-leñosas que les ha permitido soportar ambientes desérticos y de forma paralela evolucionar hacia mecanismos de resistencia al déficit hídrico. A modo de ejemplo, Monk et al., (1981) estiman que en *Acacia pulchella* el nitrógeno acumulado anualmente que proviene de la simbiosis puede alcanzar un 70 % del total.

A pesar de que pueden existir distintos procesos por los que se incrementa el nivel de nitrógeno en los suelos de ambientes xerofíticos,



sólo la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa leñosa tiene un nivel tal, que permite ser un elemento útil en la recuperación de sitios degradados.

Acerca de las leguminosas leñosas, consideradas adecuadas para crecer en ambientes áridos y semiáridos, Allen y Allen (1981), señalan que el microorganismo responsable de la nodulación en estos géneros corresponde a razas de *Rhizobium* de lento crecimiento. Sin embargo, en estudios posteriores, Herrera et al., (1986) y Jenkins et al., (1987) encontraron que plantas leñosas que crecían en zonas xerofíticas poseían nódulos formados tanto por razas de rápido como de lento crecimiento, y aunque estas últimas eran más frecuentes, las de rápido crecimiento fueron las que mostraron mayor eficiencia relativa. En otros muestreos realizados, también en zonas áridas, se encontraron que de 70 aislamientos de nódulos, todas las razas fueron de rápido crecimiento (Jenkins et al., 1988).

## **2. Micorrizas**

### **2.1. Aspectos generales**

Desde la segunda mitad del pasado siglo se conocen descripciones de relaciones entre hifas fúngicas y raíces, sin embargo, el concepto de micorriza es acuñado por Frank, en 1885, denominando con éste al sistema raíz-hongo presente en miembros de la familia *Cupuliferae* hoy *Fagaceae* (Harley, 1989). Posteriormente, se pudo comprobar que la mayoría de las plantas forman en sus raíces esta asociación simbiótica, siendo la excepción aquéllas que no la sustentan.

Esta relación ha sido objeto de intensos estudios en el presente siglo, concentrándose especialmente en las últimas dos décadas, con lo que se ha podido determinar que las micorrizas son una parte integral de la planta con un importante papel en el crecimiento y desarrollo del vegetal. En la actualidad se acepta que las micorrizas son uno de los componentes fundamentales de la raíz y de la rizosfera y que tienen gran importancia en el funcionamiento de la primera y en la dinámica de las poblaciones microbianas del suelo que las rodea (Linderman, 1988).

Los hongos de la micorriza, habitantes frecuentes del suelo, colonizan la corteza de las raíces y establecen con la planta un complejo sistema de interrelaciones determinadas por mecanismos físicos, bioquímicos y genéticos, que en la actualidad no son conocidos en su totalidad. El vegetal, además de proporcionar un nicho ecológico, suministra con los fotosintatos, sustratos energéticos y esqueletos carbonados al hongo, mientras que, en forma análoga, el microorganismo por medio de su amplia red de hifas externas, que puede extenderse más allá de las zonas de agotamiento rizosférico, capta nutrientes minerales que transfiere a la planta hospedadora, aspecto que tiene especial importancia entre los minerales que difunden más lentamente en la solución edáfica, tales como P, Cu y Zn.

Las plantas pueden presentar diferente grado de dependencia a la micorrización, característica que se observa al analizar el crecimiento y desarrollo de aquéllas, en presencia o no del hongo formador de micorrizas. De esta forma han jugado un destacado papel en la evolución y supervivencia de la mayoría de los vegetales, al mismo tiempo que tienen una significativa incidencia en la actual producción vegetal tanto en sistemas agrícolas como forestales, donde ocasionalmente es necesario incorporar hongos formadores de micorrizas con objeto de suplir las posibles carencias de no existir este factor.

Las micorrizas son asociaciones casi omnipresentes que tienen una amplia distribución entre los vegetales. Sólo en un reducido grupo de plantas no se forman, o todavía no se han observado, entre éstas destaca el orden *Centrospermales* y las familias: *Commelinaceae*, *Crucifereae*, *Cyperaceae*, *Fumaraceae*, *Polygonaceae* y *Urticaceae* (Harley, 1989).

Dentro de los anteriores grupos se han citado algunas excepciones, de tal forma, Hirrel et al., (1978) y Ocampo (1986), encontraron que varias especies de *Chenopodiaceae* y *Crucifereae* se micorrizaban de forma limitada en presencia de una planta ya micorrizada, no así, si crecían en solitario. Además, algunas especies del orden *Centrospermales* (Williams et al., 1974) y varias de la familia *Cyperaceae* (Mejstrick, 1972) y *Crucifereae* (Ross y Harper, 1973), forman simbiosis con hongos

micorrícicos en condiciones normales.

Desde un punto de vista anatomorfológico las micorrizas se han clasificado en tres grandes grupos: ectotróficas, endotróficas y ectendotróficas (Harley y Smith, 1983). Las ectomicorrizas junto a las endo-micorrizas son las dominantes y en todas ellas la invasión fúngica queda limitada a la región cortical no suberificada de la raíz de la planta hospedadora.

Las ectomicorrizas están presentes <sup>en</sup> alrededor de un 3% de las plantas superiores de gran interés, siendo comunes en distintas especies forestales, entre las que se pueden citar las familias *Betulaceae*, *Fagaceae*, *Pinaceae*, *Salicaceae* y *Tiliaceae* y en algunas especies de las familias *Ericaceae*, *Junghlandaceae*, *Leguminoseae*, *Mirtaceae* y *Rosaceae* (Harley y Smith, 1983).

Los hongos que las forman, de micelio tabicado, están relacionados con las clases Basidiomicete y Ascomicete (Harley y Smith, 1983), producen un manto fúngico que rodea la raíz y su desarrollo en el interior de la corteza radical es intercelular, lo que origina la denominada red de Hartig (Harley, 1989). Los hongos ectomicorrícicos dependen de sus hospedadores, en condiciones normales, para obtener compuestos de carbono reducido, sin embargo, muchas especies se pueden cultivar en ausencia de hospedador utilizando diferentes medios artificiales. Esta característica ha facilitado enormemente el estudio de la asociación.

Las endomicorrizas se dividen en 3 grupos, de los cuales el más extendido (lo forman del 80-90% de las especies vegetales) y el que incide directamente en el presente estudio, se caracteriza por el desarrollo de unas estructuras especializadas, vesículas y arbusculos en el córtex radical de la planta hospedadora, por ello se denominan micorrizas vesículo arbusculares (MVA). Los hongos que las forman no se han podido cultivar en medios nutritivos, son por tanto, simbiotes obligados, incapaces de desarrollar su ciclo de vida plenamente si no es en presencia de una planta hospedadora (Harley y Smith, 1983).

Los hongos formadores de MVA (HMVA) son inespecíficos en cuanto al hospedador, de tal forma que un simple propágulo puede colonizar un amplio rango de plantas hospedadoras (Stribley, 1989). No obstante, hay evidencia de que ciertas asociaciones tienen mayor eficacia que otras de acuerdo con el grado de "compatibilidad funcional" (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988) que es diferente para cada asociación.

Las esporas de los hongos formadores de MVA se pueden encontrar en el suelo, agrupadas en esporocarpos, libres o asociadas a micelio extrarradical. Tienen una pared externa gruesa, son globosas u ovaladas y con la edad aparecen vacuoladas, su contenido citoplasmático es denso y rico en gotas lipídicas.

Como criterio de clasificación taxonómica de los distintos hongos formadores de MVA se han usado, principalmente, las características morfológicas de sus esporas y esporocarpos así como el modelo de germinación, además de los tipos de estructuras producidos en el hospedador cuando se ha establecido la simbiosis. A pesar de esto no existe una certeza total respecto a la separación de cada nueva especie ya que los criterios taxonómicos basados en estudios genéticos o bioquímicos son muy rudimentarios (Morton, 1988).

## **2.2. Características diferenciales de los géneros formadores de MVA**

Resumiendo la información existente (Azcón-Aguilar et al., 1991) se puede decir: *Glomus* y *Sclerocystis* forman clamidosporas, originadas asexualmente en los extremos de hifas vegetativas. Las esporas están libres en el suelo o agrupadas al azar en esporocarpos en el caso de *Glomus* y ordenadas en esporocarpos en una capa simple alrededor de un plexo central de hifas estériles en *Sclerocystis*, por lo que se trata de un género de hongo endocárpico. En ambos géneros la colonización interna está formada por arbúsculos y vesículas.

*Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora* forman "azigosporas", similares a las zigosporas pero, salvo en un caso

excepcional, sin proceso sexual ni partenogénesis.

En *Gigaspora* y *Scutellospora* las esporas se forman sobre una hifa de sustentación de base bulbosa engrosada. En *Gigaspora*, el tubo de germinación de la espora emerge directamente a través de la pared y en la colonización producida al hospedador se observa la presencia de arbúsculos, pero no de vesículas en el parénquima cortical. En *Scutellospora*, género recientemente descrito, separado de *Gigaspora* (Walker y Sanders, 1986), la germinación se produce por uno o más tubos producidos cerca de la base de la espora a partir de una "placa" de germinación que es característica del género.

*Acaulospora* forma las azigosporas en solitario, lateralmente sobre una hifa especializada con un hinchamiento terminal o vesícula que después vacía su contenido en lo que será una espora sésil. *Entrophospora* forma las esporas a partir de una vesícula terminal producida en una hifa especializada por acumulación del contenido de la célula madre. Son dos géneros de difícil separación cuando las esporas están aisladas, como carácter distintivo se puede usar la existencia de uno o dos puntos de sutura.

### **2.3. Formación de MVA**

#### **2.3.1. Fases de la colonización**

El desarrollo de una micorriza ocurre según uno de los modelos siguientes: formación rápida y extensiva, extensiva pero con una fase retardada y lenta formación con una extensión limitada (Abbot y Robson, 1982). En el suelo existen dos tipos de inóculos claramente diferenciables que actúan como propágulos de MVA: las azigosporas o clamidosporas y las hifas externas que emergen de raíces micorrizadas. También existen otras estructuras como: trozos de hifas o esporas secundarias de las que no se tiene evidencia de su carácter colonizador como posibles propágulos (Warner y Mosse, 1980; Hayman, 1982; St John et al., 1983).

Las esporas de resistencia son capaces de soportar condiciones adversas durante mucho tiempo y pueden germinar cuando éstas son favorables. Estos órganos en los HMVA presentan un periodo de letargo innato que depende de la especie, pero que en términos generales, en condiciones de suelo húmedo, puede durar varias semanas desde la formación de la espora, mientras que en suelo seco se reduce significativamente tal periodo (Tommerup, 1985).

En la germinación de la espora, se produce absorción de agua que promueve una mayor turgencia y cambios biofísicos en las membranas (Siqueira, 1987). Si después de germinar no se produce la colonización, en la espora ocurre una retracción del citoplasma de la hifa de germinación, mecanismo que se lleva a cabo mediante su tabicación. De esta forma, se mantiene su viabilidad (Warner y Mosse, 1980), pudiendo volver a germinar y repetir el proceso varias veces (Koske, 1988). Lo anterior, es de gran valor ecológico, ya que las esporas pueden actuar como un inóculo funcional durante mayor tiempo. De cualquier forma la fuente de inóculo más eficaz está constituido por las hifas procedentes de restos de raíces colonizadas (Tommerup y Abbott, 1981), aunque estas sólo mantienen su capacidad colonizadora mientras la raíz conserva un mínimo de actividad metabólica.

En el ciclo de vida de los hongos MVA, la formación de la simbiosis constituye un proceso complejo en el que siempre se pueden distinguir, al menos, las siguientes etapas:

#### I. Germinación de la espora y desarrollo del micelio "saprofítico"

La espora tiene almacenado ARNm para la síntesis de proteínas necesarias en su germinación y posterior síntesis de nuevo ARNm para el desarrollo de hifas (Hepper, 1979). De esta manera, la capacidad biosintética de las grandes esporas de hongos MVA es suficiente para lograr la formación de un micelio mas o menos desarrollado, cuyo crecimiento, depende de las reservas de la espora madre.

Tanto la germinación de las esporas como la dirección del crecimiento hifal son independientes de la presencia de las raíces de la planta hospedadora (Powell, 1976). Sólo cuando al menos una de las hifas llega a la zona rizosférica, se produce una serie de interrelaciones en las que el hospedador ejerce una considerable influencia en el comportamiento del endofito.

## II. Estimulación de una hifa cuando está en la rizosfera

En la estimulación fúngica en la rizosfera los exudados radicales parecen desempeñar un importante papel. De tal forma, se observa una correlación positiva entre el grado de micorrización y el ritmo de exudación radical, que estaría según algunos autores (Azcón y Ocampo, 1981; Graham et al., 1981), posiblemente correlacionado con la permeabilidad de las membranas de las células radiculares.

La presencia de microorganismos rizosféricos también puede facilitar la formación de micorrizas por medio de diferentes mecanismos (Barea y Azcón-Aguilar, 1983), tales como, la producción de compuestos permeabilizadores de la membrana de las células radiculares (Bowen, 1980), el aumento de la exudación o de la producción de fitohormonas que potencian la micorrización (Azcón et al., 1978).

## III. Unión de la hifa infectiva a la superficie radical

Las estructuras fúngicas de unión al hospedador varían de acuerdo al origen de la hifa de colonización, así si la hifa procede de una espora, forma una estructura de preinfección consistente en un abanico de hifas tabicadas no infectivas, del cual se desarrolla otra colonizadora no tabicada. Sin embargo, cuando la hifa procede de otra raíz micorrizada, no se forma la estructura de preinfección, lo que puede sugerir que en este último caso hay un apoyo nutritivo o funcional (Powell, 1976).

#### IV. Formación de un punto de penetración

Cuando una hifa contacta con una raíz susceptible de ser micorrizada, puede que ocurra o no la penetración, sin embargo, si se produce el primer punto de entrada, en la raíz se aumenta la predisposición a ser colonizada nuevamente (Azcón Aguilar *et al* 1984; Bonfante-Fasolo, 1984).

##### 2.3.2. Morfología de las MVA

Según la edad de las células radicales, éstas pueden o no manifestar la colonización, así en células jóvenes, tanto su estructura como la del hongo aparecen íntegras, mientras que en otras de mayor edad, ambos simbioses muestran estructuras degradadas (Allen *et al.*, 1989). De todas formas, la magnitud de la colonización interna está controlada por el hospedador (Buwalda *et al.*, 1984).

Tras la penetración, el hongo coloniza el córtex mediante hifas distributivas que se ramifican inter e intracelularmente (Bonfante-Fasolo, 1984). En la parte externa del parénquima cortical el endofito forma unos enrollamientos espirales de hifas intracelularmente, mientras que en las células de la parte interna desarrolla hifas intercelulares que, al penetrar, se ramifican. La membrana de las células del hospedador se invagina rodeando las ramificaciones del hongo. A esas estructuras ramificadas se les denomina "arbúsculos".

Los arbúsculos, que pueden aparecer entre los 6 y 8 días de la penetración, se producen por división dicotómica de una rama lateral de una hifa de desarrollo intercelular paralela al cilindro vascular. Dentro de una célula cortical hospedadora sólo se forma un arbúsculo, con función de intercambio biotrófico bidireccional de nutrientes (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988). Tras una corta vida, de 4 a 10 días, degeneran y la célula cortical recupera su actividad normal, e incluso la capacidad de que en su interior se desarrolle un nuevo arbúsculo.

Las "vesículas", el otro órgano característico de las MVA, se forman



a lo largo de toda la raíz y en algunos casos incluso, extrarradicalmente, cuando el desarrollo de las hifas internas está establecido. Su contenido elevado en lípidos, hace suponer que actúan como órganos de reserva, y la cantidad de ellas en una raíz, dependerá de su edad fisiológica.

Al mismo tiempo, las hifas del hongo MVA crecen externamente hacia el sustrato que rodea a la raíz, formando el micelio extrarradical, cuyo desarrollo es un hecho clave en la respuesta de la planta a la micorriza (Abbot y Robson, 1985). Según Smith y Gianinazzi-Pearson (1988) 1 cm de raíz micorrizada puede tener varios metros de hifas externas capaces de explorar un volumen de suelo adicional, al que no acceden las raíces no micorrizadas. Así, se aumenta notablemente la capacidad de captación de nutrientes al explorar más allá de las zonas de agotamiento de nutrientes inmóviles de la rizosfera.

Sobre la red tridimensional de micelio externo se forman las esporas de resistencia, ricas en material lipídico, que a veces se agrupan en esporocarpos y que constituyen el inicio y fin del ciclo de vida de estos hongos.

### **2.3.3. Factores que afectan la formación de las MVA**

#### **2.3.3.1. Grado de dependencia de la planta**

Las especies con un sistema radical tipo magnoloide, poco ramificado, grueso y sin pelos radicales, tienen mayor dificultad para captar nutrientes que difunden lentamente en la solución edáfica, o con mayor demanda por ellos; son las que obtienen más beneficios de las MVA, al mismo tiempo, este hecho se traduce en que sean las más dependientes de la simbiosis para alcanzar un crecimiento óptimo. De esta manera, la morfología y geometría de la raíz por un lado, y el metabolismo y fisiología de la planta por otro, determinan, en gran medida, el grado de micotrofia de las plantas.

Una vez establecida la simbiosis, el genotipo de la planta

hospedadora condiciona su eficiencia (Estaún y Save, 1990), mientras que la relación encontrada entre la colonización, el potencial del inóculo y la abundancia de esporas condiciona la interdependencia planta MVA y sus respuestas a condiciones ambientales (Benjamin, et al., 1988). De todas formas, esta interacción entre planta-hongo indica un grado extraordinario de compatibilidad tanto a nivel estructural como fisiológico (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988).

#### **2.3.3.2. Especificidad en las MVA**

Los HMVA presentan una baja especificidad, a pesar de esto, aparecen en determinadas condiciones de suelo o clima especies predominantes (Bethlenfalvay et al., 1989). Lo anterior se puede deber a las diferentes alternativas de supervivencia y adaptación de los hongos, lo que tiene especial importancia en suelos semiáridos (McGee, 1989).

Entre las propiedades del suelo que ejercen mayor influencia selectiva en los HMVA, se encuentra el pH y el nivel de macro y micronutrientes asimilables sobre distintas especies de hongos MVA (McGee 1989).

#### **2.3.3.3. Efectividad de las MVA**

A pesar de la no especificidad en la simbiosis hongo-planta, sí hay una fuerte correlación entre el tipo de endofito y la planta hospedadora (Barea, 1991) en lo que a eficiencia de la relación se refiere.

La respuesta de una planta a la simbiosis dependerá de sus requerimientos nutritivos y de los mecanismos que le permitan superar el estrés nutritivo (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988). De todas formas, las plantas con MVA presentan una relación de distribución de fitomasa raíz/parte aérea menor que aquellas asimbióticas, además dicho valor es inversamente proporcional a la biomasa total (Bethlenfalvay et al., 1985a).

La efectividad simbiótica de estos hongos se puede definir como la capacidad de estimulación del crecimiento del vegetal, a pesar de esto, no existe correlación entre la magnitud de la infección interna y su repercusión en el crecimiento de la planta (Clarke y Mosse, 1981), ni tampoco, entre la velocidad y extensión de la colonización con la efectividad de la simbiosis (Vierheilig, 1990). Los mejores endofitos deberían ser los que produzcan más micelio externo para captar nutrientes (Abbott y Robson, 1984).

#### **2.3.3.4. Condiciones físico químicas del medio**

Los factores ambientales, como humedad y temperatura, afectan directamente la simbiosis. Concretamente, cuando las temperaturas alcanzadas por las raíces van de 40 a 45°C la colonización de MVA no modera la conductividad hídrica (Newman, 1988). Por otro lado, si se disminuye la intensidad luminosa o cuando el fotoperíodo se acorta, se reduce la respuesta a la micorrización (Hayman, 1984) por una menor capacidad fotosintética de la planta, lo que rebaja el aporte de carbohidratos al hongo.

También el ambiente puede afectar indirectamente a la simbiosis al incidir en la germinación de las esporas. Otros factores como la contaminación disminuyen la micorrización, incluso en árboles considerados sanos (Holes y Berki, 1988). La aplicación excesiva de fertilizantes químicos fosforados y nitrogenados es otro ejemplo de factor negativo en la formación de MVA (Abbott y Robson, 1984; Barea y Azcón-Aguilar, 1983; Avio y Giovannetti, 1988).

#### **2.3.3.5. Condiciones biológicas del medio**

La presencia de microorganismos es un aspecto de notable incidencia en la germinación de los HMVA, pudiendo tener efectos más o menos significativos según el microorganismo involucrado (Azcón-Aguilar et al., 1986, Mayo et al., 1986).

Se ha observado que la reducción en la efectividad de algunas asociaciones micorrícicas en campo, está asociada a la presencia en estos suelos de microartrópodos, especialmente del orden *Collembola* (McGonigle y Fitter, 1988). A pesar de que generalmente estos organismos se asocian desde un punto de vista positivo en relación a los ciclos de nutrientes del suelo, al parecer la continua ingestión de micelio micorrícico puede provocar una disminución de las conexiones hifales, dando origen a una pérdida de producción de biomasa vegetal.

Las respuestas, sin embargo, a los anteriores factores por los HMVA no es la misma en todos los casos y varía de acuerdo a la especie de hongo así como del lugar de aislamiento del mismo (Mosse et al., 1981).

### 3. *Rhizobium*

#### 3.1. Aspectos generales

El ciclo del N tiene uno de sus eslabones más importantes en la incorporación del dinitrógeno de la atmósfera a la biosfera mediante la llamada fijación biológica de nitrógeno (FBN), este proceso es llevado a cabo por microorganismos de vida libre o asociados simbióticamente a plantas. Pieza clave en la FBN es la enzima nitrogenasa, siendo el amonio el primer producto estable que aparece en el proceso (Emerich et al., 1983). Entre las distintas formas de FBN la de mayor importancia es la que ocurre en órganos nodulares radicales en las plantas superiores. La fijación simbiótica del  $N_2$  es un proceso tan importante en el mantenimiento de la vida en los ambientes terrestres, que sólo es desplazada a un segundo plano por la fotosíntesis. La FBN es extremadamente importante, ya que la planta puede proveerse de este elemento de la atmósfera que en términos prácticos es una fuente sin límite de  $N_2$  (Beringer, 1984).

Se puede concluir que la FBN alcanza su máxima eficiencia y magnitud en las simbiosis radicales establecidas entre gran parte de las especies de la familia *Leguminosae* y algunos géneros de la familia *Rhizobiaceae*, pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*,

*Azorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Frankia*. En esta relación, el microorganismo es capaz de inducir estructuras nodulares específicas en la raíz, sitios en los que la bacteria, previa transformación fisiológica y anatómica a bacteroide, es capaz de reducir el dinitrógeno atmosférico a amonio, utilizando como fuente de energía los compuestos carbonados fotosintetizados por la planta.

Como se dijo anteriormente, la capacidad de reducción del  $N_2$  se debe a la actividad del complejo enzimático "nitrogenasa", que presenta una estructura y propiedades similares en todos los microorganismos fijadores de nitrógeno. Su evolución se ha asociado, según diversos autores, (Burns y Hardy, 1975; Trinick, 1982) a un carácter primitivo. La enzima nitrogenasa consta de dos subunidades, la I o molibdoferroproteína, y la II o ferropoteína. Tanto la FBN, como todas las otras reacciones que cataliza esta enzima, requieren además de la presencia de ambos componentes, poder reductor, Mg, ATP, protones y ambiente anaeróbico (Burgess, 1984). El proceso de fijación en leguminosas implica un complejo proceso de interacciones metabólicas entre el citoplasma de la célula hospedadora infectada y el bacteroide de *Rhizobium*, sistema que es controlado por una serie de mecanismos bioquímicos y genéticos.

La actividad nitrogenasa produce liberación de  $H_2$  que puede tener una importante consecuencia fisiológica, por su capacidad inhibidora de la reducción de  $N_2$ , aunque no de protones. De esta forma, una acumulación de  $H_2$  implicará la disminución en la fijación de  $N_2$ , sin embargo, la nitrogenasa continuará produciendo  $H_2$  lo que supone una gran pérdida de poder reductor y ATP (Herrera, 1984). Actualmente se reconoce que es el hospedador el que determina la expresión de la hidrogenasa, ya que una misma raza de *Rhizobium* se comportará de forma diferente de acuerdo con el hospedador que tenga. Lo anterior sucede, no sólo en especies diferentes de leguminosas, sino que también entre variedades de una misma especie (Bedmar et al., 1983).

La energía requerida en la simbiosis *Rhizobium*- leguminosa se obtiene a partir del fotosintato que llega a los nódulos a través del floema. Se establece así una estrecha relación entre la fotosíntesis de

la planta, la distribución de fotosintato y la fijación del  $N_2$ . De esta forma, las necesidades de energía asociadas con la reducción de  $N_2$  en el endofito y la asimilación del  $NH^+$ , producido en el citosol del hospedador, además de la síntesis de compuestos orgánicos nitrogenados para exportar desde el nódulo, se satisfacen con productos de la fotosíntesis. Por último, el fotosintato es utilizado como esqueleto carbonado, lo que permite el desarrollo y mantenimiento del tejido nodular (Schubert, 1986).

### 3.1.1. Clasificación

Desde que a fines del siglo pasado se conoció que son bacterias las responsables de la formación de los nódulos radicales en las leguminosas, y de la fijación de nitrógeno, se han realizado multitud de esfuerzos por clasificar taxonómicamente dichos microorganismos.

Inicialmente se separaron en dos grupos, en base a su velocidad de crecimiento, posteriormente, dada la especificidad mostrada por distintas leguminosas hospedadoras, el género *Rhizobium* fue dividido en seis especies diferentes, además de un grupo extra en el que se situaban aquellas razas de clasificación conflictiva, según se indica en el cuadro I.

Recientemente y por medio de análisis de homología de ADN, relaciones serológicas, electroforesis de proteínas solubles y por análisis taxonómico numérico, se han reclasificado las bacterias de este género, agrupando algunas especies, eliminando otras, además de incorporar la presencia de un nuevo género (Cuadro II).

Aquellas bacterias que no pueden situarse en ninguna de las especies se denominan, *Rhizobium* o *Bradyrhizobium* sp., acompañado del nombre latino de la especie de leguminosa a la que nodulan.

Cuadro I.- Clasificación inicial de las bacterias fijadoras de N<sub>2</sub> en simbiosis con leguminosas.

Tipo de crecimiento	<i>Rhizobium</i>	Hospedadores
rápido crecimiento	<i>R. leguminosarum</i>	<i>Pisum, Lens, Vicia</i>
	<i>R. phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
	<i>R. trifolii</i>	<i>Trifolium</i>
	<i>R. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>
lento crecimiento	<i>R. japonicum</i>	<i>Glycine</i>
	<i>R. lupini</i>	<i>Lupinus, Ornithopus</i>
	<i>R. COWPEA</i>	Otros

Cuadro II. Última clasificación de bacterias fijadoras de N<sub>2</sub> en simbiosis con leguminosas

GENERO	ESPECIE	BIOVARIEDAD	PLANTAS QUE NODULA	CARACTERISTICAS
<i>Rhizobium</i>	<i>meliloti</i>		<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>	Rápido crecimiento
	<i>leguminosarum</i>	<i>viceae</i>	<i>Pisum, Vicia, Lens</i>	"
		<i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>	"
		<i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i>	"
	<i>loti</i>		<i>Lotus</i>	"
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>		<i>Glycine y Lupinus</i>	Lento crecimiento
<i>Azorhizobium</i>	<i>caulinodans</i>		<i>Sesbania rostrata</i>	Nódulos en tallo y raíz
<i>Sinorhizobium</i>	<i>fredii</i>		<i>Glycine</i>	Rápido crecimiento
	<i>xinjiangensis</i>			Rápido crecimiento



### 3.2. Formación de los nódulos

#### 3.2.1. Fases de la infección

Desde el momento en que la bacteria está en la rizosfera de la leguminosa, hasta que se produce la fijación de  $N_2$ , se pueden diferenciar una serie de etapas, definidas y secuenciales, controladas por ambos simbioses, de tal forma que si falla alguna de ellas el proceso aborta. Así, la formación de nódulos fijadores de N en plantas leguminosas es la culminación de un proceso integrador en el que están involucrados numerosos genes de la bacteria y de la planta, sujetos a señales y cambios que ocurren entre el macro y microsimbionte (Downie y Johnston, 1988).

Los sucesos que tienen lugar en la fase de preinfección, infección y nodulación, en la colonización de leguminosas por *Rhizobium*, son similares a los que tienen lugar en otras asociaciones con carácter parasítico (Sharifi, 1984).

Para Faria *et al.*, (1988) la secuencia en la infección está dada por:

- a) Colonización de la superficie radical
- b) Penetración de la pared primaria de células epidérmicas radicales
- c) Penetración intracelular
- d) Penetración ocasional de células epidérmicas y corticales entre células vecinas.

Los mecanismos de infección de los microorganismos fijadores de  $N_2$  de la familia *Rhizobiaceae* son diversos y se han descrito los siguientes sitios de entrada en la planta: pelos radicales, heridas y epidermis (Sprent y Faria, 1988).

La penetración de las bacterias a través de los pelos radicales de la planta hospedadora ocurre normalmente entre 20 y 22 horas después de la inoculación (Ridge y Rolfe, 1985). La bacteria induce una invaginación en el pelo radical, formando un canal de infección por el continuo

crecimiento bacteriano dentro de él, posteriormente, las bacterias son liberadas en algunas células del córtex radical.

Existe un alto grado de especificidad cuando el sistema de infección en la planta hospedadora se realiza vía pelos radicales, mientras que es menor cuando la bacteria penetra directamente, rompiendo la epidermis radical o a través de una herida (Solheim, 1983).

El establecimiento de la bacteria en las células de la planta requiere un gran equilibrio entre el endofito y el hospedador, la penetración puede tener lugar sólo en una o en un reducido número de células que se dividen rápidamente produciendo la estructura nodular propia de la simbiosis (Sprent y Faria, 1988). No obstante, hay algunas evidencias acerca de que, antes incluso de la penetración, podría ocurrir división celular en el tejido del futuro nódulo, por lo que se podría estar en presencia de un factor extracelular difusible que desencadena el proceso de formación nodular (Long, 1989).

### **3.2.2. Factores que afectan a la simbiosis**

En términos generales, cualquier factor que incida en alguna de las fases del proceso puede influenciar el estado de la simbiosis, sin embargo hay algunas condiciones que afectan específicamente la relación simbiótica, a pesar de que son de poca relevancia para las partes si se analizan independientemente.

#### **3.2.2.1. Condiciones químicas del medio**

En áreas áridas o semiáridas puede que el agua no sea el mayor factor limitante para el crecimiento de la planta, pero sí lo puede ser en el establecimiento y función de la simbiosis (Dommergues, 1982). De tal forma, en algunos casos, el estrés hídrico puede reducir o impedir la nodulación o hacer que decrezca la fijación de  $N_2$  (Peña et al., 1988).

Dentro de los factores químicos, el pH también afecta a los procesos de infección y nodulación, si bien lo hace de forma diferente según la especie de leguminosa o la raza de *Rhizobium*. No obstante, en condiciones naturales de suelo, es muy difícil aislar el pH de otros factores, tales como la presencia de elementos tóxicos (Ca, Mn, Al). También se debe de considerar que, en áreas de pH ácido, el P es un factor limitante de particular importancia para el crecimiento de la planta, nodulación y fijación de N<sub>2</sub>. Becking (1976), sin embargo, a partir de ensayos de laboratorio, sugiere que el pH no es el limitante de la nodulación en plantas no leguminosas (actinorrizas).

La salinidad es otro factor a considerar en el suelo, en este sentido, Singleton et al., (1982) encontraron en una serie de ensayos, que muchas razas de *Rhizobium* pueden crecer y sobrevivir a concentraciones salinas que son limitantes a un amplio número de cultivos agrícolas, no obstante las primeras etapas del proceso simbiótico pueden ser extremadamente sensibles a la salinidad (Bohlool et al., 1986). Otro aspecto que incide negativamente en la nodulación es la presencia de N combinado, en el sustrato de cultivo del vegetal (Dixon y Wheeler, 1983).

#### 3.2.2.2. Condiciones físicas

Los fenómenos de adsorción entre microorganismos y las partículas del suelo, en muchos ambientes, tienen una importancia de primera línea en ecología microbiana. De esta manera, se ha sugerido que la textura del suelo puede ser una importante característica que determina la capacidad de algunas razas de *Rhizobium* a sobrevivir a la desecación y al calor (Bushby, 1982).

La temperatura del suelo rizosférico, al influir directamente en la temperatura que alcanza la raíz, incide también en la simbiosis. De esta forma, se ha estimado que sobre los 30°C se afecta la nodulación, retardándola o disminuyéndola, según los inoculantes y de acuerdo a si las plantas están o no adaptadas a estas condiciones. A pesar de lo anterior, no se conoce cómo afecta la temperatura a la distribución de los nódulos en especies leñosas. Aunque se debe tener en cuenta que en

muchas leguminosas, la mayor cantidad de nódulos se localiza en los estratos menos superficiales del suelo con lo que se disminuye este problema (Munns et al., 1977).

### **3.2.2.3. Condiciones biológicas**

Los suelos en los que se cultivan leguminosas pueden sostener abundantes poblaciones de *Rhizobium* sp., que pueden ser o no efectivos en un cultivo determinado. En tales casos los inóculos seleccionados tienen que competir por sustrato y espacio, tanto con las razas nativas de *Rhizobium*, como con la población microbiana del suelo (Trinick, 1982).

La materia orgánica también interacciona con los microorganismos del suelo y aunque se asume que su presencia debería ser beneficiosa para la sobrevivencia de *Rhizobium*, no siempre ocurre así. Los mecanismos por los que la materia orgánica aumenta la supervivencia de la bacteria es posible que estén asociados a una alteración en la relación de predación, al otorgar una protección extra frente a bacteriófagos (Bushby, 1982).

Algunos factores intrínsecos de la bacteria también se deben de tener en cuenta, de esta forma, los requerimientos nutricionales son diferentes para razas de rápido o lento crecimiento (Stowers y Elglesman, 1984).

También se ha observado que algunos agentes patógenos como nematodos e insectos que producen defoliación producen ataques a las plantas cuyas consecuencias inciden sobre los efectos de la simbiosis, reduciendo la nodulación.

## **4. Doble simbiosis en leguminosas: micorrizas y nódulos**

### **4.1. Fisiología de la doble simbiosis**

La simbiosis tripartita *Rhizobium*-MVA-leguminosa permite que se alcance un nivel nutricional óptimo en las plantas que la sustentan. En las subfamilias *Mimosoideae* y *Papilionoideae*, dentro de las cuales se

incluye una gran variedad de especies leñosas, tanto arbustos como árboles, se puede encontrar frecuentemente este tipo de doble simbiosis (Hayman, 1986; Barea et al., 1990a). En estas subfamilias se encuentran menor número de especies leñosas que en las *Caesalpinioideae*, sin embargo, son las que tienen mayor tasa de fijación de N. (Brewbaker, 1990)

En las últimas décadas se ha comenzado el estudio de la doble simbiosis en leguminosas, sin embargo se ha dirigido principalmente a plantas herbáceas, de esta manera, la información existente en leguminosas leñosas es relativamente escasa y en algunos casos contradictoria, o muy específica para determinadas condiciones de ensayo.

Se ha descrito que, ocasionalmente, el desarrollo de cada microsimbionte radicular es mayor en ausencia del otro (Brown y Bethlenfalvay, 1986). La inhibición se ha atribuido a la competición entre ellos por carbohidratos radiculares, aspecto que también afecta a la productividad de la planta (Bethlenfalvay et al., 1985b).

El orden y tiempo de inoculación de los simbiontes radiculares es muy importante en la interacción, así Brown y Bethlenfalvay, (1986) observaron que la nodulación en la simbiosis tripartita se inhibía cuando se introducía el hongo formador de MVA en una fase inicial. Por otra parte, si ambos endofitos se inoculan cuando la planta tiene 20 días, el área foliar es mayor que cuando se inoculan en el momento de germinación de las semillas. Si se aplica un solo inoculante o ambos separadamente, se da origen a plantas de área foliar intermedia (Brown y Bethlenfalvay, 1987).

Sin embargo, en suelos con deficiencia de P, Kaur y Singh (1988) señalan, que la doble inoculación produce un gran incremento, tanto en la colonización por hongos MVA, como en la nodulación y en el contenido de N y P de la planta hospedadora, con la consiguiente mayor producción de biomasa. La respuesta de la leguminosa herbácea a la doble inoculación se debe entender como un fenómeno de interacción sinérgica, en estas condiciones ambientales y nutricionales, la contribución de las MVA en

la simbiosis tripartita es particularmente significativa en las leguminosas, debido al gran requerimiento de P en la formación de los nódulos y en la posterior fijación de N<sub>2</sub>.

La deficiencia de P puede limitar la nodulación, sin embargo, en plantas de soja en doble simbiosis, con *Rhizobium* y hongos MVA se ha observado que se elimina la incidencia de este factor cuando la concentración de este elemento en el suelo es, al menos, de 20 µM. (Bethlenfalvay y Yoder, 1981). De esta manera, si una leguminosa crece en ambientes con bajo contenido de P asimilable, la formación de MVA promueve la nodulación y fijación de N<sub>2</sub> (Barea y Azcón Aguilar, 1983). Análogamente la asociación planta-*Rhizobium* influye positivamente en la colonización y desarrollo de las vesículas del hongo en las raíces de la planta hospedadora (Pacovsky et al., 1986).

Es evidente, por tanto que la doble simbiosis es particularmente importante en leguminosas cultivadas en ambientes deficitarios en P y N ya que la micorrización estimula la actividad nodular, con lo que se aumenta el crecimiento de la planta hospedadora (Vejsadova et al., 1987). La colonización del sistema radical por uno o ambos de los endofitos produce cambios en la absorción y distribución de algunos elementos nutricionales de la planta hospedadora, particularmente fósforo o nitrógeno (Bethlenfalvay y Yoder, 1981).

La interacción existente entre los microsimbiontes asociados a una misma leguminosa puede ser directa o mediante la acción que ejercen sobre la planta. Tales interacciones entre *Rhizobium* y HMVA puede existir tanto a nivel de precolonización en la rizosfera, como durante el proceso de penetración de la raíz, o en etapas posteriores de la simbiosis. La información respecto a las interacciones entre los dos microsimbiontes en la rizosfera indica que, aunque la nodulación y la formación de MVA ocurren prácticamente en forma simultánea, los dos endofitos no parecen competir por sitios de penetración (Smith y Bowen, 1979; Ames y Bethlenfalvay, 1987).

El efecto de las MVA sobre la capacidad colonizadora de *Rhizobium*, en el número y tamaño de los nódulos y en la actividad de éstos, parece deberse, en gran parte, a un efecto generalizado derivado de la mayor disponibilidad de P de las plantas micorrizadas (Gueye et al., 1987).

Sin embargo, Ames y Bethlenfalvay (1987) señalan la existencia de un factor potenciador del peso seco de la raíz y de la actividad nodular, de carácter localizado, no sistemático y no mediado directamente por el P. En este sentido, además del aporte extra de P inducido por las micorrizas a las plantas con que se asocian, Pacovsky et al. (1986) han descrito, que en leguminosas también se producen mayores concentraciones de Fe, Zn y Cu.

Los resultados de la doble simbiosis medidos como eficiencia en uso del P y N, en comparación con los que se producen en plantas dadas de P y N (fertilizante), sugieren efectos no nutricionales, de las MVA sobre las funciones simbióticas que estarían mediados por el hospedador (Brown y Bethlenfalvay, 1988). La respuesta de la planta a la doble colonización es compleja, y depende del equilibrio existente entre los tres simbioses, que en muchos casos, sólo se puede explicar por la intervención de procesos de regulación funcional que ocurren en forma adicional a los relacionados con el aporte de nutrientes por los microsimbioses (Pacovsky y Fuller, 1988).

Tanto la calidad como la cantidad de carbohidratos, proteínas y aminoácidos encontrados en plantas asociadas a *Rhizobium* y HMVA dependen de los cambios fisiológicos ocasionados por la infección bacteriana o del hongo endomicorrízico (Pacovsky, 1989).

Bajo estrés hídrico, la doble simbiosis también altera la fisiología de las plantas, de tal manera que, en estas condiciones, se ha observado que gran parte de los valores correspondientes a parámetros fisiológicos de las plantas con doble inoculación son mayores que los de aquéllas sin micorrizar, o con aporte de P compensatorio (Bethlenfalvay et al., 1987); Barea et al., 1990b). Específicamente, se ha descrito una disminución significativa en la transpiración y conductancia medida en hojas, que fue

significativamente mayor en plantas micorrizadas. Esta mejor adaptación al ambiente seco, observada en plantas con doble simbiosis, se puede explicar por el efecto estimulador de las HMVA en el desarrollo de los nódulos y en la fijación de  $N_2$ , con lo que se mejora el estado nutricional de la planta. Lo anterior no es sólo resultado de una mejor nutrición fosforada, sino que también hay incremento en la fijación de  $CO_2$  por una mejor conductancia foliar, producto de la existencia de sistemas bioreguladores propios de la simbiosis. Los efectos producidos en los niveles de  $CO_2$ , P y N en plantas con doble simbiosis frente a plantas no simbióticas, son positivos y se pueden considerar como consecuencia directa de la doble simbiosis; además, se ha encontrado que los efectos de los endofitos sobre la fijación de  $CO_2$  son aditivos (Brown *et al.*, 1988).

Las diferentes respuestas de las plantas ante los inoculantes han sido expresadas en términos de biomasa, relaciones hídricas, tolerancia a metales pesados o desarrollo del micelio externo del hongo. La procedencia geográfica de las especies de HMVA puede ser una fuente de variabilidad que de origen a distintas características o respuestas en la simbiosis. De esta forma, los aislamientos de HMVA en zonas áridas, y la posterior inoculación de éstos en leguminosas, produce mayores contenidos en K que en leguminosas noduladas inoculadas con la misma especie de hongo procedente de zonas semiáridas o templadas (Bethlenfalvay *et al.*, 1989).

#### **4.2. Transporte de nutrientes**

Hay evidencias experimentales que apoyan la existencia de puentes de unión establecidos por las hifas de las micorrizas comunes a diferentes plantas que crecen en vecindad en comunidades naturales. Este hecho modifica los fenómenos de competición por nutrientes, el ciclado de estos y su tasa de reposición (Newman, 1988).

Otro caso es el efecto de las MVA sobre la translocación y distribución de nutrientes en la propia planta. Boerner (1986), describe



la existencia de retranslocación de nutrientes, en plantas leñosas cuando crecen en sitios de baja fertilidad, con valores superiores a los encontrados en plantas herbáceas asociadas.

En plantas herbáceas que ocupan el sotobosque, se ha observado reabsorción, pero no así en los vegetales que crecen en ambientes muy luminosos, lo cual se explicaría por la disminución de las reservas energéticas ocasionada por la limitación luminosa a que están sometidas dichas plantas (Boerner, 1986).

Además, si se considera el transporte de nutrientes dentro de la propia planta, hay que tener en cuenta sus asociaciones simbióticas, no en la medida en que alteren la distribución en ella, sino también, en el transporte de nutrientes desde el microsimbionte al hospedador y viceversa. En estas asociaciones con transporte bidireccional, la estructura y función de las interfases y el flujo a través de las membranas de ambos organismos es de gran importancia. En este sentido, el funcionalismo de las ATPasas de membranas en hongos deben de estar implicadas en los mecanismos de transporte de la simbiosis micorrícica, lo que posiblemente incidirá en el establecimiento de un modelo biológico de mayor complejidad que el de un simple cambio de carbono por fósforo (Smith y Smith, 1990).

Normalmente, el hongo MVA toma P del suelo por un mecanismo activo, lo transloca pasivamente a la interfase apoplástica del arbusculo, sitio en donde de forma activa es tomado por las células radicales. El transporte de P entre plantas requiere que la interfase simbiótica de la planta donadora tenga un transporte inverso al que existe normalmente, con un flujo de P desde las células radicales hasta el apoplasto y absorción de éste por el hongo.

En la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, el  $N_2$  atmosférico es reducido en los bacteroides con lo que la planta obtiene N en forma de amonio; este producto debe ser asimilado rápidamente en una combinación orgánica con objeto de impedir la inhibición del proceso enzimático, y por el carácter tóxico del mismo (Dixon y Wheeler, 1983). No se ha encontrado

evidencia de que ocurra el transporte de formas inorgánicas de N. Por otra parte, en la simbiosis MVA, el hongo puede transportar a la planta N en forma de glutamina, y quizás otros aminoácidos, además de nutrientes inorgánicos como P, Zn y Cu. Tanto en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa como en la MVA, no hay transporte hacia la planta de ninguna forma de carbono orgánico. Así, en ambas simbiosis, es la planta la fuente de carbono orgánico, que en el caso del hongo, se realiza probablemente en forma de hexosas, mientras que en el caso de *Rhizobium*, se hace como ácidos orgánicos (Smith y Smith, 1990).

Respecto al transporte de nutrientes entre plantas, los estudios realizados con trazadores isotópicos ponen de manifiesto el posible movimiento de C, N y P desde una planta donadora a una receptora a través de las uniones entre hifas micorrícicas (Newman, 1988).

Aunque se ha observado la transferencia de  $^{14}\text{C}$  de una planta a otra, vía unión micorrícica, no está claro que la transferencia de compuestos orgánicos pueda ser suficiente para aumentar significativamente el crecimiento, o la supervivencia, de la planta receptora (Newman, 1988).

Haystead et al. (1988) demuestran, utilizando  $\text{N}^{15}$ , la transferencia de nitrógeno entre sistemas radicales de leguminosas y gramíneas asociadas, mediado posiblemente, por hifas micorrícicas. En este sentido es ampliamente conocido el efecto beneficioso en la nutrición nitrogenada en cultivos mixtos de plantas fijadoras de nitrógeno y no fijadoras, que está relacionado con la posible transferencia de nitrógeno procedente de la fijación, a los vegetales no fijadores (Burity et al., 1989). Se ha descrito que los niveles de fijación calculados son diferentes si las plantas fijadoras crecen aisladas o junto a plantas no fijadoras. Esto se atribuye a la existencia de transferencia de N que influye en el caso de cultivos mixtos (Papastyljanov y Danso, 1989). Sin embargo, Barea et al (1989a), en ensayos análogos han encontrado que los niveles de fijación de  $\text{N}_2$  calculados ( $\text{N}^{15}$ ) en leguminosas micorrizadas es similar cuando crecen aisladas o junto a gramíneas.

#### 4.3. Trazadores isotópicos

El uso de  $N^{15}$  en estudios de fisiología vegetal ofrece amplias ventajas con respecto a otros sistemas de análisis. Particularmente el empleo de este isótopo estable es base de métodos de elección para estudiar fijación de  $N_2$ , mineralización del N, nitrificación y transferencia del N entre especies vegetales que crecen en proximidad (Guiraud y Marol, 1982; Chotte et al., 1986; Danso, 1988; Guiraud et al., 1989; Martinez y Guiraud, 1990; Mallarino et al., 1990a,b).

En el caso de condiciones áridas o semiáridas el uso de  $N^{15}$  ha permitido estimaciones de gran interés, tales como selección de simbioses (Kirda et al., 1989) determinación del coeficiente de utilización de un fertilizante (Guiraud y Boniface, 1987), evaluación del efecto de las micorrizas (Azcón et al., 1988) etc.

Existen varios procedimientos que usan  $N^{15}$  para evaluar la FBN, entre ellos se pueden seleccionar los basados en:

a) Uso de  $^{15}N_2$ .

Permite estimaciones directas de la fijación de nitrógeno. Se requiere mantener las plantas un corto espacio de tiempo en una cámara cerrada y suministrarles una atmósfera enriquecida con  $^{15}N_2$ . La principal limitante del método radica en que las condiciones de aplicación difieren de las naturales.

b) Diferencia en la "abundancia natural" de  $N^{15}$  entre el suelo y la atmósfera.

Esta es una técnica de gran precisión que ofrece estimaciones muy fiables en los casos en que es aplicable. Se basa en la existencia de un cierto nivel de discriminación isotópica durante el desarrollo de los suelos, por lo cual, en muchos casos, éstos tienen una relación mayor de  $N^{15}/N^{14}$  que la que hay en la atmósfera (Hardanson et al., 1987). En consecuencia, las plantas fijadoras suelen tener una abundancia natural

en  $N^{15}$  ligeramente más baja que las no fijadoras (Rennie, 1986). Dado que la abundancia natural media de  $N^{15}$  es de 0.3660%, y que las alteraciones afectan usualmente solo a la cuarta decimal, las medidas son extremadamente complicadas y requieren ineludiblemente un espectrómetro de masas.

c) Uso de sustratos enriquecidos con  $N^{15}$  por adición de un fertilizante.

Este es el único método directo que permite una evaluación integrada de la FBN a lo largo del tiempo y distinguir la contribución del suelo (% Npd Suelo), fertilizante (%Npd Fert.) y atmósfera (%Npd Fij.) al contenido total de la planta (Npd=N procedente de). En esta metodología existen dos variantes: la "técnica de dilución isotópica" y la "técnica del valor A". En ambos casos el uso correcto del método requiere la elección de una planta de referencia adecuada, que se usa para estimar la relación  $N^{15}/N^{14}$  del suelo, o el N disponible en el mismo (Danso, 1988; Hardanson y Danso, 1990).

Ambas técnicas asumen que: (a) El N procedente del suelo al que se aplicó fertilizante marcado tiene una relación  $N^{15}/N^{14}$  más alta que el procedente de la atmósfera; y (b) La asimilación del N del suelo y del fertilizante por las plantas se realiza en proporción directa a las cantidades disponibles en cada una de estas fuentes. En otras palabras que la planta no distingue, al menos al nivel de tercera decimal  $N^{15}$  de  $N^{14}$ .

En el caso de la técnica de dilución isotópica, la cantidad de fertilizante enriquecido con un exceso isotópico en  $N^{15}$  que se aplica tiene que ser la misma para la leguminosa y la planta de referencia. La dosis debe ser suficiente para el crecimiento de la planta no fijadora, pero al mismo tiempo no inhibidora de la fijación atmosférica de  $N_2$ . Ambas plantas utilizan una fuente de igual composición isotópica del sistema suelo-fertilizante, por lo cual la relación  $N^{15}/N^{14}$  que deriva del medio debe ser la misma en los dos vegetales. En la planta fijadora de  $N_2$ , dicha relación es menor debido a la dilución de la concentración de  $N^{15}$  por el

aporte de N atmosférico de composición isotópica similar a la "abundancia natural" (Danso, 1988; Hardarson y Danso, 1990), o sea, prácticamente  $N^{14}$ . Cuanto mejor sea el sistema fijador, menor será la relación  $N^{15}/N^{14}$ .

A pesar de las ventajas de estas técnicas y de la precisión que ofrecen, existen algunas fuentes de error. Las principales se refieren a que la planta control no fijadora o "planta de referencia" difiera en su "ecofisiología" de la planta fijadora de  $N_2$ .

En la estimación de la FBN en leguminosas es de suma importancia una adecuada selección de la planta de referencia. Schoeneberger *et al.* (1989) señalan a *Lolium perenne* como planta de referencia apropiada para la determinación de la fijación de  $N_2$  por el método de dilución isotópica para leguminosas forrageras tales como para *Lotus sp.* y *Trifolium sp.*

Las medidas de FBN en plantas leñosas presentan dificultades metodológicas objeto actual de estudio; sin embargo, ya se dispone de datos fiables de fijación en este tipo de leguminosa. Como ejemplo, en *Leucaena leucocephala*, Sanginga *et al.* (1989) encontraron que la fijación, en condiciones de campo, aporta entre el 34 y el 39% del N de la planta, mientras que en plantas control no inoculadas, un 54-56% del N proviene del suelo y un 56% de éste corresponde al fertilizante.

Por citar otros ejemplos representativos de estudios que utilizan  $N^{15}$ , Barea *et al.* (1987; 1989a; 1989b) encontraron que las micorrizas mejoran la asimilación de N del suelo y actúan, de forma indirecta, sobre la fijación de  $N_2$  mediante el aporte de P que se requiere en FBN.

A título de ejemplo también se cita el trabajo de Yoneyama (1988), que mide la abundancia natural de  $N^{15}$  y encuentra que el citosol del nódulo tenía más  $N^{15}$  que el bacteroide y que el tejido radical. El nódulo como conjunto tenía una relación  $N^{15}/N^{14}$  superior que la parte aérea, ello indica discriminación isotópica entre los distintos órganos o partes de la planta.

#### 4.4. Análisis de ureidos

Las plantas fijadoras de N, de acuerdo al tipo de metabolito exportado desde los nódulos, pueden clasificarse, en términos generales, como exportadores de ureidos, o de amidas. En soja, entre el 70 y el 90% del N<sub>2</sub> fijado es transportado como ureidos, (alantoína y ácido alantoico) mientras que en *Lupinus* el N es transportado como amidas (asparragina y glutamina) (Reynolds *et al.*, 1982, Schubert, 1986).

A pesar de la separación de las leguminosas en estos dos grupos, se puede encontrar en la savia de leguminosas que exportan amidas bajos niveles de alantoína y ácido alantoico, mientras que en forma análoga, es posible detectar trazas de amidas en aquellas exportadoras de ureidos. No se trata pues, de formas de transporte excluyentes, sino mayoritarias. El carácter productor de amidas o ureidos se ha tratado de asociar a las condiciones ambientales de origen de las leguminosas; de esta forma se indica que las especies de clima templado son principalmente exportadoras de amidas, mientras que las tropicales lo son de ureidos (Schubert, 1986).

La importancia del medio de crecimiento en la forma de transporte es muy grande y la presencia en éste de NO<sub>3</sub> o NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, produce un cambio notable en algunas plantas productoras de ureidos, observándose una fuerte disminución de su contenido relativo presente en savia (Herridge 1982a; McNeil y LaRue, 1984 y Berkun *et al.*, 1985).

El contenido relativo de ureidos en el xilema de plantas noduladas depende de la eficacia de la FBN, aunque es estable ante cambios ambientales ó de ritmos de exudación. Concretamente, el contenido de ureidos relativo es insensible a las fluctuaciones metabólicas diurnas de la planta. (Herridge, 1982b). En un estudio de revisión reciente (Lluch, 1990) se analizan los aspectos más actuales del metabolismo de los ureidos en leguminosas. No se conocen referencias bibliográficas de que las MVA afecten el metabolismo de los ureidos en leguminosas noduladas.

#### 4.5. Doble simbiosis en leguminosas leñosas y su desarrollo en zonas áridas

La disponibilidad de agua y nitrógeno, principales limitantes en estos suelos (Felker y Bandurski, 1979), así como la de otros elementos nutritivos puede variar tanto temporal como espacialmente en los ecosistemas áridos y semiáridos, propiciando la introducción de arbustos propios del desierto (Schesinger et al, 1990), que frecuentemente son especies con bajo nivel de microtrofia. Una situación similar ha sido descrita por Allen (1989), quien indica que diversas plantas anuales no micorrícicas de las familias, *Chenopodiaceae*, *Brassicaceae*, *Amaranthaceae* y *Zygophyllaceae* están muy bien adaptadas a condiciones xerofíticas, hecho que produce que, a pesar de la existencia de una dispersión natural de esporas de estos hongos, la presencia continua de plantas no hospedadoras frene la formación de la asociación simbiótica. De esta manera, la población de hongos micorrícicos en el suelo será baja, en donde las plantas no micorrícicas dominan la comunidad vegetal (Bagyaraj, 1989). Una destacada cualidad de las leguminosas leñosas es su carácter pionero en las sucesiones vegetales en condiciones de aridez (Virginia, 1990); dada la capacidad formadora de micorrizas de estas plantas, pueden ser una importante herramienta en la recuperación integral de estos ambientes deteriorados. De todas maneras, se debe tener en consideración que las relaciones, en cuanto a forma y función, en asociaciones simbióticas pueden alterarse durante la ontogenia de estas, por acción de diferentes condiciones externas. Esto puede ser interpretado en términos de diferencias reales entre el hospedador y los endofitos (Bethlenfalvay et al., 1989).

Diferentes autores (Roskoski et al., 1982; De la Cruz et al., 1988), han indicado la importancia que tiene la simbiosis tripartita en las leguminosas leñosas en diferentes condiciones como suelos áridos o deficitarios de P. Lo anterior es de singular importancia, dado que la

deficiencia de P, inhibe severamente la nodulación en las leguminosas. Las micorrizas VA y *Rhizobium* tienen una interacción aditiva en condiciones limitantes de P, que permite una mayor eficiencia en la utilización de este recurso, lo que se traduce en una mayor nodulación y fijación de nitrógeno, con un consecuente incremento en el crecimiento de la leguminosa (Diederichs, 1990). Además, no se debe olvidar que, la presencia de MVA en leguminosas leñosas, que crecen en ambientes áridos y semiáridos, representa una ventaja en la captación de agua y ciclado de nutrientes en estos suelos.

Los hongos formadores de MVA están presentes en la mayoría de los suelos en condiciones naturales, pero su presencia puede reducirse e incluso perderse después de deterioros mecánicos y eliminación de la vegetación (St John, 1990). El mal manejo del suelo y su posterior deterioro puede afectar la población de los microsimbiontes necesarios para la formación de las asociaciones simbióticas planta-hongo o planta-bacteria (Virginia, 1990), lo anterior es de gran importancia ya que la condición micorrícica de las poblaciones vegetales tiene una estrecha correlación con el éxito o fracaso de los agro-ecosistemas. De esta forma, Reeves et al. (1979), describen cómo en un ambiente semiárido, suelos similares, con la única diferencia de que uno estaba en condiciones naturales, mientras que el otro presentaba un proceso de deterioro, eran capaces de soportar poblaciones vegetales completamente diferentes; así, en el primer suelo, más del 99% de la cubierta vegetal formó MVA, mientras que en el suelo degradado, menos del 1% eran plantas formadoras de endomicorrizas. La masiva presencia de plantas no micotróficas puede incidir en la reducción de inóculo para las especies que sí necesitan la asociación micorrícica para sobrevivir. Lo anterior, concuerda perfectamente con lo indicado recientemente por Gange et al. (1990), quienes han encontrado evidencias acerca de que la reducción de la micorrización en condiciones de campo puede dar origen a una disminución en la diversidad vegetal.



En la actualidad la experiencia existente respecto a la importancia de los microorganismos en la recuperación de suelos de baja fertilidad en zonas deforestadas indican que las inoculaciones de hongos MVA pueden ejercer una influencia positiva en el desarrollo del vegetal. De la Cruz et al. (1988), han descrito que tanto la nodulación, como la micorrización en las diferentes leguminosas leñosas inoculadas con distintas especies de HMVA, varía de acuerdo al hongo utilizado, así, mientras *Sclerocystys clavispora* fue consistentemente efectivo en la promoción del crecimiento de distintos hospedadores, *Glomus fasciculatum*, *G. margarita* o *Scutellospora persica*, estimularon la nodulación y la FBN. Resultados similares se han obtenido en algunos ensayos de introducción de poblaciones vegetales en las que se ha usado *Acacia pyrifolia* inoculada con *Glomus* sp. En ellos, se han observado incrementos del 70% en producción de materia seca y altos niveles de P en la planta, sin embargo, la respuesta al P, o a la inoculación con HMVA, puede verse limitada por la deficiencia de N combinado existente en el suelo (Jasper et al., 1989a). No obstante, ocasionalmente se ha observado, que las inoculaciones con suelo que contenía propágulos de micorrizas pueden causar depresión inicial en el crecimiento de las plantas. En este sentido Bethlenfalvay et al. (1989) introducen el concepto de edafotipo y sugieren que las especies de hongos MVA tienen diferentes respuestas en la simbiosis de acuerdo al sitio desde donde han sido aisladas, de esta manera edafotipos idénticos, en las mismas condiciones del hospedador, suelo, potencial de inóculo o microbiota del suelo, pueden producir efectos distintos en una determinada planta hospedadora. El estado de los hongos MVA en los sistemas radicales está regulado por diferentes factores, como la edad de la raíz (Perry, 1986) y la forma de esta que es afectada por la disponibilidad local de los nutrientes en el suelo (Koide y Mingguang, 1990). Recientemente Gange et al. (1990) ponen en evidencia que la reducción en la micorrización en campo resulta de una disminución en la diversidad de las especies vegetales.

La interacción efectiva de la simbiosis entre *Rhizobium*, leguminosas y hongos MVA, puede verse limitada por las pérdidas nutricionales que acompañan los procesos erosivos, relativamente frecuentes en las zonas áridas (Aziz y Habte, 1989). El deterioro del suelo es un importante aspecto en el establecimiento de las leguminosas, sin embargo, esto no se debe sólo a una pérdida de nutrientes minerales, sino que también a la disminución de propágulos de HMVA; de esta manera en muchos sitios degradados se debe considerar como una etapa fundamental la recuperación de la población microbiana del suelo. No obstante, la incorporación de propágulos de microorganismos no significa, necesariamente, su establecimiento definitivo en dicho ambiente, ya que las posibles interrelaciones pueden variar durante la ontogenia de la simbiosis, de acuerdo a las condiciones externas del medio (Allen, 1989). A pesar de lo anterior, Habte et al (1988), al analizar la incidencia de la erosión en la micorrización VA y su efectividad en plantas de *Leucaena leucocephala*, inoculadas con hongos MVA y cultivadas en un oxisol, encontró, que la erosión simulada no sólo no inhibía la colonización fúngica, sino que incluso los valores encontrados eran mayores que en el suelo no erosionado, este hecho se puede relacionar con la menor población de microorganismos nativos del suelo que pudiesen competir con los hongos MVA.

#### **4.6. Ecología de la doble simbiosis**

La presencia de hongos micorrícicos puede ayudar tanto en la recuperación de sitios degradados, con limitaciones hídricas o nutricionales, como en los sitios en donde las estaciones de crecimiento son cortas, situación que implica que las plantas deben obtener los recursos del suelo rápidamente, para así poder sobrevivir (Perry y Amaranthus, 1990). En este sentido, se ha sugerido que la germinación tardía o más lenta, de algunas especies de hongos formadores de MVA, puede ser una adaptación a las condiciones de aridez, ya que las plantas

propias de estos ambientes tienen frecuentemente un lento crecimiento y las ocasionales lluvias pueden favorecer una germinación precoz en las esporas con riesgo de que no de lugar a la correspondiente colonización radical (Jasper et al., 1989b).

La presencia continuada de N y la forma en que se encuentra en el medio, puede afectar la respuesta de la planta a la micorrización. En plantas micorrizadas y en condiciones de pH controlado se ha encontrado que el tipo de fuente de N incide en la eficiencia de colonización del hongo en el hospedador; de esta forma el nivel de micorrización es mucho mayor en las plantas que han tenido nitrato y no amonio como sustrato nitrogenado (Johnson, 1984). La concentración de N en el suelo también ejerce un considerable efecto en la actividad micorrícica, de esta manera la adición de 25 ppm de N en un suelo erosionado y pobre en este elemento, fue suficiente para incrementar significativamente la actividad micorrícica en plantas de *Leucaena leucocephala* (Aziz y Habte, 1989). Al parecer, el P no interactúa con el tipo de fuente de N utilizada (Johnson, 1984), sin embargo, la concentración de este elemento (P) es de importancia en la simbiosis micorrícica. Los ciclos de N y del P experimentan interacciones naturales en los vegetales, las cuales se incrementan en plantas micorrizadas (Jarrell, 1990). De esta forma, la colonización por HMVA y la máxima actividad micorrícica en plantas de Cowpea se halla a niveles de 0,026  $\mu\text{g/ml}$  de P en la solución del suelo (Aziz y Habte, 1987). El valor anterior, es similar al obtenido en plantas de *Leucaena leucocephala* en las que se indica 0,021  $\mu\text{g/ml}$  como el nivel óptimo de contenido de P en la solución del suelo (Habte y Manjunath, 1987). De cualquier manera, en experimentos en invernadero con plantas de *L. leucocephala* y *Acacia nilotica* noduladas se ha determinado que el efecto beneficioso de las micorrizas puede igualar al efecto del fertilizante fosforado (Michelsen y Rosendahl, 1990).

Tanto *Rhizobium* como los hongos MVA en condiciones xerofíticas, tienen mayores posibilidades de ser efectivos en la promoción de crecimiento de sus respectivos hospedadores cuando son capaces de soportar el microambiente del suelo. Un factor especialmente importante es el pH del suelo, ya que incide sobre la capacidad infectiva de los HMVA; así variaciones de 5,3 a 7,5 de pH, modificaron el poder infectivo en dos especies del género *Glomus* (Abbott y Robson, 1985). En este sentido, en zonas áridas se ha sugerido utilizar HMVA aislados de sectores en condiciones de aridez y pH similar a la de los sitios a donde se van a trasladar las plantas en el futuro, en lugar de utilizar los hongos de colección, que normalmente provienen de ambientes templados (Jasper et al., 1989a).

Las MVA se encuentran naturalmente en todo tipo de ambientes tanto en zonas tropicales húmedas (Janos, 1980), como áridas (McGee, 1986) en donde son comunes en las especies forestales. En los bosques tropicales, la diversidad de especies ha sido correlacionada con la presencia de diferentes tipos de micorrizas (Bagyaraj, 1989). Esta asociación también es frecuente en las especies leñosas en zonas templadas (Brudett et al., 1990) o frías, y en general han desempeñado un destacado papel ecológico contribuyendo a la evolución de las plantas, a su supervivencia y a la diversidad de especies (Malloch et al., 1980). Incluso, recientemente (Allen, 1989), se ha descrito un aparente efecto patogénico, de hongos MVA sobre plantas no formadoras de micorrizas.

Simous y Pope (1987), señalan la gran importancia que tienen las MVA en la recuperación de la estructura de suelos compactados, originada por la acción del micelio extraradical al explorar el suelo circundante y permiten la circulación del aire, las MVA son capaces de inducir cambios cuantitativos y cualitativos en la microflora y fauna del suelo (Linderman, 1988), de esta forma se ha descrito su capacidad de reducción de poblaciones de nematodos y hongos patógenos, por lo que tendrían un

gran valor desde un punto de vista fitosanitario (Caron, 1989), a pesar de que otros autores han obtenido resultados contradictorios en estos aspectos (Stribley, 1989). Inicialmente, se suponía que la presencia de las MVA estaba restringida a los estratos más superficiales del suelo, sin embargo en análisis radiculares de leguminosas leñosas Virginia *et al.* (1986), recuperaron raíces de *Prosopis glandulosa* entre 4 y 5 metros de profundidad micorrizadas. Análisis posteriores han indicado que raíces de esta leguminosa a 12 metros de profundidad también presentan colonizaciones por hongos MVA (Virginia y Jarrel, 1987).

Las distintas condiciones existentes en el medio hacen que en unos lugares predominen determinados ecotipos de *Rhizobium*, de tal manera que es frecuente encontrar asociadas a ecosistemas específicos, razas bacterianas con características particulares. En el estudio de la ecología de *Rhizobium* asociado a leguminosas leñosas de zonas áridas Jenkins *et al.*, (1988) encontraron que casi el 60% de los nódulos existentes en las plantas muestreadas (en un trayecto de 270 m) se encontraban entre 15 y 30 cm de profundidad. Lo anterior hace pensar que resulta de interés el conocimiento de los requerimientos de las razas de *Rhizobium* en el establecimiento de leguminosas.

Inicialmente, se asociaba la presencia de ecotipos de *Rhizobium* de lento crecimiento (*Bradyrhizobium*) a las simbiosis establecidas con plantas leñosas (Allen y Allen, 1981); sin embargo resultados posteriores indicaron que muchas de estas especies podrían ser infectadas tanto por uno u otro de los tipos de bacterias (Herrera 1984). Aún más, en *Prosopis glandulosa* creciendo en ambientes áridos se han encontrado nódulos producidos tanto por razas de rápido como de lento crecimiento, de acuerdo a la profundidad que alcanzaba el desarrollo radical. De esta forma, en la parte superficial (0-0.6 m) se encontraron mayoritariamente ecotipos de rápido crecimiento mientras que a mayor profundidad (3.9-4.5 m) los ecotipos encontrados fueron de lento crecimiento, al analizar en

mayor detalle esta situación se pone de manifiesto que las que crecían en profundidad estaban sometidas a una temperatura y humedad constante y baja disponibilidad nutricional y las de superficie estaban sometidas a gran disponibilidad de nutrientes y fluctuación en temperatura o disponibilidad de agua. (Jenkins et al., 1987)

La existencia de MVA requiere una serie de condiciones ambientales ecológicas mínimas; al no encontrarlas o cuando el ambiente se ha deteriorado profundamente es difícil recuperar dicha simbiosis. Un ejemplo de esta situación se produce claramente en explotaciones mineras en las que el suelo ha sufrido fuertes modificaciones, especialmente en lo que se refiere a la eliminación de plantas y movimientos de tierra. Waaland y Allen (1987) indican que en algunos sitios que han sufrido esta actividad han desaparecido las MVA y que al menos tres décadas no han sido suficiente tiempo, para que el ambiente se recupere naturalmente.

MATERIALES Y METODOS

## **MATERIALES Y METODOS**

### **A. PARTE GENERAL**

#### **1. Suelos**

Los distintos ensayos que conforman el presente estudio se desarrollaron o utilizaron suelos localizados en el término municipal de Lanjarón, Comarca de las Alpujarras, Provincia de Granada. Corresponde a una zona de orientación Sur, con una altitud aproximada a 1000 m.s.n.m., de pendiente media a fuerte. El clima de dicho sector corresponde a Medirerráneo de montaña, con precipitaciones cercanas a los 400 l/m<sup>2</sup> /año irregularmente distribuidas. La vegetación actual es un ralo estrato arbustivo compuesto principalmente por *Ulex parviflorus*.

Uno de los suelos utilizados es conocido localmente como "launa", se encuentra ampliamente distribuido en el área de estudio. Procede de pizarras, con un alto grado de intemperización. También se usó, un segundo suelo más evolucionado, destinado normalmente a sustrato de semilleros o viveros forestales del sector.

Los parámetros fisico-químicos determinados en los suelos utilizados fueron: pH, textura, conductividad eléctrica, capacidad de campo, contenido en fósforo, materia orgánica, nitrógeno y materia orgánica.

El pH se determinó en suspensión acuosa 1:2. La textura se estableció por procedimiento de campo; la estructura se definió según normas FAO; la conductividad eléctrica se midió a partir de extracto saturado de acuerdo a Allison (1972), mientras que la capacidad de campo se evaluó por la técnica de Bouyoucos, modificado por Schofield *et al.* (1935).

#### **2. Material vegetal**

Las plantas usadas fueron en su mayoría leguminosas leñosas.



Corresponden a las especies: *Anthyllis cytisoides*, *Medicago arborea*, *Robinia pseudoacacia*, *Spartium junceum*, *Acacia caven* y *Prosopis chilensis*, estas dos últimas utilizadas circunstancialmente. También se utilizó *Ditrichia viscosa*.

Las características botánicas de las cuatro leguminosas, material básico del presente estudio, son las siguientes: *Anthyllis* L. es un género que pertenece a la tribu *Loteae* (*Papilionoideae*), incluye de 30 a 50 especies, siendo *A. vulneraria* L. la especie tipo. Pueden ser herbáceas o arbustivas, anuales o perennes, con hojas imparipinnadas con cinco o más, raramente uno o tres, foliolos por hoja. Está presente en toda Europa, norte de África y Oeste asiático, con alrededor de 20 especies en el área mediterránea. Es frecuente en praderas, bien adaptado a suelos secos, se cultiva en Europa desde mediados del siglo pasado en la producción de forraje. También, tiene interés desde un punto medicinal por su poder cicatrizante (Allen y Allen, 1981). Sin embargo *A. cytisoides*, no está recogida en la citada recopilación acerca de Leguminosas de Allen y Allen (1981).

*Medicago* L., es un género que pertenece a la tribu *Trifolieae* (*Papilionoideae*), incluye entre 50 y 100 especies, de las cuales se considera tipo a *M. sativa* L, suelen ser hierbas (anuales o perennes), raramente arbustos. Sus hojas son pinnadas con tres foliolos, y de flores grandes amarillas o violetas. Se han descrito miembros de este género, nativos del área mediterránea de Eurasia y África. Son especies que prefieren un suelo medianamente fértil, con un rango de pH de 6,5 a 7,5 para obtener un óptimo crecimiento. *M. arborea* es propia de Francia (Allen y Allen, 1981).

*Robinia* L. es un género de la tribu *Galegeae* (*Papilionoideae*), incluye 20 especies, es propia de América del Norte. Son arbustos o árboles, pequeños o grandes de tronco recto, con hojas imparipinnadas, con flores blancas o rosadas. La especie tipo es *R. pseudoacacia*, que asilvestrada en Europa desde el siglo XVI, requiere suelos bien drenados y calcáreos para alcanzar su máximo crecimiento (Allen y Allen, 1981).

*Spartium* L. (*Papilionoideae*), género monotípico de la tribu *Genisteae*, es endémico de regiones del borde mediterráneo, del Sudoeste de Europa e Islas Canarias. Son arbustos erectos de 3 a 4 metros de altura, de follaje verde glauco de hojas sésiles, enteras, grandes y con un sólo folíolo; sus flores son aparentes y amarillas (Allen y Allen, 1981).

### **3. Microorganismos**

Los microorganismos que se han utilizado en este trabajo, junto a sus respectivas procedencias, se muestran en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1.- Razas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* utilizadas.

Raza	Aislada de	Fuente
<i>R. leguminosarum</i> GRO24	<i>Vicia faba</i>	Olivares et al. 1980
<i>R. meliloti</i> GR4B	<i>Medicago sativa</i>	Casadesus y Olivares 1979
<i>R. lotti</i> N2P,XGLO,A4,G4,U226	<i>Lotus corniculatus</i>	Este laboratorio
<i>R. trifolii</i> GRO17	<i>Trifolium repens</i>	" "
<i>R. phaseoli</i> GRO12	<i>Phaseolus vulgaris</i>	" "
<i>B. japonicum</i> PJ17	<i>Glycine max</i>	" "
<i>B. japonicum</i> (Lupinus)	<i>Lupinus reticulatus</i>	" "
<i>Bradyrhizobium</i> sp. 3824	<i>Vigna sinensis</i>	" "
<i>Rhizobium</i> sp. GRH11	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Este trabajo
GRH12	" "	" "
GRH13	<i>Medicago arborea</i>	" "
GRH14	" "	" "
GRH15	<i>Spartium junceum</i>	" "
GRH16	" "	" "
GRH17	<i>Anthyllis cytisoides</i>	" "

Tabla 2.- Endofitos de MVA utilizados en este estudio.

Especie	Procedencia
<i>Glomus mosseae</i> (O)	Este laboratorio
<i>G. fasciculatum</i> (D)	" "
<i>G. fasciculatum</i> (M)	" "
<i>G. fasciculatum</i> (A)	" "
<i>Glomus</i> sp.(B)	" "
<i>Scutellospora</i> sp.(SO)	Este trabajo
<i>Glomus</i> sp.	" "

#### 4. Aislamiento de endofitos

Las muestras de suelo rizosférico y raíces de las especies vegetales seleccionadas para la reforestación, existentes en la zona de estudio se llevaron al laboratorio en bolsas de plástico y se conservaron en oscuridad a 4<sup>o</sup> C. Dicho material fue utilizado como material de aislamiento de diferentes endofitos, tanto a nivel de hongos MVA como de bacterias del género *Rhizobium* o *Bradyrhizobium*.

El aislamiento de las bacterias de los géneros *Rhizobium* o *Bradyrhizobium*, se realizó a partir de los nódulos de raíces de las plantas de leguminosas leñosas seleccionadas y recolectadas en campo. Para esto se efectuó, en primer lugar, un lavado exhaustivo de la raíz con agua de grifo para separar el suelo adherido. Posteriormente, se separaron los nódulos y se esterilizaron en superficie con Cl<sub>2</sub>Hg al 2,5 por mil durante cinco minutos, después se lavaron cinco veces con agua estéril. Finalizado el lavado, los nódulos se machacaron con una varilla de vidrio flameada y fría. El macerado se esparció sobre la superficie de una placa de Petri con medio 79 de Allen (1951), al que se le había agregado cristal violeta.

Las esporas de los HMVA se aislaron de los suelos rizosféricos de las especies seleccionadas, por la técnica del tamizado húmedo y decantación de Gerdemann y Nicolson (1963). La separación de las esporas se realizó bajo lupa binocular con ayuda de la placa de Doncaster.

El nivel natural de micorrización de la raíces se estableció por medio de tinción diferencial de éstas, según la técnica clásica de Phillips y Hayman (1970). Previamente, las raíces se secaron y cortaron en trozos de aproximadamente 1 cm de longitud. La evaluación de la infección se realizó de acuerdo a Giovanetti y Mosse (1980) utilizando una placa cuadrada de poliacrilamida de 10 x 10 cm, con retícula de 15 x 15 mm.

## 5. Esterilización de esporas en superficie. Estudio de la germinación de esporas de HMVA

Con objeto de eliminar contaminaciones de agentes patógenos o de otros microorganismos no deseados acompañantes de las esporas, en los estudios que lo requerían, se procedió a la esterilización en superficie de dichas esporas. En este proceso se utilizó como solución esterilizante agua estéril (100 ml) con:

Cloramina T..... 2 %  
Estreptomicina.....0.2%  
Tween 80.....trazas

Dicho proceso, se realizó en un dispositivo de filtrado provisto de una membrana, esterilizada previamente en autoclave, donde se colocaron las esporas y se sometieron por 20 minutos a un baño de solución esterilizante. Posteriormente las esporas, en el mismo sistema de filtrado, se lavaron con agua estéril, al menos cinco veces.

Todo el proceso de esterilización se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar, con objeto de disminuir los riesgos de contaminación. Una vez que las esporas se esterilizaron en superficie, se transfirieron con pipetas capilares estériles a placas de Petri con el medio adecuado. Estas, se sellaron con "Parafilm" y se incubaron en oscuridad a temperatura controlada.

Dado que la germinación de las esporas no es sincrónica, el porcentaje de germinación se determinó por medio de una observación microscópica periódica.

## 6. Medios de cultivo

El medio de cultivo base para el aislamiento y conservación de las razas de *Rhizobium* fue el 79 de Allen (1951), cuya composición se

detalla a continuación:

PO <sub>4</sub> HK <sub>2</sub> .....	0.6 g
SO <sub>4</sub> Mg .....	0.2 g
CO <sub>3</sub> Ca .....	1.0 g
Cl <sub>2</sub> Ca .....	0.2 g
ClNa .....	0.2 g
Manitol .....	7.6 g
Glucosa .....	2.4 g
Extracto de levadura.....	0.4 g
Agua .....	1000 ml
Agar .....	15 g

Se ajusta el pH a 7 - 7.2 y se esteriliza a 115°C durante 30 minutos.

Para el crecimiento masivo, o para la obtención de grandes volúmenes de cultivo de *Rhizobium* o *Bradyrhizobium*, se emplearon los medios YMB (Vincent, 1970) y TY (Beringer, 1974), cuya composición se detalla a continuación:

YMB

Manitol.....	5 g
Extracto de levadura.....	0.4 g
Cl Na.....	0.1 g
PO <sub>4</sub> NK <sub>2</sub> .....	0.5 g
SO <sub>4</sub> Mg.7H <sub>2</sub> O.....	0.1 g
Agua.....	1000 ml
Agar (para medio sólido).....	15 g

TY

Triptona.....	5 g
Extracto de levadura.....	3 g
Cl <sub>2</sub> Ca.2H <sub>2</sub> O.....	0.9 g
Agua.....	1000 ml
Agar (para medio sólido).....	15 g

En el medio de cultivo para aislar *Rhizobium* se adicionó cristal violeta a una concentración de 1:80.000, para facilitar la identificación de las colonias e inhibir el desarrollo de contaminantes Gram (+).

En la producción de razas resistentes a estreptomycin, se utilizaron medios de cultivo selectivos, a los que se les adicionó el antibiótico disuelto en agua y esterilizado por filtración (0,45  $\mu$  de poro). La concentración final con este antibiótico fue de 375 mg por litro.

Como soporte para la germinación de esporas de los hongos MVA se usó agar (Bacto Difco)-agua al 0.8%, esterilizado en autoclave a 115°C por 30 minutos.

## **7. Cultivo axénico de las plantas**

### **7.1. Esterilización en superficie de semillas**

Las semillas se esterilizaron de acuerdo con las técnicas de Bonnier y Brackel (1969), sumergiéndolas en una solución de  $Cl_2Hg$  al 2,5% durante 10 a 12 minutos; posteriormente fueron lavadas, al menos, cinco veces con agua estéril para eliminar los restos de  $Cl_2Hg$ . En sustitución de este compuesto, en algunas semillas de cubierta muy permeable, se usó solamente un baño con etanol durante 3 minutos seguido de lavados con agua estéril.

### **7.2. Germinación de las semillas**

Una vez esterilizadas en superficie, las semillas se dejan en imbibición en agua durante 2 a 3 horas. Tras este periodo, se llevan en condiciones asépticas, en un número variable que oscila entre 20 y 200, según sea su tamaño, a placas de Petri que contienen un círculo de papel filtro humedecido.



Las placas con las semillas se mantienen en oscuridad en una cámara con un ciclo de temperatura de 15 y 23 °C durante 48 a 72 horas, hasta que germinan.

### 7.3. Solución nutritiva

En los cultivos de las plantas, ya sea en tubos, macetas o jarros Leonard en que se ha estudiado la simbiosis *Rhizobium* - leguminosa, se utilizó la solución nutritiva libre de nitrógeno descrita por Rigaud y Puppo (1975), que tiene la siguiente composición:

PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K.....	200 mg
SO <sub>4</sub> Mg.....	200 mg
ClK.....	200 mg
SO <sub>4</sub> Ca.....	120 mg
Edta Fe Na.....	25 mg
MoO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> .....	4 mg
SO <sub>4</sub> Mn.....	2 mg
SO <sub>4</sub> Cu.....	2 mg
SO <sub>4</sub> Zn.....	3 mg
BO <sub>3</sub> H.....	18 mg
Agua destilada.....	1000 ml

Antes de esterilizar a 115°C durante 30 minutos se ajusta el pH a 7 - 7.5 con KOH.

En los ensayos con hongos formadores de micorrizas se utilizó la solución nutritiva de Hewitt (1952), cuya composición es la siguiente:

NO <sub>3</sub> K.....	300 mg
(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Ca.....	1400 mg
SO <sub>4</sub> Mg.....	370 mg
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> Na.....	200 mg
Edta Fe (II).....	25 mg
SO <sub>4</sub> Mn.....	2 mg
SO <sub>4</sub> Cu.....	0.2 mg
SO <sub>4</sub> Zn.....	0.3 mg
BO <sub>3</sub> H.....	1.9 mg
Mo <sub>7</sub> (NH <sub>4</sub> ).....	3.5 mg
Agua destilada.....	1000 ml

Si se desea utilizar la solución libre de nitrógeno, se elimina el NO<sub>3</sub>K y (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Ca, reemplazándose por:

SO <sub>4</sub> K <sub>2</sub> .....	30 mg
Cl <sub>2</sub> Ca.....	95 mg

En el caso de que se requiera, libre de fósforo, se elimina el PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>Na y el Mo<sub>7</sub>(NH<sub>4</sub>) y se reemplaza por:

MoO <sub>4</sub> Na(NH <sub>4</sub> ).....	4 mg
--	------

Para el cultivo de plantas en medio libre de N se emplea la solución nutritiva de Fahraeus (1957), cuya composición es:

CaCl <sub>2</sub> .....	100	mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	100	mg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	150	mg
Mg SO <sub>4</sub> .....	74	mg
C mat Fe (EDTA).....	5	mg
Mn SO <sub>4</sub> .....	7	mg
Zn SO <sub>4</sub> .....	2.5	mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	1.5	mg
KI.....	0.7	mg
Cu SO <sub>4</sub> .....	0.4	mg
Na MO <sub>4</sub> .....	0.02	mg
H <sub>2</sub> O destilada.....	1000	ml

#### 7.4. Cultivo de plantas

Las plantas fueron cultivadas, según los requerimientos de cada ensayo, en tres sistemas diferentes. Estos son:

Tubos de ensayo de 20x200 y 25x250 mm con 15 y 20 ml de solución nutritiva de Rigaud y Puppo respectivamente.

Jarras Leonard (Leonard, 1943), que constan de un recipiente con la solución nutritiva y una parte superior (una botella invertida a la que se le ha cortado la base), que sirve para portar el sustrato, en este caso vermiculita. Por último se han usado macetas plásticas de diferentes volúmenes, selladas en su base para los ensayos con N<sup>15</sup>. Los sustratos empleados fueron: mezcla de suelo de "launa" con arena de cuarzo lavada, vermiculita o suelo calcáreo, de acuerdo a los ensayos realizados.

Los sustratos como los soportes de producción de las plantas fueron esterilizados de la forma más adecuada en cada caso. De esta forma, se

aplicaron, para los suelos, tres ciclos de una hora de duración de vapor fluyente, mientras que en los otros sustratos la esterilización se realizó por autoclavado. La forma de esterilización de las macetas varió de acuerdo a la resistencia del material, y en el caso de que este no fuera resistente a autoclavarse se usó un baño en solución antiséptica.

#### **8. Medida de la efectividad de la simbiosis**

A pesar de las limitaciones descritas a cerca de la evaluación de la actividad nitrogenasa mediante la técnica de reducción de acetileno a etileno, su rapidez y facilidad la hacen útil en análisis preliminares de la efectividad de la simbiosis (Hardy et al., 1968).

Las medidas se realizaron colocando las plantas noduladas en tubos de vidrio que se cerraron herméticamente con un tapón de goma perforable. A cada tubo se le reemplazó un 10% de su atmósfera por acetileno y se mantuvieron en incubación en condiciones ambientales normales, posteriormente se tomaron alícuotas de dicha atmósfera a los 20 y 40 minutos que fueron analizadas en un cromatógrafo de gases provisto de un detector de ionización de llama. El parámetro estudiado fué la actividad específica que se indica como  $\mu\text{mol}$  de etileno producido por planta, ó  $\mu\text{mol}$  de etileno por g de peso seco de nódulo y por hora.

Para la evaluación de la efectividad de la simbiosis, en el sistema HMVA-planta, los parámetros determinados fueron la producción de biomasa y contenido en N y P de la parte aérea y del sistema radicular, en relación al porcentaje de colonización micorrícica.

#### **B. ENSAYOS ESPECIFICOS**

#### **9. Ensayo de inoculación cruzada**

Tradicionalmente se ha considerado la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa como una relación de fuerte especificidad, sin embargo, en la actualidad se reconocen grupos de leguminosas y bacterias, que tienen características de amplia promiscuidad. De esta manera, cuando se

estudian nuevos sistemas *Rhizobium*-leguminosa, surge la necesidad de determinar el caracter selectivo o no de cada simbiote.

El propósito de este ensayo, fue establecer el rango de susceptibilidad de las diferentes plantas seleccionadas, frente a los distintos ecotipos y especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, en relación a la simbiosis fijadora de nitrógeno. De forma análoga, con las razas de *Rhizobium* aisladas de las plantas en estudio, se pretendió definir su rango de infectividad y efectividad con las plantas de los grupos tradicionales de inoculación cruzada.

#### **10. Determinación de razas de *Rhizobium* y afines presentes en suelo de "launa"**

Los suelos naturales pueden presentar una amplia variación respecto a los microorganismos que en ellos habitan. Esta situación también sucede en el caso de las bacterias de los géneros *Rhizobium* o *Bradyrhizobium*, por este motivo se diseñó un experimento cuyo objetivo fue la determinación de las posibles razas de *Rhizobium* o *Bradyrhizobium* presentes en el suelo de "launa" de la zona de estudio. Se emplearon diversas leguminosas de los distintos grupos de inoculación cruzada, que se cultivaron en un sustrato compuesto por vermiculita estéril y suelo natural de "launa", en una relación 1/1 (v:v), bajo condiciones controladas de invernadero y con riego con agua esterilizada. Después de un periodo de dos meses, se analizó la presencia de nódulos radicales, a partir de los que se realizaron aislamientos de distintas razas bacterianas, que fueron inoculadas posteriormente en los respectivos hospedadores. A continuación, se estudió la eficiencia de las razas de *Rhizobium* aisladas de dicho suelo.

#### **11. Curva de crecimiento de los endofitos aislados en la zona de estudio**

El objetivo de este ensayo es determinar la tasa de crecimiento de las distintas razas de *Rhizobium* aisladas a partir de las plantas y suelo en estudio. Dicho parámetro es fundamental en la producción de inoculantes, ya que es necesario utilizar una cantidad de bacterias

similar en los diferentes ensayos, si se desea realizar, entre ellos, un análisis comparativo válido. Para conseguir lo anterior, se cultivaron las razas de *Rhizobium* sp GRH16 y *Rhizobium* sp GRH17 aislados de *S. junceum* y *A. cytisoides*, respectivamente, en medio líquido, durante un tiempo lo suficiente largo como para alcanzar la estabilidad del cultivo. Cada 8 horas se midió la absorbancia en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 600 nm durante un total de 72 horas. El anterior valor de densidad óptica fue relacionado posteriormente con el número de células obtenido por medio del recuento en placa de alícuotas de series decrecientes de diluciones del cultivo.

## **12. Estudio de la supervivencia de *Bradyrhizobium* sp (vigna) 3824 en condiciones variables de suelo de "launa" o "calcareo", y en simbiosis con *Spartium junceum***

Uno de los principales problemas que existen cuando se intenta utilizar en revegetación leguminosas noduladas con una raza específica de *Rhizobium*, es la competición que la nueva raza debe experimentar frente a la población bacteriana nativa del suelo, tanto con las razas de *Rhizobium* que competirán por posibles loci de infección en la raíz de la leguminosa, como por los restantes grupos de bacterias que pueden presentar relaciones de antagonismo diversas, tales como la producción de antibióticos entre otras.

El objetivo de este ensayo es analizar el efecto competitivo que puede existir entre las diferentes razas nativas de un suelo determinado, respecto a *Bradyrhizobium* sp (vigna) 3824 inoculado en suelo y a *S. junceum*.

Se utilizaron macetas de 300 ml con un sustrato, consistente en diferentes mezclas de suelo natural o esterilizado, de "launa" y "calcareo" en las siguientes proporciones: 0:4; 1:3; 2:2; 3:1 y 4:0 a razón de 10 macetas por cada una de las series empleadas. Cada maceta fué inoculada con 5 ml de una suspensión de *Bradyrhizobium* sp (Vigna) 3824 de una concentración de  $10^{10}$  células por ml. El 50% de las macetas, de cada uno de los distintos tratamientos, fue utilizado como soporte para

cultivar en simbiosis *S. junceum*, que se mantuvieron en invernadero durante un año, a lo largo del cual se realizaron muestreos periódicos a las 10, 15, 30 y 42 semanas.

Con el objeto de reconocer la raza bacteriana usada, se marcó haciéndola resistente a estreptomycin por medio de mutación espontánea. El seguimiento poblacional de la bacteria inoculada se realizó por medio de la técnica del número más probable de Brockwell (1982), y por conteo del crecimiento de la bacteria en placa, a partir de 1 g de suelo tomado de los tratamientos en que se inocula *S. junceum*.

### **13. Estudio del efecto del nitrógeno combinado ( $\text{NO}_3\text{K}$ ) sobre la nodulación y actividad fijadora de nitrógeno en plantas de *S. junceum* inoculadas con *Rhizobium***

La presencia de nitrógeno combinado en el medio de crecimiento de las leguminosas inoculadas con *Rhizobium* puede ser un limitante de la infección, nodulación y fijación del N. El vegetal en la simbiosis tiene un importante papel en el control del efecto del N combinado, pudiendo de esta forma existir, o no, efectos negativos en la simbiosis.

Se tomó *S. junceum* como planta modelo en este ensayo, debido a que, de entre las seleccionadas, es la que muestra características de cultivo, adaptación al medio, desarrollo y susceptibilidad a las simbiosis más apropiadas para su manejo.

El microsimbionte elegido para el ensayo fue *Bradyrhizobium* sp (vigna) 3824, al ser ésta, la raza que se mostró en experimentos previos más efectiva en la simbiosis con *S. junceum*.

El experimento se estableció en jarras Leonard y se mantuvo en condiciones controladas de invernadero durante 8 semanas. Las plantas pregerminadas "in vitro" en condiciones axénicas, se cultivaron posteriormente, en un número de dos por jarra. Se utilizó como solución nutritiva la de Rigaud y Puppo (1975) diluída a la mitad, reponiéndola semanalmente. Se establecieron 4 tratamientos con 6 repeticiones cada

uno, con dosis crecientes de  $\text{NO}_3\text{K}$  de 0; 2,5; 5 y 10mM. Se usaron estas concentraciones dado que entre ellas, se encuentra el rango de nitratos limitante de algunas simbiosis *Rhizobium*-leguminosa (Munns et al, 1977).

Como consecuencia de los resultados obtenidos, el ensayo se repitió ampliando las concentraciones, a 20 y 50mM de  $\text{NO}_3\text{K}$ . Las condiciones de cultivo y evaluación de éste fueron idénticas a las del primer ensayo.

Cada una de las plantas de los distintos tratamientos fue evaluada respecto a su número de nódulos. Posteriormente, se midió la actividad nitrogenasa a partir de nódulos recolectados en forma aleatoria. Se hicieron 3 medidas por tratamiento y se expresó la actividad nitrogenasa como  $\mu\text{mol}$  de acetileno reducido a etileno por gramo de peso seco de nódulo y por hora.

#### 14. Caracterización *in vitro* de microsimbiontes MVA

A partir de las esporas que previamente se aislaron y seleccionaron desde el suelo rizosférico natural, se realizaron diferentes pruebas de caracterización fisiológica y anatómica, con objeto de establecer su posición taxonómica, así como definir las condiciones óptimas de germinación y desarrollo fúngico, respecto a los principales factores ambientales. Las esporas se sometieron a tratamientos en los que se hizo cambiar la temperatura de cultivo, ensayándose 20,25 y 37 °C; también se probaron diferentes grados de acidez preparando medios con pH 5, 6, 7 y 8, además se determinó el efecto ejercido por el sulfito y la cisteína en el medio, así como la influencia de la presencia de microorganismos acompañantes. Los parámetros anatomorfológicos que se controlaron y que resultaron más útiles en la clasificación taxonómica del hongo VAM fueron: diámetro de la espora, del suspensor y de las células auxiliares, número de capas de la espora y grosor de cada una y número de células auxiliares.

*pared de*

*estado de  
nació*

El desarrollo del micelio se evaluó microscópicamente contando el número de intersecciones que las hifas hacían con una cuadrícula de 0.9 mm de lado. Este método está basado en el sistema propuesto por Marsh



(1971) para estimar la longitud de raíces mediante la determinación del número de intersecciones que hacen con cualquier sistema de líneas, cuando se distribuyen al azar sobre él. Previamente a la cuantificación, las placas se secaron a una temperatura entre 65 y 70°C, durante el tiempo necesario para que el agar quedase reducido a una capa muy fina, y todas las hifas producidas se encontraran en el mismo plano.

#### **15. Evolución de los propágulos de *Scutellospora persica***

De los diferentes hongos formadores de micorrizas VA aislados, se analizó especialmente *Scutellospora*, por no tener información básica acerca de él.

Se aisló de suelo rizosférico proveniente del sector de estudio en el área de Lanjarón. Tras los estudios iniciales de caracterización se ha creído importante obtener información respecto a su comportamiento infectivo a lo largo de las estaciones climáticas. Para lo cual se realizaron muestreos de esporas en condiciones naturales de campo. Cada 3 meses se tomaron muestras compuestas de suelo rizosférico de 3 plantas de *S. junceum* seleccionadas aleatoriamente de entre los ejemplares de crecimiento medio, encontrados en el área de estudio.

#### **16. Multiplicación por cultivo de tejidos**

##### **16.1. Procedencia del material para propagar por cultivo de tejidos**

Se partió de semillas de *Anthyllis cytisoides* y *Spartium junceum*. Los cultivos se iniciaron a partir de secciones nodales, procedentes de plantas cultivadas en invernadero en condiciones controladas, tras germinación axénica de las semillas.

##### **16.2. Esterilización en superficie y germinación de las semillas**

Las semillas de *S. junceum*, fueron esterilizadas en superficie en una solución de hipoclorito de sodio (49%), durante un minuto, posteriormente se lavaron en abundante agua estéril por 5 veces, donde

se dejaron en imbibición durante 2 horas. En el caso de *A. cytisoides*, las semillas se deben someter, además, a un tratamiento intermedio de calor húmedo, y el tiempo de imbibición mínimo es de 24 horas.

La germinación de ambos tipos de semillas se realizó en placas de Petri esterilizadas, provistas de papel de filtro humedecido, en una cámara de cultivo en oscuridad con un ciclo de temperatura de 22 y 18°C.

Con objeto de mejorar el rendimiento de germinación de las semillas, se probó un sistema alternativo en el que se usaron diferentes concentraciones de giberelina sobre un medio mínimo líquido (MS), en tubos de ensayo con soporte de Heller. El medio de cultivo utilizado (MS), consta de la mezcla de sales descrita por Murashige y Skoog (1962) y como fuente de energía, sacarosa, además de inositol y una solución de vitaminas, compuesta de tiamina-HCL, piridoxina-HCL, ácido nicotínico y glicina. En el caso de usar el medio de cultivo en forma sólida se agregan 8 g por litro de bacto-agar (Difco).

Los reguladores de crecimiento, utilizados según los requerimientos, fueron: ácido naftalen acético (ANA), ácido indol butírico (IBA), 6 benzil aminopurina (BA) y ácido giberélico (GA). E l medio se ajusta a pH de 5,7, repartiéndose 25 ml por tubo; posteriormente se esteriliza en autoclave a 120°C por 15 minutos.

### **16.3. Esterilización superficial de explantos**

Tanto las yemas axilares como los tallos, que se utilizaron como explantos en los experimentos de subcultivos sucesivos, se esterilizaron en una solución de hipoclorito sódico al 0,5% con unas gotas de TWEEN 20, durante 20 minutos. Esta solución esterilizadora es lo suficientemente efectiva como para eliminar los microorganismos contaminantes y al mismo tiempo inócua para el tejido vegetal.

#### **16.4. Técnicas de micropropagación**

El material vegetal utilizado, consistió en tallos apicales e internodales de 1 y 1,5 cm de longitud respectivamente, éstos se hicieron crecer individualmente, en tubos con medio MS suplementado con diferentes hormonas según se tratase de ensayos de iniciación, elongación o enraizamiento. Para mantener el "stock" de multiplicación, este mismo material se cultivó en frascos de vidrio de 500 ml con el medio adecuado, en grupos de 10 a 12 tallos.

Las condiciones físicas de la cámara de cultivo fueron constantes a lo largo de todos los ensayos, la temperatura fué de 25°C, y la intensidad luminosa de 45  $\mu\text{E m}^2\text{s}^{-1}$ , suministrada por lámparas GroLux de Sylvania de espectro regular, con un fotoperiodo de 16 horas día.

#### **17. Incidencia de la micorrización en parámetros fisiológicos vegetales con hongos MVA de colección**

El sentido de este experimento, llevado a cabo en condiciones de suelo natural de "launa", fue establecer en una primera aproximación cuál de los microsimbiontes inoculados se adapta mejor a las plantas en estudio. A lo largo de éste se observaron los siguientes parámetros: Supervivencia de la planta, producción de biomasa aérea y radical, resistencia a factores de estrés fisiológicos o patológicos.

#### **18. Estudio preliminar de la doble simbiosis *Rhizobium* - MVA - leguminosa por medio de $\text{N}^{15}$**

##### **18.1. Plantas seleccionadas y condiciones de cultivo**

En este ensayo se utilizaron plantas de *Robinia pseudoacacia* y *Spartium junceun*, cultivadas en suelo de "launa" y "calcareo", respectivamente. En ambos casos se usaron macetas de 1 l selladas en su base, en las que se hicieron crecer las plantas, y a las que se agregó fertilizante nitrogenado con un 10% de exceso atómico de  $\text{N}^{15}$ , cantidad que permite determinar la eficiencia del uso de fertilizantes y evaluar

la capacidad fijadora de nitrógeno (Zapata, 1990). Con este experimento se pretendió incorporar esta técnica en el estudio de la simbiosis de leguminosas leñosas.

Las plantas en estos ensayos se mantuvieron a capacidad de campo para evitar pérdidas por lavado.

## 18.2. Preparación de la muestra y cálculos

Las plantas cosechadas fueron tratadas según Axmann et al. (1990) para a partir del extracto Kjeldahl obtenido, realizar los tubos de descarga (Pyrex de 7 mm de diámetro) que se midieron en el espectrómetro de emisión.

El valor R o R' que se obtiene a partir del registro de la medida en nuestro espectrómetro de emisión sopra G.S.I., se logra por la relación existente entre 2 picos consecutivos de la banda emitida por el N.

$$R = \frac{H(29)}{H(28)}$$

$$R' = \frac{H(30)}{H(29)}$$

Mediante estas dos ecuaciones se puede calcular el porcentaje T y T' de átomos de N<sup>15</sup>:

$$T' = 200 R' / (2 R' + 1)$$

$$T = 100 R / (2 + R)$$

En este equipo solamente, pueden ser registrados excesos atómicos inferiores al 10% de N<sup>15</sup> con una precisión satisfactoria (Le Massom et al., 1982). La cantidad de N que se utiliza es de 0.2 mg a 20 mg según el volumen y preparación del tubo de descarga (Axmann, 1990).

A partir de estos datos se puede determinar la eficacia en el uso

de un fertilizante, FBN y transferencia de N. La eficiencia de un fertilizante (% NpdFert) o la eficacia en el uso de un fertilizante (Zapata, 1990).

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

Para calcular FBN la técnica (cálculos) a utilizar depende de que la cantidad de fertilizante marcado añadido (trazador) sea igual para la planta fijadora que para la no fijadora. En este caso se puede usar la técnica de la dilución isotópica mediante la cual:

$$\% \text{ NpdFij} = \left( 1 - \frac{\% \text{ NpdFert Fijadora}}{\% \text{ NpdFert control}} \right) \times 100$$

Como se observa mediante esta fórmula se calcula la cantidad de N procedente de la fijación, independientemente de la biomasa cosechada (Hardanson y Danso, 1990)

Para determinar la FBN cuando se añade más fertilizante marcado a la no fijadora se precisa usar la técnica del "valor A" del suelo, este se calcula previamente mediante la siguiente fórmula aplicada a los datos obtenidos con la planta control (no fijadora).

$$A_{\text{suelo}} = \frac{100 - \% \text{ NpdFert}}{\% \text{ NpdFert}} \times \text{dosis N aplicado}$$

A partir de este dato se calcula el N procedente de la fijación atmosférica (% NpdFij).

$$\% \text{ NpdFij} = \frac{\% \text{ NpdFert}}{A_f} \times A_a$$

Donde  $A_a = (A_{\text{suelo}} + A_{\text{atmósfera}}) - A_{\text{suelo}}$ , o lo que es lo mismo:

A planta fijadora - A planta control.

$A_f$  = fertilizante aplicado y  $A_a$  = N atmosférico.

## 19. Transporte de nutrientes

Uno de los objetivos de este trabajo es evaluar la incidencia de la doble simbiosis micorriza *Rhizobium*, tanto en planta de leguminosas noduladas como en aquéllas no fijadoras que crecen junto a las anteriores. Para lo cual se hicieron crecer juntas y separadas una leguminosa (*Spartium junceum*) y una no leguminosa (*Dittrichia viscosa*) inoculadas con *Rhizobium* y hongo MVA o sin inóculo, en condiciones controladas de invernadero y con sustrato inerte (arena:vermiculita, v/v, 1/1) esterilizado. Ello dió origen a 5 tratamientos con 6 repeticiones cada uno. Los diferentes tratamientos fueron analizados en los 3 meses, considerando cada planta por separado. Los parámetros que se midieron fueron: peso seco de la planta tanto de la parte aérea como de la raíz, % de micorrización, número de nódulos por planta y contenido en N, P, K en cada especie vegetal.

Las macetas se regaron con la solución nutritiva de Hewitt (1952) adecuada a cada tratamiento. La evaluación del ensayo tiene como objetivo determinar el sinergismo o antagonismo entre los distintos simbioses, así como el contenido de nutrientes en cada planta, poniendo de manifiesto el sentido de la movilización de éstos.

## 20. Estudio de la colonización en la doble simbiosis en leguminosas leñosas

Como se ha dicho anteriormente, las micorrizas son un elemento importante en el desarrollo de muchas especies de leguminosas tanto herbáceas como leñosas. En lo que a leguminosas leñosas se refiere, pocas investigaciones se han realizado sobre la doble simbiosis con *Rhizobium* y MVA, por lo que se conocen mal los mecanismos de interacción entre los simbioses.

En una primera etapa, de estudio básico de la doble simbiosis, se diseñaron una serie de experimentos destinados a conocer la ultraestructura nodular y la posible coexistencia de los microsimbioses.

Un aspecto de interés, es la incidencia de la población microbiana del suelo y en especial de los hongos MVA en relación a la formación de nódulos bacterianos fijadores de nitrógeno.

La infección de *Rhizobium* en leguminosas, es un proceso complejo en el que intervienen numerosos factores que dependen tanto de la planta como de la bacteria. En este estudio, se ha querido establecer la incidencia que tiene la presencia de uno y otro endofito en la nodulación y en la formación de MVA. Con este objeto, se diseñó un ensayo con tres tratamientos, en los que las variables eran el tiempo y orden de inoculación de uno y otro tipo de microorganismo.

Como planta modelo se usó *S. junceum* inoculada con *Glomus fasciculatum* y *Rhizobium* sp GRH16 o *Bradyrhizobium* sp (vigna) 3824, lo que dió origen a 6 tratamientos diferentes con 15 repeticiones en cada uno de ellos. Los efectos de los distintos tratamientos fueron analizados cada 3 meses a razón de 5 repeticiones cada vez.

Los parámetros obtenidos en cada análisis fueron: peso seco de parte aérea y raíz, % de micorrización y número de nódulos por planta. Cuando existió nodulación se determinó su eficacia por medida de la actividad nitrogenasa.

#### **21. Medida de los ureidos totales**

Recientemente se ha descrito la determinación de ureidos como base de un sistema que podría ser utilizado en la medida de la FBN.

La determinación de ureidos se ha realizado mediante análisis colorimétrico según el método de la glioxil-fenilhidrazona (Glenister y LaRue, 1987). La evaluación de estos compuestos se realizó en un homogeneizado de 530 mg de tejido vegetal fresco, para cada tratamiento, con tres repeticiones en cada caso. En la primera etapa, común para todo el material sometido a análisis, se realizó una extracción en una mezcla 1:1 (v/v) de etanol y tampón fosfato 0.1 M y pH 7.

Las soluciones extractadas se repartieron a razón de 1.5 ml por tubo, para determinar alantoína, ácido alantoico y ácido glioxílico en cada tratamiento. Mediante la adición de NaOH 0.5 N se consigue el paso de alantoína a ácido alantoico y por acción de HCl 0.65N o 0.15N se transforma en ácido glioxílico.

En esta técnica, el ácido glioxílico se neutraliza mediante tampón fosfato 0.4M (pH, 7) y con la adición de 0.5 ml de solución de fenilhidracina se logra el paso de glioxilato a glioxil-fenilhidrazona que finalmente pasa a dibencilformazan tras agregarle 2.5 ml de HCl concentrado y 0.5 ml de ferricianuro potásico.

La medición de absorbancia se realizó a 535 nm después de mantener la solución de reacción 15 minutos a temperatura ambiente para obtener el revelado del color. Como curva patrón en nuestro ensayo se utilizaron siete concentraciones de alantoína desde 0 a 0.2 mM.

En la serie de tratamientos establecida se hicieron crecer en forma conjunta *Spartium junceum* y *Festuca rubra*, inoculadas con *G. fasciculatum* y *Bradyrhizobium* sp. (Vigna) 3824. Las plantas de *Festuca rubra* se hicieron crecer separadas inoculadas con micorrizas (*G. fasciculatum*). Los tratamientos, con 12 repeticiones cada uno, se mantuvieron en condiciones controladas de invernadero, durante 3 meses. El sustrato usado en el ensayo fue arena:vermiculita (1:1, v/v).

## **22. Instalación de parcelas permanentes**

Se parte de semillas pregerminadas *in vitro*, que en bolsas de plástico de 1 l pasaron en condiciones controladas de invernadero 3 meses, tras los que y con objeto de aclimatar las plantas a condiciones ambientales naturales se mantendrán otros 3 meses en un invernadero abierto antes de instalar en campo. Con el fin de mejorar el estado fisiológico de las plantas, éstas se inoculan con *Rhizobium* y MVA seleccionados previamente, mientras que otras plantas se mantienen sin simbiosis, constituyendo el control del ensayo compensando el efecto de la inoculación con la aplicación quincenal de solución nutritiva de



Hewitt adecuada a tales efectos (10 ml por bolsa). El sustrato empleado fue suelo procedente de la zona de instalación de las parcelas mezclado con arena, para evitar compactación (5:2, v/v). Las plantas que se han utilizado en este ensayo fueron: *Spartium junceum*, *Robinia pseudoacacia*, *Anthyllis cytisoides* y *Medicago arborea* *Acacia caven* y *Prosopis chilensis*.

En las parcelas seleccionadas, a una altura de 1000 m, de pendiente media a fuerte y orientación sur-este, se les realiza un seguimiento de supervivencia y desarrollo. Una de las parcelas es de suelo de "launa" y la otra del tipo "calcáreo" ; ambas se dividieron en diez terrazas de 1.5 m de ancho y 30 m de largo, realizadas según curvas de nivel. Para distribuir las plantas se usó un sistema de bloques al azar. En una primera etapa las evaluaciones del ensayo se realizaron mensualmente.

## 22. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en los distintos ensayos se han comparado y tratado estadísticamente mediante un análisis de varianza de 3 vías, y cuando han existido diferencias entre medias, estas se han comparado mediante un test de Duncan. Así mismo se han realizado análisis de regresión y correlación simples.

## RESULTADOS

#### IV. RESULTADOS

##### 1. Características del suelo

Los análisis correspondientes de los suelos utilizados en los distintos ensayos permiten establecer como característica fundamentales los siguientes: El suelo de "launa", tien un pH que varía entre 7,2 a 7,3, mientras que del suelo "calcáreo" es de 7,8. De acuerdo con el análisis conductimétrico del contenido en sales solubles totales del suelo, obtenido a partir de un extracto saturado del mismo, el suelo de "launa" se incluye entre los no-salinos por tener una conductividad media, a 25°C, inferior a 2 mmhos/cm, concretamente de 0,45 mmhos. En cuanto al suelo de "calcareo" la conductividad es de 0,37 mmhos, por lo que también se trata de un suelo no-salino.

La textura del suelo de "launa", según la clasificación USDA, corresponde a la de "franco-arenosa". Por otra parte, la estructura, es típicamente laminar, muy fina, con orientación de la mayoría de las superficies en un plano horizontal y tienen menos de un milímetro de espesor.

La capacidad de campo es de tan sólo 10,6% en el caso de "launa", y de 20,7% para suelo "calcareo". La concentración de P asimilable (Olsen) expresada como P soluble en acetato amónico, es de 0,16 y 1,05 ppm, respectivamente. El contenido en nitrógeno total, es de 0,07% en "launa" y 0,17% en "calcareo" y el de materia orgánica es de 0,28% en "launa" y 0,9% en "calcareo".

##### 2. Ensayos de inoculación cruzada

Las plantas seleccionadas fueron inoculadas con todas y cada una de las razas de *Rhizobium* de los grupos de inoculación cruzada y las aisladas de los nódulos radiculares, obtenidas de plantas de las especies

en estudio. Con respecto de *S. junceum*, las razas infectivas fueron:

- B. japonicum* (Glycine)
- Bradyrhizobium japonicum* (Lupinus)
- Bradyrhizobium* sp. (Vigna) 3824
- Rhizobium* sp. GRH16
- Rhizobium phaseoli*
- Rhizobium meliloti* GR4B

La efectividad se evaluó con la técnica de la reducción de acetileno a etileno, comprobándose que solo eran efectivas las razas. *B. japonicum* (Glycine), *B. japonicum* (Lupinus) *Bradyrhizobium* sp. (Vigna) 3824 y *Rhizobium* sp. GRH16. Según se observa en la Gráfica 1, *Bradyrhizobium* sp. (Vigna) 3824, fué la especie más efectiva.

Los resultados con *Antyllis cytisoides* mostraron que, de las diferentes razas de *Rhizobium* probadas, esta planta solo fué nodulada por *R. trifolii*, *R. phaseoli*, y por la raza homóloga aislada de nódulos radicales de *A. cytisoides*. Se debe destacar que estas asociaciones no resultan efectivas en los dos primeros casos. Al inocular *A. cytisoides* con 5 razas diferentes de *R. lotti* se observó que todas eran infectivas, además de efectivas. En la Gráfica 2 se muestran los niveles de fijación de nitrógeno, medido por la técnica de la reducción de acetileno a etileno.

En el caso de *Medicago arborea* se puede comprobar que existe una gran especificidad bacteria-hospedador y sólo *R. meliloti* fué capaz de nodularla. Los nódulos formados fueron efectivos, trás la evaluación de actividad fijadora. Por otra parte, *Robinia pseudoacacia* fué nodulada por *R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. leguminosarum*, *B. japonicum* (Glycine), *B. japonicum* (Lupinus), *R. phaseoli*, sin que ninguna de las razas se mostrara efectiva.

La Tabla 3 resume el comportamiento de las distintas especies vegetales frente a distintas razas de *Rhizobium* sp.. Concretamente GRH16 y GRH17, aisladas de *S. junceum* y *A. cytisoides* respectivamente, no nodularon en las diferentes leguminosas pertenecientes a los grupos de

inoculación cruzada. *Rhizobium* sp. GRH11 y GRH13, aislados de *R. pseudoacacia* y *M. arborea*, respectivamente, fueron infectivos solo para *Medicago sativa* (Tabla 3); sin bién, su eficiencia en la fijación de nitrógeno fué menor que la encontrada en razas homólogas de colección.

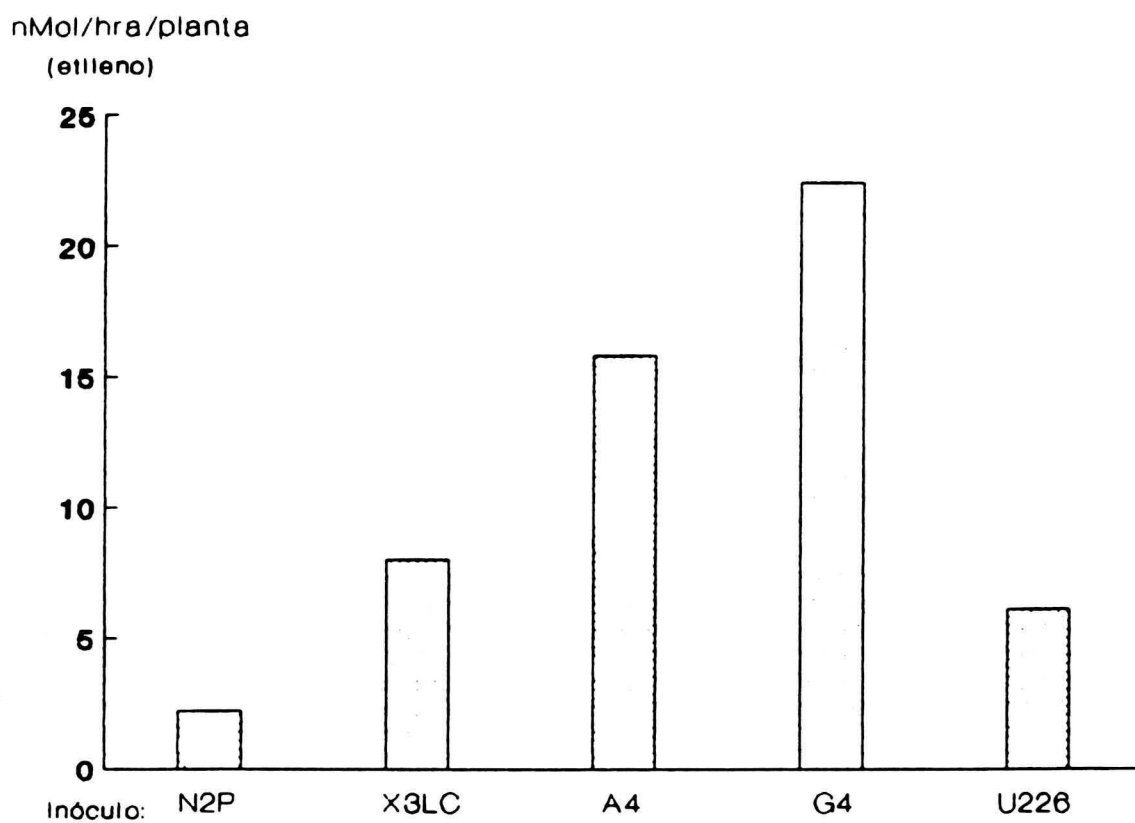
En la Tabla 4 se indica el caracter infectivo de las distintas razas de *Rhizobium* en el ensayo de inoculación cruzada, en relación a las plantas seleccionadas en la zona de estudio.

Tabla 3.- Infectividad (+) o no-infectividad (-) de los *Rhizobium* sp aislados de las leguminosas crecidas en la zona de estudio, en ensayo de inoculación cruzada.

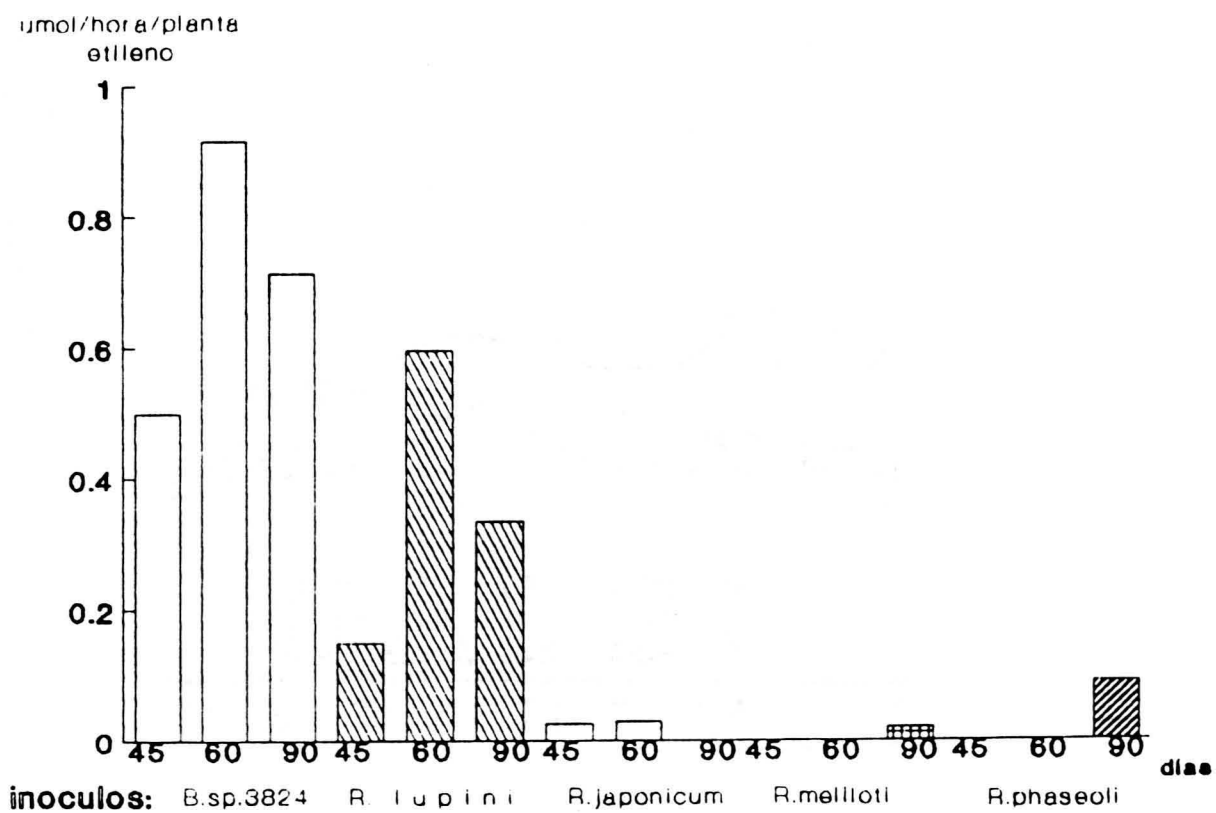
	Hospedadores					
	Alfalfa	Trébol	Soja	Guisante	Altramuz	Haba
GRH11	+	-	-	-	-	-
GRH13	+	-	-	-	-	-
GRH16	-	-	-	-	-	-
GRH17	-	-	-	-	-	-

Tabla 4.- Efectividad (↑, ↓, no), e infectividad (+, -) de las razas de *Rhizobium*, en ensayo de inoculación cruzada, en simbiosis con las plantas seleccionadas.

<i>Rhizobium</i> sp.	Hospedadores			
	<i>Spartium</i>	<i>Anthyllis</i>	<i>Medicago</i>	<i>Robinia</i>
<i>R. meliloti</i>	-	-	+ (↑)	+(no)
<i>R. trifoli</i>	+(no)	+(no)	-	+(no)
<i>R. leguminosarum</i>	+(no)	-	-	+(no)
<i>B. japonicum</i> (G)	+(↓)	-	-	+(no)
<i>B. japonicum</i> (L)	+(↑)	-	-	+(no)
<i>R. phaseoli</i>	+(↓)	+(no)	-	+(no)
<i>B. sp</i> (Vigna) 3824	+(↑↑)			



Gráfica 2. Actividad específica de diferentes especies de *R. lotii* en simbiosis con *A. cytisoides*.



Gráfica 1. "Actividad específica" de la simbiosis entre distintas razas de *Rhizobium* y *S. junceum* a diferentes tiempos de medida.



### 3. Determinación de las razas de *Rhizobium*, y afines, presentes en suelo de "launa"

De este ensayo se infiere que el suelo de "launa", a pesar de su baja fertilidad, puesta de manifiesto a través del cultivo de diferentes especies vegetales, presenta una población bacteriana (*Rhizobium*) lo suficientemente amplia como para que en ella convivan razas infectivas de distintas leguminosas.

Concretamente se encontró que plantas pertenecientes a los géneros: *Phaseolus*, *Pisum*, *Medicago*, *Trifolium* y *Lupinus*, eran noduladas cuando crecían en suelo de "launa".

Una vez comprobado que existían naturalmente razas infectivas, las plantas noduladas fueron evaluadas para comprobar si las simbiosis establecidas eran efectivas. Se detectó este carácter en todas ellas, excepto en *Lupinus*, sin embargo el nivel de actividad fijadora de nitrógeno evaluado fué muy variable.

La raza aislada de *Trifolium* fué poco infectiva y de baja o nula capacidad fijadora de N<sub>2</sub>. En cuanto a la raza aislada de *Medicago sativa*, tanto por su carácter infectivo como por su efectividad y forma de crecimiento, puede considerarse *R. meliloti*.

El conocimiento de la existencia de una población bacteriana establecida en los suelos de "launa" en la zona de estudio, es de gran interés, ya que si se piensa incorporar plantas inoculadas con microsimbiontes al ecosistema, se debe tener en cuenta la capacidad de colonización previa de éste.

Las razas de *Rhizobium* existentes en este área, a pesar de no ser de probada su eficiencia, seguramente provocarán un efecto competitivo, en cuanto a sitios de infección, y en el nivel de supervivencia de las nuevas razas que se intentan establecer.

#### 4. Curva de crecimiento de los endofitos aislados de la zona de estudio

A partir de estas curvas de crecimiento se determinó que tanto la raza aislada de *S. junceum* como la de *A. cytisoides*, son razas de rápido crecimiento. Ambas tienen una tasa de reproducción de 3 a 4 horas. La raza aislada de *A. cytisoides* muestra una curva de absorbancia mayor que la que genera la raza aislada de *S. junceum*. A pesar de producir distintos valores de absorbancia, ambos cultivos tienen valores similares en cuanto a número de células se refiere, como puede observarse en las Graficas 3 y 4. Esto puede indicar que *Rhizobium* sp. GRH17, aislado de *A. cytisoides*, es una raza de mayor tasa reproductora que *Rhizobium* sp. GRH16, aislado de *S. junceum*.

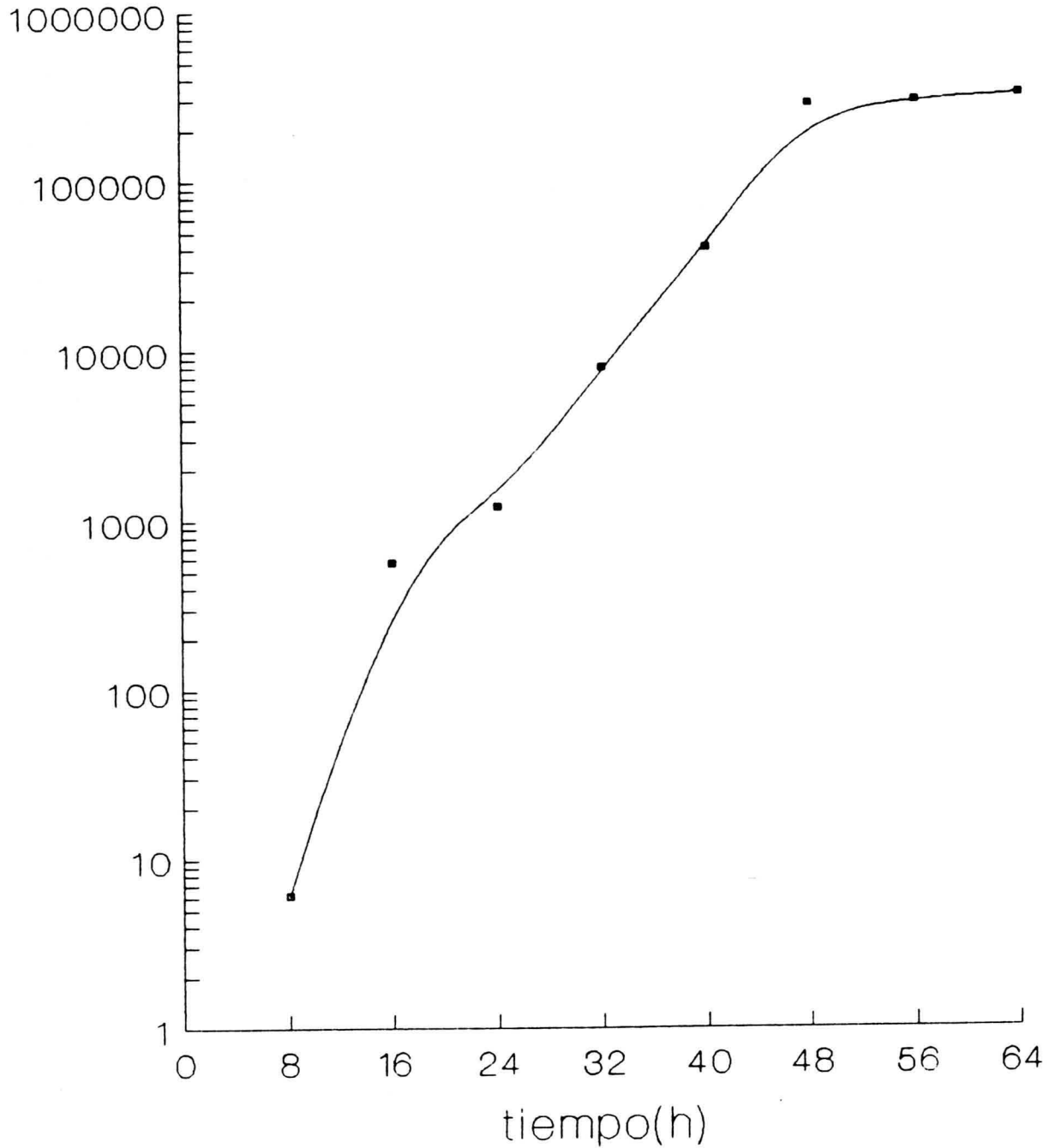
Por otra parte *S. junceum* forma nódulos tanto con razas de rápido crecimiento (*Rhizobium* sp. GRH16) como con *Bradyrhizobium*.

Las razas aisladas de los nódulos de *S. junceum* y *A. cytisoides* que crecen en los suelos del área de estudio son de rápido crecimiento y no se muestran muy efectivos en la fijación de  $N_2$ , siendo infectivas.

Esta población bacteriana, nativa del suelo, al tener un rápido crecimiento podría representar un elemento de competencia a razas seleccionadas que quisieran introducirse. Lo anterior es de particular importancia si la raza seleccionada fuese del género *Bradyrhizobium*.

# *Rhizobium* sp. GRH16

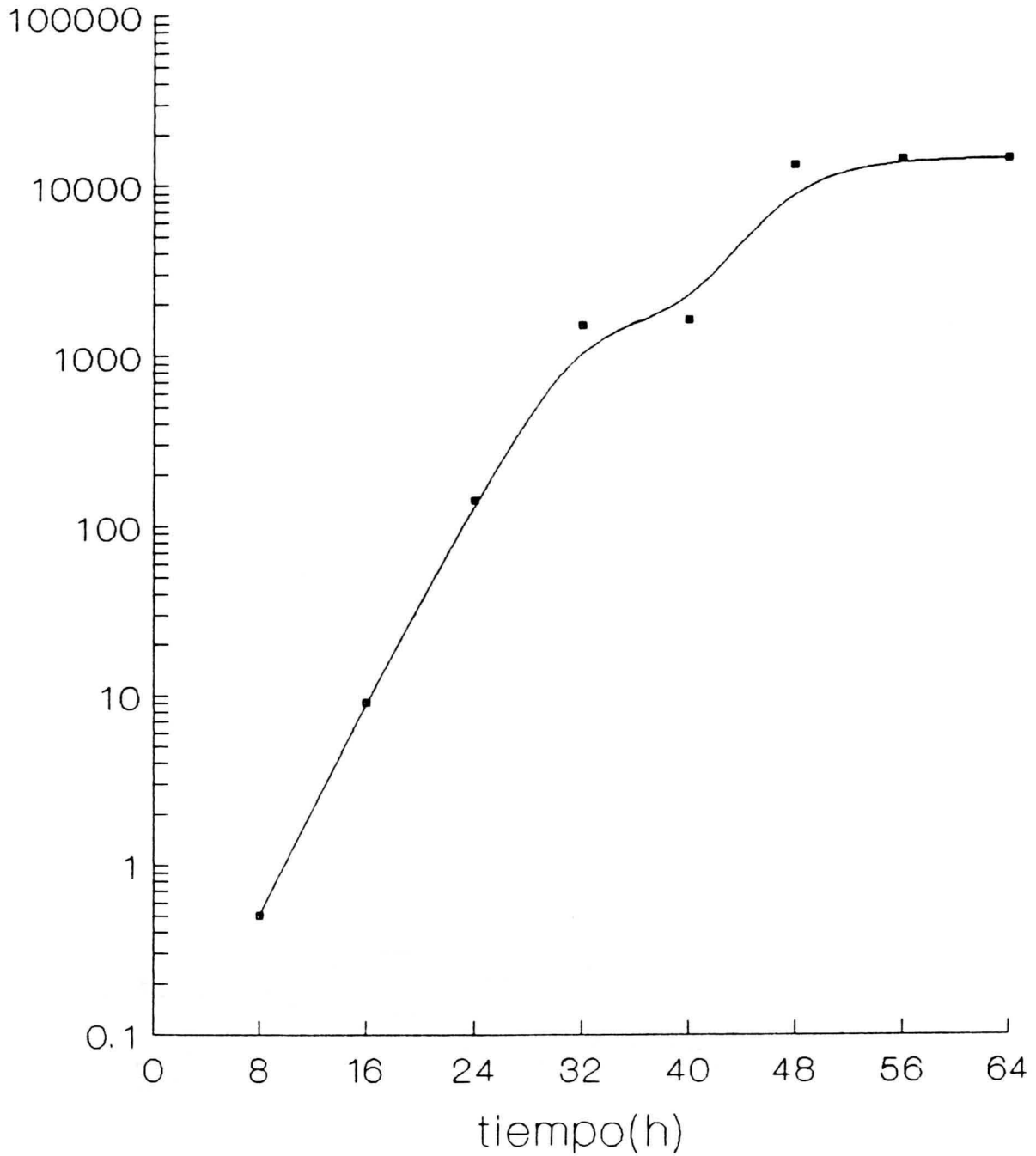
número de células  
(millones)



Gráfica 4. Evaluación del crecimiento de *Rhizobium* sp GRH16.

# *Rhizobium* sp. GRH17

número de células  
(millones)



Gráfica 3. Evaluación del crecimiento de *Rhizobium* sp GRH17.

**5. Estudio de la supervivencia de *Bradyrhizobium* sp. (Vigna) 3824 en condiciones variables de suelo de "launa" o "calcareo", y en simbiosis con *S. junceum***

La idea de este ensayo, fué determinar el comportamiento, en condiciones de suelo natural, de una raza de *Rhizobium* seleccionada por sus buenas características de fijación de  $N_2$  en plantas de *S. junceum*.

Una característica deseable de los inoculantes de *Rhizobium* es que tengan capacidad de adaptación al medio ambiente natural, que les permita competir con otros microorganismos autóctonos, de tal forma, que su representación en el entorno sea perdurable, pudiendo así servir como un inoculante permanente a las plantas que en él se desarrollen. Ello es de especial importancia en situaciones en que las plantas crecen en ambientes estresados, como es el caso que concierne al presente estudio.

De la compleja serie de tratamientos establecida inicialmente en este estudio de supervivencia, los resultados preliminares obtenidos en las primeras semanas, indicaron la conveniencia de concentrar la investigación en aquéllos, en los que el inoculante se encontraba en presencia de *S. junceum* en condiciones de suelo no estéril.

La población de *Bradyrhizobium* sp. (Vigna) 3824 inicial por maceta fue equivalente a 5ml de una suspensión de  $2 \times 10^6$  células por ml, lo que representa, en el conjunto de la maceta, un valor de  $3 \times 10^4$  células por gramo de suelo.

En la Gráfica 5 se recogen los valores de la supervivencia de *Bradyrhizobium* sp. (Vigna) 3824  $Sm^+$  para "launa" y "calcareo" respectivamente.

En la primera evaluación, a las 10 semanas de la inoculación, la población bacteriana tuvo un aumento en ambos tipos de suelo, siendo

mayor en el caso de "launa". A las 15 semanas, la supervivencia de la raza inoculada, de acuerdo con el crecimiento en placa, bajó ligeramente en ambos tratamientos. En este momento la presencia de bacterias es similar a la encontrada al tiempo de inoculación.

La evaluación a las 30 semanas indicó una fuerte caída en el caso de suelo de "calcareo", sin embargo, en el suelo de "launa" la población bacteriana de *Rhizobium* solo tuvo un pequeño descenso, manteniéndose cercana a los valores en tiempo cero.

Por último, la evaluación a las 45 semanas no indicó presencia de la raza inoculada por lo que puede entenderse que no hay supervivencia de *Bradyrhizobium* sp. (Vigna) 3824.

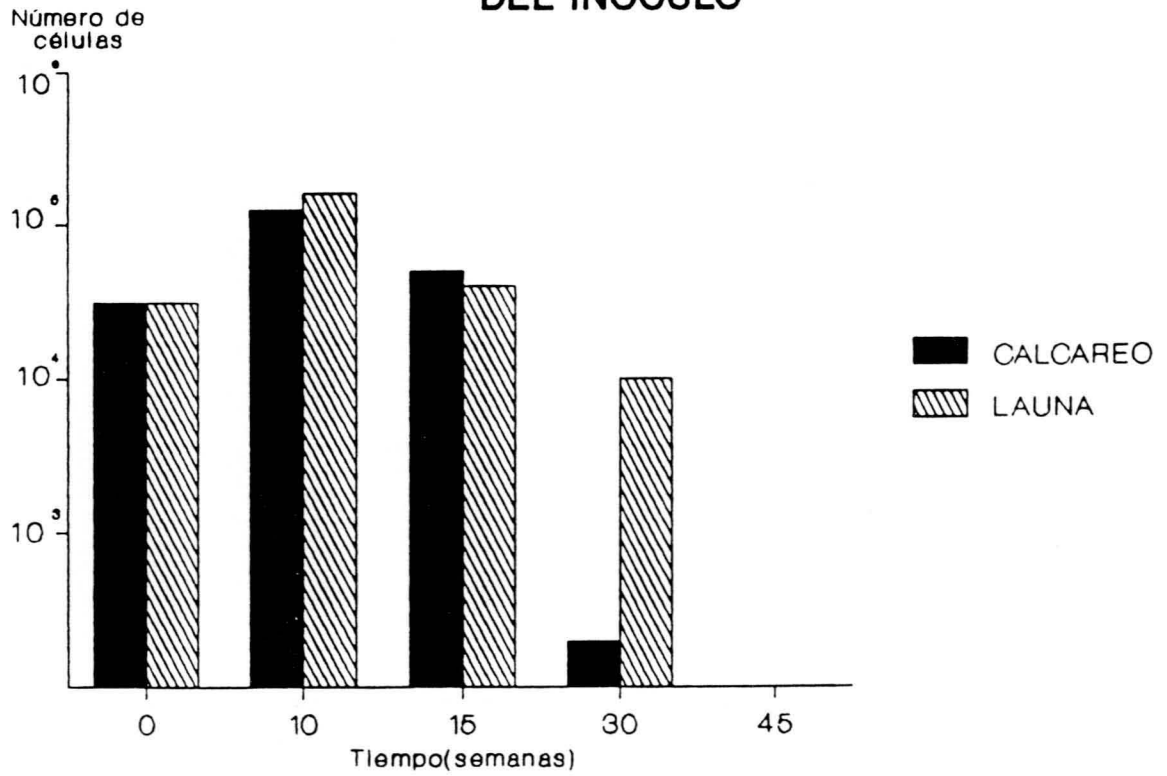
El ligero aumento en la población bacteriana encontrado inicialmente, puede indicar una rápida multiplicación de ésta, al estar en contacto con su hospedador, o sus exudados radiculares.

Posterior a la primera etapa, la bacteria inoculada tiende a estabilizarse en valores cercanos a los encontrados en el momento de inoculación. Esto se mantiene por corto periodo, ya que a las 30 semanas se observa una fuerte disminución de *Bradyrhizobium* sp. (Vigna) 3824 en suelo "calcareo", mientras que el caso de "launa" esta disminución de población es menos notoria. Esta última situación podría explicarse, en el caso del suelo "calcareo", por la presencia de una mayor población microbiana natural, la que competiría por un mismo nicho ecológico.

De otro lado, el suelo de "launa" de peores características físicas y nutricionales, por lo tanto, más pobre microbiológicamente, lo que quiere decir que los inoculantes exógenos no están sometidos a una gran presión por los microorganismos preexistentes. De las 3 primeras evaluaciones se puede inferir que esta raza es capaz de adaptarse al suelo de "launa" donde, al parecer, en condiciones ambientales normales se muestra persistente.

La última evaluación, realizada a las 45 semanas, no indicó presencia de la raza inoculada en ninguno de ambos suelos. Este hecho debe ser analizado teniendo en cuenta que en este último periodo las plantas se sometieron a unas condiciones climáticas extremas, en lo referente a temperatura y a humedad relativa, que han podido provocar una situación letal para las bacterias.

## SUPERVIVENCIA DEL INOCULO



Gráfica 5. Número de células de *Bradyrhizobium* sp (Vigna) 3824 en suelo de "launa" y "calcareo" a lo largo del tiempo.



**6. Estudio del efecto del nitrógeno combinado (NO<sub>3</sub>K), sobre la nodulación y actividad fijadora de nitrógeno en plantas de *S. junceum* inoculadas con *Rhizobium***

Lo primero que debe destacarse, es la elevada nodulación en la mayoría de los tratamientos, y que, dicho proceso fué inhibido sólo a partir de la concentración de 20mM de NO<sub>3</sub>K (Tabla 5), hecho que puede interpretarse aceptado que la presencia de N combinado no incide en el mutuo reconocimiento entre la leguminosa y la bacteria y la posterior infección, como ocurre en otras plantas.

Las medidas de fijación de N<sub>2</sub>, mediante la técnica de la reducción de acetileno, ponen de manifiesto que los nódulos más activos son los existentes en plantas que crecieron en un medio sin N combinado. Las tasas de fijación fueron inversamente proporcionales a la cantidad de N combinado presentes en el medio. La actividad fijadora de los nódulos de las plantas que crecieron en la concentración de 20 mM es casi 1/5 de la encontrada en aquéllas que crecieron en medio sin N.

En este ensayo no se encontró un nivel de N combinado que inhibiera completamente la nodulación, sin embargo, 50 mM de NO<sub>3</sub>K si que eliminan la fijación de nitrógeno.

Las dosis de N que se adicionaron fueron las equivalentes a 75, 150 y 300, 600 y 1500 Kg de N/ha. A pesar de que los valores encontrados, tanto en la fijación como en número de nódulos, pueden parecer bajos, se debe indicar que, en otras plantas, niveles inferiores de N combinado ya producen inhibición, en algunos casos, de forma total.

Por otra parte, el análisis de la producción de biomasa (Tabla 5), muestra que el tratamiento que provoca los valores superiores en este parámetro es aquel en que coinciden valores mayores de actividad nitrogenasa por planta, con el aporte de menor dosis de nitrógeno, lo que permite al vegetal, casi duplicar su peso seco con respecto al testigo (sin adición de NO<sub>3</sub>K). Esto podría justificarse por la existencia de un

efecto sinérgico en beneficio de la planta entre fijación simbiótica de nitrógeno y pequeño aporte de N exógeno.

El estudio de la respuesta en cuanto a desarrollo de biomasa de parte aérea y raíz (Tabla 5), indica que la adición de diferentes concentraciones de  $\text{NO}_3\text{K}$  incrementó el desarrollo de ambas partes de la planta hasta la dosis de 20 mM, en la que sólo la raíz mostró incremento con respecto al testigo. Una concentración superior (50 mM) provocó una disminución general de biomasa. En cuanto a reparto de la biomasa entre la parte aérea raíz el efecto fue siempre a favor del desarrollo de la primera.

Los valores de los análisis de N, P, y K para los diferentes tratamientos se muestran en la Tabla 6. Las concentraciones de P, N y K se mantienen prácticamente constantes, independientemente del  $\text{NO}_3\text{K}$  adicionado.

Tabla 5. Efecto del N combinado en distintos parámetros de plantas de *S. junceum* noduladas.

(NO <sub>3</sub> K) (mM)	NO <sub>3</sub> Nod	Nasa	PSA (g)	PSR (g)
0	60.3 <sup>ab</sup>	24.0 <sup>a</sup>	1.06 <sup>abc</sup>	0.19 <sup>bc</sup>
2.5	80.5 <sup>a</sup>	21.0 <sup>b</sup>	1.94 <sup>a</sup>	0.59 <sup>a</sup>
5	78.3 <sup>a</sup>	14.0 <sup>c</sup>	1.82 <sup>ab</sup>	0.56 <sup>a</sup>
10	40.6 <sup>bc</sup>	8.2 <sup>d</sup>	1.78 <sup>ab</sup>	0.39 <sup>ab</sup>
20	18.7 <sup>cd</sup>	5.4 <sup>d</sup>	0.93 <sup>bc</sup>	0.30 <sup>bc</sup>
50	8.5 <sup>d</sup>	0 <sup>e</sup>	0.70 <sup>c</sup>	0.13 <sup>c</sup>

NO<sub>3</sub> Nod, se refiere a número de nódulos por jarra Leonard; Nasa, es actividad nitrogenasa (μmol acetileno reducido/g nod/hora); PSA y PSR, son peso seco de parte aérea y de raíz respectivamente.

Nota: Para cada parámetro, los números seguidos de la misma letra no muestran diferencias estadísticamente significativas según el Test de Duncan. S.I.=0.01.

Tabla 6.- Concentración de N, P, K, en la parte aérea de plantas de *S. junceum* en presencia de concentraciones crecientes de N combinado.

NO <sub>3</sub> K mM	N (%)	P (%)	K (%)
0	1.97 <sup>b</sup>	0.32 <sup>a</sup>	3.06 <sup>a</sup>
2.5	1.89 <sup>b</sup>	0.29 <sup>b</sup>	3.27 <sup>ab</sup>
5	2.12 <sup>b</sup>	0.29 <sup>b</sup>	3.78 <sup>ab</sup>
10	1.84 <sup>b</sup>	0.25 <sup>b</sup>	4.01 <sup>a</sup>
20	2.46 <sup>ab</sup>	0.34 <sup>a</sup>	3.92 <sup>ab</sup>
50	3.32 <sup>a</sup>	0.25 <sup>b</sup>	4.37 <sup>a</sup>

Nota: Comentario al análisis estadístico, igual que en Tabla 5.

## 7. Caracterización in vitro de MVA

Los datos que permiten la identificación de un hongo formador de MVA aislado de la zona de estudio se recogen en la Tabla 7.

Los resultados preliminares indicaron que se trataba de un hongo perteneciente al género de *Scutellospora* al que posteriormente se clasificó como *S. persica* (Foto.1).

Como los hongos MVA son simbioses obligados, la única forma de reproducirlos es mediante la asociación simbiótica con una planta hospedadora adecuada. Por é ello se procedió a preparar inóculos utilizando distintos sustratos y plantas, con el fin de determinar las condiciones óptimas de desarrollo del hongo.

Se procedió posteriormente a la caracterización del hongo aislado respecto a diferentes factores ecológicos como pH, temperatura, iones inorgánicos y presencia de microorganismos.

Los ensayos sobre la influencia de la temperatura mostraron, que el óptimo para la germinación y desarrollo del micelio tenía lugar a 25°C (Gráfica 6), mientras que a 37°C se inhibía la germinación. Las esporas que al ser sometidas durante 21 días a 37°C, sin que iniciaran aparentemente su germinación, se transfirieron después de este periodo de incubación, a temperaturas de cultivo de 20°C o 25°C. En ambos casos germinaron y, nuevamente, se obtuvieron mayores porcentajes de germinación a 25°C. En cuanto al desarrollo del micelio, estimado mediante la producción de células auxiliares, es también óptimo a 25°C de temperatura (Gráfica 7).

De los distintos pH ensayados, es a pH=7 al que se obtienen mejores resultados en cuanto a germinación, desarrollo del micelio y número de células auxiliares (Tabla 8)

Dado el efecto estimulador que producen algunos microorganismos acompañantes de las esporas sobre la germinación y el crecimiento del

micelio (Azcón-Aguilar et al., 1986) se estudió el efecto de estos sobre *Scutellospora*. Como puede observarse en la Tabla 9, la presencia de microorganismos estimula el desarrollo de las hifas del hongo.

El efecto del sulfito y la cisteína sobre el crecimiento del micelio de *S. pèrsica* fué asimismo estimulador (Tabla 10). Al igual que ocurre con otros hongos formadores de micorrizas VA, el efecto del sulfito es más estimulador que el de la cisteína sobre el desarrollo del micelio del hongo, lo cual, también se manifiesta en la formación de mayor número de células auxiliares.



Foto.1.-Aspecto de *Scutellospora persica*, hongo MVA, aislado de la zona de estudio.

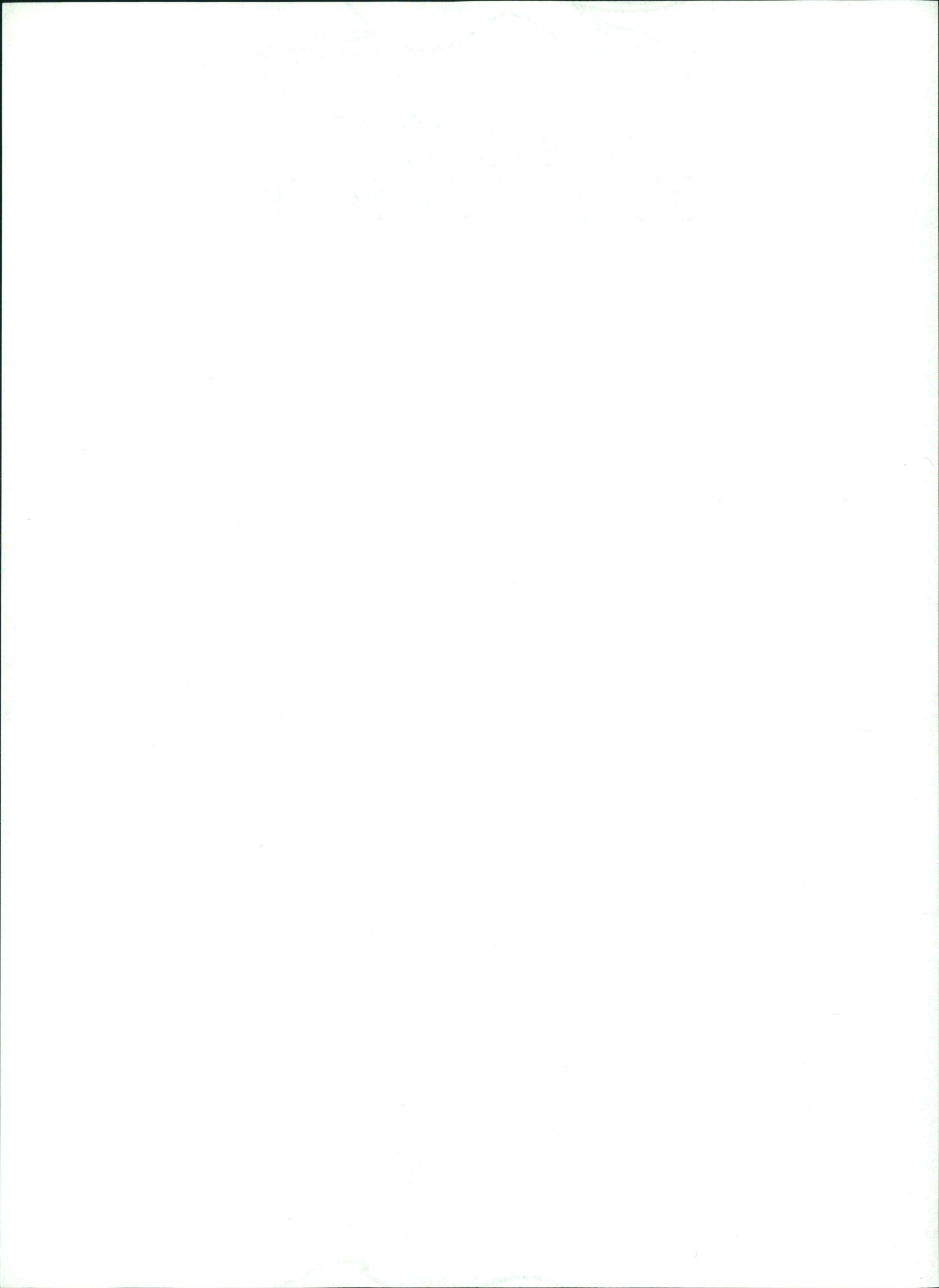


Tabla 7. Parámetros morfológicos de las esporas en identificación.

(*) Espora	$\varnothing(\mu)$	$\varnothing(\mu)$	Grosor( $\mu$ )			Celulas auxiliares		
		Suspensor	Pared	Capas		Nº	$\varnothing$	
			1a	2a	3a			
<	268	29	12.3	2.1	8.36	2.1	18	16.7
>	435	50	18.1	2.1	14.63	2.1	5	20.1
X	342	39	15.5	2.1	11.61	2.1	13	18.4
n	25	12	24	11	24	11	6	24

(\*) < = tamaño menor medido

> = tamaño mayor medido

X = Media

n = Número de medidas

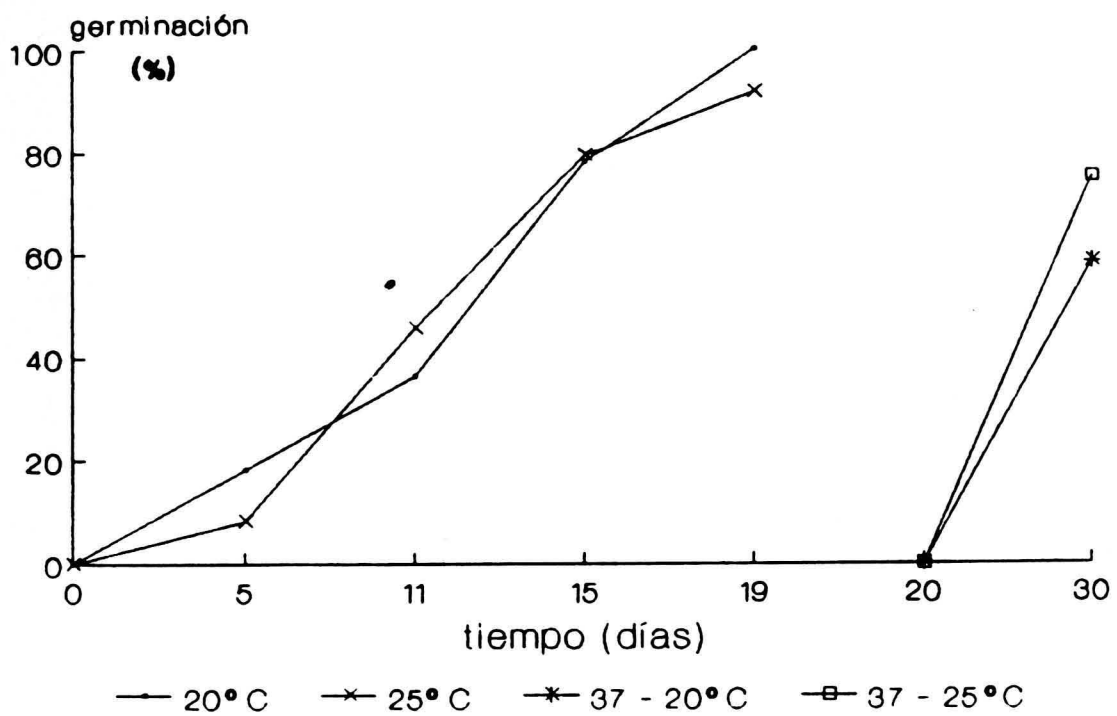
Tabla 8.- Efecto del pH en el desarrollo (D) y germinación (G) de *S. persica*.

pH	%G	%D	%Con auxiliares
5	42	0	0
6	87*	50*	0
7	87*	100**	50**
8	42	100**	0

\* y \*\* con un 90% y 95% de significación estadística respectivamente

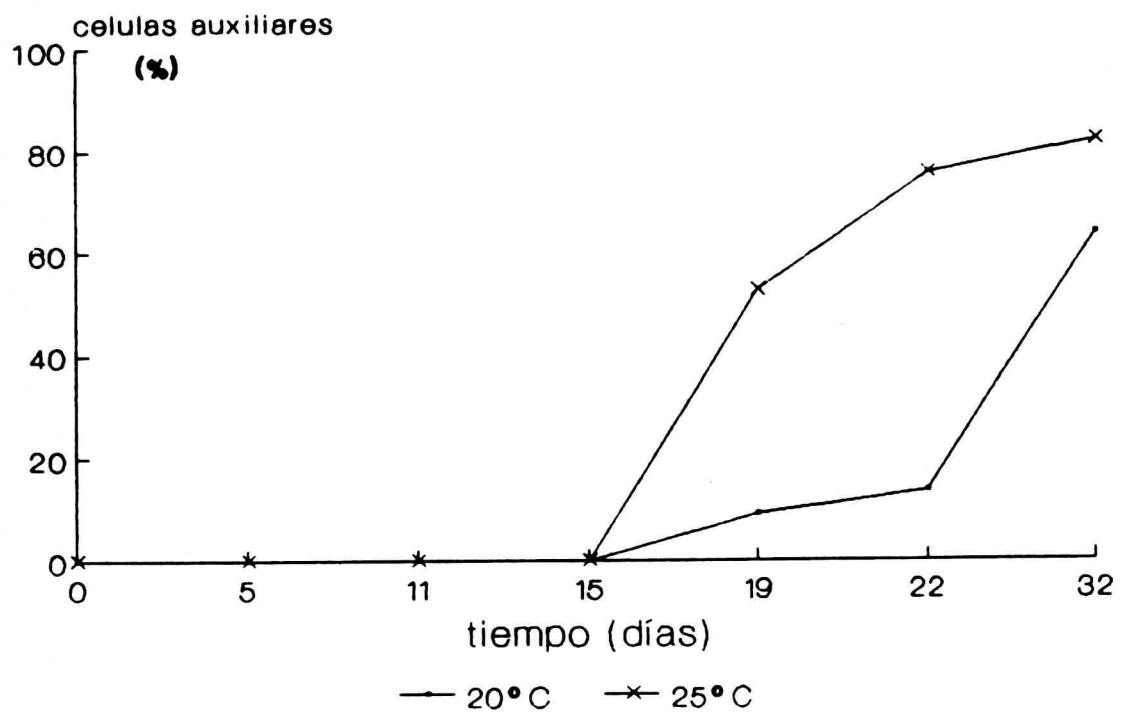


## *Scutellospora persica*



Gráfica 6. Germinación de *S. persica* a distintas temperaturas.

## *Scutellospora persica*



Gráfica 7. Desarrollo del micelio de *S. persica* a distintas temperaturas.

Tabla 9.- Efecto de los microorganismos en el desarrollo del micelio producido "in vitro" a partir de esporas de *S. persica*.

Tratamiento	Tamaño del micelio (Ø de colonia, mm)
En presencia de microorganismos acompañantes	10.0 **
En ausencia de microorganismos	1.1

\*\*Con un 95% de significación estadística

Tabla 10.- Efecto de distintos compuestos azufrados sobre el desarrollo del micelio de *S. persica*.

Tratamiento	Tamaño del micelio (Ø de colonia mm)
Agar-agua	55.3
Cisteína	85.4 *
Sulfito	101.0 **

\* con un 90% de significación estadística.

\*\* con un 95% de significación estadística.

## 8.- Evolución de los propágulos de *Scutellospora persica*

El recuento de esporas presentes en suelos de la zona de estudio, en los diferentes ciclos anuales, pone de manifiesto la incidencia de los cambios estacionales del clima en la población muestreada, la cual es variable en el tiempo.

Tras cuatro muestreos secuenciales, llevados a cabo cada tres meses a lo largo de un año, se observó que la cantidad de esporas es máxima en primavera, periodo de temperaturas y lluvias suaves, va decreciendo paulativamente hasta llegar al mínimo al final del verano, tras pasar la época de más altas temperaturas y de mayor estrés hídrico (Tabla 11).

De aquí, se infiere que, para este tipo de esporas, resultan más limitantes las altas temperaturas que las bajas. Además se aprecia que después del periodo más frío es cuando se produce la esporulación masiva. Con estas estructuras de resistencia, el hongo es capaz de resistir todo el periodo mas desfavorable.

Tabla 11.- Presencia de *Scutellospora persica* en suelo de "calcareo" en los 25 cm de la capa superior del suelo rizosférico de *Spartium junceum*.

Meses	Nº de esporas (100 g)
Marzo	79.5
Junio	36
Septiembre	10
Diciembre	30

## 9. Propagación "in vitro" de las plantas objeto de estudio

Antes de abordar el estudio de la micropropagación de este material leñoso, dado el interés de esta técnica y las dificultades de su macropropagación se iniciaron una serie de estudios preliminares tendentes a evaluar la incidencia de diferentes concentraciones de giberelina (ácido giberélico-AG<sub>3</sub>-) en este proceso.

### 9.1 Influencia hormonal en la germinación de semillas

El ensayo se realizó, poniendo en contacto semillas previamente esterilizadas en superficie, con concentraciones crecientes de giberelina (0, 1, 3, 10 mg/l), en tubos de ensayo mantenidos en una cámara de cultivo. Se efectuaron evaluaciones periódicas cada cuatro semanas.

Después de tres meses de ensayo, se determinó que la hormona usada, en ninguna de las concentraciones, ejerció efecto sobre las semillas de *Anthyllis cytisoides*. Este hecho se podría explicar por la impermeabilidad que presenta su cubierta seminal. Además, el pequeño tamaño y dureza de la semilla de *A. cytisoides* dificulta la extracción del embrión correspondiente, lo que imposibilita el análisis de la influencia ejercida por la hormona.

En el caso de *Spartium junceum* no ocurre lo mismo, (Gráfica 8) ya que la germinación es estimulada significativamente. Las concentraciones de hormona que mejoraron la germinación corresponden a 1 y 3 mg/l, que aumentaron alrededor de un 70% dicho valor. Sin embargo, concentraciones superiores de giberelina (10 mg/l), tienen un carácter tóxico y disminuyeron la germinación en más de un 30% respecto al tratamiento control.

### 9.2. Inicio del cultivo in vitro

Una primera etapa de la propagación vegetativa *in vitro* es la obtención de una cantidad adecuada de material vegetal que sirva para la propagación de propágulos base. En este caso se partió de plantas

obtenidas por germinación de semillas, cultivadas en condiciones axénicas en invernadero, de las que se pudieron extraer secciones nodales homogéneas. Estas, se sometieron a diferentes concentraciones de 6 benzilaminopurina (BA) y se evaluaron después de 4 semanas. En el caso de *Spartium junceum*, las concentraciones ensayadas fueron 0; 0,1; 0,3 y 1 mg/l. Los resultados indicaron que la concentración de 0,3 mg/l de BA se comporta como un estimulante de la proliferación y desarrollo celular, dando origen a tallos de mejor aspecto y calidad. La concentración mayor (1 mg/l), también ejerce un ligero efecto positivo en el crecimiento de las yemas, sin embargo, la calidad del mismo es inferior al encontrado con 0,3 mg/l (Gráfica 9).

En un ensayo posterior, en el que se prolongó el tiempo de evaluación hasta 6 semanas, se probó la concentración de BA que había dado mejores resultados (0,3 mg/l). Se obtuvieron valores de respuesta muy similares a los del caso anterior.

Respecto a *Anthyllis cytisoides*, utilizando igual rango de concentraciones de BA que el usado con *S. junceum*, las concentraciones de 0,1, 0,3 y 1 mg/l de BA produjeron un mayor desarrollo que el tratamiento control; a pesar de esto, la calidad del material vegetal fué inversamente proporcional a la concentración hormonal, de tal forma que a 0,3 y 1 mg/l, el efecto estimado tanto por la longitud y número de tallos como de hojas era inferior en este material que en el que se había logrado desarrollar a 0 y 0,1 mg/l. De esta forma, la concentración de 0,3 mg/l, después de cuatro semanas, fué la que produjo el mayor incremento en el desarrollo de las yemas, mientras que la de 0.1 mg/l produjo la mayor calidad en el desarrollo.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se creyó conveniente tratar de establecer en un ensayo a 6 semanas los niveles hormonales que combinasen los mejores efectos de calidad y cantidad. Para esto se definieron tratamientos con 0; 0,05; 0,1; 0,2; y 0,4 mg/l de BA. Al evaluar los efectos de este rango con mayor precisión de concentraciones al cabo de seis semanas, se comprobó que 0,2 mg/l de BA era una cantidad

suficiente para producir un doble efecto positivo en el de desarrollo como en calidad del material vegetal (Gráfica 10).

### 9.3 Multiplicación vegetativa

Un punto fundamental a considerar en la multiplicación *in vitro* es la determinación del número de veces que los explantos pueden subcultivarse antes de que degeneren. El proceso de multiplicación de estos se realizó en una secuencia encadenada de ensayos, consistentes en series dobles de subcultivos.

Los dos primeros subcultivos se evaluaron a las ocho (Gráfica 11) y cuatro semanas (Gráfica 12), respectivamente. En ellos se encontró que la concentración de 0,2 mg/l de BA, en *A. cytisoides*, era la que daba mejores resultados (Gráfica 11). Por otra parte, en *S. junceum*, 0.3 mg/l de BA produce mayor desarrollo que el tratamiento control (Gráfica 11).

En el tercer subcultivo se probó el efecto del origen de los explantos, que ocasionalmente puede ser responsable de las distintas respuestas a la acción hormonal. Se usaron secciones apicales o nodales, en las concentraciones de BA antes indicadas. En *A. cytisoides*, la procedencia de los explantos no tuvo efectos. Sin embargo, en *S. junceum*, se pudo apreciar un notorio aumento del número de tallos capaces de dar origen a nuevo tejido vegetal, cuando procedían de secciones apicales. A pesar de lo anterior, el menor número de explantos de secciones nodales que crecen producen mayor cantidad de biomasa, compensando así la diferencia existente respecto al material apical (Gráfica 13).

A lo largo del cuarto (Gráfica 14) y quinto (Gráfica 15) subcultivo, se pudo comprobar que en *A. cytisoides* los efectos de BA disminuyen y son aún más bajos que el tratamiento control (Gráfica 14). La situación es diferente en *S. junceum*, ya que los efectos hormonales aumentaron a lo largo de las distintos subcultivos, alcanzándose un 100% en el quinto (Gráfica 15).



Otra etapa en la multiplicación por cultivo de tejidos es la fase de elongación de tallo, en la que se determinan las mejores condiciones para lograr un adecuado desarrollo en longitud de las plantas. En las especies ensayadas no fue necesario utilizar la fase de elongación de tallos, dado el buen desarrollo observado durante las diferentes etapas de multiplicación, hecho que se puede explicar por el origen juvenil del tejido. Como consecuencia de la fase de multiplicación, los tallos obtienen el tamaño adecuado para pasar a la siguiente etapa, en la que el objetivo principal es obtener un enraizamiento adecuado.

#### **9.4. Enraizamiento**

Los explantos de ambas especies, procedentes del "stock" general, se sometieron a concentraciones crecientes (0; 0,1; 0,3 y 1 mg/l) de las auxinas: ácido indol butírico (IBA) y ácido naftalen acético (ANA). Se pudo comprobar que la presencia de hormonas es fundamental en el enraizamiento de ambas especies (Gráfica 16); no obstante, *A. cytisoides* muestra una mejor respuesta al tratamiento con bajo nivel hormonal, al mismo tiempo que es capaz de soportar mayores concentraciones de hormona (Gráfica 17). En el caso de *S. junceum*, los explantos manifiestan sensibilidad a 1 mg/l de auxina, cantidad que resulta tóxica, inhibiendo el enraizamiento (Gráfica 18).

A pesar de que las dos hormonas probadas inducían el enraizamiento, las respuestas de las plantas fueron diferentes, así ANA estimulaba la formación de raíces atípicas engrosadas y con bajo número de raíces secundarias mientras que, las raíces producidas en plantas tratadas con IBA tenían características normales (Fotos. 2 y 3).

#### **9.5 Aclimatación**

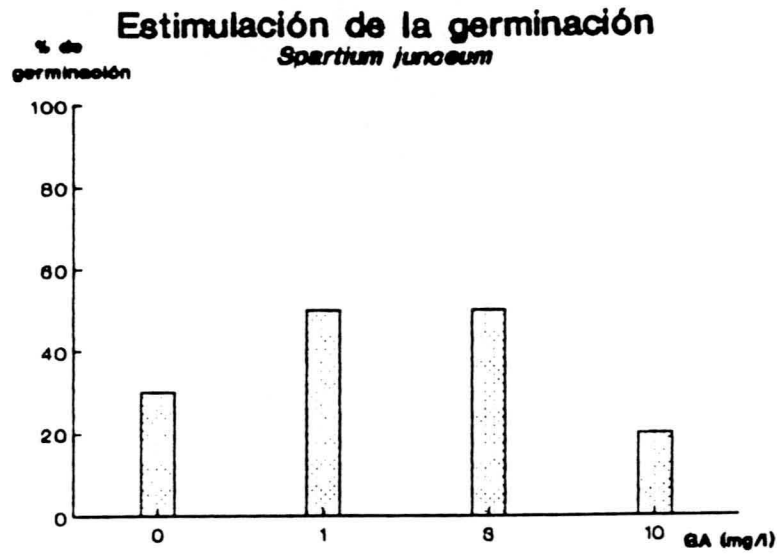
El proceso de aclimatación tiene, normalmente, tres etapas definidas. Primero, las plántulas se cultivan en frascos de vidrio, luego bajo un túnel de niebla, para posteriormente pasar a condiciones normales de invernadero. Sin embargo, cuando se trata de especies leñosas que se desean utilizar en la reforestación de zonas áridas y semiáridas, es

conveniente introducir una cuarta etapa en la que se obtenga un buen grado de lignificación de la planta y una adaptación a las condiciones xerofíticas del ambiente. Este sistema se sigue con objeto de obtener una adaptación progresiva y completa del material propagado y cada etapa dura aproximadamente un mes.

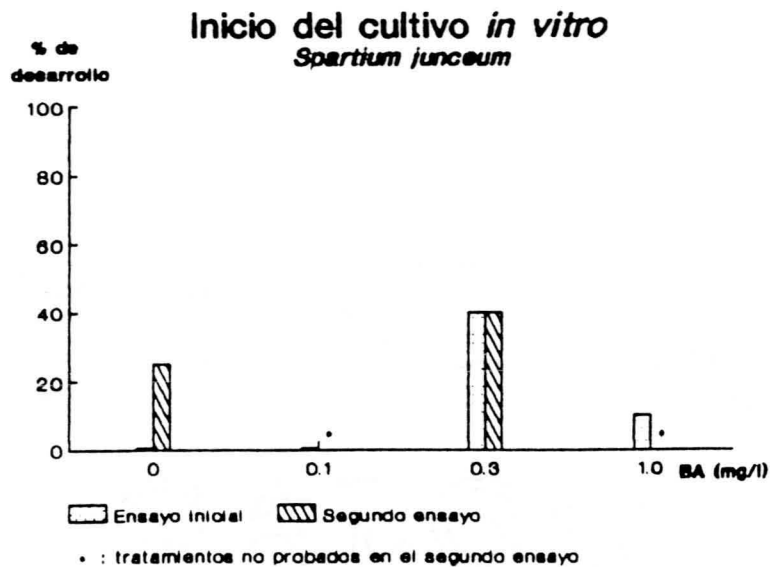
Algunas de las etapas iniciales se han podido acortar e incluso eliminar y en su lugar se ha probado la inoculación con microorganismos simbióticos radiculares en condiciones axénicas (*Rhizobium* y HMVA). En el caso de *Rhizobium*, se ha conseguido nodular plantas procedentes directamente de la fase de enraizamiento, en la que se ha podido evaluar la actividad nitrogenasa. Respecto a HMVA, se han utilizado en la etapa de invernadero contribuyendo a una mejor y más rápida aclimatación.

Las plantas que se aclimataron se sometieron a distintos tratamientos, según que estas estuvieran enraizadas, o simplemente fueran tallos. Las plantas enraizadas pasaron a macetas con sustrato de suelo : arena (5:2, v:v) inoculadas con *G. fasciculatum* o *Glomus sp.*. Se encontró que las de *A. cytisoides* responden muy satisfactoriamente a la aclimatación, con una supervivencia del 100%. En las de *S. junceum* si bien hay inicialmente, más problemas de supervivencia muestran después respuesta a la inoculación (Tabla 12).

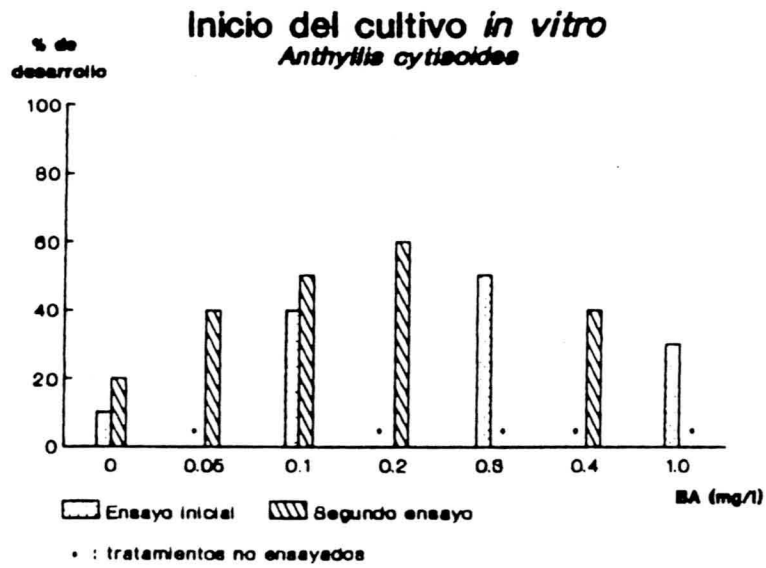
Las plantas que iniciaban la fase de aclimatación sin raíz se dividieron en dos lotes: Un control, y un tratamiento, durante 15 segundos, en solución de IBA (100 mg/l), pH 6-6.5, Estos tallos apicales, de 2 cm de longitud, se aclimataron en frascos en un sustrato con 50% de turba negra y 50% de perlita. La supervivencia, se controló cada 4 semanas, hasta población estable, lo cual ocurrió a las 4 meses, después de los cuales, el resultado final es el que se observa en la Tabla 13.



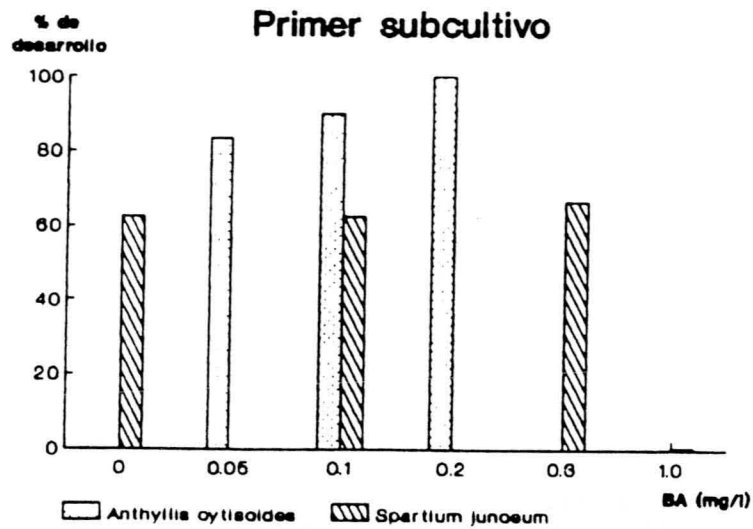
Gráfica 8. Acción de la giberelina sobre la germinación de *Spartium junceum*.



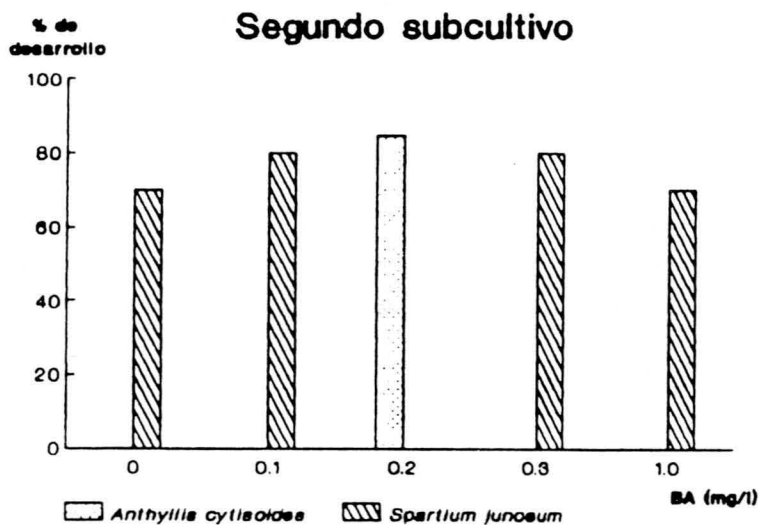
Gráfica 9. Desarrollo del cultivo inicial de *S. junceum*



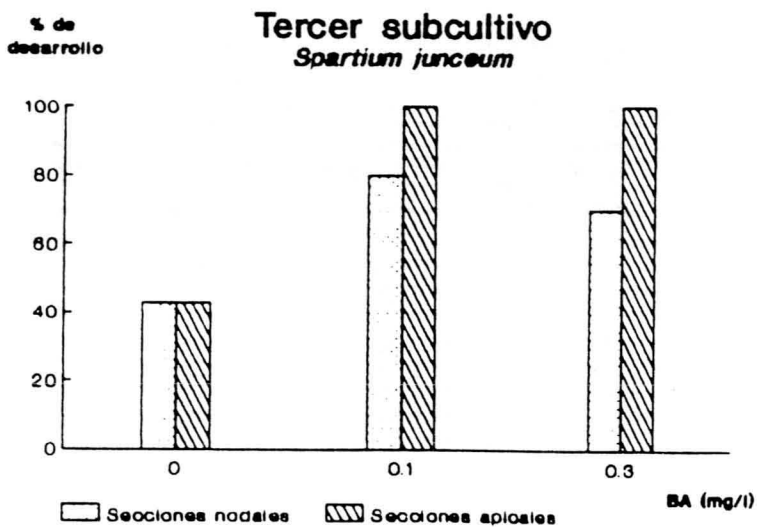
Gráfica 10. Desarrollo del cultivo inicial en *A. cytisoides*



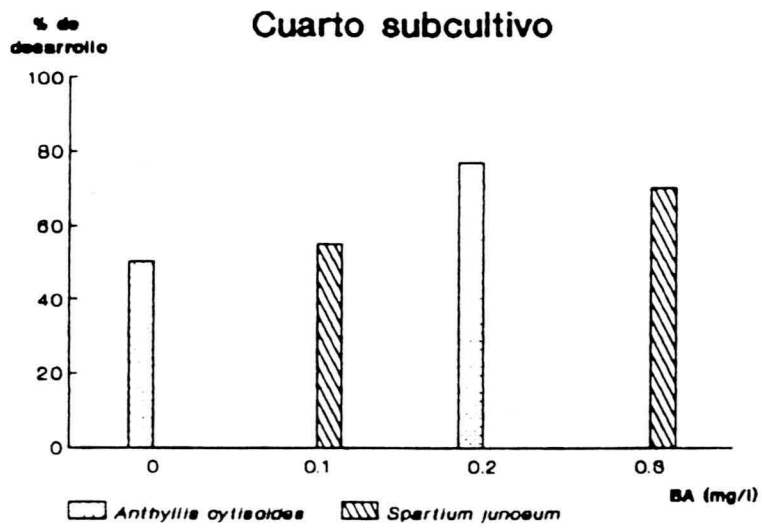
Gráfica 11. Primer subcultivo de *S. junceum* y *A. cytisoides*



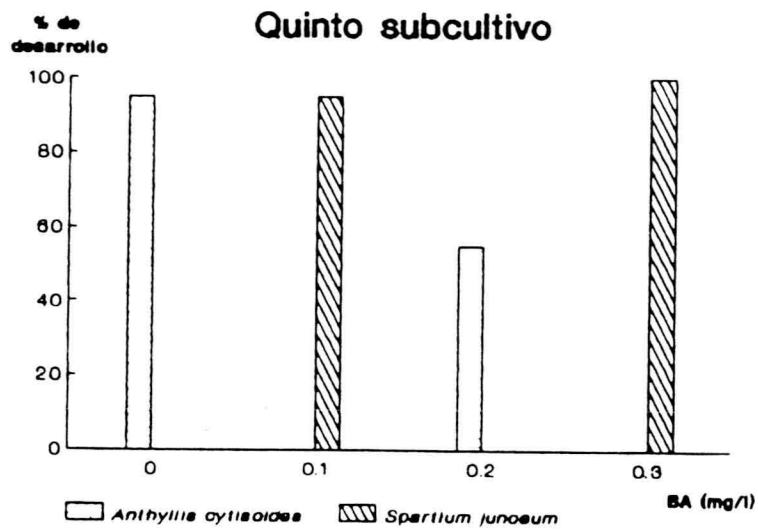
Gráfica 12. Efecto de la BA en el segundo subcultivo de *S. junceum* y *A. cytisoides*



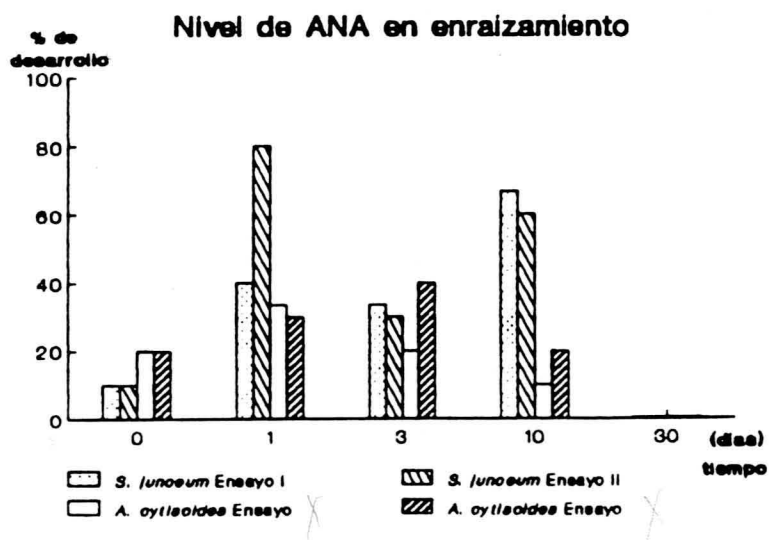
Gráfica 13. Tercer subcultivo en *S. junceum*



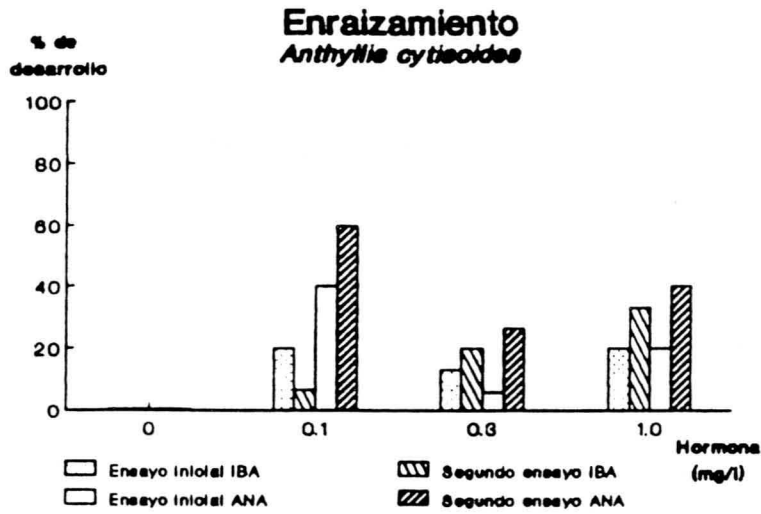
Gráfica 14. Cuarto subcultivo de *A. cytisoides* y *S. junceum*



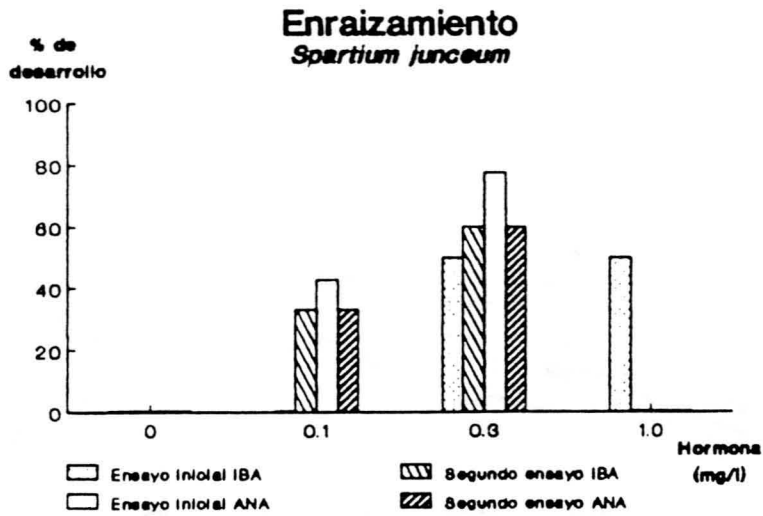
Gráfica 15. Quinto subcultivo de *A. cytisoides* y *S. junceum*



Gráfica 16. Efecto de la auxina ANA sobre el enraizamiento de *S. junceum* y *A. cytisoides*.



Gráfica 17. Efecto hormonal sobre el enraizamiento de *A. cytisoides*



Gráfica 18. Efecto hormonal sobre el enraizamiento de *S. junceum*



Tabla 12. Aclimatación de *A. cytisoides* y *S. junceum* en macetas.

	% S.T.	%S.I.	%S.N.I.
<i>A. cytisoides</i>	100% X	100% X	100% X
<i>S. junceum</i>	75% X	100% X	50% X

S.T. es supervivencia total, S. I. es supervivencia en plantas inoculadas con HMVA y S.N.I. supervivencia de plantas no inoculadas.

Tabla 13 Aclimatación de tallos de *A. cytisoides* y *Spartium*.

	Tratamiento	Supervivencia (%)
<i>A. cytisoides</i>	IBA	26%
	Control	11%
<i>S. junceum</i>	IBA	70%
	Control	42%



Foto.2.- Aspecto del enraizamiento "in vitro" de plantas de *S. junceum* con ANA.

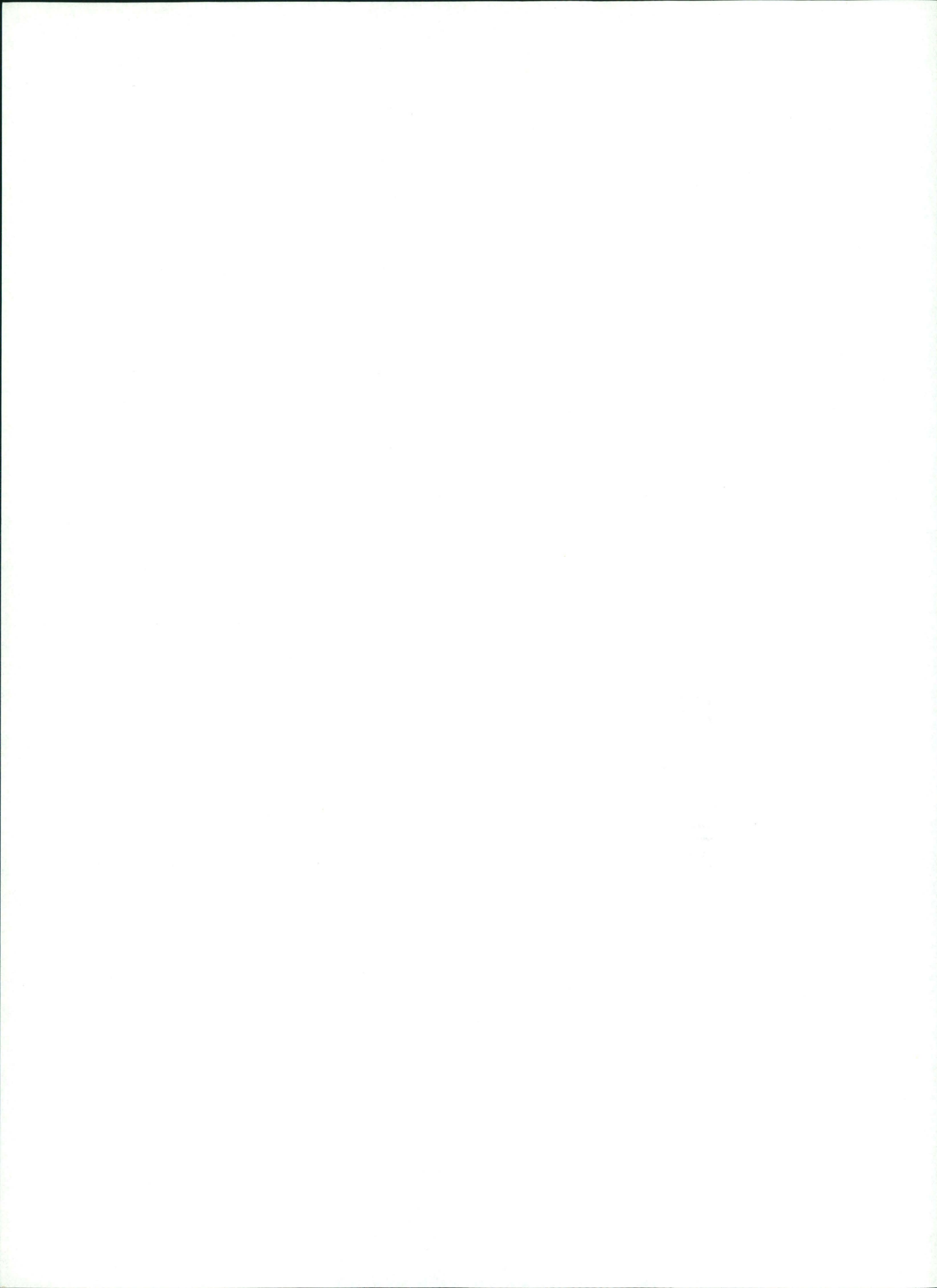




Foto.3.- Aspecto del enraizamiento "in vitro" de plantas de *S. junceum* con IBA.

© 1980  
WIMMER & HILF

## 10. Incidencia de la micorrización en parámetros fisiológicos de la planta

De acuerdo a los resultados obtenidos previamente, en los que se encontró que: (a) Los endofitos de MVA no eran muy abundantes en el suelo de "launa"; (b) bajos niveles de micorrización en las plantas seleccionadas; y (c) que las razas de *Rhizobium*, existentes en la zona a pesar de ser infectivas, no eran muy efectivas, sugirieron diseñar un ensayo de inoculación, en condiciones controladas, con HMVA de colección utilizando suelo de "launa" del sector de Lanjaron.

El diseño para cada especie fué:

Con *Rhizobium* sp.: *Glomus* sp. (B)

*G. fasciculatum*

*G. mosseae*

Inóculo natural

Suelo estéril

sin *Rhizobium* :

PO<sub>4</sub>

Micorriza

Suelo estéril

En cada tratamiento, con 5 repeticiones, se usó como inóculo de *Rhizobium* el aislado de los hospedantes homólogos, con excepción de *M. arborea* en la que se usó además inóculo de colección (*Rhizobium meliloti* GR4B). Los resultados de este experimento, que se evaluó a los 6 meses, sugieren, que en *S. junceum* la mejor combinación esta dada por una inoculación mixta de *G. fasciculatum* más *Rhizobium* sp. GRH16, produciendo esta doble simbiosis mejores efectos sobre el crecimiento de la planta que incluso los ejercidos por una fertilización fosforada muy rica como puede verse en la Gráfica 19.

El efecto de la doble inoculación sobre la biomasa de *M. arborea*, pone de manifiesto que *G. mosseae* inoculado junto con *R. meliloti* GR4B, es la combinación que produce mayor desarrollo. En todos los casos, la doble inoculación mejora el crecimiento de la planta respecto de un

1871  
1872  
1873  
1874  
1875  
1876  
1877  
1878  
1879  
1880  
1881  
1882  
1883  
1884  
1885  
1886  
1887  
1888  
1889  
1890  
1891  
1892  
1893  
1894  
1895  
1896  
1897  
1898  
1899  
1900

## 10. Incidencia de la micorrización en parámetros fisiológicos de la planta

De acuerdo a los resultados obtenidos previamente, en los que se encontró que: (a) Los endofitos de MVA no eran muy abundantes en el suelo de "launa"; (b) bajos niveles de micorrización en las plantas seleccionadas; y (c) que las razas de *Rhizobium*, existentes en la zona a pesar de ser infectivas, no eran muy efectivas, sugirieron diseñar un ensayo de inoculación, en condiciones controladas, con HMVA de colección utilizando suelo de "launa" del sector de Lanjaron.

El diseño para cada especie fué:

Con <i>Rhizobium</i> sp.:	<i>Glomus</i> sp. (B)
	<i>G. fasciculatum</i>
	<i>G. mosseae</i>
	Inóculo natural
	Suelo estéril
sin <i>Rhizobium</i> :	PO <sub>4</sub>
	Micorriza <i>X</i> <i>real</i>
	Suelo estéril

En cada tratamiento, con 5 repeticiones, se usó como inóculo de *Rhizobium* el aislado de los hospedantes homólogos, con excepción de *M. arborea* en la que se usó además inóculo de colección (*Rhizobium meliloti* GR4B). Los resultados de este experimento, que se evaluó a los 6 meses, sugieren, que en *S. junceum* la mejor combinación esta dada por una inoculación mixta de *G. fasciculatum* más *Rhizobium* sp. GRH16, produciendo esta doble simbiosis mejores efectos sobre el crecimiento de la planta que incluso los ejercidos por una fertilización fosforada muy rica como puede verse en la Gráfica 19.

El efecto de la doble inoculación sobre la biomasa de *M. arborea*, pone de manifiesto que *G. mosseae* inoculado junto con *R. meliloti* GR4B, es la combinación que produce mayor desarrollo. En todos los casos, la doble inoculación mejora el crecimiento de la planta respecto de un



patrón bien fertilizado, pudiendo observarse (Gráfica 20) que la presencia de micorriza (todas las especies ensayadas) mejora el efecto sobre el crecimiento de las plantas producidas por las distintas razas de *Rhizobium* inoculadas (*Rhizobium* GRH13 y *R. meliloti* GR4B). También puede verse que la acción ejercida por la micorriza sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas es mejorada por la presencia de *Rhizobium*, ya se trate de la raza de colección o la aislada de la zona de estudio (Lanjarón).

En *Robinia pseudoacacia*, al considerar aisladamente el efecto sobre el desarrollo de parte aérea y raíz que ejerce la inoculación, ya sea por separado o conjunta de *Rhizobium* y HMVA puede verse que, en ambos casos, la presencia de microorganismos aumenta la producción de biomasa. El hongo formador de micorrizas que induce más desarrollo en presencia de *Rhizobium* GRH11 es *Glomus mosseae*; esta combinación resulta más efectiva que las otras, sobre todo en lo que a producción de parte aérea se refiere (Gráfica 21).

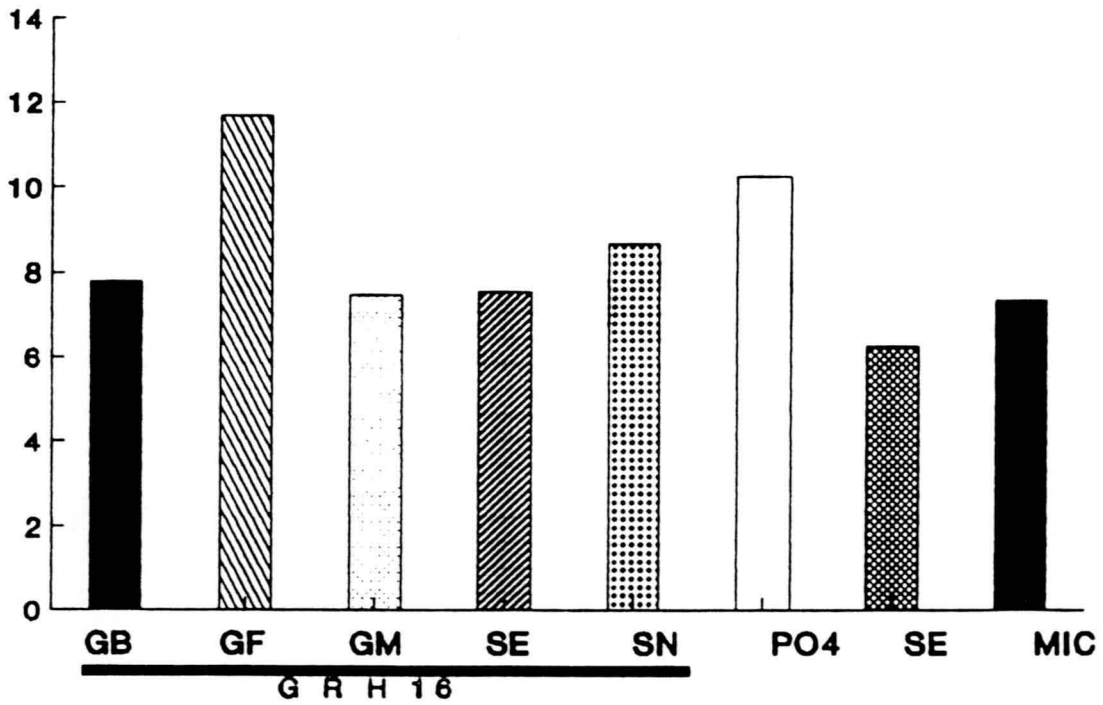
En lo que a crecimiento radical se refiere, el efecto de la inoculación individual de HMVA sin *Rhizobium* es similar al ejercicio por fosfato. La doble inoculación dobla el efecto de la fertilización química como puede verse en la Gráfica 22.

Cuando se compara el crecimiento producido por distintos inoculantes en *Anthyllis cytisoides*, es de destacar que todos los tratamientos con microorganismos incrementan el desarrollo de la planta respecto de cuando ésta crece sola.

El inóculo recomendado para *A. cytisoides* es *Glomus* sp. (B), más *Rhizobium* sp. GRH17. Con esta combinación, además del crecimiento que induce, se logra un mejor reparto de fitomasa que se manifiesta en el mayor peso de la parte aérea respecto al de la raíz en las plantas inoculadas frente a aquéllas sin inocular o con fertilización química (Gráfica 23).

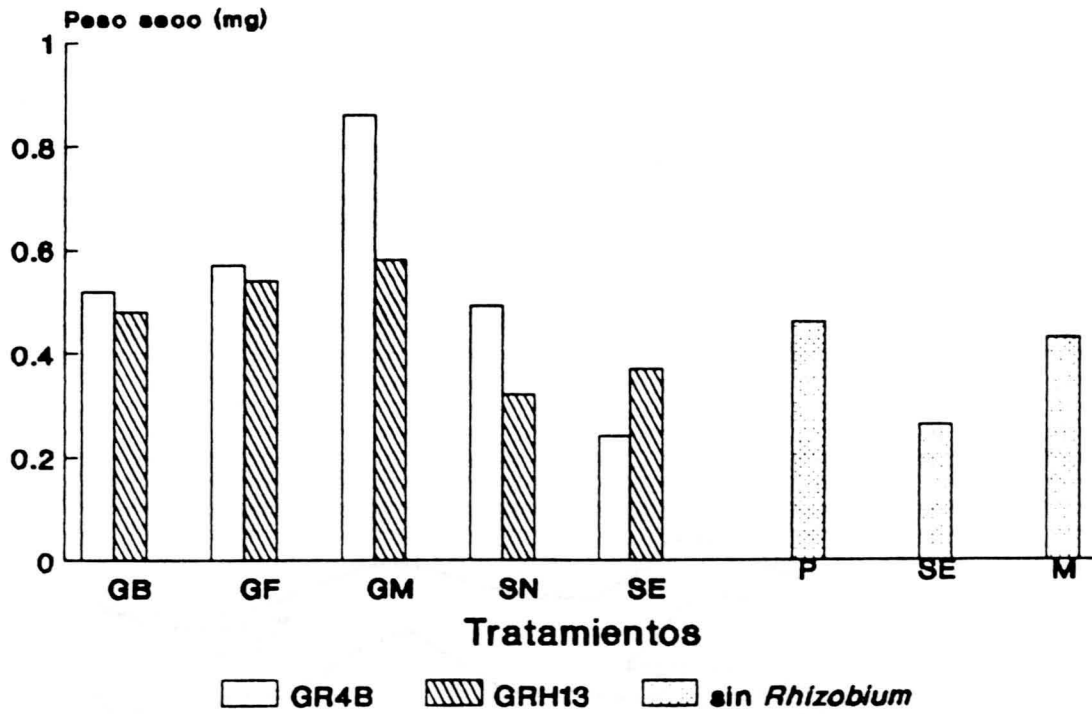
peso seco  
(g)

*Spartium junceum*



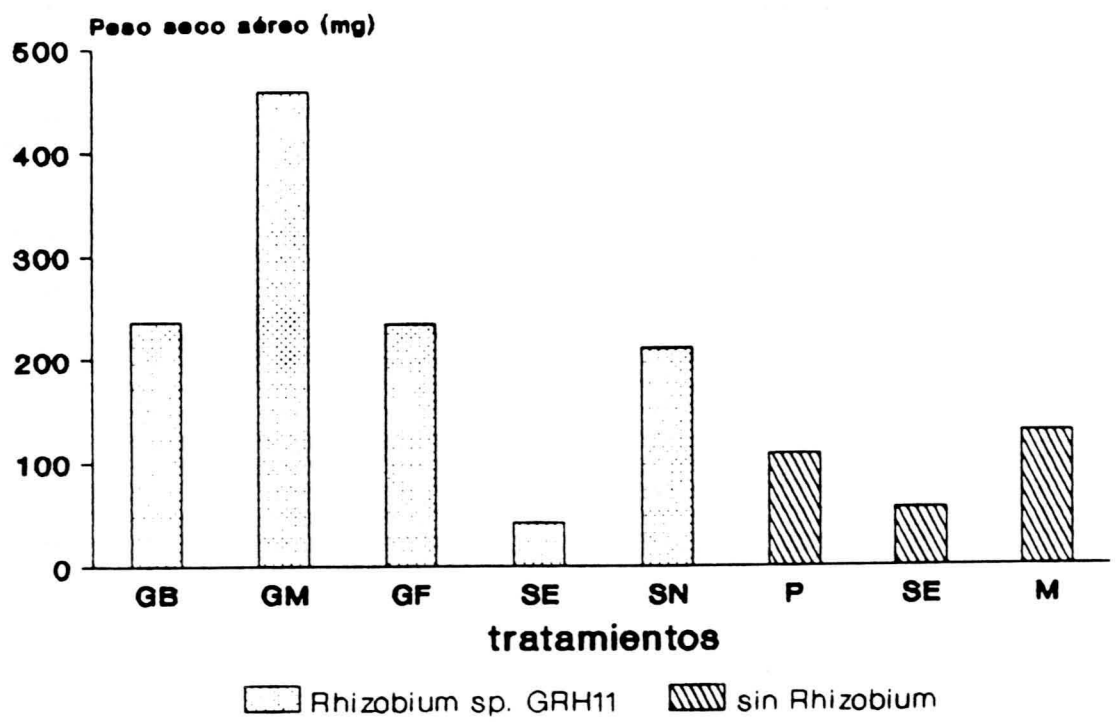
Gráfica 19. Efecto de distintas combinaciones de inoculantes sobre el crecimiento de *S. junceum*

*Medicago arborea*



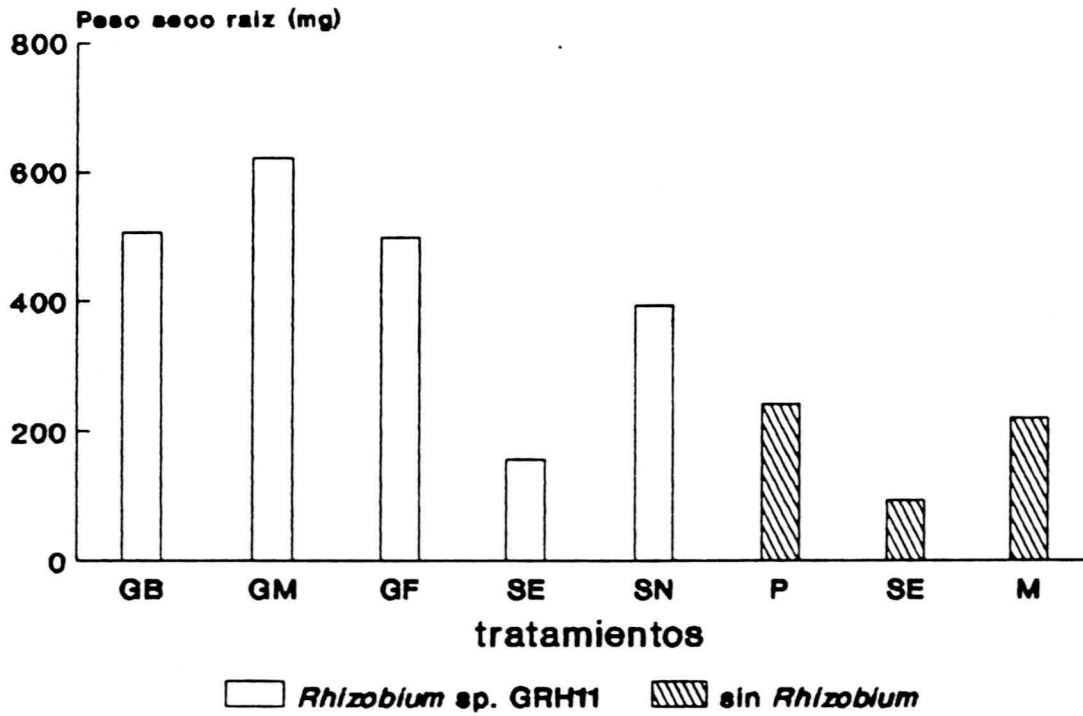
Gráfica 20. Efecto de distintas combinaciones de *Rhizobium* y micorriza sobre el crecimiento de *M. arborea*

*Robinia pseudoacacia*



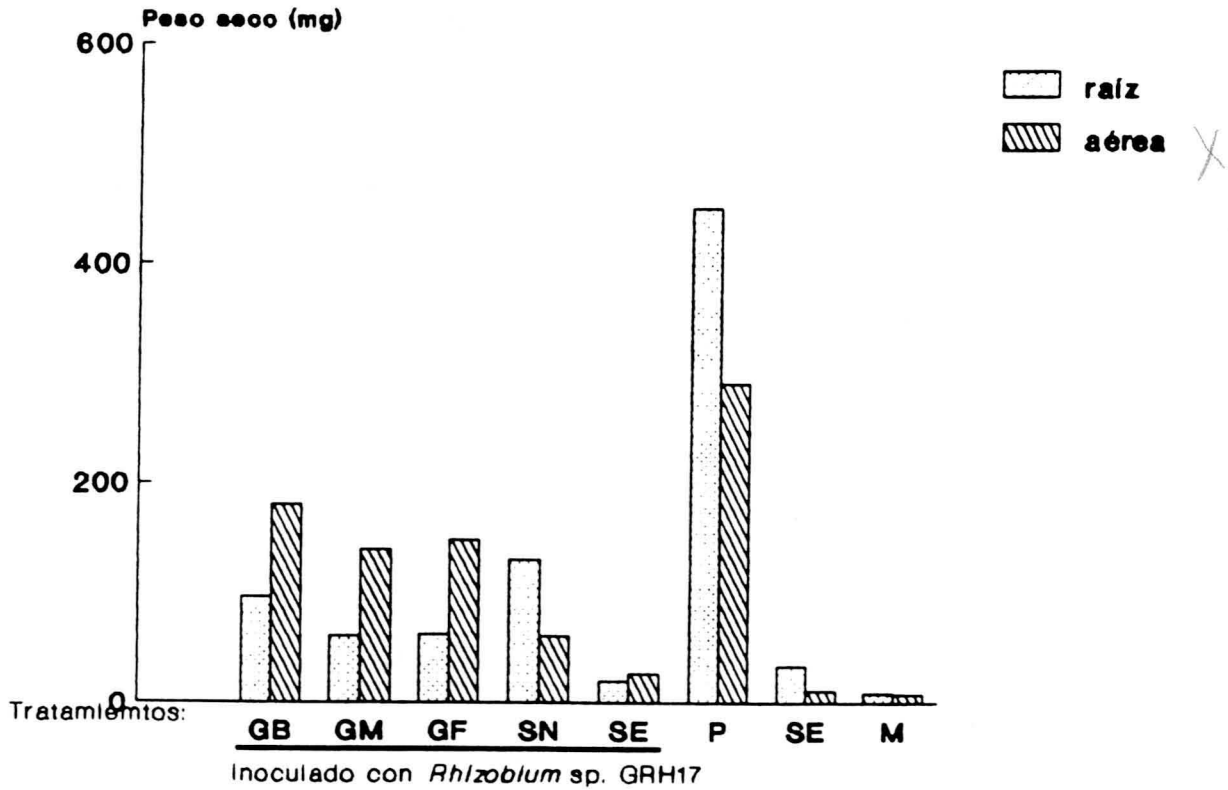
Gráfica 21. Efecto de distintos tratamientos de inoculaciones sobre el crecimiento de la parte aérea de *R. pseudoacacia*.

*Robinia pseudoacacia*



Gráfica 22. Efecto de distintos tratamientos de inoculación sobre el crecimiento de la raíz en *R. pseudoacacia*.

*Anthyllis cytisoides*



Gráfica 23. Efecto comparativo de la parte aérea y de la raíz radical producido por distintos inoculantes de *Anthyllis cytisoides*.

**11. Estudios sobre la doble simbiosis *Rhizobium*-MVA en leguminosas leñosas, utilizando trazadores isotópicos**

Se ha trabajado con *Spartium junceum* y *Robinia pseudoacacia* en condiciones controladas de invernadero. Las plantas fueron cultivadas en macetas con suelo "calcareo" y tratados con sulfato amónico, que contenían con un exceso atómico del 10% de N<sup>15</sup>. Cada ensayo se mantuvo en invernadero 4 meses con adición de agua, manteniendo la capacidad de campo del suelo al 80%. Para *Spartium junceum*, los datos de producción de biomasa, porcentaje de colonización MVA y fijación de N<sub>2</sub>, medida como reducción de acetileno, aparecen en la Tabla 14. 15

Estos análisis ponen de manifiesto el efecto que los inoculantes ejercen sobre el crecimiento y nutrición de esta planta. Todas las combinaciones de inoculación aplicadas aumentan la producción de biomasa en *Spartium* tanto a nivel de raíz como parte aérea. Es de señalar que los tratamientos que produjeron mas biomasa también incrementaron la concentración de P en los tejidos de la planta. Evidentemente es un efecto de la inoculación de microsimbiontes (Tabla 14).

La medida de la fijación de N mediante la técnica de la reducción de acetileno (Tabla 15), indica que *Rhizobium* sp. GRH16 es el mas efectivo. Sin embargo, el contenido de nitrógeno en plantas inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. (Vigna) 3824 (Tabla 14), es mayor. Ello evidencia que el dato instantáneo comparativo que proporciona dicha técnica no es apropiado. La medida de FBN mediante N<sup>15</sup> es, en cambio de gran utilidad. X

En el caso de *Robinia pseudoacacia*, los valores de producción de biomasa y de concentración de N, así como la fuente de procedencia del nutriente, en parte aérea se muestran en la Tabla 16. X

Tabla 14.- Efectos de la inoculación sobre el crecimiento y concentración de nutrientes en la parte aérea de plantas de *S. junceum*

	PSR (mg)	PSA (mg)	N (%)	P (%)	K (%)
CONTROL	64 <sup>c</sup>	104 <sup>b</sup>	2.12 <sup>a</sup>	0.05 <sup>b</sup>	0.96 <sup>a</sup>
GRH16+GF	216 <sup>b</sup>	492 <sup>a</sup>	1.89 <sup>a</sup>	0.11 <sup>ab</sup>	0.99 <sup>a</sup>
RH16+Sc	136 <sup>b</sup>	500 <sup>a</sup>	2.34 <sup>a</sup>	0.15 <sup>a</sup>	0.93 <sup>a</sup>
3824+GF	516 <sup>a</sup>	410 <sup>a</sup>	2.16 <sup>a</sup>	0.15 <sup>a</sup>	1.13 <sup>a</sup>
3824+Sc	180 <sup>b</sup>	498 <sup>a</sup>	2.38 <sup>a</sup>	0.15 <sup>a</sup>	0.83 <sup>a</sup>

GRH16 = *Rhizobium* sp., aislado de *S. junceum*; 3824 = *Bradyrhizobium* sp (Vigna). Hongos formadores de MVA: GF = *Glomus fasciculatum* y Sc = *Scutellospora persica*.  
Nota: tratamiento estadístico y resto de abreviaturas igual que en la Tabla 5.

Tabla 15.- Medida de parámetros simbióticos MVA y fijación de nitrógeno.

	MVA (%)	Fijación de N	
		Nasa	%NpdFij
Tratamientos			
CONTROL	-	-	-
GRH16+GF	34.88 <sup>b</sup>	29.42 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup> X
GRH16+Sc	33.46 <sup>b</sup>	103.88 <sup>a</sup>	51 <sup>a</sup> X
3824+GF	3.36 <sup>b</sup> X	42.30 <sup>b</sup>	2 <sup>c</sup> X
3824+Sc	49.56 <sup>a</sup>	58.76 <sup>ab</sup>	40 <sup>b</sup> X

Tratamiento estadístico y abreviaturas igual que en Tabla 5 y 14 respectivamente.



Tabla 16. Producción de biomasa, concentración de N (%), fijación de N (% NpdFij) en plantas de *Robinia pseudoacacia* sometidos a diferentes tratamientos de inoculación.

	PSA(mg)	%N	% NpdFij
R+GF	.74 <sub>a</sub>	2.70 <sub>c</sub>	22.93 <sub>b</sub>
R+GB	.64 <sub>a</sub>	3.73 <sub>a</sub>	4.70 <sub>c</sub>
R+GM	.54 <sub>a</sub>	2.44 <sub>c</sub>	38.10 <sub>a</sub>
Control	.54 <sub>a</sub>	3.05 <sub>b</sub>	-

R = *Rhizobium* GRH13, aislado de *Robinia pseudoacacia*; GF, GB y GM = inoculación con los hongos formadores de MVA, *Glomus fasciculatum*, *Glomus* sp (B) y *Glomus mosseae*, respectivamente.

Tratamiento estadístico igual que en Tabla 5.

## 12.- Transporte de nutrientes

En este tipo de ensayo resulta determinante la densidad de siembra, que permita análisis comparativos para poder establecer conclusiones partiendo de biomazas comparables. Por ello se hizo crecer una planta de *S. junceum* junto a dos de *Dittrichia viscosa* (cultivo mixto) y una de *S. junceum* y cuatro de *D. viscosa* en cultivo monoespecífico.

Las soluciones nutritivas que se aportan a las plantas a lo largo de su desarrollo, trataban de compensar el efecto de los microsimbiontes, a efectos comparativos. Se usó solución nutritiva de Hewitt, (con un décimo de fósforo); sin N, cuando las plantas se inoculaban con *Rhizobium*; sin P adicional, cuando se micorrizaba; y sin N ni P adicional, si llevaban ambos inoculantes. Los controles no inoculados se regaron con solución de Hewitt completa. X

El contenido de N en parte aérea de *S. junceum* inoculado con *Rhizobium* no se afecta por la presencia de *D. viscosa* (Tabla 17).

En cuanto a *D. viscosa*, como se dijo anteriormente, los mayores contenidos de N se consiguen cuando ésta crece en la misma maceta, con *S. junceum* inoculado con *Rhizobium*, o en plantas micorrizadas compensadas con N.

La inoculación de *Rhizobium* incrementó la producción de biomasa (especialmente en parte aérea) en *Spartium junceum*. La micorrización favoreció el desarrollo de parte aérea y raíz de *D. viscosa* (Tabla 17).

Para comprobar el posible paso de N desde la leguminosa a la no leguminosa, vía hongo, basado en la posibilidad de que *S. junceum* exude al medio compuestos nitrogenados, que el hongo capta y transfiere, posteriormente, a la planta no leguminosa asociada, se diseñó un ensayo apropiado; así se midió el N que procede de FBN en plantas noduladas de *Spartium junceum*, en el medio de crecimiento, inicialmente, libre de N. También se midió en el medio de crecimiento la cantidad de ureidos, para

determinar si el exudado se realiza bajo esta forma. Los datos de estas medidas muestran que el medio se enriqueció en 0,17% de nitrógeno y que había 7,93 mol/ml de ureidos.

Tabla 17.- Medidas de biomasa, micorrización y contenido de N.

Inóculo	Plantas	PSA (mg)	PSR (mg)	N (mg/planta)
R+MVA	<i>S. junceum</i>	101 <sub>b</sub>	34 <sub>a</sub>	1.16 <sub>b</sub>
	<i>D. viscosa</i>	83 <sub>a</sub>	53 <sub>b</sub>	0.85 <sub>a</sub>
R	<i>S. junceum</i>	101 <sub>b</sub>	48 <sub>a</sub>	1.65 <sub>a</sub>
	<i>D. viscosa</i>	30 <sub>b</sub>	30 <sub>c</sub>	0.33 <sub>b</sub>
NI	<i>S. junceum</i>	105 <sub>b</sub>	44 <sub>a</sub>	1.19 <sub>b</sub>
	<i>D. viscosa</i>	60 <sub>ab</sub>	60 <sub>a</sub>	0.60 <sub>ab</sub>
R	<i>S. junceum</i>	141 <sub>a</sub>	54 <sub>a</sub>	1.65 <sub>a</sub>
MVA	<i>D. viscosa</i>	42 <sub>b</sub>	27 <sub>c</sub>	0.44 <sub>b</sub>

R = *Rhizobium*, NI = no inoculado, PSA = peso seco de la parte aérea. Los datos que se muestran están ajustados a densidad de siembra.

Tratamientos estadístico igual que en la Tabla 5.

### 13. Doble colonización por microsimbiontes en leguminosas leñosas

Se ha podido comprobar la coexistencia de los dos microsimbiontes: *Rhizobium* y hongo formador de MVA, en los nódulos (Foto. 4).

Para determinar como se manifiesta la presencia previa de un inoculante sobre la colonización posterior del otro; se llevaron a cabo una serie de ensayos apropiados. En ellos se evaluó la incidencia del orden y tiempo de inoculación, los efectos de la aplicación los inoculantes simultáneamente o por separado, y la evolución de los tratamientos a lo largo del tiempo, mediante un control trimestral de los mismos.

En la Tabla 18 se puede observar que cuando se inocula primero *G. fasciculatum* no se produce nodulación por GRH16, aunque se ve un aumento significativo en el peso seco de la parte aérea de la planta. En el caso de *Bradyrhizobium* sp. (Vigna) 3824 hay un buen desarrollo de nódulos y de la parte aérea, tanto cuando se inocula primero *G. fasciculatum* como si se inoculan ambos simultáneamente.

La respuesta de *Spartium junceum*, a la doble inoculación, a los 6 meses de realizada ésta, se muestran en la Tabla 20. Cuando se inoculan con *Rhizobium* sp. GRH16 y simultáneamente con *G. fasciculatum* se obtuvieron los mayores valores de peso seco de la parte aérea, aunque la mayor actividad nitrogenasa corresponde a las plantas no micorrizadas, inoculadas inicialmente con *Rhizobium* sp. GRH16. Estos resultados son semejantes a los que se encontraron a los nueve meses de crecimiento (Tabla 22). La inoculación inicial con *Bradyrhizobium* sp. (Vigna) 3824 produjo mayores valores de fijación de N, a los seis meses, aunque esto no se refleja en un mejor estado de la planta, si bien, se encontró que en plantas inoculadas previamente con *G. fasciculatum* hay mayor desarrollo de la parte radical. A los 9 meses (Tabla 22) se aprecian diferencias significativas en el desarrollo de las plantas que se inocularon primero con *G. fasciculatum*.

Si se compara el desarrollo de las plantas inoculadas, *Bradyrhizobium* sp. (Vigna) 3824 fue más efectivo que *Rhizobium* sp. GRH16, sobre todo en lo referente a la parte aérea de plantas inoculadas previamente con *G. fasciculatum*.

La concentración de N, P y K en la parte aérea de *S. junceum*, determinada a los 3, 6 y 9 meses de crecimiento se muestra en las Tablas 19, 21 y 23.

La concentración de N, P y K en la parte aérea de *S. junceum*, determinada a los 3, 6 y 9 meses de crecimiento se muestra en las Tablas 19, 21 y 23.

repetidos } no

Tabla 18. Primera evaluación del efecto de la doble simbiosis en *Spartium junceum* a los tres meses.

Inóculo	PSA (g)	PSR (g)	MVA (%)	Nº Nod
1º GF 2º GRH16	0.116 <sub>a</sub>	0.120 <sub>a</sub>	24.30 <sub>a</sub>	0 <sub>a</sub>
1º GRH16 2º GF	0.072 <sub>b</sub>	0.120 <sub>a</sub>	14.82 <sub>b</sub>	2 <sub>a</sub>
GF+GRH16	0.088 <sub>b</sub>	0.086 <sub>b</sub>	11.56 <sub>b</sub>	0 <sub>a</sub>
1º GF 2º 3824	0.120 <sub>a</sub>	0.104 <sub>a</sub>	22.44 <sub>a</sub>	9.2 <sub>a</sub>
1º 3824 2º GF	0.062 <sub>b</sub>	0.048 <sub>c</sub>	15.12 <sub>b</sub>	8 <sub>a</sub>
GF+3824	0.123 <sub>a</sub>	0.075 <sub>b</sub>	20.74 <sub>a</sub>	9.8 <sub>a</sub>

GF = *Glomus fasciculatum* y las bacterias noduladas GRH16 y 3824 son la aislada de *S. junceum* y *Bradyrhizobium* sp (Vigna)3824 respectivamente. 1º y 2º hace referencia al orden de inoculación (30 días de separación). PSA y PSR hace referencia al peso seco de la parte aérea y de la raíz. La colonización del hongo micorrícico se expresa como %MVA y el número de nódulos formado por la bacteria simbiótica es Nº Nod.

Nota: Tratamiento estadístico igual que la Tabla 5.

Tabla 19. Concentración de N, P y K en la parte aérea de *S. junceum*, a los tres meses de crecimiento.

	N%	P%	K%
1 <sup>o</sup> GF 2 <sup>o</sup> GRH16	1.59 <sub>b</sub>	0.07 <sub>a</sub>	1.75 <sub>b</sub>
1 <sup>o</sup> GRH16 2 <sup>o</sup> GF	1.42 <sub>b</sub>	0.05 <sub>b</sub>	1.59 <sub>c</sub>
GF+GRH16	1.93 <sub>a</sub>	0.09 <sub>a</sub>	2.17 <sub>a</sub>
1 <sup>o</sup> GF 2 <sup>o</sup> 3824	2.23 <sub>a</sub>	0.10 <sub>a</sub>	2.52 <sub>a</sub>
1 <sup>o</sup> 3824 2 <sup>o</sup> GF	2.33 <sub>a</sub>	0.04 <sub>b</sub>	1.66 <sub>c</sub>
GF+3824	2.09 <sub>b</sub>	0.07 <sub>a</sub>	2.07 <sub>b</sub>

Nota: Tratamiento estadístico y abreviaturas igual Tabla 18.



Tabla 20. Segunda evaluación de los efectos de la doble simbiosis en *S. junceum*, a los seis meses.

Inóculo	PSA (g)	PSR (g)	MVA (%)	NONod	Nasa
1 <sup>o</sup> GF 2 <sup>o</sup> GRH16	0.36 <sub>b</sub>	0.28 <sub>a</sub>	22.30 <sub>a</sub>	2 <sub>b</sub>	0 <sub>c</sub>
1 <sup>o</sup> GRH16 2 <sup>o</sup> GF	0.19 <sub>c</sub>	0.15 <sub>c</sub>	11.21 <sub>c</sub>	2 <sub>b</sub>	0.356 <sub>a</sub>
GF+GR16	0.45 <sub>a</sub>	0.20 <sub>b</sub>	15.31 <sub>b</sub>	7 <sub>a</sub>	0.119 <sub>b</sub>
1 <sup>o</sup> GF 2 <sup>o</sup> 3824	0.57 <sub>a</sub>	0.30 <sub>a</sub>	20.04 <sub>b</sub>	16 <sub>a</sub>	0.267 <sub>c</sub>
1 <sup>o</sup> 3824 2 <sup>o</sup> GF	0.45 <sub>b</sub>	0.24 <sub>b</sub>	14.17 <sub>c</sub>	18 <sub>a</sub>	0.623 <sub>a</sub>
GF+3824	0.46 <sub>b</sub>	0.25 <sub>b</sub>	28.12 <sub>a</sub>	13 <sub>b</sub>	0.415 <sub>b</sub>

Nota: abreviaturas y tratamiento estadístico igual que Tabla 18.

Tabla 21. Concentración de N, P y K, en la parte aérea de *Spartium junceum* a los seis meses de crecimiento.

	N%	P%	K%
1º GF 2º GRH16	0.83 <sub>c</sub>	0.09 <sub>a</sub>	1.32 <sub>c</sub>
1º GRH16 2º GF	1.23 <sub>b</sub>	0.06 <sub>b</sub>	1.71 <sub>a</sub>
GF+GRH16	1.39 <sub>a</sub>	0.05 <sub>b</sub>	1.48 <sub>b</sub>
1º GF 2º 3824	1.25 <sub>c</sub>	0.05 <sub>a</sub>	1.68 <sub>a</sub>
1º 3824 2º GF	1.56 <sub>a</sub>	0.05 <sub>a</sub>	1.41 <sub>b</sub>
Gf+3824	1.38 <sub>b</sub>	0.05 <sub>a</sub>	1.44 <sub>b</sub>

Nota: Abreviaturas y tratamiento estadístico igual que en Tabla 18.

Tabla 22.- Tercera evaluación de los efectos de la doble simbiosis en *S. junceum* a los 9 meses de crecimiento.

	PSA (g)	PSR (g)	MVA (%)	NºNod	Nasa
1º GF 2º GRH16	0.49 <sub>a</sub>	0.44 <sub>a</sub>	16.24 <sub>a</sub>	1.2 <sub>c</sub>	0 <sub>b</sub>
1º GRH16 2º GF	0.38 <sub>c</sub>	0.36 <sub>b</sub>	12.80 <sub>b</sub>	7.8 <sub>a</sub>	0.82 <sub>a</sub>
GF+GRH16	0.51 <sub>a</sub>	0.43 <sub>a</sub>	13.28 <sub>a</sub>	4.2 <sub>b</sub>	0 <sub>b</sub>
1º GF 2º 3824	0.60 <sub>a</sub>	0.46 <sub>a</sub>	18.48 <sub>a</sub>	20 <sub>b</sub>	0.51 <sub>c</sub>
1º 3824 2º GF	0.46 <sub>b</sub>	0.40 <sub>b</sub>	11.60 <sub>b</sub>	28 <sub>a</sub>	1.86 <sub>a</sub>
GF+3824	0.55 <sub>a</sub>	0.40 <sub>b</sub>	16.14 <sub>a</sub>	24.8 <sub>b</sub>	1.30 <sub>b</sub>

Nota: Abreviaturas y tratamiento estadístico igual que en Tabla 18.

Tabla 23. Concentración de N, P y K, en la parte aérea de *Spartium junceum*, a los nueve meses de crecimiento

	N%	P%	K%
1º GF 2º GRH16	1.53 <sub>a</sub>	0.12 <sub>b</sub>	1.89 <sub>a</sub>
1º GRH16 2º GF	1.54 <sub>a</sub>	0.24 <sub>a</sub>	1.82 <sub>a</sub>
GF+GRH16	1.56 <sub>a</sub>	0.10 <sub>b</sub>	1.77 <sub>b</sub>
1º GF 2º 3824	1.29 <sub>b</sub>	0.05 <sub>a</sub>	1.53 <sub>a</sub>
1º 3824 2º GF	1.61 <sub>a</sub>	0.09 <sub>a</sub>	1.52 <sub>a</sub>
Gf+3824	1.56 <sub>a</sub>	0.08 <sub>a</sub>	1.38 <sub>b</sub>

Nota: Abreviaturas y tratamiento estadístico igual que en Tabla 18.

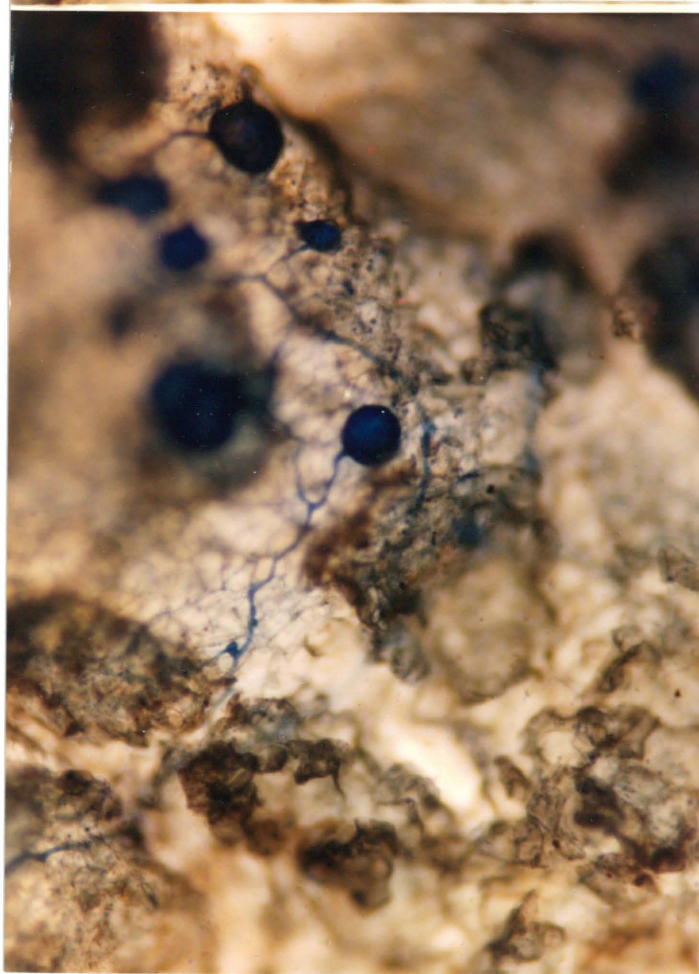


Foto.4.- Aspecto de la epidermis de un nódulo de *Bradyrhizobium* sp. (Vigna) 3824 formado en *S. junceum* micorrizada con *G. fasciculatum* (x125).



#### 14.- Determinación de ureidos (alantoato)

Los datos correspondientes se muestran en la Tabla 24. El primer hecho a destacar es que en esta leguminosa leñosa intervienen los ureidos como compuestos para el transporte de N procedente de la fijación. Como se aprecia el cultivo mixto provoca la presencia de ureidos en la planta no fijadora. Ello podría tomarse como un indicador de "transferencia de N". El cultivo mixto también incrementa la presencia de ureidos en la propia leguminosa.

Tabla 24. Contenido en ureidos (mmol de alantoato/g de peso fresco) en parte aérea de *Festuca rubra* (+MVA) y *Spartium junceum* (Brady + MVA).

Cultivo	<i>Festuca</i>	<i>Spartium</i>
mono	0 <sub>a</sub>	332 <sub>a</sub>
mixto	38 <sub>b</sub>	679 <sub>b</sub>

Nota: Para cada columna números seguidos de la misma letra no tienen diferencias estadísticamente significativas, según test de Duncan. SE=0.01.

Brady = *Bradyrhizobium* (sp) Vigna 3824

MVA = Micorrización



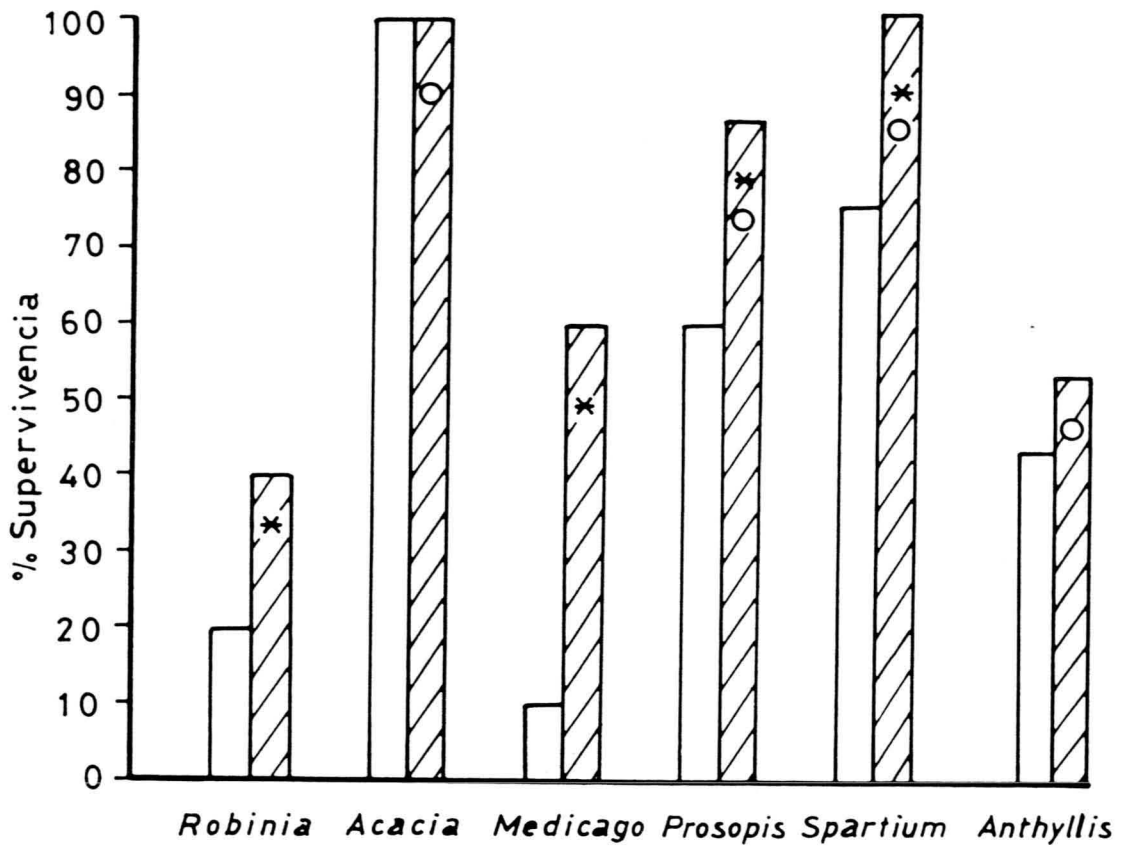
## **15. Establecimiento y supervivencia de la plantas en las "parcelas permanentes"**

En las Gráficas 24 y 25 se muestran los resultados de supervivencia y adaptación de las plantas llevadas a cabo, después de un periodo de cuatro meses desde que se instaló el ensayo, en los suelos de "launa" y "calcáreo", respectivamente.

Como puede observarse es manifiesto el efecto de la inoculación con los microsimbiontes previamente seleccionados. Hay que destacar que aunque no haya efectos sobre la supervivencia, en algunos casos pudo apreciarse un efecto beneficioso de la inoculación en cuanto a envergadura y vigor de la planta se refiere. Ello se manifiesta más claramente en la Gráfica 26. En la Foto. 5, se ofrece un modelo de la respuesta en campo de las plantas.

Efectos significativos (5%)

- \* Supervivencia
- Desarrollo vegetal
- Endofitos naturales
- ▨ " " + Inoculados



Gráfica 24.- Efecto de la inoculación a los 4 meses de transplante a campo (Suelo de "Launa")

Efectos significativos (5%)

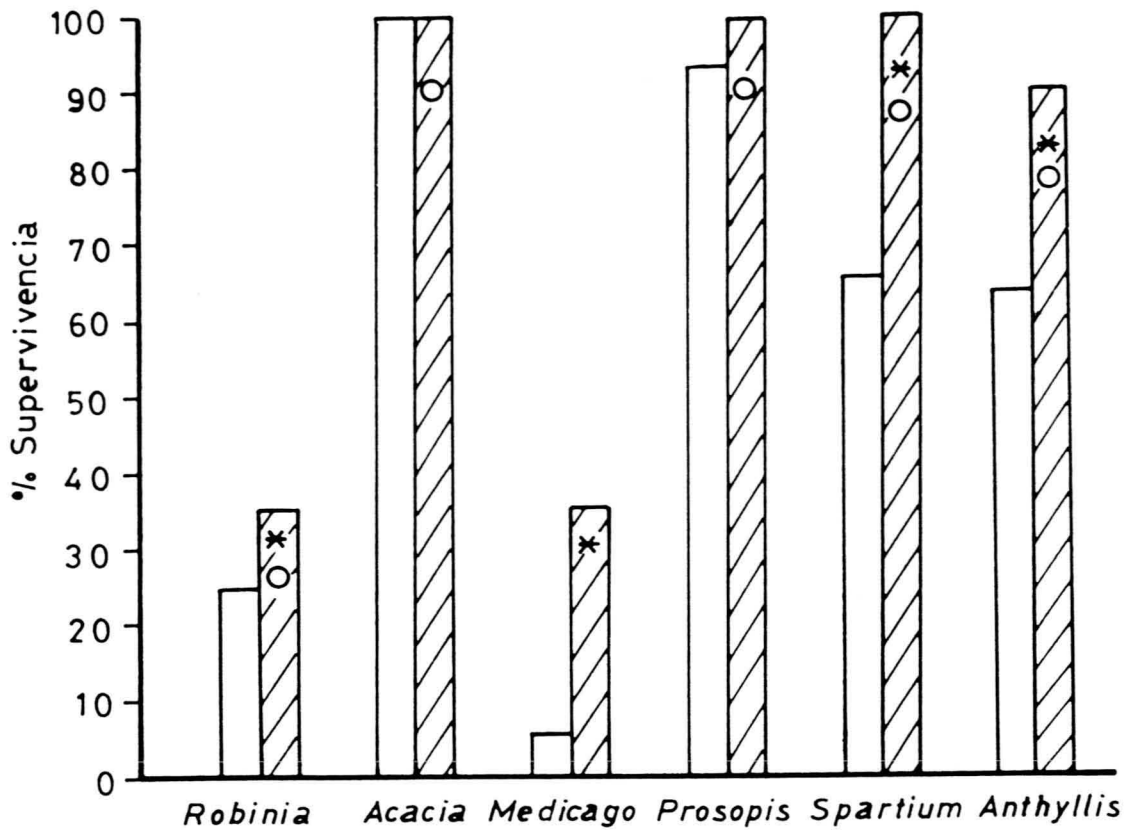
\* Supervivencia

○ Desarrollo vegetal

□ Endofitos naturales

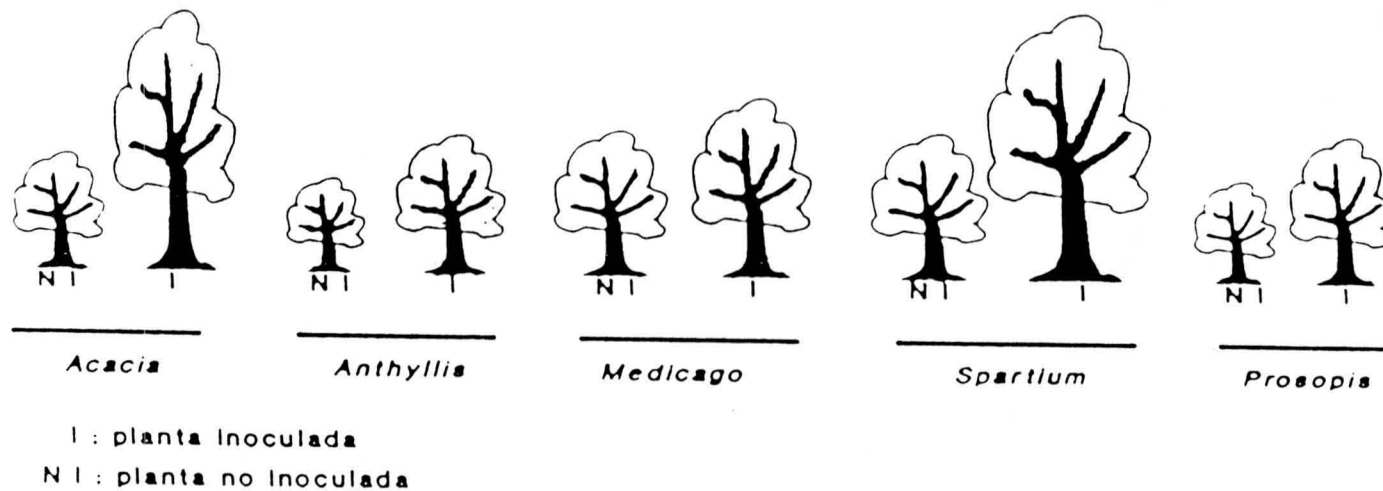
▨ " " " " " "

+ Inoculados



Gráfica 25.- Efecto de la inoculación a los 4 meses de transplante a campo (Suelo "calcáreo")

## Comparación relativa de tamaño



Gráfica 26. Comparación relativa de tamaño en plantas llevadas a campo.



Foto. 5.- Planta de *S. junceum* al año de llevada a campo. En la que se ve flor y fruto, demostrando la velocidad de crecimiento producida por la inoculación.

## DISCUSSION

## VI DISCUSION

Como se había previsto inicialmente, las condiciones de los suelos experimentales usados hacen de estos un soporte de baja fertilidad. Ello viene determinado por el deterioro natural que han sufrido, por procesos de erosión eólica e hídrica así como por la acción del hombre. Por otra parte el origen geológico de los suelos les otorga características físicas poco favorables al cultivo. Otro aspecto perjudicial al uso agrícola es la situación topográfica. Todo ello responde a los procesos de degradación propios de ecosistemas mediterráneos (Lopez-Bermudez y Albaladejo, 1990).

El área de estudio se encuentra en un clima de montaña con grandes diferencias térmicas entre el día y la noche, así como entre el invierno y el verano. Con precipitaciones en un corto espacio de tiempo. Durante bastantes años la actividad a la que se destinó fue a una ganadería extensiva en los sectores altos, mientras que en laderas medias a bajas fue un cultivo extensivo de cereal. Esta actividad humana, si bien es cierto que en un primer momento no incidió negativamente en el ambiente, posteriores modificaciones de carga animal y de cultivo agrícola, junto con las condiciones climáticas antes señaladas, contribuyeron al deterioro ecológico de la zona tal como se describió para situaciones similares ( Ortiz Silla, 1990).

De esta forma, en la actualidad y a pesar de que se ha dejado de usar en gran medida estos suelos agricolamente, todavía pueden observarse señales obvias de procesos erosivos progresivos.

Además de los aspectos antes señalados, se debe indicar que estos suelos, conocidos localmente como "launas" son un sustrato poco evolucionado, con cierta impermeabilidad, de tal manera que son frecuentes los problemas de encharcamiento. Otro problema asociado a este tipo de estructura es la compactación que dificulta un adecuado desarrollo radicular. Un elemento más que contribuye a intensificar los problemas de erosión es la pendiente, en general de media a fuerte.

Los *Rhizobium* spp. aislados de *S.junceaum* y *Anthyllis cystisoides* son especies/ecotipos de rápido crecimiento, ello está de acuerdo, con lo que encuentra Herrera (1984), lo cual no era lo esperado previamente en plantas leñosas. Probablemente al tratarse de especies de zonas áridas sea lógico que las bacterias noduladoras sean de rápido crecimiento. El inocular con bacterias de lento crecimiento las plantas en campo tiene el problema de la competitividad (Sprent y Faria, 1988) como se ha encontrado en ensayos de invernadero. Aunque estas bacterias son más efectivas al cabo de un tiempo la cantidad inicial va decreciendo, en virtud de la competencia con los microorganismos existentes en el suelo, o por estar peor adaptadas a las condiciones climáticas de la zona.

Es posible que entre las poblaciones de hongos formadores de micorrizas existentes en la zona y los inoculados también haya problemas de competitividad (Mosse et al., 1981), aún no siendo así, se plantea la necesidad de conocer mejor los hongos MVA que hay en la zona de estudio, por sus características de crecimiento, adaptadas a las condiciones ambientales y ecológicas existentes. De acuerdo a los resultados se ha observado una especificidad del HMVA respecto al sustrato y su efectividad para las plantas que lo colonizan. Esto es de gran interés tanto a nivel fisiológico, por mejorar el estado de las especies vegetales, como ecológico, en el efecto de recuperación de suelos degradados e introducción de especies aptas para la regeneración de zonas degradadas (Skujins y Allen, 1986). Por ello, es de gran importancia un estudio adecuado para la selección de las especies de HMVA apropiadas ya que de otra forma los efectos que se produzcan pueden no ser los más óptimos. Al igual que hay factores que inciden sobre la formación y desarrollo de las micorrizas, también hay que tener en cuenta que las MVA condicionan aspectos ecológicos concretos. Así es importante que se puedan mejorar determinadas características del suelo (Thomas et al., 1986). Ello justifica la importancia de conocer la distribución de estos hongos y el efecto que pueda ejercer su incorporación a sitios desérticos y degradados (Allen, 1989).

Al caracterizar uno de los hongos formador de MVA encontrado en el área de estudio (*Scutellospora persica*) y, posteriormente, determinar



algunos de sus requerimientos en crecimiento, se ha encontrado cierta afinidad con otros hongos de esta misma especie estudiados (Morton, 1988), si bien hay algunas características especiales que están principalmente referidas a los ritmos de crecimiento. Se ha observado que los propágulos de *Scutellospora persica* evolucionan en el suelo a lo largo del año de una forma peculiar, ya que está perfectamente adaptado el máximo poblacional con las mejores condiciones ambientales para el hongo. La disminución en el número de esporas del suelo después de Marzo hasta Agosto puede ser consecuencia del lavado producido, ya que este periodo es en el que se registran las mayores precipitaciones, lo que unido a la gran pendiente de las parcelas justifica esta disminución. La pérdida de capa arable es, en efecto, factor que acelera un descenso en el número de propágulos de MVA (Habte et al., 1988).

En cuanto a las plantas seleccionadas es importante señalar la destacada afinidad existente en *S. junceum* por *Rhizobium*, ya que en dosis crecientes de  $\text{NO}_3\text{K}$  esta planta ha sido nodulada incluso en presencia de una cantidad de nitrato suficiente para inhibir la nodulación en otras especies vegetales (Papastyliauou y Danso, 1989). Según los ensayos que aquí se discuten, el  $\text{NO}_3\text{K}$  incide en la fijación de nitrógeno, pero no en la nodulación.

Teniendo en cuenta que la inoculación de *Rhizobium* junto con un pequeño aporte N exógeno es la combinación que origina una mayor producción de biomasa en *S. junceum*, se puede hablar de un efecto sinérgico de ambos, que redundará en un mayor beneficio para la planta.

Al analizar la situación frente a la inoculación en cada una de las especies vegetales estudiadas se pudieron observar diferentes tendencias en cada una de ellas. Las plantas de *Spartium junceum* inoculadas con las diferentes razas de *Rhizobium* mostraron que se estaba en presencia de una especie muy susceptible a ser nodulada. De las razas ensayadas sólo *R. meliloti* no infectó a estas plantas, mientras que el resto de las razas, tanto de lento como de rápido crecimiento, la nodularon. Los nódulos encontrados en estas plantas son del tipo indeterminado, con un sistema vascular abierto y con un meristemo bien definido, son piriformes de una

longitud máxima de 5mm. Empiezan a ser funcionales desde un punto de vista de actividad nitrogenasa a partir de las cuatro semanas de la inoculación, sin embargo alcanzan una actividad máxima a partir de los dos meses.

Para evitar los problemas de germinación de las semillas de algunas de las especies vegetales seleccionadas, se han usado las técnicas de multiplicación vegetativa por cultivo de tejidos, dadas las grandes ventajas de estas técnicas en micropropagación (Tisserat, 1985; Barceló et al. 1989 y Vietez et al. 1987). Ello ha permitido obtener gran cantidad de material vegetal útil y de interés para el presente trabajo. Esta técnica se ha puesto a punto para *S. junceum* y *A. cytisoides*, dos especies de leguminosas leñosas de importancia en revegetación. El material así obtenido es homogéneo y resulta genéticamente idéntico. Con él se ha logrado micorrización y nodulación semejantes a las que se consiguen en plantas procedentes de semillas, lo que permite mayor fiabilidad de que las diferencias encontradas son producidas por los microorganismos simbióticos y no por la variabilidad genética del material vegetal, previsiblemente alta en este caso ya que las semillas son recolectadas directamente del campo.

Dado que el hospedador es determinante en el tipo de infección producida por las bacterias fijadoras de nitrógeno, la asociación de la leguminosa con hongos formadores de micorrizas vesículo arbusculares, al actuar estos sobre la fisiología de la planta hospedadora, debe tenerse en cuenta a la hora de producir una doble simbiosis. Los resultados, que aquí se presentan han permitido establecer la combinación de microorganismos que se muestra más efectiva para cada leguminosa, encontrando diferentes respuestas a la simbiosis cuando se cambia uno de los microorganismos inoculantes; ello concuerda con observaciones previas (Bethlenfalvay et al. 1989). La efectividad de la inoculación también se ve afectada por el orden en que se aplican los microorganismos, así como por la fase del desarrollo del vegetal en que se inoculan (Bethlenfalvay et al. 1985b).

Como es conocido el ritmo de translocación de P en plantas micorrizadas está determinado por los componentes de la simbiosis y su interacción con el medio (Hayman, 1983). También se sabe que otros factores ambientales lo modulan. Así, el transporte de P es dependiente de la temperatura y se ve reducido en los casos en que la planta tiene una baja transpiración (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988).

Al trabajar con leguminosas leñosas, se ha determinado que es conveniente analizar los resultados de la doble inoculación así como el establecimiento del estado simbiótico a los seis meses de inoculada la planta, ya que antes las observaciones pueden resultar poco indicativas, teniendo en cuenta la fisiología del desarrollo de estas especies vegetales. Cuando las simbiosis están bien establecidas, se ha encontrado que existe contacto entre los dos microorganismos desarrollándose el hongo dentro de los nódulos. Este hecho no es común en leguminosas herbáceas, pero si se ha descrito en plantas actinorrízicas noduladas y micorrizadas (Gardner, 1986). Por ello se puede pensar que sea propio de la diferente ontogénesis del nódulo en plantas fijadoras leñosas. En esta coexistencia se ha podido llegar más lejos de lo que supone un mero contacto físico que quizás pueda significar una relación más estrecha a niveles fisiológicos o metabólicos.

Con objeto de optimizar la productividad vegetal, uno de los objetivos de la investigación es estudiar la asociación entre una leguminosa leñosa y una planta no fijadora de nitrógeno (Haystead et al., 1988; Barea et al., 1989b). Ello es importante si se considera el posible paso de nutrientes de una planta a otra, y que tal paso, puede ser estimulado por acción del hongo.

Como es sabido, es necesario que el N procedente de la fijación sea incorporado al metabolismo de la planta (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988; Smith y Smith, 1990). Posteriormente, mediante los procesos de exudación radical, o de degradación de nódulos (Barea, 1990), los compuestos nitrogenados se liberan a la rizosfera de la leguminosa. Esta puede ser la base de la "transferencia de N" a plantas no fijadoras

(Heichel, 1987) y que podría justificar las indicaciones sobre "transferencia de N" encontradas en el presente estudio.

Después de encontrar evidencia de que existe transporte de nutrientes entre plantas que crecen juntas, se puede pensar que una de las formas nitrogenadas que se movilizaron era un ureido (Herridge, 1982 a y b).

Previamente se había determinado que los nódulos de las plantas estudiadas exportaban ureidos, lo cual parece ser propio de ciertas leguminosas (Sprent, 1980; Berkum et al., 1985), entre ellas las leñosas aunque cabe destacar que en estas la cantidad producida no está relacionada con la eficacia del proceso de fijación de N (Van Kessel et al., 1988).

Es de destacar la presencia de ácido alantoico en plantas noduladas (McNeil y Larue, 1984) y en la planta no fijadora asociada. Se puede concluir que estos fenómenos de transferencia de nutrientes son claves en el equilibrio de tales asociaciones y que en ello desempeñan un papel importante las micorrizas, tal como postulo Newman, 1988.

Mediante el uso de la técnica del  $N^{15}$  se pudo determinar la efectividad que muestran las plantas estudiadas para fijar  $N_2$  atmosférico (Zapata, 1990). El que el aporte de N del medio a la planta sea muy pequeño se explica por el carácter arcilloso de nuestros suelos, lo que justifica que el N prioritariamente proceda de la fijación atmosférica aunque se pudo estimar captación del N del suelo proceso estimulado por las MVA. Esto confirma estudios previos (Barea et al., 1987).

Así mediante el uso de las técnicas de marcaje isotópico se ha determinado que alrededor de un 50% del N existente en las leguminosas procede la fijación biológica. Lo cual en suelos que pueden dar poco N a la planta, ya sea porque tengan poco N o porque esté inmovilizado; como son los hay en el área del presente estudio; justifica plenamente la inoculación de estos vegetales (Barea y Azcón-Aguilar, 1983).

Aspecto importante a destacar es la falta de correlación existente entre las medidas de fijación de N (reducción de acetileno) y la respuesta de la planta (crecimiento, contenido en N, ect). Ello era de esperar ya que, como es sabido (Witty y Minchin, 1988) la técnica de la reducción de acetileno, con grandes ventajas para comparaciones relativas de efectos, no cuantifica de forma integrada la fijación de N<sub>2</sub>. En este sentido son las técnicas basadas en el uso de N<sup>15</sup> las más apropiadas (Danso, 1988), como se manifiesta en el presente estudio.

Por otra parte la asociación *Rhizobium*-leguminosa se afecta considerablemente por la micorrización, depende mucho del tipo de hongo que se asocie a las plantas noduladas y que condiciona la cantidad de N en planta procedente de la fijación. Esta situación se muestra de interés con vista a la selección de microsimbiontes y ha sido descrita en leguminosas herbáceas (Azcón et al., 1991).

Mención especial merece el hecho del papel clave que mostraron los microsimbiontes en el establecimiento de las plantas en las parcelas experimentales en la zona de estudio. El efecto sobre la supervivencia y/o desarrollo de las leguminosas leñosas es evidente, lo cual aboga por un efecto positivo de la introducción de este material vegetal mejorado por la aplicación de dos biotecnologías: micropropagación e inoculación de microsimbiontes. Ello puede ser el inicio de un proceso de revegetación y, consecuentemente de recuperación de suelos degradados, tal como ha sido descrito en situaciones de ese tipo (Skujins y Allen, 1986; Aziz y Habte, 1989; White et al., 1989).

## CONCLUSIONES

## VII CONCLUSIONES

- 1ª De acuerdo con criterios de tipo ecológico, y de interacción con microsimbiontes, se recomiendan las leguminosas leñosas siguientes: *Anthyllis citisoides*, *Spartium junceum* (arbustivas, autóctonas); *Robinia pseudoacacia* y *Acacia caven* (leñosas, adaptadas) para llevar a cabo ensayos de revegetación en la región.
- 2ª De acuerdo con criterios de "compatibilidad funcional" se han determinado los microorganismos más adecuados para establecer doble simbiosis con cada una de las plantas seleccionadas.
- 3ª Se han puesto a punto los métodos de macropropagación para todas las especies seleccionadas y los de micropropagación para *Spartium juceum* y *Anthyllis citisoides*.
- 4ª El análisis isotópico ( $N^{15}$ ) ha permitido establecer que al menos el 50% de N que incorporan las leguminosas es procedente de la fijación simbiótica.
- 5ª Se ha evidenciado que, en contra de lo que ocurre en leguminosas herbáceas, el hongo de la MVA coloniza el tejido nodular.
- 6ª Se ha puesto de manifiesto la transferencia de compuestos nitrogenados, entre ellos ureidos, desde plantas leguminosas a las no leguminosas micorrizadas acompañantes.
- 7ª Se ha puesto de manifiesto el transporte de N en forma de ureidos en *S. junceum*.
- 8ª Se ha evidenciado el efecto beneficioso de los microsimbiontes en el establecimiento, supervivencia y desarrollo de las plantas en parcelas experimentales en campo.

**BIBLIOGRAFIA**



## BIBLIOGRAFIA

- Abbott, L. K. y Robson, A. D.** (1982) Infectivity of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils. *Aust. J. Agric. Res.* 33, 1049-1059.
- Abbott, L. K. y Robson, A. D.** (1984) The effect of mycorrhizas on plant growth. En: "VA mycorrhiza". (C. LL. Powel, y D. J. Bagyaraj eds.) CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Abbott, L. K. y Robson, A. D.** (1985) Formation of external hyphae in soil by four species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 99, 255.
- Allen, O.N.** (1951) Experiments in soil bacteriology. Minnesota. Burgess Publishing Minneapolis.
- Allen, E. B.** (1989) The restoration of disturbed arid landscapes with special reference to mycorrhizal fungi. *J. Environ.* 17, 279-286.
- Allen, E. B. y Allen, M. F.** (1988) Facilitation on succession by the nonmycotrophic colonizer *Salsola kali* (Chenopodiaceae) on a harsh site: effects of mycorrhizal fungi. *Aust. J. Bot.* 75, 257-266.
- Allen, O. N. y Allen, E. K.** (1981) The leguminosae: A Source Book of Characteristics, Uses and Nodulation. The university of Wisconsin Press, Madison. 812 pp.
- Allen, W. K., Allaway, W. G., Cox, G. C. y Valder, P. G.** (1989) Ultrastructure of mycorrhizas of *Dracophyllum secundum* R. B.r. (Ericales: Epacridaceae) *Aust. J. Plant Physiol.* 16, 147-151.
- Allison, L. E.** (1973) Oversaturation method for preparing saturation extracts for salinity appraisal. *Soil Sci.* 116, 65-68.
- Ames, R. N. y Bethlenfalvay, G. J.** (1987) Localized increase in nodule activity but no competitive interaction of cowpea rhizobia due to pre-establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza. *New Phytol.* 106, 207-215.
- Avio, L. y Giovannetti, M.** (1988) Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of lucerne roots in a cellulose-amended soil. *Pl. Soil.* 112, 99-104.
- Axmann, H.** (1990) Methods for <sup>15</sup>N determination En: "Use of nuclear techniques in studies of soil-plant relationships". (G. Hardanson ed.) IAEA, Viena. pp. 55-60.

- Axmann, H., Sebastianelli, A. y Arrillaga, J. L.** (1990) Sample preparation techniques of biological material for isotope analysis. En: "Use of nuclear techniques in studies of soil-plant relationships". (G. Hardanson ed.) IAEA, Viena. pp 41-50.
- Azcón-Aguilar, C., Barea, J. M. y Roldan Fajardo, B.** (1984) Avances recientes en el estudio de las micorrizas vesículo arbusculares. II. Factores que afectan su formación y función y aplicaciones prácticas en agricultura. *Anales de Edafología y Agrobiología*. 43, 975-998.
- Azcón-Aguilar, C., García García, F. y Barea, J. M.** (1991) Germinación y crecimiento axénico de hongos formadores de MVA. En: "Fijación y movilización de nutrientes. II. Fijación de nitrógeno y micorrizas" (J. López Gorjé, J., Olivares y J. M. Barea eds.), CSIC. Madrid.
- Azcón-Aguilar, C., Barea, J. M., Azcón, R. y Díaz Rodríguez, R. M.** (1986) Assessment of field situations for the feasibility of vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation using a forage legume as test plant. *Agric. Ecosyst. Environ.* 15, 241-252.
- Azcón, R. y Ocampo, J. A.** (1981) Factors affecting the vesicular-arbuscular infection and mycorrhizal dependency of thirteen wheat cultivars. *New Phytol.* 87, 677-685.
- Azcón, R., El-Atrach, F. y Barea, J. M.** (1988) Influence of mycorrhiza vs. soluble phosphate on growth, nodulation, and  $N_2$  fixation  $^{15}N$  in alfalfa under different levels of water potential. *Biol. Fertil. Soils.* 7, 28-31.
- Azcón, R., Marín, A. y Barea, J. M.** (1978) Comparative role of phosphate in soil or inside the host on the formation and effects of endomycorrhiza. *Pl. Soil.* 49, 561-567.
- Azcón, R., Rubio, R. y Barea, J. M.** (1991) Selective interactions between different species of mycorrhizal fungi and *Rhizobium meliloti* strains and their effects on growth,  $N_2$ -fixation ( $^{15}N$ ) and nutrition of *Medicago sativa* L. *New Phytol.* 117, 399-404.
- Aziz, T. y Habte, M.** (1987) Determining vesicular arbuscular mycorrhizal effectiveness by monitoring P status of leaf disks. *Can. J. Microbiol.* 33, 1097-1101.
- Aziz, T. y Habte, M.** (1989) Influence of inorganic N on mycorrhizal activity nodulation, and growth of *Leucaena leucocephala* in an oxisol subjected to simulated erosion. *Soil Sci. and Plant Analysis* 20, 139-251.

- Bagyaraj, D. J.** (1989) Mycorrhizas. En: "Tropical Rain Forest Ecosystems" ( H. Liet and M. J. A. Werger eds.) pp. 537-546. Elsevier Press. Amsterdam.
- Bainbridge, D. A.** (1990) The restoration of agricultural lands and drylands. En "Environmental Restauration". (J. J. Berger ed.) Island Press. Washington D.C. pp. 4-13.
- Barceló, A., Pliego, F. y Barea, J. M.** (1989) Micropropagación de aguacate (*persea americana* mill) en fase juvenil. Actas de Horticultura. III Congreso de la SECH 2, 293-296.
- Barea, J. M.** (1991) Vesicular-Arbuscular mycorrhizae as modifiers of soil fertility. En "Advances in Soil Science" vol 15. (B. A. Stewart ed.), New York, pp. 1-40.
- Barea, J. M. y Azcón-Aguilar, C.** (1983) Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants. In: "Advances in Agronomy" (N. C. Brady ed.) pp. 1-54, Academic Press, New York.
- Barea, J. M., Azcón-Aguilar, C. y R. Azcón.** (1987) Vesicular-arbuscular mycorrhiza improve both symbiotic N<sub>2</sub> fixation and N uptake from soil as assessed with a <sup>15</sup>N technique under field conditions. *New Phytol* 106, 717-725.
- Barea, J. M., Azcón, R. y Azcón-Aguilar, C.** (1989b) Time-course of N<sub>2</sub>-fixation (<sup>15</sup>N) in the field by clover growing alone or in mixture with ryegrass to improve pasture productivity, and inoculated with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 112, 399-404.
- Barea, J. M., El-Atrach, F. y Azcón, R.** (1989) Mycorrhiza and phosphate interactions as affecting plant development, N<sub>2</sub> fixation, N-transfer and N-uptake from soil in legume-grass mixtures by using a <sup>15</sup>N dilution technique. *Soil Biol. Biochem.* 21, 581-589.
- Barea, J. M., Salamanca, C. P. y Herrera, M. A.** (1990b) The role of VA-mycorrhiza at improving N<sub>2</sub>-fixation by woody legumes in arid zones. En: "Fast growing trees and nitrogen Fixing Trees. (D. Werner y P. Müller Eds.). Stuttgart. pp. 303-311.
- Barea, J. M., Salamanca, C. P. y Herrera, M. A.** (1990a) La simbiosis microbio-planta en el establecimiento de una cubierta vegetal sobre suelos degradados. En "Degradación y regeneración del suelo en condiciones ambientales mediterráneas" (J. Albaladejo, M. A. Stocking y E. Diaz Eds.).Murcia. pp. 138-157.

- Batchelor, C. A., Yacs, D., Koehler, M. J. y Harris, P. J. C.** (1989) In vitro propagation of *Prosopis* sp. (*P. Chilensis*, *P. cineraria* and *P. Juliflora*). *Amer. Sci. For.* 46, 110-112.
- Becking, J. H.** (1976) Nitrogen fixation in some natural ecosystems in Indonesia En: "Symbiotic nitrogen fixation in plants" (P. S. Nutman, ed.), Cambridge University Press, Cambridge, London. pp. 539-550.
- Bedmar, E. J., Edie, S. A. y Phillips, D. A.** (1983) Host plant cultivar effects on hydrogen evolution by *Rhizobium leguminosarum*. *Plant Physiol.* 72, 1011-1015.
- Benjamin, P. K., Anderson, R. C. y Liberta, A. E.** (1988) Vesicular-arbuscular mycorrhizal ecology of little bluestem across a prairie-forest gradient. *Can. J. Bot.* 67, 2678-2685.
- Beringer, J. E.** (1984) The significance of symbiotic nitrogen fixation in plant production. *CRC Critical Reviews in Plant Sciences* 1, 269-286.
- Berkum, P. V., Sloger, C., Weber, D. F., Cregan, P. B. y Keyser, H. H.** (1985) Relationship between ureide N and N<sub>2</sub> fixation, aboveground N accumulation, acetylene reduction, and nodule mass in greenhouse and field studies with *Glycine max* L. (Merr). *Plant Physiol.* 77, 53-58.
- Bethlenfalvay, G. J. y Yoder, J. F.** (1981) The *Glycine-Glomus-Rhizobium* symbiosis I. Phosphorus effect on nitrogen fixation and mycorrhizal infection. *Physiol Plant.* 52, 141-145.
- Bethlenfalvay, G. J., Brown, M. S. y Stafford, A. E.** (1985a) *Glycine-Glomus-Rhizobium* symbiosis. *Plant Physiol.* 79, 1054-1058.
- Bethlenfalvay, G. J., Ulrich, J. M., y Brown, M. S.** (1985b) Plant response to mycorrhizal fungi: Host, endophyte, and soil effects. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 49, 1164-1168.
- Bethlenfalvay, G. J., Brown, M. S., Mihara, K. L. y Stafford, A. E.** (1987) *Glycine-Glomus-Rhizobium* symbiosis V. Effects of mycorrhiza on nodule activity and transpiration in soybeans under drought stress. *Plant Physiol.* 85, 115-119.
- Bethlenfalvay, G. J., Franson, R. L., Brown, M. S. y Mihara, K. L.** (1989) The *Glycine-Glomus-Bradyrhizobium* symbiosis. IX. Nutritional, morphological and physiological responses of nodulated soybean to geographic isolates of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Physiol. Plant.* 76, 226-232.

- Boerner, R. E. J.** (1986) Seasonal nutrient dynamics, nutrient resorption, and mycorrhizal infection intensity of two perennial forest herbs. *Amer. J. Bot.* 73, 1249-1257.
- Bohlood, B. V., Nakao, P. y Singleton, P. W.** (1986). Ecological determinants of interstand competition in *Rhizobium*-legumine symbiosis. *Aust. Just. Agri. Sci.* 25, 145-148.
- Bonfante-Fasolo, P.** (1984) Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. En: "VA Mycorrhiza" (C. Ll. Powell, D. J. Bagyaraj eds) pp. 5-34, CRC Press, Boca Raton Florida.
- Bonier, C y Brackel, J.** (1969) Lutte biologique contre la faim Glembloux (J. Duculot. S. A. Ed.)
- Bowen, G. D.** (1980) Misconceptions, concepts and approaches in rhizosphere biology. En: "Contemporary Microbial Ecology" (D. C. Ellwood, J. N. Hedger, M. J. Latham, J. M. Lynch y J. H. Stater eds.) pp. 283-304, Academic Press, London.
- Brewbaker, J. L.,** (1990) Nitrogen fixing trees. En: "Fast Growing Trees And Nitrogen Fixing Trees". ( D. Werner y Müller, P. Eds.) Stuttgart. pp 253-262.
- Brockwell, J.** (1982) Plant infection test in tubes Plant infection counts of Rhizobia in soils. En: Nitrogen fixation (Newton C. Ed.) pp.45-51.
- Brown, M. S. y Bethlenfalvay, G. J.** (1986) The *Glycine-Glomus-Rhizobium* symbiosis III. Endophyte effects on leaf carbon, nitrogen, and phosphorus nutrition. *J. Pl. Nut.* 9, 1199-1212.
- Brown, M. S. y Bethelenfalvay, G. J.** (1987) *Glycine-Glomus-Rhizobium* symbiosis. V. Photosynthesis in nodulated, mycorrhizal or N and P-fertilized soybean plants. *Plant Physiol.* 85, 120-123.
- Brown, M. S. y Bethlenfalvay, G. J.** (1988) The *Glycine-Glomus-Rhizobium* symbiosis VII. Photosynthetic nutrient-use efficiency in nodulated, mycorrhizal soybeans. *Plant Physiol.* 86, 1292-1297.
- Brown, M. S., Thamsurakul, S., Bethlenfalvay, G. J.** (1988) The *Glycine-Glomus-Bradyrhizobium* symbiosis. VIII. Phosphorus-use efficiency of CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> fixation in mycorrhizal soybean. *Physiol. Plant.* 74, 159-163.
- Brudett, H. M., Muase, G. y Kendrick, B.** (1990) Comparative anatomy of roots and mycorrhizae of common Ontario trees. *Can. J. Bot.* 68, 551-578.

- Burgess, B. K.** (1984) Structure and reactivity of nitrogenase-an overview. En: "Advances in Nitrogen Fixation" ( C. Veeger, y W. E. Newton eds.) Martinus Nijhoff Publisher, The Hague.
- Burity, H. A., Ta, T. C., Faris, M. A., y Coulman, B. E.** (1989) Estimation of nitrogen fixation and transfer from alfalfa to associated grasses in mixed swards under field conditions. Pl. Soil 114, 249-255.
- Burns, R. C. y Hardy, R. W.** (1975) Azotobacter nitrogenase: ATP kinetics and inhibition by high ionic strength. En: "Nitrogen Fixation by free-living microorganisms" (W. D. P. Stewart ed.) Cambrige, University Press, Cambrige, pp. 437-446.
- Busby, H. V. A.** (1982) Ecology in Nitrogen fixation. Vol 2. ( W. J. Broughton ed), Clarendon Press, Oxford. 35pp.
- Buwalda, J. G., Stribley, D. P. y Tinker, P. B.** (1984) The development of endomycorrhizal root systems V. the detailed pattern of infection and the control of development of infection level by host in young leek plants. New Phytol. 96, 411-427.
- Caron, M.** (1989) Potencial use of mycorrhizae in control of soil-borne diseases. Can. J. Plant Physiol, 2, 77-17
- Chotte, J. L., Hetier, J. M., Guiraud, G. y Andreux, F.** (1986) Observations sur le devenir de l'azote organique du sol et des residus racinaires en presence de culture de mas. C. R. Acad. Sc. 7, 269-272.
- Clarke, C. y Mosse, B.** (1981) Plant growth response to vesicular-arbuscular mycorrhiza. XII. Field inoculation responses of barley at two soil levels, New Phytol. 87, 695-703.
- Danso, S. K. A.** (1988) The use of <sup>15</sup>N enriched fertilizers for estimating nitrogen fixation in grain and pasture legumes. En: Nitrogen Fixation by Legumes in Mediterranean Agriculture (D. P. Beck y L. A. Materon eds.) ICARDA, pp. 245-358.
- Deberg, P. C. y Maene, L. J.** (1981) A schene for comercial propagation of ornamental plants by tissue culture. Sci. Hort. 14, 335-345.
- Deberg, P. C. y Maene, L. J.** (1983) Contribution of tissue culture techniques to horticultural research and production. Acta Hort. pp-131.
- De la Cruz, R. E., Manab, M. Q., Aggangan, N. S. y Tambato, J. D.** (1988) Growth of three legume trees inoculated with VA mycorrhizal fungi and *Rhizobium*. Pl. Soil. 108: 111-115.

- Dieterichs, C.** (1990) Improved growth of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. in an unsterile tropical soil by three mycorrhizal fungi. *Pl. Soil.* 123, 261-266.
- Dixon, R. O. y Wheeler, C. T.** (1983) Biochemical, physiological and environmental aspects of symbiotic nitrogen fixation. En: "Biological Nitrogen Fixation in Forest Ecosystems Foundations and Applications" (J. C. Gardon y C. T. Wheeler eds.) Martinus Nijhoff Publisher, The Hague, pp. 108-171.
- Dommergues, Y.** (1982) Ensuring effective symbiosis in nitrogen-fixing trees. En: Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture. (P. H. Graham, S. C. Harris eds.) pp. 395-411, Cali, Colombia.
- Downie, J. A. y Johnston, A. W. B.** (1988) Nodulation of legumes by rhizobium. *Plant. Cell Environ.* 11, 403-412.
- Emerich, D. W., Lepp, J. E. y Evans, H. J.** (1983) Nodule metabolism. En: "Nitrogen Fixation V3: Legumes" (W. J. Broughton ed.), Clarendon Press, Oxford. pp. 213-224.
- Estaun, V. y Save, R.** (1990) Salt stress and vesicular-arbuscular mycorrhizae interactions on *Pistacea vera* water relations. 8<sup>th</sup> NACOM. Abstract pag. 96 Wyoming U.S.A.
- Faria de, S. M., Hay, G. T. y Sprent, J. I.** (1988) Entry of rhizobia into roots of *Mimosa scabrella* Benth occurs between epidermal cells. *J. Gen. Microbiol.* 134, 2291-2296.
- Felker, P.** (1981) Uses of tree legume in semiarid regions. *Econ. Bot.* 35, 174-186.
- Felker, P. y Bandurski, R. S.** (1979) Uses and potential uses of leguminous trees for minimal energy in agriculture. *Econ. Bot.* 33, 172-184.
- Frank, A. B.** (1885) Über die auf wurzelymblose beruhende ernährung gewisser bäume durch unterirdische. Pilze. *Ber. dt. bot. Ges.* 3, 128-195.
- Garner, I. C.** (1986) Mycorrhizae of actinorrhizal plants. *MIRCEN J.*, 2, 147-160.
- Gange, A. C., Brown, V. K. y Faarmer, L. M.** (1990) A test of mycorrhizal benefit in an early successional plant community. *New Phytol.* 115: 85-91.
- Gerdemann, J. W. y Nicolson, J. H.** (1963) Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions*

- Brithis Mycology Society. 46, 235-244.
- Giovanetti, M. y Mosse, B.** (1980) An evaluation of techniques of measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84, 489-500.
- Glenister, R. A. y La Rue T. A.** (1987) Measuring ureides. En: "Symbiotic fixation technology" (G. H. Elkan, ed.), New York y Basel. pp. 307-320.
- Graham, J. H.** (1986) Citrus mycorrhizae: Potential benefits and interactions with pathogens. *Hort. Sci.* 21, 1332-1336.
- Graham, J. H., Leonard, R. T. y Menge, J. A.** (1981) Membrane mediated decrease in root ecudation responsible for. *Plant Physiol.* 68, 548-552.
- Gueye, M., Diem, H. G. y Dommergues, Y. R.** (1987). Variation in N<sub>2</sub> fixation, N and P contents of micorrhizal *Vigna unguiculata* in relation to the progressive development of extrarradical hyphae of *Glomus mosseae*. *MIRCEN Journal.* 3, 75-86.
- Guiraud, G. y Boniface, R.** (1987) Utilization de l'azote 15 pour les studes de transfert d'azote dans le systeme sol-plante. Nitrogen-15 utilization for nitrogen transfer studies in soil-plant system. *Acad. Agric. Fr.* 73, 23-38.
- Guiraud, G. y Marol, Ch.** (1982) Utilisation de l'azote 15 en science du sol application l'stude transferts d'azote entre les formes minrales et organiques dans un sol calcaire. *Science du Sol Bulletin de l'A.F.E.S.* 2, 125-144.
- Guiraud, G., Marol, C. y Thibaud, M. C.** (1989) Mineralization of nitrogen in the presence of a nitrification inhibitor. *Soil. Biol. Biochem.* 21, 29-34.
- Habish, H. A. y Khairi, S. M.** (1970) Nodulation of legumes in the Sudan II. Rhizobia strains and cross inoculation of *Acacia* spp. *Exp. Agric.* 6, 171-176.
- Habish, H. A. y Khairi, S. M.** (1986) Nodulation of legumes in the Sudan: cross-inoculation groups and the associated *Rhizobium* strains. *Exp. Agric.* 4, 227-234.
- Habte, M., y Manjunath, A.** (1987) Soil solution phosphorus status and mycorrhizal dependency in *leucaene leucocephale*. *Appl. and Environ. Microbiol.* 53, 797-801.
- Habte, M., Fox, R. L., Asis, R. y El-Swaify, S. A.** (1988) Interaction of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi with erosion in an oxisol. *Appl.*



Environ. Microbiol. 45: 945-950.

**Hardanson, G. y Danso, S. K. A.** (1990) Use of  $^{15}\text{N}$  methodology to assess biological nitrogen fixation. En: "Use of nuclear techniques in studies of soil-plant relationships (G. Hardanson ed.), IAEA, Viena pp. 129-160.

**Hardanson, G., Danso, S. K. A. y Zapata, F.** (1987) Biological nitrogen fixation by field crops. En: "CRC Handbook of Plant Science in Agriculture. Vol. I y II. CRC Press, pp. 165-192.

**Hardy, R. W. F., Holsten, R. D., Jackson, E. K. y Burns, R. C.** (1968) The acetylene-ethylene assay for  $\text{N}_2$ -fixation: laboratory and field evaluation. Plant Physiol. 43, 1185-1207.

**Harley, J. L.** (1989). The significance of mycorrhiza. Mycology. 92, 129-139.

**Harley, J. L., y Smith, S. E.** (1983) Mycorrhizal symbiosis. Academic Press. London, pp. 483.

**Hayman, D. S.** (1982) Influence of soils and fertility on activity and survival of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Phytopathology 72, 1119-1125.

**Hayman, D. S.** (1983) The physiology of vesicular-arbuscular endomycorrhizal symbiosis. Can. J. Bot. 61, 944-963.

**Hayman, D. S.** (1984) Methods for evaluating and manipulating vesicular-arbuscular mycorrhiza. En: "Microbiological methods for environmental biotechnology" (The Society for Applied Bacteriology Ed.) pp. 95-117.

**Hayman, D. S.** (1986) Mycorrhizae of nitrogen-fixing legumes. MIRCEN J. 2, 121-145.

**Haystead, A., Malajczuck, N., y Grove, T. S.** (1988) Underground transfer of nitrogen between pasture plants infected vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol. 108, 417-423.

**Hepper, C. M.** (1979) Germination and growth of *Glomus caledonium* spores: The effects of inhibitors and nutrients. Soil Biol. Biochem. 11, 269-277.

**Herrera, M. A.** (1984) Estudio de algunos aspectos de la simbiosis *Rhizobium* leguminosas leñosas. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Madrid. ETSI de Montes.

**Herrera, M. A., Bedmar, E. J. y Olivares, J.** (1986) Host specificity of *Rhizobium* strains isolated from nitrogen fixing trees and nitrogenase activities of strain GRH in symbiosis with *Prosopis chilensis*. Plant Sci.

41, 177-182.

**Herridge, D. F.** (1982a) Relative abundance of ureides and nitrate in plant tissues of soybean as a quantitative assay of nitrogen fixation. *Plant Physiol.* 70, 1-6.

**Herridge, D. F.** (1982b) Use of the ureide technique to describe the nitrogen economy of field-grown soybeans. *Plant Physiol.* 70, 7-11.

**Hewitt, E. J.** (1952) Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Technical Communication, Vol 22. Farnham Royal Commonwealth Agricultural Bureau Bucks.

**Hiechel, G. H.** (1987) Legume nitrogen: Symbiotic fixation and recovery by subsequent crops. En: "Energy in Plant Nutrition and Pest Control" (A. R. Helsen Ed.) Elsevier, Amsterdam. pp. 63-80.

**Hirrel, M. C., Mehravaran, H., y J. W. Gerdeman** (1978) Vesicular-arbuscular mycorrhizae in the Chenopodiaceae and cruciferae: do they occur. *Can. J. Bot.* 56, 2813-2817.

**Holes, L. y Berki, I.** (1988) Lokale industrielle emission und waloschden in nordungarn III. gesltaltung del nebenwurzelwerkes und der mykorrhiza-beziehungen bei gesunden und kranken baumen. *Acta Bot. Hung.* 34, 39-49.

**Hu, C. Y. y Wang, P. J.** (1983) Meristem shoot tip, and bud cultures. En: "Handbook of plant cell culture" Vol II. (D. A. Evans, W. R. Shap, P. V. Ammirato y Y. Yamada eds.) McMillan Publishing Co. New York.

**Jarrel, W. M.** (1990) Nitrogen in agroecosystems. En: *Agroecology* (C. R. Carroll; J. H. Vandermeer, P. Rosset eds.), McGraw-Hill, New York, pp. 385-412.

**Jasper, D. A., Abbott, L. K. y Robson, A. D.** (1989a) Hyphae of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus maintain infectivity in dry soil, except when the soil is disturbed. *New Phytol.* 112, 101-107.

**Jasper, D. A., Abbott, L. K., y Robson, A. D.** (1989b) Soil disturbance reduces the infectivity of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 112, 93-99.

**Janos, D. P.** (1980) Vesicular-arbuscular mycorrhizae effect low land tropical rain forest plant growth, *Ecology.* 61, 151-162.

**Jenkins, M. B., Virginia, R. A. y Jarrell, W. M.** (1988) Rhizobial ecology of the woody legume *Psoralea argemone* in a sonoran desert arroyo. *Pl.*

Soil. 105, 113-120.

**Jenkins, M. B., Virginia, R. A., y Jarrell, W. P.** (1987) Rhizobial ecology of the woody legume mesquite (*Prosopis glandulose*) in the sonoran desert. Appl. Environ. Microbiol. 64, 36-40.

**Johnson, C. R.** (1984) Phosphorus nutrition on mycorrhizal colonization, photosynthesis, growth and composition of *Citrus aurantium*. Pl. Soil. 80, 35-42.

**Junta de Andalucía** (1989) Informe: Medio Ambiente en Andalucía (Consejería de Cultura y Medio Ambiente, Agencia de Medio Ambiente, Dirección General de Planificación eds.) 330 pp.

**Kaur, S. y Singh, O. S.** (1988) Response of ricebean to single and combined inoculation with *Rhizobium* and *Glomus* in a P-deficient sterilized soil. Pl. Soil. 112, 293-295.

**Kirda, Danso, S. K. A. y F. Zapata.** (1989) Temporal water stress effects on nodulation, nitrogen accumulation and growth of soybean. Pl. Soil. 1, 49-56.

**Koide, R. T. y Mingguang, L.** (1990) On host regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. New Phytol. 114, 59-74.

**Koske, R. E.** (1988) Vesicular arbuscular mycorrhizae of some Hawaiian Dune plants. Pacif. Sci. 92, 217-229.

**Lemasson, L., Pages, J., y Guiraud, G.** (1982) Routine <sup>15</sup>N analysis on small samples by emission spectrometry. Analisis 10, 23-30.

**Leonard, L. T.** (1943) Method of testing bacterial cultures and results of test of commercial inoculants. Washington. U.S.D.A. CIRC. 703, 8pp.

**Linderman, R. G.** (1988) Micorrhizal interactions with the rhizosphere microflora. The mycorrhizosphere effect. Phytopatology. 78, 366-371.

**Long, S. R.** (1989) *Rhizobium*-legume nodulation-life together in the underground. Cell. 56, 203-214.

**Lopez Bermudez, J., Albaladejo, J.** (1990) Factores ambientales de la degradación del suelo en el área mediterránea en degradación y regeneración del suelo en condiciones ambientales mediterráneas (Ed. J. Albaladejo, M. A. Stocking y E. Díaz) Murcia pp. 15-42.

**Lluch, C.** (1990) Metabolismo de los ureidos en nódulos de leguminosas. Soc. Esp. Fisiol. Veg. 14, 15-21.

- Mallarino, A. P., Wedin, W. F., Goyenola, R. S., Perdomo, C. H. y West, C. P.** (1990a) Nitrogen transfer from white clover, red clover, and birdsfoot trefoil to associated grass. *Agron. J.* 82: 790-795.
- Mallarino, A. P., Wedin, W. F., Goyenola, R. S., Perdomo, C. H. y West, C. P.** (1990b) Legume species and proportion effects on symbiotic dinitrogen fixation in legumes grass mixtures. *Agron. J.* 82: 785-789.
- Malloch, D. W., Pirozynsky, K. A. y Raven, P. M.** (1980) Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbiosis in vascular plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 2113-2118.
- Marsh, B. A. B.** (1971). Measurement of length in random arrangements of lines. *J. Appl. Ecol.*, 8, 265.
- Martinez, J., y Guiraud, G.** (1990) A lysimeter study of the effects of a ryegrass catch crop, during a winter wheat/maize rotation, on nitrate leaching and on the following crop. *J. Soil Sci.* 41, 5-16.
- Mayo, K., Davis, R. E., y Motta, J.** (1986) Estimation of germination of spores of *Glomus vesdiforme* by spore-associated bacteris. *Mycologia* 78, 426-431.
- McGee, P. A** (1986) Mycorrhizal association of plant species in a semiarid community. *Aust. J. Bot.* 34, 583-591
- McGee, P. A.** (1989) Variation in propagule numbers of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in a semi-arid soil. *Mycol. Res.* 92, 28-33.
- McGonigle, T. P., y Fitter, A. H.** (1988). Growth and phosphorus inflows of *Trifolium repens* L. with a range of indigenous vesicular-arbuscular mycorrhizal infection levels under field conditions. *New Phytol.* 108, 59-65.
- McNeil, D. L. y LaRue, R. A.** (1984) Effect of nitrogen source on ureides in soybean *Plant physiol.* 74, 227-232.
- Mejstrich, V. K.** (1972) Vesicular-arbuscular mycorrhizas of the species of molinietum coeruleae. L. I association: The ecology. *New Phytol.* 71, 883-890.
- Michelsen, A. Rosendahl, S.** (1990) The effect of VA mycorrhiza fungi phosphorus and drought stress on the growth of *Acacia nicotica* and *Leucaena leucocephala* seedlings. *Pl. Soil.* 124, 7-13.
- Monk, D., Pate, J. S. y Loneragan, W. A.** (1981) Biology of *Acacia pulchella* R. Br. With special reference to symbiotic nitrogen fixation.

Aust. J. Bot. 29, 579-592.

**Morton, J. B.** (1988) Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: classification, nomenclature, and identification. *Mycotaxon*. 32, 267-324.

**Mosse, B., Stribley, D. P. y Le Tacon, F.** (1981). Ecology of mycorrhizae and mycorrhizal fungi. *Adv. Microb. Ecol.* 5, 137-210.

**Munns, D. N., Fogle, V. W. y Hallosk, B. G.** (1977) Alfalfa root nodule distribution and inhibition of nitrogen fixation by heat. *Agron. J.* 69, 377-380.

**Murashige, T. y Skoog, F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 463-497.

**Murashige, T.** (1974) Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25, 135-166.

**Naciones Unidas** (1977) Desertification: Its causes and consequences. Pergamon Press, New York.

**Nemeth, G.** (1986) Induction of rooting. En: "Biotechnology in Agriculture and Forestry". (Y. P. S. Bayaraj ed.) Springer-Verlag. Berlin.

**Newman, E. I.** (1988) Mycorrhizal-links between plants: Their functioning and ecological significance. *Adv. Ecol. Res.* 18, 343-270.

**Ocampo, J. A.** (1986) Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of "host" and "non-host" plants: effect on the growth responses of the plants and competition between them. *Soil. Biol. Biochem.* 18, 607-610.

**Olivares, J., Casadesus, J. y Bedmar, E. J.** (1980) Method for testing degree on infectivity of *Rhizobium meliloti* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 967-970.

**Ortiz Silla, R.** (1990) Mecanismos y procesos de degradación del suelo con especial referencia a las condiciones ambientales mediterráneas. En *Degradación y regeneración del suelo en condiciones ambientales mediterráneas* (Eds. J. Albaladejo, M. A. Stocking, y E. Díaz) Murcia, pp 47-68.

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

**Pacovsky, R. y Fuller, G.** (1988) Mineral and lipid composition of *Glycine-Glomus-Bradyrhizobium* symbioses. *Physiologia plantarum.* 72, 733-746.

**Pacovsky, R., Fuller, G. y Stafford, A. E.** (1986) Nutrient and growth interactions in soybeans colonized with *Glomus fasciculatum* and *Rhizobium*

- japonicum*. Pl. Soil. 92, 37-45.
- Papastylianou, I. y Danso, S. K. A.** (1989) Effect of nitrogen fertilization and cropping system of the reference crop on estimation of N<sub>2</sub> fixation by vetch using <sup>15</sup>N methodology. Pl. Soil 114, 227-233.
- Peña, J. I., Sanchez Diaz, M., Aguirreolea, J. y Becama, M.** (1988) Increased stress tolerance of nodule activity in the *Medicago-Rhizobium-Glomus* symbiosis under drought. J. Plant Physiol. 133, 79-83.
- Perry, D. A. y Amaranthus, M. P.** (1990) The plant-soil Bootstrap: microorganisms and reclamation of degraded ecosystems. En: "Environmental restoration" (J. J. Berger, ed.) Island Press, Washington DC. pp. 94-102.
- Perry, R. L.** (1986) Interactions of soil-borne organisms and Woody perennial root systems. Hort. Science. 21, 1294-1298.
- Phillips, J. M. y Hayman, D. S.** (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Br. Mycol. Soc. 55, 158-161
- Powell, C. Ll.** (1976) Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. VIII. Uptake of P by onion and clover infected with different *Endogone* spore types in <sup>32</sup>P- labelled soil. New Phytol. 75, 563-566.
- Reeves, F. B., Wagner, D., Moorman, T. y Kirel, J.** (1979) The role of endomycorrhizae in revegetation. Practics in the semiarid west I.A. comparison of incidence of micorrhizae in severely disturbed V.S. Natural environments. Amer. J. Bot. 66,6-13.
- Rennie, R. J.** (1986) Comparison of methods of enriching a soil with nitrogen-15 to estimate dinitrogen fixation by isotope dilution. Agron. J. 78, 158-163.
- Reynolds, P. H. S., Blevins, D. G., Boland, M. J., Schubert, K. R., Randall, D. D.** (1982) Enzymes of ammonia assimilation in legume nodules: A comparison between ureide and amide transporting plants. Physiol. Plant. 55, 255-260.
- Ridge, R. W., y Rolfe, B. G.** (1985) *Rhizobium* sp. Degradation fo legume root hair cell wall at the site of infection thread origin. App. Environ. Eco. 717-720.
- Rigaud, J. y Puppo, A.** (1975) Indole-3 acetic catabolism by soybeans bacteroids. J. Gen. Microbiol. 88, 223-228.
- Roskoski, J. P., Montano, J., Van Kessel, C. y Castilleja, G.** (1982) Nitrogen fixation by tropical woody legumes: potential source of soil

- enrichment. En: Biological Nitrogen Fixation Technology for tropical agriculture. P. H. Grahaam and S. C. Harris. Centro INTERNACIONAL de Agricultura tropical Calí. Colombia. pp. 447-454.
- Ross, S. P. y Harper, J. A.** (1973) Horst of vesicular-arbuscular endogone species. J. Elish. Mitchell. Sci. Soc. 89, 1-3.
- Sanginga, N., Mulongoy, K., y Ayanaba, A.** (1989) Nitrogen fixation of field-inoculated *Leucocephala* (Lam.) de wit estimated by the  $^{15}\text{N}$  and the difference methods. Pl. Soil. 117, 269-274.
- Schlesinger, W. H., Reynolds, J. F., Cunningham, G. L., Jarrel, W. M., Virginia, R. A. y Whitford, W. G.** (1990) Biological feedbacks in global desertification. Science. 247, 1043-1048.
- Schoeneberger, M. M., Volk, R. J. y Davey, C. B.** (1989) Selection of reference plants and methods for estimating  $\text{N}_2$  fixation in mycorrhizal leguminous plants. Soil Sci. Soc. Amer. J. 53, 1425-1429.
- Schofiels, R. K. y Botelho Da Costa, J. V.** (1935) Determination of the pH at permanent wilting and the moisture equivalent by the freezing point method. 3<sup>th</sup> Internan. Cong. Soil Sci. 1, 6-10
- Sharifi, E.** (1984) Parasitic origins of nitrogen-fixing *Rhizobium*-legume symbioses. A Review of the evidence. Bio. Systems. 16, 269-289.
- Schubert, K. R.** (1986) Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport, and metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. 37, 539-574.
- Simmons, G. L. y Pope, P. E.** (1987) Influence of soil compaction and vesicular-arbuscular mycorrhizae on root growth of yellow poplar and sweet gum seedlings. Can. J. For. Res. 17, 910-975.
- Singleton, P. W., Swaify, El S. A. y Bohlool, B. B.** (1982) Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival. App. Environ. Microbiol. 44, 884-890.
- Siqueira, J. O.** (1987) Cultura axnica e monoxica dos fungos micorrízicos vesículo-arbusculares. II Reuniao Brasileira sobre Micorrizas. Sao Paulo. pp. 44-70
- Skujins, J. y Allen, M. F.** (1986) Use of mycorrhizae for land rehabilitation. MIRCEN J. 2, 161-176.
- Smith, S. E. y Gianinazzi-Pearson, V.** (1988) Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39, 221-244.

- Smith, S. E. y Smith, F. A.** (1990) Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport. *New Phytol.* 114, 1-38.
- Solheim, B.** (1983) Infection process in the rhizobium-legume simbiosis. *Plant Physiol.* 69, 217-221.
- Sprent, J. L.** (1980) Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin in some *Leguminosae*. *Plant Cell. Environ.* 3, 35-43.
- Sprent, J. L. y Faria, S. M.** (1988) Mechanisms of infection of plants by nitrogen fixing organisms *Pl. Soil* 110, 157-165.
- St. John, T. V.** (1990) Mycorrhizal inoculation of container stock for restoration of self-sufficient vegetation. En: "Environmental Restoration ( J. J. Berger ed.) pp. 103-112. Island Press, Washington D.C.
- St. John, T. V., Hays, R. I. y Reid, C. P. P.** (1983) Influence of a volatile compound on formation of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Transactions of the British Mycological Society.* 81, 153-154.
- Stowers, M. y Eaglesham, A. R. J.** (1984) Physiological and symbiotic characteristics of fast-growing *Rhizobium japonicum*. *Pl. Soil* 77, 3-14.
- Stribley, D. P.** (1989) Present and future value of mycorrhizal inoculants. En: "Microbial Inoculation of Crop Plants. (R. Campbell y R. M. MacDonald eds.), IRL Press, Oxford University Press. pp. 49-65.
- Thomas, R. S., Dakessian, S., Ames, R. N., Brown, M. S. y Bethlenfalvay, G. J.** (1986) Aggregation of a silty clay loam soil by micorrhizal onion roots. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 50, 1494-1499.
- Tisserat, B.** (1985) Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. En: "Plant Cell Culture". (R. A. Dixon, ed.), IRL Press, Oxford. Washington D. C. pp. 79-106.
- Tommerup, I. C.** (1985) Inhibition of spore germination of VAM fungi in soil. *Transactions of the British Mycological Society.* 85: 267-278.
- Tommerup, I. C. y Abbott, L. K.** (1981) Prolonged survival and viability of VA mycorrhizal hyphae after root death. *Soil Biol. Biochem.* 13, 431-433.
- Trappe, J. M.** (1981) Mycorrhizae and productivity of arid and simiarid range lands. In: "Advanced in food producing systems for arid and semiarids laans". (J. T. Manassah y El J. Briskey eds) Acedimic Press, New York. pp. 581-589.



- Trappe, J. M., and Fogel, R. D.** (1977) Ecosystematic functions of mycorrhizae. Range Sci. Dep. Sci. Ser. Colorado, State Univ. pp. 205-214.
- Trinick, M. J.** (1982) Biology. En: "Nitrogen fixation" (W. J. Broughton Ed.) pp. 76-146. Clarendon Press, Oxford.
- Van Kessel, C., Roskoski, J. P. y Keane, K.** (1988) Ureide production by  $N_2$ -fixing and non- $N_2$ -fixing leguminous trees. Soil Biol. Biochem. 20, 891-897.
- Vejsadova, H., Hrsealova, H., Prikryl, Z., y Vanoura, V.** (1987) Interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Bradyrhizobium japonicum* and soybean plants. Fol. Microb. 32, 506, 115-123.
- Vieitez, A. M., Ballester, A., Vieitez, M. L. San Jose, M. C., Vietitez, F. S. y Vieitez, W.** (1987) Propagación de plantas leñosas por cultivo *in vitro*. CSIC. Instituto de Investigación Agrobiologica de Galicia. Diputación Provincial de Pontevedra. pp.96.
- Vierheilig, H. I.** (1990) Estudio de factores implicados en la susceptibilidad de plantas a la colonización por endofitos vesículo-arbusculares. Dpto. de Biología Vegetal, Universidad de Granada, Facultad de Ciencias.
- Virginia, R. A.** (1990) Desert restoration: The role of woody legume. En: "Environmental Restoration". (J. J. Berger Ed.) pp. 23-30. Island Press. Washington D. C.
- Virginia, R. A. y Jarrel, W. M.** (1987) Approaches for studying the function of deep root systems. En: "Plant response to stress (J. D. Tenhunen, F. M. Catarino, O L. Lange, y W. C. Gechel. Springer, Verlag, Berlin, pp. 107-127.
- Virginia, R. A., Jenkins, M. B. y Jarrel, W. M.** (1986) Depth of root symbiotic occurrence in soil. Biol. Fert. Soils. 2, 127-130.
- Waaland, M. E. y Allen, E. B.** (1987) Relationships between VA mycorrhizal fungi and plant cover following surface mining in wyoming. J. Range Manag. 40, 271-276.
- Walker, C., y Sanders, F. E.** (1986) Taxonomic concepts in the endogonaceae: III the separation of *Scutellospora* gen. nov. from. *Gigaspora* Gerd. and Trappe. Mycotaxon 28, 169-182.
- Warner, A. y Mosse, B.** (1980) Independent spread of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in soil. Trans. Br. Mycol. Soc. 74, 407-410.

- White, J. A., Munn, L. C. y Williams, S. E. (1989) Edaphic and reclamation aspects of vesicular-arbuscular mycorrhizae in Wyoming red desert soils. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 53, 86-90.
- Will, M. E. y Sylvia, D. M. (1990) Interaction of rhizosphere bacteria fertilizer, and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi with sea oats. *Appl. Environ. Microbiol.* 112, 2073-2079
- Williams, S. E., Wollum, A. S. y Aldon, E. J. (1974) Growth of *Atriplex canescens* (pursh) nutt. improved by formation of vesicular arbuscular mycorrhizae. *Soil. Sci. Soc. Amer. Proc.* 38, 362-365.
- Witty, J. F. y Minchin, F. R. (1988) Measurement of nitrogen fixation by the acetylene reduction assay: myths and mysteries. En: "Nitrogen Fixation by Legumes in Mediterranean Agriculture" (Bech, D. P. y Materon, L. A. Eds.) Boston. pp. 331-344.
- Yoneyama, T. (1988) Natural abundance of  $^{15}\text{N}$  in root nodules of pea and broad bean. *J. Plant Physiol.* 132, 59-62.
- Zapata, F. (1990) Isotope techniques in soil fertility and plant nutrition studies. En: "Use of nuclear techniques in studies of soil-plant relationships" (Hardanson, Ed.), IAEA, Viena, pp. 61-128