T. Prov. 23/1

T
17
2

Facultad de Ciencias

UNIVERSIDAD DE GRANADA

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 2/7/99
ENTRADA NUM. 2194

Efecto de microorganismos modificados genéticamente, utilizados como biofertilizantes o bioprotectores, sobre el desarrollo y función de micorrizas arbusculares

UNIVERSIDAD DE GRANADA
28 JUN. 1999
COMISION DE DOCTORADO

María del Mar Vázquez Vázquez

1999

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento 1968705
Nº Copia 2123887x

Efecto de microorganismos modificados genéticamente, utilizados como biofertilizantes o bioprotectores, sobre el desarrollo y función de micorrizas arbusculares

Memoria que presenta la Licenciada en
Biología María del Mar Vázquez Vázquez
para aspirar al Título de Doctor

Fdo: María del Mar Vázquez Vázquez

V° B°

Los Directores

Fdo: D. Jose Miguel Barea Navarro
Doctor en Farmacia
Profesor de Investigación del C.S.I.C.

Fdo: Dª. Rosario Azcón Gonzalez de Aguilar
Doctora en Farmacia
Profesor de Investigación del C.S.I.C.

UNIVERSIDAD DE GRANADA

1999

UNIVERSIDAD DE GRANADA

COMISION DE DOCTORADO

—

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 2/7/99
ENTRADA NUM. 2194

Fecha: 28 de Junio de 1999
Su Refª.
Nuestra Refª.
Fecha de Salida:
Unidad de Origen: COMISIÓN DE DOCTORADO

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Registro General
29 JUN. 1999
SALIDA N.º 8709

Destinatario:

Iltmo. Sr. DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

En cumplimiento del artículo 36 de las Normas Reguladoras de los estudios de Tercer Ciclo de esta Universidad, adjunto se remite un ejemplar de la Tesis Doctoral presentada por el Doctorando Dª.MARIA DEL MAR VAZQUEZ VAZQUEZ titulada EFECTO DE MICROORGANISMOS MODIFICADOS GENETICAMENTE, UTILIZADOS COMO BIOFERTILIZANTES O BIOPROTECTORES, SOBRE EL DESARROLLO Y FUNCION DE MICORRIZAS ARBUSCULARES y dirigida por el Profesor/es Dr/es JOSE MIGUEL BAREA NAVARRO, ROSARIO AZCON GONZALEZ DE AGUILAR con objeto de mantenerla depositada desde el día 28 de Junio de 1999 hasta el día 01 de Septiembre de 1999 para que pueda ser examinada por cualquier Doctor que así lo desee.

Granada, a 28 de Junio de 1999.

EL SECRETARIO DE LA COMISIÓN

DE DOCTORADO

S. W.

UNIVERSIDAD DE GRANADA Comisión de Doctorado

Fdo.: SULTANA WAHNON BENSUSAN
Secretaria de la Comisión de Doctorado

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín (C.S.I.C.), Granada y financiada mediante una beca predoctoral con cargo al Proyecto de Investigación titulado *"Interactions between Microbial inoculants and resident Populations in the rhizosphere of Agronomically important Crops in Typical soils"* dentro del Programa de la Unión Europea BIOTECHNOLOGY, ref: CE: BIO4-CT96-0027.

A *mis padres*
A *mis hermanos*
A Enrique

Indice

INTERES Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION 3

INTRODUCCION 9

1. Sistemas y componentes de la producción en Agricultura 9

1.1. Consideraciones generales 9

1.2. Los productos agroquímicos 10

1.3. Problemática del uso incontrolado de agroquímicos 11

2. Nuevas perspectivas en agricultura: Agricultura sostenible 15

2.1. Conceptos generales 15

2.2. Objetivos de la Agricultura sostenible 16

2.3. Propiedades biológicas del suelo 19

3. Importancia de microorganismos rizosféricos en agricultura 21

3.1. Conceptos generales 21

3.2. Concepto y significado de la rizosfera 22

3.3. Tipos de microorganismos. Inoculantes microbianos 24

3.3.1. Microorganismos patógenos (simbiontes parasíticos) 26

3.3.2. Saprófitos beneficiosos 27

3.3.2.1. Conceptos generales 27

3.3.2.2. Rizobacterias beneficiosas o PGPR 28

a. Efectos beneficiosos de las PGPR: Mecanismos de acción 29

b. Las PGPR y su aplicación en Agricultura 35

3.3.2.3. Hongos beneficiosos 37

a. Mecanismos de acción 38

3.3.3. Simbiontes mutualistas 39

3.3.3.1. Conceptos generales 39

3.3.3.2. Hongos formadores de micorriza: MICORRIZAS 40

a. Conceptos generales y tipos de micorrizas 40

b. Efectos sobre el crecimiento y nutrición de las plantas 44

c. Otros efectos de las micorrizas sobre el desarrollo y salud de las plantas 47

d. Ecología de las micorrizas 49

e. Micorrizas y su aplicación en agricultura 53

3.3.3.3. Bacterias fijadoras de Nitrógeno:

FIJACION DE N 56

a. Conceptos generales 56

b. Fijación simbiótica de Nitrógeno en leguminosas 58

c. FBN en la asociación *Rhizobium*-leguminosa 59

d. Factores limitantes de la FBN simbiótica 62

e. Aplicaciones prácticas de la FBN en agricultura 63

4. Interacciones de las micorrizas con microorganismos rizosféricos 65

5. Biotecnología y Biología molecular aplicada a la obtención de nuevos inoculantes (OMGs) 67

MATERIAL Y METODOS 73

1. Características de los suelos empleados 73

2. Tipos y características de los inoculantes microbianos empleados 73

3. Medios de cultivo 77

3.1. Medio Ty 77

3.2. Medio R&C 78

3.3. Medio YEP 78

3.4. Medio RC (Rojo Congo) 78

3.5. Medio LB (Luria Bertani) 79

3.6. Medio SA (Sacarosa-Asparagina) 79

3.7. Medio S1 79

3.8. Medio PDA (Agar-Patata-Dextrosa) 79

3.9. Medio MYA (Agar-Extracto de Levadura-Extrato de Malta) 79

4. Soluciones 80

4.1. Solución nutritiva Hewitt 80

4.2. Solución Ringers 80

4.3. Soluciones de antibióticos y otros marcadores 81

5. Obtención de inoculantes 81

5.1. *Rhizobium* 81

5.2. Solubilizadores de P (*Enterobacter* sp., *B. subtilis*) 81

5.3. *Azospirillum* 82

5.4. *Pseudomonas* 82

5.5. *Trichoderma* 82

6. Semillas 82

6.1. Tipos de semillas 82

6.2. Esterilización de las semillas 83

6.3. Germinación de las semillas 83

7. Inoculación de microorganismos 83

7.1. Inoculación de micorrizas 83

7.2. Inoculación de bacterias 84

7.3. Inoculación de hongos saprófitos 84

8. Cuantificación de microorganismos en semillas, raíces y suelo rizosférico mediante el método de dilución y recuento en placas 85

8.1. Cuantificación del número de ufc del inoculante/semilla 85

8.2. Recuperación de los inoculantes a partir de raíces 85

8.3. Recuperación de los inoculantes a partir de suelo 87

8.4. Cuantificación del número total de microorganismos (bacterias y hongos) cultivables en suelo 87

9. Obtención de esporas y esporocarpos mediante la técnica del tamizado húmedo y decantación 87

10. Identificación de esporas 88

11. Estudios de biodiversidad de hongos MA 89

12. Ensayo de germinación de esporas de MA *in vitro* 89

12.1. Esterilización de esporas 90

12.2. Medio para cultivo *in vitro* de esporas de MA: Medio Agar-Agua-Mes (AAM) 90

12.3. Germinación de esporas 91

12.4. Desarrollo del micelio 91

12.5. Análisis estadístico de los resultados 92

13. Cuantificación del porcentaje de micorrización 92

13.1. Tinción de raíces 92

13.1.1. *Tinción con azul tripán* (TB) 92

13.1.2. *Tinción vital de succinato dehidrogenasa* (SDH) 93

13.1.3. *Tinción vital de fosfatasa alcalina* (ALP) 93

13.2. Cuantificación del porcentaje de infección 94

14. Determinación de la fijación de N mediante la técnica de la dilución isotópica (^{15}N) 94

15. Determinación de la captación y utilización de P mediante la técnica de la dilución isotópica (^{32}P) 95

16. Valoración de Prolina en hoja 96

17. Determinación de la actividad nitrato reductasa (NR) (EC 1.6.6.1) en hojas y raíces 97

17.1. Extracción del enzima NR 97

17.2. Cuantificación de la actividad NR 97

18. Estudio de la estructura del sistema radical 99

19. Detección de isoenzimas 99

19.1. Extracción de proteínas de los tejidos vegetales 99

19.2. Extracción de proteínas de las esporas de la MA 100

19.3. Extracción de proteínas bacterianas 100

19.4. Determinación del contenido proteico de los distintos extractos obtenidos 101

19.5. Separación de proteínas mediante electroforesis 101

19.6. Detección de las actividades isoenzimáticas: tinción de los geles 102

19.7. Cuantificación de la actividad enzimática 102

20. Determinación de la actividad enzimática del suelo 103

20.1. Determinación de la actividad esterasa 104

20.2. Determinación de las actividades fosfatasa y quitinasa 104

20.3. Deteminación de la actividad trealasa 105

21. Tipos de ensayos realizados 106

21.1. Ensayos en microcosmos bajo condiciones controladas 106

21.2. Ensayos en microcosmos bajo condiciones de campo 106

21.3. Ensayo de campo 107

22. Análisis estadístico de los resultados 108

INTERACCIONES MA-*AZOSPIRILLUM* 111

Introducción 111

Ensayos de interacciones 113

1. Ensayo *in vitro* 113

1.1. Efecto de *A. brasilense* Sp 245 (S) y Sp 245b (MG) sobre la germinación de esporas y desarrollo del micelio de *G. mosseae in vitro* 113

Material y Métodos 113

Resultados 114

2. Ensayos en microcosmos bajo condiciones controladas 116

2.1. Efecto de *A. brasilense* Sp 245 (S) y Sp 245b (MG) sobre la infectividad de *G. mosseae* y el desarrollo del sistema radical de tomate en dos estadíos distintos del ciclo de cultivo (2 y 4 semanas) 116

Material y Métodos 116

Resultados 117

2.2. Efecto de *A. brasilense* Sp 245 (S) y Sp 245b (MG) sobre la infectividad de *G. mosseae*, el desarrollo de la planta y la expresión de determinadas actividades isoenzimáticas en maíz tras 3 y 6 semanas de crecimiento 129

Material y Métodos 129

Resultados 130

3. Ensayos en mesocosmos bajo condiciones de campo 135

3.1. Efecto de distintos inoculantes de *Azospirillum* (*A. brasilense* Sp7, *A. brasilense* Sp245, *A. lipoferum* RG20a, *A. irakense* KBC1) sobre el desarrollo de las plantas y de la micorrización en maíz 135

Material y Métodos 135

Resultados 136

Discusión 140

INTERACCIONES MA-*TRICHODERMA* 149

Introducción 149

Ensayos de interacciones 151

1. Ensayos en microcosmos bajo condiciones controladas 151

1.1. Efecto de la inoculación de hongos formadores de micorrizas arbusculares (*G. mosseae*, *G. deserticola* y endofitos naturales) y hongos del género *Trichoderma* sobre el desarrollo de la planta y la estructura poblacional y actividad microbiana en la rizosfera de plantas de maíz 151

Material y Métodos 151

Resultados 152

2. Ensayos en mesocosmos bajo condiciones de campo 158

2.1. Efecto de distintas cepas de *Trichoderma* (*T. harzianum*: TH1, T4 y T12; *Trichoderma* spp.: N47 y PS2DN) sobre el desarrollo de las plantas y de la micorrización en maíz cultivado en mesocosmos bajo condiciones de campo 158

Material y Métodos 158

Resultados 159

Discusión 162

INTERACCIONES MA-*RHIZOBIUM* 167

Introducción 167

Ensayos de Interacciones 170

1. Ensayos en microcosmos bajo condiciones controladas 170

1.1 Efecto del estrés hídrico y la inoculación combinada de hongos de la micorriza (*G. deserticola* y *G. fasciculatum*) y *Rhizobium meliloti* (S vs. MG), sobre el crecimiento de la planta, la formación y función de la simbiosis 170

Material y Métodos 170

Resultados 171

1.2. Efecto de dosis crecientes de N (0mM, 4 mM, 8mM y 16 mM) y la inoculación combinada micorriza (*G. mosseae* y *G. fasciculatum*)-*Rhizobium meliloti* (GR4) sobre el crecimiento de la planta, la formación y función de la simbiosis 179

Material y Métodos 180

Resultados 182

1.3 Efecto de dosis crecientes de N (0mM, 4 mM, 8mM y 16 mM) y la inoculación combinada micorriza (*G. mosseae*)-*Rhizobium meliloti* (S vs. MG) sobre el crecimiento de la planta, la formación y función de la simbiosis 188

Material y Métodos 188

Resultados 188

1.4. Empleo de técnicas de dilución isotópica (^{32}P y ^{15}N) para evaluar los efectos de la interacción *Rhizobium*-micorriza-solubilizadores de P y la adición de fosfato de roca sobre el crecimiento de la planta, la formación y función de la simbiosis y la adquisición de N y P por *Medicago sativa* 200

Material y Métodos 200

Resultados 201

1.5. Efecto del estrés hídrico y de la inoculación de una cepa de *Rhizobium meliloti* modificada genéticamente sobre las actividades fosfatasa alcalina y succinato dehidrogenasa fúngica en plantas de alfalfa micorrizadas 210

Material y Métodos 210

Resultados 211

Discusión 217

INTERACCIONES MA-*PSEUDOMONAS* 227

Introducción 227

Ensayos de interacciones 228

1. Microcosmos bajo condiciones controladas 228

1.1. Estudio del efecto de *P. fluorescens* F113Rif100 (S) y pAF3Tc50 (MG) sobre el desarrollo de la planta y la formación de micorriza por *G. mosseae*, utilizando como modelo tomate, a dos estadíos del ciclo de cultivo (4 y 8 semanas) 228

Material y Métodos 229

Resultados 230

2. Ensayos en mesosocosmos bajo condiciones de campo 234

2.1. Efecto de distintos inoculantes de *Pseudomonas* (*P. chlororaphis* PCL1391, *P. chlororaphis* W38, *P. fluorescens* WCS365, *P. fluorescens* CHA0 y *P. fluorescens* CHA96) sobre el desarrollo y la micorrización de plantas de tomate cultivado en mesocosmos bajo condiciones de campo 234

Material y Métodos 234

Resultados 235

Discusión 239

ENSAYO DE CAMPO 247

Introducción 247

Ensayos de campo 248

1. Descripción de la parcela experimental 248

2. Muestreos previos a la utilización de inoculantes: Estudios de homogeneidad de la parcela 249

Material y Métodos 249

Resultados 251

3. Efecto del uso de inoculantes de *Pseudomonas fluorescens* (S vs. MG) y prácticas agrícolas normales sobre la cosecha de plantas de maíz y sobre la estructura y función de hongos de la MA y poblaciones de bacterias en rizosfera de dichas plantas 258

Material y Métodos 258

Resultados 261

4. Efecto del uso de inoculantes de *Pseudomonas fluorescens* (S vs. GM) y *Rhizobium leguminosarum* (S vs. MG) y prácticas agrícolas normales sobre las poblaciones naturales de hongos de la micorriza en rizosfera de veza en condiciones de campo 267

Material y Métodos 267

Discusión 269

CONCLUSIONES 275

BIBLIOGRAFIA 279

Interés y Objetivos del Trabajo

Interés y Objetivos del Trabajo

En las últimas décadas se han utilizado unas prácticas de cultivo, que se conocen con el nombre de "Agricultura intensiva", basadas en el uso de dosis elevadas de fertilizantes químicos, para incrementar la producción, así como en la aplicación de otros productos agroquímicos tales como fungicidas, plaguicidas y otros fitofármacos, utilizados para proteger a los cultivos frente a plagas y enfermedades. Estas prácticas están siendo reconsideradas en la actualidad dadas las posibles consecuencias negativas sobre la salud humana y el medioambiente, derivadas del uso excesivo de tales productos de síntesis. Es sabido que la aplicación de fertilizantes minerales, especialmente los nitrogenados, puede dar lugar a una contaminación de las aguas subterráneas por exceso de nitratos. Así mismo, la desnitrificación, ocasiona que bajo determinadas condiciones, el fertilizante aplicado dé lugar a compuestos nitrogenados en estado gaseoso que se volatilizan desde el suelo a la atmósfera. Algunos de estos compuestos, como el óxido nitroso, pueden contribuir al efecto invernadero y/o a la destrucción de la capa de ozono.

A la vista de tal problemática, y con el fin de evitar problemas que afecten a la salud y el medioambiente, se ha despertado un gran interés por la búsqueda de nuevas alternativas a la utilización (excesiva) de productos agroquímicos, pero, al mismo tiempo, que aseguren buenas cosechas y la protección sanitaria de los cultivos. Se trata por tanto de promover una agricultura basada en los principios del **desarrollo sostenible**, es decir, un tipo de agricultura que permita preservar la fertilidad del suelo a largo plazo. En este contexto, el uso de microorganismos beneficiosos, aplicados como inoculantes por sus funciones como **biofertilizantes**, **fitoestimuladores** y **agentes de control biológico**, respresenta una atractiva alternativa al uso tradicional de fertilizantes y fitofármacos de síntesis.

Por otro lado, el creciente desarrollo experimentado en el campo de la biotecnología y la genética molecular en los últimos años proporciona nuevas oportunidades y ofrece soluciones a problemas en ámbitos tan diversos como el cuidado de la salud, la producción de alimentos y el control de la contaminación. En particular, las aplicaciones biotecnológicas en producción vegetal son tan variadas que se llega a hablar de una auténtica revolución agrícola. Así, gracias al poder de la ingeniería genética, que permite obtener organismos modificados genéticamente (OMGs) se pretende el desarrollo de cultivos con mayores rendimientos y calidad de la cosecha o cultivos capaces de desarrollarse bajo condiciones ambientales desfavorables.

Los OMGs se definen como organismos en los cuales el material genético ha sido alterado en una forma dirigida que no ocurre de manera natural. Básicamente su construcción se basa en la introducción de caracteres deseables en el organismo mediante la transferencia de material genético (ADN). Esta nueva tecnología conduce al desarrollo de nuevos cultivos que modificados genéticamente (plantas transgénicas) pueden presentar resistencia a plagas y enfermedades, o tolerancia a herbicidas; así como al desarrollo de nuevas cepas de microorganismos que, aplicadas durante la siembra o transplante, pueden ejercer acción protectora frente a patógenos e incrementar el desarrollo de la planta, por lo que puede reducirse de este modo el uso de pesticidas, fungicidas y fertilizantes químicos.

Con la aplicación de estas nuevas tecnologías surgen diversas cuestiones relacionadas con el desarrollo y uso de OMGs en agricultura. Así hay que destacar las consideraciones éticas que conlleva el hecho de manipular la naturaleza, el efecto sobre la biodiversidad (p.e. la introducción de un inoculante microbiano en el suelo para controlar un patógeno vegetal podría tener efectos no deseables sobre otros grupos de microorganismos que pueden estar beneficiando a la planta), así como los

efectos a largo plazo que los OMGs pueden tener sobre el hombre y sobre el ambiente.

Toda esta problemática ha llevado a los gobiernos a regular la liberación de OMGs al medioambiente. De este modo es necesaria la realización de pruebas rigurosas , ensayadas previamente en el laboratorio, para determinar el comportamiento, características e impacto ecólogico en situaciones que simulan el medioambiente, utilizando micro y mesocosmos en condiciones controladas (cámaras de cultivo e invernaderos), antes de ser contrastados en condiciones de campo, que garantize una aplicación segura del producto obtenido biotecnológicamente.

Con tal fin, 17 grupos de investigación de organismos públicos y empresas europeas propusieron al programa BIOTECH de la UE un proyecto de investigación titulado "**I**nteraction bewteen **M**icrobial inoculants and resident **P**opulations in the rhizosphere of **A**gronomically important **C**rops in Typical soils" (IMPACT). El objetivo general de este projecto es analizar el efecto que la introducción de microorganismos (tanto silvestres como modificados genéticamente) puede tener sobre la microbiota (ecología y función) presente en el suelo asociado a raíces de plantas de interés agrícola. El presente estudio queda enmarcado dentro de dicho proyecto de investigación. Concretamente pretende investigar si determinados inoculantes microbianos, incluyendo OMGs, afectan al desarrollo y función de las micorrizas arbusculares, simbiosis beneficiosa microbio-planta de gran interés en el desarrollo y productividad de agrosistemas.

Los hongos formadores de micorriza son uno de los componentes más importantes de las comunidades microbianas del suelo y están presentes en la mayoría de cultivos de interés agrícola (tales como cereales y leguminosas; plantas hortícolas, frutales, etc) donde juegan un papel clave en el ciclo de nutrientes, conservación de la estructura del suelo y salud de la planta. El comportamiento de estos hongos puede

resultar afectado, directa o indirectamente (cambios en la fisiología vegetal), por la presencia de otros microorganismos. Consecuentemente y dada la importancia de esta simbiosis, habrá que garantizar que el uso de microorganismos modificados genéticamente, especialmente los agentes de control biológico productores de sustancias con efecto antifúngico, no va afectar negativamente al hongo responsable de esta asociación.

Así, los objetivos concretos planteados fueron:

1. Analizar el impacto de la aplicación de biofertilizantes (*Rhizobium*), fitoestimuladores (*Azospirillum*) y bioprotectores (*Pseudomonas* y *Trichoderma*) sobre la formación, desarrollo y efectividad de la micorriza arbuscular, es decir, su efecto sobre el desarrollo y la producción vegetal.

2. Evaluar el impacto de la aplicación de biofertilizantes (*Rhizobium*), y bioprotectores (*Pseudomonas*) sobre la diversidad (cambios cuantitativos y cualitativos) en los hongos formadores de la micorriza arbuscular en un suelo agrícola.

3. Estudiar el efecto de una rotación de cultivos sobre la dinámica poblacional de los hongos micorrícicos.

4. Investigar el efecto de la micorriza en el establecimiento de poblaciones de los microorganismos inoculados.

5. Evaluar el efecto de la doble asociación micorriza-*Rhizobium* sobre la captación de nutrientes utilizando técnicas isotópicas (^{15}N o ^{32}P).

Introducción

Introducción

1. Sistemas y componentes de la producción en Agricultura

1.1. Consideraciones generales

Antes de la 2ª Guerra Mundial la forma de aumentar la producción agraria era incrementar la superficie cultivada. Es decir, a medida que crecía la población, más y más terreno se destinaba al cultivo agrícola. Durante este período las cosechas se mantuvieron e incluso mejoraron gracias al uso de abonos orgánicos de origen animal o vegetal, así como a las técnicas de rotación de cultivos.

Esta estrategia expansiva cambia radicalmente tras la 2ª Guerra Mundial. Desde entonces, a nivel global, la productividad agraria ha crecido a una tasa media anual del 2.5%, aproximadamente. Este espectacular incremento no fue debido a una mayor expansión de la superficie cultivable, sino a un aumento importante de la productividad por unidad de superficie, que se logró gracias a un avance impresionante en el desarrollo de nuevas tecnologías que fueron la base de la llamada "revolución verde". Esta se basó en el monocultivo de variedades de alto rendimiento, lo cual favorece la aparición de plagas y enfermedades. Como consecuencia, se produjo un abuso de productos fitosanitarios, y un empleo excesivo de productos fertilizantes químicos obtenidos a través de una alta tecnología. Hoy día llega a hablarse de la "era del abonado químico o mineral".

En la actualidad, hay dos tipos generales de tecnologías para la producción agrícola: (a) agricultura intensiva altamente mecanizada y basada en el uso intensivo del suelo, agua y energía, y (b) agricultura órgano-biológica. El primer tipo de tecnología ha sido la característica de la mayor parte del sistema de producción

agrícola. La escasez, cada vez mayor, de recursos naturales, incluídos los combustibles fósiles no renovables, junto con las elevadas pérdidas netas de nutrientes minerales, materia orgánica, calidad de agua y erosión del suelo, está originando un cambio inevitable hacia el segundo tipo de tecnología en agricultura.

1.2. Los productos agroquímicos

El mercado de los fertilizantes se inicia a finales del siglo pasado con el empleo del superfosfato, que aportó P a suelos que sólo habían recibido las escasas restituciones procedentes del estiércol. A partir de aquí su empleo se consolida y algo más tarde se complementa con el uso del sulfato amónico y el nitrato sódico a los que rápidamente se les une el cloruro potásico y otros varios compuestos nitrogenados. Con el tiempo y el desarrollo de la agroquímica, es decir la agricultura actual basada en el uso de productos químicos (fertilizantes, plaguicidas, herbicidas, bactericidas y fungicidas), aparecen en el mercado nuevos productos. Esta agricultura tuvo en sus comienzos unos rendimientos espectaculares, provocados por los fertilizantes químicos y los restos de materia orgánica que aún contenía el suelo. Sin embargo, con el agotamiento del humus, ha sido necesario reforzar la dosis de fertilizantes, dado que cada vez son menores estos rendimientos. Así, en el caso concreto de España se consume una media de 58 kg/ha de fertilizantes nitrogenados, una cantidad similar a la de la Unión Europea, pero en ciertos lugares de la Comunidad Valenciana se han llegado a usar hasta 1000 kg/ha (Ramos & Varela, 1990). En el caso de biocidas ocurre algo similar, pues la mayoría de ellos se aplican en zonas concretas de cultivos intensivos y aunque se usan de forma estacional, se hace regularmente.

Actualmente existen pocas novedades, y sólo cabe destacar el uso de abonos líquidos adaptados a sistemas de riego localizado, goteo y microaspersión. Es lo que se conoce como fertirrigación, forma más eficiente y económica de aplicación que los sistemas convencionales. Este sistema permite aplicar cantidades adecuadas de agua y

nutrientes según las necesidades de la planta en cada etapa de su desarrollo. La fertirrigación cuando se lleva a cabo de forma correcta evita la contaminación de las aguas subterráneas por exceso de fertilizantes y asegura un abastecimiento continuo de macro y micronutrientes.

En cuanto a los biocidas, hasta 1940 se empleaban productos no específicos frente a un organismo determinado, por ejemplo, fungicidas de amplio espectro como el cloruro de mercurio, el formaldehido y sobre todo, el bromuro de metilo. En los años 60 surge ya una larga lista de compuestos que afectan procesos metabólicos específicos y de mayor efectividad. Pero con el paso del tiempo sólo muy pocas especies, que son regularmente tratadas, no desarrollan niveles significativos de resistencia al producto. Además, en determinadas ocasiones la aplicación de estos productos puede reducir el número o la efectividad de microorganismos antagonistas naturales de los patógenos.

1.3. Problemática del uso incontrolado de agroquímicos

Los agroquímicos pueden ser instrumentos excelentes cuando son correctamente aplicados, pero constituyen un grave peligro cuando son usados indebidamente. Así, pueden aumentar o disminuir la cosecha, la resistencia de las plantas a plagas y enfermedades, la resistencia de las plantas a la sequía y las heladas, pueden mejorar o empeorar el valor nutritivo y la calidad de los productos, la estructura del suelo y su pH, etc. Por tanto, y a pesar de que en un principio se pensó que el uso de productos agroquímicos era la panacea, actualmente es más la problemática que envuelve su uso, que las ventajas que aparentemente se pueden obtener de su utilización.

Las consecuencias que el uso creciente y excesivo de agroquímicos pueden tener sobre el medio y la salud de los seres vivos quedan reflejadas por su influencia sobre los siguientes procesos:

a. Pérdidas de fertilidad y erosión del suelo. Como consecuencia de la utilización de dosis elevadas de abonos químicos inorgánicos, se olvida el papel fundamental de las aportaciones orgánicas. En efecto, el empobrecimiento de las tierras en humus tiene consecuencias negativas sobre la fertilidad, estructura, vida microbiana, etc, en el suelo. La aplicación de fertilizantes hace que la materia orgánica sea mineralizada más rápidamente y el suelo pierde su bioestructura, compactándose, lo que conlleva a una producción insatisfactoria. Realmente, el descenso en los niveles de materia orgánica en las tierras de labor, hace bajar el nivel de la microbiota, cuya pérdida o disminución puede conducir a la mineralización y desertificación del suelo. Como problemas asociaciados cabe citar que este tipo de fertilización puede llevar a la acidificación y salinización del suelo. La degradación de agrosistemas, provocados por el uso intensivo de productos químicos diversos, se manifiesta en la pérdida de la cubierta vegetal, en el descenso de la productividad agrícola y está asociada a cambios en la calidad del suelo (López-Bermúdez & Albaladejo, 1990).

b. Contaminación de los recursos naturales. El agua, el aire y el suelo sufren las consecuencias del empleo indiscriminado y abusivo de fertilizantes. Las aguas, sufren problemas de acumulación de nitratos y fosfatos en las capas superficiales y subterráneas, con pérdida de potabilidad. Existe también el problema de eutrofización de las aguas continentales y zonas costeras, aumentando hasta niveles nocivos los productos orgánicos e inorgánicos derivados de aguas residuales y fertilizantes. Cuando el agua está contaminada, los suelos también lo están, presentando acumulaciones excesivas de elementos minerales y metales pesados. La eliminación de estos contaminantes químicos es muy difícil, a veces imposible. Algunos ejemplos

de contaminación atmosférica, como consecuencia de la fabricación de agroquímicos, aparecen en el sector de los abonos nitrogenados, donde se liberan amoniaco, ácido nítrico, partículas de nitrato amoniacal y urea; y en la fabricación de abonos fosfatados, donde las emisiones de polvo, flúor y la producción de yeso fosfórico son los causantes de problemas.

c. Degradación del medio ambiente. En primer lugar, se pone en peligro la diversidad ecológica de la fauna, flora y microbiota. Tal es el caso de las lombrices, que están desapareciendo del suelo agrícola, de la mortandad de peces en ríos víctimas de vertidos y prácticas contaminantes, así como de la pérdida de multitud de especies de microorganismos presentes en el suelo indispensables para conservar su fertilidad. Del mismo modo, también hay que tener en cuenta la proliferación de variedades resistentes a determinados productos fitosanitarios.

d. Problemas sobre la salud. En muchos agrosistemas los fertilizantes nitrogenados son los más usados, dado que el nitrógeno es el nutriente mineral más demandado por las plantas (en trópicos y en ciertos tipos de suelos es el P), siendo, por tanto, factor limitante de la producción. El ión nitrato es la forma preferentemente absorbida por las plantas, pues al ser poco tóxico para los vegetales (a diferencia de lo que ocurre con el ión amonio), puede circular en mayor concentración por la savia. La desnitrificación del nitrato, efecto especialmente llamativo en condiciones de exceso del ión, constituye una de las principales pérdidas de nitrógeno del sistema suelo-planta. En este proceso se formarán fundamentalmente óxidos de nitrógeno y nitrógeno molecular. El tipo de suelo, la temperatura, el pH y la humedad pueden influenciar la desnitrificación. Los nitratos pueden pasar a nitritos, que constituyen auténticos venenos para el organismo. Uno de los efectos causados por los nitritos es la metahemoglobinemia, donde los nitritos se combinan con la hemoglobina bloqueándose la absorción celular de oxígeno. Si los nitritos se combinan con aminas darán nitrosaminas, compuestos cancerígenos. Por otro lado, los nitratos *per se*

reducen la actividad de la glándula tiroidea y provocan carencia de vitamina A, y al igual que ocurre con los nitritos se pueden combinar con otras sustancias dando lugar a productos cancerígenos (Artigas, 1986). Otros efectos patológicos de los nitratos pueden quedar reflejados en una disminución de las funciones de reproducción, así como en carencias de vitaminas del grupo B. Por otro lado, con el abonado químico se aportan cantidades excesivas de determinados elementos minerales (P, N y K), olvidándose a veces en estas fórmulas de fertilización determinados elementos minoritarios considerados menos importantes o innecesarios. Al mismo tiempo, algunos elementos quedan bloqueados para ser absorbidos por la planta, bien porque los fertilizantes químicos pueden tener efecto quelante, bloqueando micronutrientes como Cu, Mg, Fe y Zn, o bien porque su tasa de solubilización a partir de la roca madre es inferior a la velocidad a la que estos elementos son incorporados a los cultivos. La carencia nutricional hace a la planta más vulnerable a plagas y enfermedades, teniendo que recurrirse a productos fitosanitarios (insecticidas, herbicidas, plaguicidas, fungicidas, etc), cuyos restos entran a formar parte de nuestra alimentación con todas sus consecuencias. Determinados herbicidas y microbicidas o gases desinfectantes tienen propiedades mutagénicas, cancerígenas y teratógenas. Así, los ditiocarbamatos (fungicidas), son poco tóxicos en sí mismos, pero se degradan en etilén-tiourea que, en animales de experimentación, se ha visto que puede incluso provocar episodios cancerígenos (Bellapart, 1988). La persistencia de los pesticidas y herbicidas en la cadena trófica es causa de innumerables problemas sanitarios, siendo, el envenenamiento por los mismos, su principal consecuencia.

e. Alto coste energético en la fabricación de estos productos (especialmente en el caso de los fertilizantes nitrogenados), ya que la mayoría de la energía que se consume proviene de combustibles fósiles (petróleo, gas y carbón fundamentalmente) no renovables y por consiguiente agotables en un futuro. Como ejemplo, la

fabricación de una tonelada de fertilizante nitrogenado requiere la energía equivalente a siete barriles de petróleo.

En resumen, las fuentes de energía disminuyen, el petróleo se agota, aumenta el gasto por la tecnología que los produce y la población crece (6000 millones de habitantes en el año 2000). Luego, ¿cómo se producirán los alimentos en el futuro?.

2. Nuevas perspectivas en agricultura: Agricultura sostenible

2.1. Conceptos generales

Aunque con un alto coste ecológico y económico, la revolución verde logró incrementar la productividad fundamentalmente en los países más desarrollados, sin embargo, en zonas menos desarrolladas, esta agricultura de alto coste energético no produjo beneficios continuados. Baste un ejemplo: en Africa la productividad agraria *per cápita* ha disminuido a un ritmo del 1% anual durante los últimos 20 años (York, 1994).

Diversos organismos internacionales, entre ellos la FAO, adviertieron, ya en los años 70, que los sistemas de producción de alimentos basados en elevadísimos costes energéticos, no son adecuados para países en vías de desarrollo, e incluso a la larga estos sistemas podrían resultan insostenibles, incluso en países más avanzados. Pero no fué hasta los primeros años de la década de los 80 coincidiendo la crisis financiera en el sector agrario de países desarrollados, con el fuerte aumento del precio del petróleo y una influencia, cada vez mayor, de movimientos ecologistas (como consecuencia de toda la problemática anteriormente mencionada), cuando se manifiesta la clara necesidad de replantear las estrategias de producción agraria y de formular los conceptos básicos y operacionales para definir y aplicar una agricultura "diferente". A finales de la década de los 80 se consigue el apoyo oficial a la

necesidad de este cambio creándose programas de investigación y educación de agricultura basado en estrategias alternativas. Como ejemplo, el llamado programa LISA ("low imput sustainable agriculture") (Schaller, 1991).

2.2. Objetivos de la Agricultura sostenible

La agricultura sostenible puede definirse como una manera de cultivar el suelo conservando al máximo la calidad medioambiental. Su consecuencia es la producción de alimentos y fibras usando sistemas que permiten obtener máximos beneficios, de acuerdo con la demanda, de la capacidad productiva inherente de los recursos naturales (Benbrook, 1991). Este tipo de agricultura debe permitir ingresos adecuados a los agricultores y proporcionar a los consumidores alimentos sanos y seguros, así como reducir al mínimo el impacto adverso sobre el medio ambiente.

Las claves de la agricultura sostenible pueden resumirse de la siguiente manera:

a. Incorporación a las prácticas agrícolas la potenciación de procesos naturales tales como el ciclado biogeoquímico de los nutrientes y el aprovechamiento de las relaciones entre organismos beneficiosos y los causantes de plagas y enfermedades. Es decir, combatir actividades patogénicas utilizando enemigos naturales de los agentes perturbadores.

b. Utilización del potencial biológico y genético de las especies animales y vegetales con vista a un incremento en la productividad.

c. Reducción del uso de recursos no renovables o de aquellos cuya utilización suponga un mayor riesgo para el medioambiente o la salud del agricultor y/o los consumidores.

d. Mejorar la relación "distribución de cultivos-potencial productivo-limitaciones físicas del terreno".

e. Producción eficiente y ecomómicamente rentable que permita una integración óptima entre ganadería y agricultura, prevención de enfermedades y la conservación del suelo, el agua, la energía y los recursos biológicos.

El objetivo fundamental de un sistema agrícola sostenible no consiste en una reducción a toda costa del uso de fertilizantes químicos y de fitofármacos, sino la utilización racional de los mismos que permita un aumento de la productividad por unidad de coste de producción y una menor dependencia de productos agroquímicos. No se trata, por tanto, de "Agricultura Biológica Estricta", sino de una estrategia que permita una mejor alimentación, más racional de la población (creciente a nivel mundial), así como de garantizar la calidad del medio ambiente y la disponibilidad de recursos naturales para las generaciones futuras.

Es por ello que en numerosos países se han adoptado diversas medidas para optimizar el uso de fertilizantes, basadas en los llamados "códigos de la buena práctica agrícola", especialmente diseñados para reducir la contaminación del agua por nutrientes minerales y, de forma más generalizada, conseguir una fertilización equilibrada de los cultivos (Soler Rovira *et al.*, 1996). En los casos de plagas y enfermedades se recurre a medios de escasa o nula toxicidad para el hombre y el medio; así se utilizan preparados a base de plantas (insecticidas vegetales) como rotenona, piretrinas, cassia, etc, ciertos fungicidas y, sobre todo la lucha biológica que lleva a cabo la destrucción de parásitos y patógenos a través de sus enemigos antagonistas naturales.

Los fertilizantes a base de residuos (lodos de depuración, "composts" de basura y otros materiales no generados directamente en la explotación agraria), que se están empleando de forma creciente en agricultura, pueden desempeñar también un

papel clave en prácticas dirigidas a una agricultura sostenible. En principio y teniendo en cuenta que gran parte del contenido de materia orgánica de los lodos de depuración de aguas residuales domésticas procede de la alimentación de la población y al igual que los residuos ganaderos tienen su origen en las cosechas, es lógico pensar que el retorno de estos residuos ricos en nutrientes a los propios campos de cultivo sería altamente recomendable. Estos lodos son una fuente rica en materia orgánica, N, P y micronutrientes, lo que permitiría reducir el uso de fertilizantes nitrogenados de síntesis, ahorrando energía, así como disminuir el uso de fertilizantes fosforados, reduciéndose de este modo la explotación de los yacimientos minerales de fosfatos que empiezan a agotarse. Sin embargo, el elevado contenido en metales pesados, policlorobifenilos (PCBs) y otros contaminantes reprensentan un impedimento fundamental para su uso masivo en agricultura, ya que estos elementos pueden afectar entre otros a microorganismos del suelo (McGrath, 1994). En un futuro, la separación de aguas residuales de origen doméstico e industrial, la reducción de metales pesados en productos de uso doméstico y la recogida clasificada de basuras para la elaboración de "composts" de bajo contenido en contaminantes, podrían hacer compatible el uso de fertilizantes procedentes de residuos con una agricultura sostenible.

Por otro lado, durante los últimos 15 años numerosos proyectos de mejora genética se han focalizado en la obtención de variedades más resistentes o tolerantes a factores nutritivos adversos y variedades más eficientes en la absorción y utilización de nutrientes. Una de las dificultades para el futuro uso masivo de estas plantas transgénicas en agricultura sostenible deriva del impacto medioambiental que tales cultivos puedan tener. Actualmente se sabe muy poco acerca de los posibles efectos de la introducción de cultivos transgénicos (organismos nuevos) sobre poblaciones de plantas y microorganismos en los agrosistemas. Por otro lado, aspectos de competitividad, toxicidad potencial de los genes introducidos para los animales y el

hombre, aparición de híbridos y proliferación de "nuevas" malas hierbas resistentes a herbicidas, son algunos problemas cuyo posible alcance está aún por descubrir (Rogers & Parker, 1995).

La manipulación de las propiedades biológicas del suelo mediante rotación de cultivos, ciertas estrategias de laboreo, adición de materia orgánica, solarización, etc, y en particular el uso de microorganismos, tanto en sistemas agrícolas de tipo sostenible como en ecosistemas naturales, tiene un futuro prometedor, basado en la realidad experimental acumulada.

2.3. Propiedades biológicas del suelo

La capacidad que tiene un suelo para proporcionar a las plantas un medio físico que les permita su establecimiento y desarrollo y de suministrarles, en cantidad y forma adecuada, los nutrientes que necesitan para satisfacer sus requerimientos durante toda su existencia, constituye el soporte conceptual de lo que clásicamente se entiende como "fertilidad del suelo" (Pauli, 1967). Entre los principales macrocomponentes que determinan la fertilidad del suelo hay que considerar los de tipo químicos, físicos, climáticos y biológicos, los cuales interaccionan entre sí para dar lugar a procesos que condicionan los ciclos biogeoquímicos de nutrientes minerales y de materia orgánica, la calidad del suelo, etc; por tanto, la dinámica de las relaciones suelo-planta habrá que estudiarla en el contexto de tales interacciones (Barea & Azcón-Aguilar, 1982). Hoy día se acepta el papel clave del componente biológico o microbiota, formada por el conjunto de microorganismos del suelo (algas, bacterias y hongos), junto con los virus y los componentes de la microfauna (amebas, artrópodos, flagelados, nematodos y otros) en la fertilidad de un suelo agrícola o en ecosistemas naturales (Barea *et al.*, 1997).

En efecto, la actividad y diversidad de la microbiota no sólo es un factor clave en la fertilidad del suelo, sino que también lo es en la estabilidad y funcionamiento de los ecosistemas naturales y de los agroecosistemas (Olivares & Barea, 1995; Barea & Olivares, 1998; Barea, 1998). La diversidad microbiana es esencial para garantizar el ciclado de los nutrientes y los procesos de descomposición del material vegetal en cualquier ecosistema terrestre (Jeffries & Barea, 1999). De hecho, la microbiota del suelo lleva a cabo procesos de renovación de la materia orgánica así como diversas funciones ecológicas de gran importancia en el desarrollo de los agroecosistemas, de modo tal, que si esta biodiversidad se pierde, el precio que el sistema tendría que pagar podría resultar muy caro (Altieri, 1994). En cambio, cuando la biodiversidad es restaurada, se reestablecen complejas interacciones entre suelo, planta y microorganismos que pueden resultar beneficiosas para el desarrollo de la planta.

Como se describe posteriormente (Apartado 3), los microorganismos del suelo desempeñan importantes funciones que repercuten en la nutrición y salud de la planta. Hoy día se conoce el enorme potencial de los microorganismos en diversos campos de la agricultura: ciclado de la materia orgánica; ciclos biogeoquímicos de los nutrientes, incluyendo la fijación biológica de nitrógeno; como agentes de biocontrol de enfermedades de plantas; mejora de la estructura del suelo mediante la formación de agregados, etc. Si se considera que la microbiota del suelo es un recurso natural renovable y se tienen en cuenta las funciones que los microorganismos son capaces de desarrollar en los sistemas suelo-planta, se deduce la trascendencia de éstos en el desarrollo sostenido de sistemas agrarios o forestales. En efecto, hoy se acepta que la sostenibilidad, tanto de ecosistemas naturales como de agroecosistemas, depende del equilibrio entre los componentes biológicos del suelo (Kennedy & Smith, 1995). Por ello, la tendencia actual de investigación en microbiología (biotecnología) del suelo se orienta al estudio de los microorganismos que colonizan las interfases suelo-planta desde el punto de vista ecológico, genético, bioquímico y fisiológico, y sus

repercusiones en la nutrición y protección de las plantas, así como su contribución a una productividad sostenida con el mínimo deterioro del medio ambiente.

3. Importancia de microorganismos rizosféricos en agricultura

3.1. Conceptos generales

Las partículas minerales y orgánicas del suelo se asocian para formar agregados, constituyendo un entramado de materia que queda inmerso en las llamadas fase gaseosa (atmósfera del suelo) y fase líquida (solución acuosa del suelo). Este conjunto es, en teoría, un hábitat favorable para los microorganismos, de hecho, tanto en la superficie de las partículas, como en el interior de los agregados, o bien asociados a las raíces de las plantas se han detectado una amplia variedad de microorganismos viables (Glick, 1995; Lynch, 1990), entre los que se incluyen bacterias, hongos, algas, nematodos y protozoos. Existen decenas de millones de organismos viables y cultivables por gramo de suelo (Lynch, 1990), existiendo también microorganismos viables pero no cultivables, que actualmente están siendo considerados en cuanto a su significado y función.

En el suelo, los microorganismos desarrollan una amplia gama de acciones que inciden en el desarrollo y nutrición vegetal, aún cuando la disponibilidad de nutrientes asimilables, particularmente la de sustratos carbonados metabolizables, puede ser limitante para la actividad de la microbiota (Bowen, 1980). No obstante, la funcionalidad de los organismos del suelo puede ser manipulada, como se verá posteriormente (Apartado 5), para permitir que se expresen de forma eficaz determinadas actividades, provocando diversos procesos que inciden en la productividad de los sistemas agrícolas.

3.2. Concepto y significado de la rizosfera

La población de microorganismos del suelo está en un equilibrio inestable. Cuando se introduce una planta, ésta suministra sustrato energético al suelo y la situación de los microorganismos cambia drásticamente, además la raíz constituye un sistema dinámico donde la formación de nuevas raíces y la muerte y descomposición de otras viejas ocurre de manera contínua. De esta forma, se desarrolla la llamada "rizosfera" (zona del suelo influenciada por la presencia de raíces) que constituye un microcosmos donde proliferan los microorganismos estimulados por el denominado "efecto rizosférico" (Hiltner, 1904). Generalmente se acepta que la causa primaria de este efecto rizosférico es la presencia de compuestos solubles e insolubles liberados (exudados) por células vivas o muertas de la raíz que son sustrato para la microbiota. También constituirán sustrato para los microorganismos los detritos, mucílagos, lisados y secreciones. Dentro de los exudados radicales se encuentran compuestos difundibles solubles en agua, y otros volátiles, así como compuestos no difusibles. De todos ellos, los que parecen más importantes desde el punto de vista funcional son los exudados solubles, pero las sustancias volátiles pueden ejercer la función de mensajeros, al ser capaz de moverse considerables distancias (varios centímetros en el suelo), y más rápidamente de lo que lo hacen los compuestos solubles en agua. Esto es de gran importancia ya que los microorganismos pueden ser estimulados por señales de la planta lejos de la superficie radical. Tanto el sistema radical de la planta como el suelo rizósferico a él asociado constituyen una zona de intensos cambios y actividades, y va a ser en esta zona donde ocurra la mayor parte del ciclado de nutrientes en suelo.

Así, en la rizosfera existe una considerable densidad poblacional de microorganismos, pudiendo alcanzar valores superiores a 10^9 células por cm^3, dándose los valores máximos por lo general en la rizoplana o superficie radical, existiendo un gradiente poblacional de pendiente regular que se extiende a unos pocos

milímetros de la raíz, llegando a densidades del orden de 10-100 veces inferiores a la encontrada en la rizosfera. Por lo general entre un 7-15% de la rizoplana está cubierta por microorganismos (Weller & Thomashow, 1994), los cuales se encuentran agrupados en microcolonias en sitios donde los nutrientes son más abundantes. Esta proporción puede resultar modificada en el caso de raíces con asociaciones simbióticas tales como las micorrizas.

Finalmente hay que considerar los microorganismos que colonizan la propia raíz (endofitos), tanto beneficiosos como patógenos. Las acciones que desarrollan los microorganismos en la rizosfera y que resultan beneficiosos para el sistema suelo-planta pueden resumirse de la manera siguiente:

a. Producción de sustancias fitoactivas (**fitoestimuladores**): hormonas, vitaminas y otras sustancias, que estimulan la germinación de las semillas y el enraizamiento.

b. Intervención de los microorganismos (**biofertilizantes**) en ciclos biogeoquímicos de nutrientes en los que ocurren fenómenos tales como fijación de N, solubilización (movilización) de elementos minerales, mineralización de nutrientes integrados en compuestos orgánicos, captación de nutrientes solubles, etc, lo que incrementa el suministro y disponibilidad de nutrientes para la planta.

c. Formación de agregados estables, mejorando la estructura del suelo y con ello la capacidad de retención de agua.

d. Desarrollo de fenómenos de antagonismo microbio-microbio (**agentes de control biológico**).

e. Eliminación de productos o residuos xenobióticos tales como detergentes, pesticidas, fungicidas, herbicidas (**bioremediadores**).

f. Incremento de la tolerancia del vegetal a salinidad, sequía, metales pesados, etc, (**mejoradores ecofisiológicos**), que en definitiva permiten proteger a la planta frente a estreses bióticos y abióticos.

3.3. Tipos de microorganismos. Inoculantes microbianos

Las actividades metabólicas de las poblaciones microbianas, estimuladas en la rizosfera tanto desde el punto de vista cuantitativo como cualitativo, son de vital importancia para el desarrollo de las plantas (Barea & Olivares, 1998). Así, desde el punto de vista de la interacción microbio-planta, los microorganismos se pueden dividir en saprófitos, simbiontes parasíticos o patógenos y simbiontes mutualistas o simbiontes por antonomasia.

Mientras los simbiontes parasíticos o patógenos son los principales causantes de enfermedades en plantas, los organismos saprófitos desempeñan un papel clave en la transformación de la materia orgánica del suelo. Dentro de este grupo se encuentran las llamadas PGPR, acrónimo en inglés de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de la Planta (Kloepper, 1992; Glick, 1995) que como se discute posteriormente, desempeñan funciones de gran interés en términos de agricultura sostenible, tales como control biológico de patógenos, solubilización y movilización de fosfatos, fijación de N_2 y fitoestimulación, al facilitar la emergencia o el enraizamiento.

Entre los microorganismos simbiontes mutualistas destacan los hongos de la micorriza y las bacterias simbióticas fijadoras de N_2 (*Rhizobium*, *Frankia* y cianobacterias), que como las PGPR también son suceptibles de aplicación práctica (Requena, 1996), lo cual implicará la formulación de preparados basados en tales organismos que pueden resultar beneficiosos para el sistema suelo-planta, es decir, implicará el uso de los denominados "inoculantes".

Las modificaciones introducidas por el hombre en el sector agrícola (monocultivo, aplicación descontrolada de fertilizantes, tratamientos con pesticidas y herbicidas) han llevado consigo una pérdida de la diversidad, número y/o actividad de los propágulos microbianos en los suelos (Kennedy & Smith, 1995). En estos casos, como en aquellos en los que se trata de recuperar suelos marginales, la introducción de inoculantes microbianos puede resultar útil para el desarrollo de la planta, hablándose de "fertilización biológica".

Los primeros inoculantes bacterianos usados en agricultura fueron a base de bacterias fijadoras de nitrógeno o solubilizadores de P. Estos trabajos se iniciaron en Rusia a mediados del presente siglo (Mishustin & Naumova, 1962; Mishustin, 1963). En esa misma época Brown *et al.* (1964) y Rovira (1963) establecen que algunos *Pseudomonas* y otras bacterias rizosféricas como *Azotobacter* también pueden aumentar el crecimiento vegetal. En las últimas dos décadas se ha demostrado que varios grupos bacterianos pueden resultar beneficiosos para las plantas; entre estos se encuentran los agentes de control biológico (Weller, 1988; Kloepper, 1992; O'Gara *et al.*, 1994; Barea *et al.*, 1998), otras PGPR (Kloepper *et al.*, 1991), bacterias que aumentan la cosecha o YIB (Mei *et al.*, 1990; Piao *et al.*, 1992; Tang, 1994) y algunas especies de *Azospirillum* (Bashan & Levanony, 1990), habiéndose propuesto como base de inoculantes (Bashan, 1998).

Actualmente se está reuniendo un cúmulo importante de datos a nivel genético, bioquímico, fisiológico, ecológico, etc, sobre inoculantes microbianos, que permita preveer unos resultados óptimos de su uso a escala productiva. Sin embargo, siempre existirán factores que no son controlables a escala agrícola y que pueden afectar al posible éxito del inoculante, como son la temperatura, la lluvia, la difusión de O_2, y principalmente problemas de competitividad entre los organismos introducidos y la población autóctona del suelo (Dowling & Broughton, 1986). En efecto, para que un organismo sea efectivo debe establecerse en un elevado número

en la rizosfera de la planta inoculada, y deberán mantener los niveles de colonización durante la fase en la que los microorganismos ejercen la acción para la cual fueron aplicados. Por tanto es muy importante cuantificar la colonización radical por el microorganismo introducido enfocado a una mejora en la producción vegetal, ya sea a través de una promoción del crecimiento, o bien a través de control biológico de la enfermedad.

Las técnicas basadas en el uso de isótopos estables (^{15}N, ^{13}C) o radioactivos (^{32}P) son metodologías de interés para estudiar la respuesta de las plantas a los biofertilizantes y a situaciones de estrés ambiental (Barea & Olivares, 1998).

3.3.1. Microorganismos patógenos (simbiontes parasíticos)

Se sabe que determinadas bacterias del suelo resultan patogénicas para la planta, entre ellas las demoninadas DRB acrónimo en inglés de "deleterious rhizobacteria" (Nehl *et al.*, 1996). Sin embargo, la mayoría de enfermedades de los vegetales que tienen importantes repercusiones agronómicas son causadas por hongos, fundamentalmente especies pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Phytophthora*, *Gaeumanomyces*, *Thielaviopsis*, *Sclerotium*, *Verticillium*, *Aphanomyces*, *Pythium* y *Rhizoctonia*, o por nematodos tales como *Rotylenchus*, *Pratylenchus*, *Meloidogyne*, etc.

Estos organismos, sobre todo los hongos, producen graves efectos en plantas cultivadas; así los daños que se producen tras una micosis se deben principalmente a una sustracción de materia, una alteración de los tejidos, originada por la secreción de enzimas del patógeno que degradan paredes celulares, y muy especialmente, a la producción de productos metabólicos tóxicos.

Si bien, hasta hace no muchos años, el principal medio para combatir y evitar los daños causados por este tipo de microorganismos era la aplicación de fungicidas y

otros biocidas, actualmente se tiende a la búsqueda de soluciones alternativas que eviten tanto el deterioro del medio ambiente como problemas en la salud asociados con el uso de estas sustancias. Surge entonces el concepto de "control biológico de enfermedades", que implica el manejo racional y dirigido de microorganismos apropiados, componentes comunes de los agrosistemas, para proteger a la planta frente al ataque de bacterias, hongos, nematodos, etc (Linderman, 1994; Cook *et al.*, 1995; Azcón-Aguilar & Barea, 1996). Se trata de microorganismos rizosféricos capaces de ejercer algún tipo de antagonismo (como se discute en los Apartados 3.3.2. y 3.3.3.) sobre otros microorganismos patógenos de la planta, lo cual beneficia indirectamente el desarrollo de ésta a través de la protección de su estado sanitario. Así, tanto bacterias (*Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp.) como hongos (*Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp.) han sido ensayados con éxito como agentes de control biológico frente a hongos del suelo patógenos de plantas (Elliott & Lynch, 1995; O'Gara *et al.*, 1994).

3.3.2. Saprófitos beneficiosos

3.3.2.1. Conceptos generales

Los organismos saprófitos son aquellos que utilizan compuestos orgánicos procedentes de residuos animales, vegetales o microbianos como fuente de energía y esqueletos carbonados (Bowen, 1980). Dentro de este grupo se encuentran fundamentalmente bacterias y hongos que intervienen en procesos tan importantes como la descomposición de materia orgánica procedente de restos vegetales o animales, constituyendo un eslabón importante en el ciclo de la materia, de aquí que sean muy útiles en la purificación del agua en las llamadas "fosas sépticas", y en la preparación de "composts" para usarlos posteriormente como enmienda agrícola

(Vassileva *et al.*, 1998). También desempeñan un papel importante en los procesos implicados en la formación de humus, carbón y petróleo.

A pesar de la importancia que tiene la intervención de estos microorganismos en los procesos anteriormente citados, el presente estudio se va a centrar sólamente en sus efectos sobre el crecimiento, desarrollo y salud de las plantas, aspectos considerados, desde hace ya algún tiempo, de gran relevancia.

3.3.2.2. Rizobacterias beneficiosas o PGPR

El término PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Kloepper *et al.*, 1989) se usa para describir bacterias colonizadoras "agresivas" de la raíz que pueden resultar beneficiosas para las plantas y por tanto ser usadas como inoculantes. También han sido denominadas YIB (Yield Increasing Bacteria) (Mei *et al.*, 1990; Piao *et al.*, 1992; Tang, 1994). Se trata de bacterias que aunque viven de forma libre en el suelo, colonizan masivamente la rizosfera, donde mantienen poblaciones de individuos a un nivel elevado que permite su efectividad (Kloepper *et al.*, 1991; Linderman, 1992). En el proceso de colonización la bacteria es atraída quimiotácticamente a la rizosfera por los exudados radicales para posteriormente unirse a la superficie radical. Algunas bacterias, generalmente *Azospirillum* spp., pueden incluso llegar a penetrar en la raíz y colonizar los espacios intercelulares, aunque no forman estructuras especializadas como ocurre en el caso de la asociación *Rhizobium*-leguminosa.

Dentro de este grupo se encuentrar especies pertenecientes a los géneros *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacteria*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Xanthomonas*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Burkholderia* y *Bacillus* (Kloepper *et al.*, 1989; Bashan & Levanony, 1990; Okon & Labandera-González, 1994; Tang, 1994). Las bacterias

de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* se podrían considerar dentro de este grupo, entendiéndose, además, que estas pueden actuar como PGPR cuando no forman simbiosis con leguminosas.

De todos los microorganismos que colonizan la rizoplana y la rizosfera, los más comunes son las bacterias Gram-negativas, y de todas ellas parece que los *Pseudomonas* fluorescentes son las dominantes, probablemente debido a su gran versatilidad metabólica (Bolton *et al*., 1993), que contribuye a su competitividad, al igual que lo hace la capacidad de quimiotaxis y adherencia a raíces en el caso de *Azospirillum* (Vande Broek & Vanderleyden, 1995). Esta bacteria Gram-negativa es muy abundante en suelo y a su vez colonizador general de raíces, mostrando una baja especificidad por un hospedador determinado, y que incrementa el desarrollo de cereales y otros cultivos (Bashan & Holguin, 1997). En resumen, bacterias de los géneros *Azospirillum* y *Pseudomonas* han sido las más extensamente estudias por sus efectos como promotoras del crecimiento vegetal.

a. Efectos beneficiosos de las PGPR: Mecanismos de acción

Los efectos más apreciados de las PGPR se basan en la producción de compuestos biológicamente activos tales como hormonas, agentes quelantes, sideróforos, enzimas, vitaminas, etc, que son ocasionalmente antagonistas de patógenos de plantas o bien están implicados en ciclos de nutrientes, como los fijadores de N y los solubilizadores de P, o en la transformación de la materia orgánica (Kloepper *et al*., 1991; Kloepper, 1992; Glick, 1995).

Las PGPR pueden afectar al crecimiento vegetal, bien de forma directa mediante el suministro de determinados compuestos a la planta, o facilitando la captación de nutrientes (fundamentalmente *Azospirillum* spp.) , o bien pueden actuar de forma indirecta evitando los efectos deletéreos de uno o más organismos

fitopatógenos (fundamentalmente *Pseudomonas* spp.), de ahí que actualmente se tienda a clasificar o dividir a las PGPR en dos grupos: "PGPB" (Plant Growth Promoting Bacteria) y "Biocontrol-PGPB" (Bashan & Holguin, 1998). El cambio del término "PGPR" por "PGPB" se debe a que muchas bacterias que ejercen efectos beneficiosos sobre la planta no son rizobacterias. Bashan y Levanony (1990) defienden la actuacción conjunta de varios de los mecanismos, siendo los mecanismos individuales menos importantes si operan de manera aislada.

Mecanismos indirectos

Aunque como mecanismos implicados en el control biológico son "mecanismos directos", dichas actividades pueden considerarse "mecanismos indirectos" en cuanto a beneficiar el crecimiento y desarrollo de las plantas:

- *Producción de sideróforos*. El hierro es un nutriente esencial para la mayoría de los microorganismos, y probablemente el único que es prácticamente insoluble en ambientes aerobios a pH neutro (Neilands, 1984), de modo que la cantidad de Fe disponible en el suelo puede resultar demasiado baja para soportar el crecimiento microbiano. Así, determinados microorganismos (fundamentalmente *Pseudomonas*) secretan compuestos de bajo peso molecular con gran afinidad por el Fe^{3+} (sideróforos), lo quelan, lo transportan dentro de sus estructuras celulares y lo utilizan para su propio crecimiento (Briat, 1992). De esta forma el nutriente no está disponible para otros microorganismos, lo que puede resultar efectivo para prevenir la proliferación de cualquier patógeno que pudiera encontrarse próximo (O'Sullivan & O'Gara, 1992). Al contrario de lo que ocurre con los fitopatógenos, las plantas no se afectan por ese agotamiento localizado de Fe (O'Sullivan & O'Gara, 1992). La capacidad de un sideróforo para actuar como supresor efectivo del ataque o enfermedad dependerá de la planta, del fitopatógeno a suprimir, de la composición del suelo, de la bacteria que sintetiza el sideróforo y de la afinidad del sideróforo por

Fe. Por estas razones, aunque una PGPR resulte efectiva bajo condiciones controladas de laboratorio, sus resultados en campo son difíciles de predecir (Glick, 1995).

- *Producción de antibióticos* (Weller, 1988; Keel *et al.*, 1992; Handelsman & Stabb, 1996). Es el mecanismo más común de biocontrol. El principal grupo de productores de antibióticos en la rizosfera lo constituyen los *Pseudomonas* fluorescentes, considerándose éstas bacterias como agentes altamente efectivos en la supresión de la enfermedad por fitopatógenos. Este mecanismo es especialmente significativo en el caso de cepas que, como se comenta posteriomente (Apartado 5) han sido modificadas genéticamente para sobreproducir el antibiótico (fenacina, pioluteorina, 2,4-diacetilfluoroglucinol, etc.) resultando la protección frente a la enfermedad o ataque por patógeno más efectiva que con la cepa salvaje (Maurhofer *et al.*, 1992; Schnider *et al.*, 1994). La inhibición del crecimiento de muchos patógenos de origen fúngico se ha demostrado en gran número de ensayos *in vitro*, aunque aproximadamente sólo un 5% de las cepas que muestran antibiosis *in vitro* promueven el crecimiento de la planta (Nehl *et al.*, 1996). La gran variedad de antibióticos producidos por PGPR no van a ejercer su efecto frente a todos los tipos de patógenos rizosféricos conocidos (Handelsman & Stabb, 1996), por lo que no se puede considerar a la producción de antibióticos como el único mecanismo o factor en control biológico.

- *Síntesis de ácido cianhídrico* (CNH) (Kloepper, 1993). La propia bacteria productora es resistente a este producto. El papel de este compuesto en la supresión de la enfermedad no parece estar firmemente establecido (Voisard *et al.*, 1989; Glick, 1995). Su toxicidad parece radicar en la capacidad de formar complejos estables con iones metálicos divalentes, pudiendo llegar a inhibir fuertemente entre otros a la citocromo C oxidasa (Way *et al.*, 1988).

- *Hidrólisis de ácido fusárico* (Toyoda & Utsumi, 1991), compuesto causante de los daños producidos por el ataque de *Fusarium*.

- *Síntesis de enzimas que hidrolizan las paredes celulares de hongos*. Caben destacar la quitinasa y laminarinasa (Lim *et al*., 1991) y la ß-1,3-glucanasa (Fridlender *et al*., 1993).

- *Competición por nutrientes y sitios de infección en la superficie de la raíz* (O'Sullivan & O'Gara, 1992). Al parecer es el mecanismo responsable de un pequeño o moderado grado de supresión de la enfermedad por muchas PGPR.

- *Inducción de resistencia sistémica en la planta* (Tuzun & Kloepper, 1994). Está basado en la activación de la síntesis de algunos metabolitos antipatogénicos en la planta, que se expresan a distancia del sitio de indución y de forma generalizada. Es un mecanismo que no implica interacción directa entre la PGPR y el patógeno.

- *Cambios en las poblaciones rizosféricas*. Ello puede estimular el número de antagonistas frente a un patógeno.

Mecanismos directos

- *Fijación de N atmosférico por bacterias de vida libre*. Fué el primer mecanismo propuesto para explicar los beneficios de la inoculación de ciertas bacterias rizosféricas. Posteriormente, se ha visto que el aporte de N es limitado e insuficiente para paliar las propias necesidades de las bacterias y el suministro posterior a la planta (Hong *et al*., 1991). La eficiencia de la fijación de esta asociación no es muy grande (en el caso de *Azotobacter* se requieren 100 kg de glucosa/kg N fijado), a menos que existan suficientes sustratos hidrocarbonados disponibles para obtener energía. Pero en el mejor de los casos, no se llegan a superar unos cientos de gramos de N fijado por ha y año frente a 300 kg/ha/año atribuidos a la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Por otro lado, el nitrógeno fijado en vida libre no es

directamente utilizable por las plantas, ya que forma parte de la célula fijadora, y sólo a su muerte y lisis entrará dentro del proceso de mineralización correspondiente. Tal complejidad sugiere que deben existir mecanismos adicionales que permitan explicar los incrementos en cosecha observados tras una inoculación con bacterias diazotrofas, grupo en el que se encuentran especies pertenecientes a los géneros *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas* y otros.

- *Síntesis de sideróforos que pueden solubilizar y secuestrar Fe del suelo*, para facilitarlo posteriormente a las raíces (Wang *et al*., 1993). Aunque esta actividad puede beneficiar la nutrición de la planta, en la mayoría de los casos el efecto es probablemente pequeño.

- *Producción de fitohormonas* (Okon & Kapulnik, 1986; Michiels *et al*., 1989; Glick, 1995; Bashan & Holguin, 1997), sustancias que pueden estimular el crecimiento en distintos estadíos del desarrollo vegetal. Este es el mecanismo más usado para explicar los efectos de las PGPR sobre la planta. De todas las fitohormonas las auxinas, y más concretamente el ácido indolacético (AIA) es el más común y mejor caracterizado, y parece ser responsable de un mayor desarrollo de plantas inoculadas (Patten & Glick, 1996). Estas sustancias son también sintetizadas por la planta, por lo que es necesario distinguir entre éstas y las producidas por la bacteria. En este sentido, para evaluar los efectos de una PGPR será útil realizar estudios comparativos entre cepas silvestres y otras modificadas genéticamente que, o bien hayan perdido la capacidad de producción de la fitohormona, o bien sean sobreproductoras. El crecimiento de la planta puede verse afectado por la cantidad de AIA que la PGPR secrete, y la respuesta puede variar de una planta a otra (Dubeikovsky *et al*., 1993). A veces los efectos observados no se deben a la producción de hormonas por la bacteria en sí misma, sino que es la propia planta la que los produce en respuesta a la colonización radical por la bacteria (Zimmer *et al*., 1988). En cualquiera de los casos, la producción de fitohormonas va a conducir a un

mayor desarrollo de la raíz, lo que a su vez puede facilitar la captación de nutrientes minerales, lo que redunda en beneficio de la planta. Un beneficio especial que la producción de AIA puede tener sobre el desarrollo de la planta se manifiesta en las leguminosas, ya que las fitohormonas producidas por *Azospirillum* promueven la diferenciación de las células epidermicas de los pelos radicales, con lo cual se aumenta el números de sitios suceptibles de infección por *Rhizobium* (Yahalom *et al.*, 1990; Andreeva *et al.*, 1993). La auxina AIA no parece ejercer ningún papel significativo en la fisiología de la bacteria, sugiriéndose que la producción y excrección de AIA al medio es una forma de reducir niveles tóxicos de Triptófano, precursor inmediato en la biosíntesis de AIA (Bar & Okon, 1992). Otro mecanismo, hasta hace poco insospechado para la promoción del crecimiento, se basa en la producción de etilieno. Así se ha visto que algunas PGPR contienen el enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa (Jacobson *et al.*, 1994), capaz de hidrolizar el ACC, precursor inmediato de la biosíntesis de etileno en plantas. Parece ser que este mecanismo de producción de hormonas tiene mayores efectos sobre el crecimiento de la planta que los pequeños incrementos mediados por el aumento de la disponibilidad en N y P.

- *Solubilización de minerales* que aportan nutrientes, como el P (Toro *et al.*, 1997; 1998). Es un mecanismo que hace a los nutrientes accesibles para su captación por las raíces. Dentro de este grupo se encuentran especies pertenecientes a los géneros *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, etc.

- *Síntesis de compuestos de bajo peso molecular o enzimas* que modulen el crecimiento y desarrollo de la planta (Kloepper *et al.*, 1989; Glick *et al.*, 1994). Estas sustancias son secretadas por la bacteria, transfiriéndolas a la planta, y una vez que cruzan la pared celular y son reconocidas por las membranas de la planta, se desencadenan una serie de procesos que en definitiva conllevarán a una alteración del metabolismo de la planta, pudiendo actuar a nivel metabólico disminuyendo los

niveles de respiración en plantas inoculadas, o aumentando actividades enzimáticas relacionadas con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, (Michiels *et al*., 1989), la glicolisis, la síntesis de aminoácidos aromáticos, etc. Por otro lado, pueden producir una mejora del nivel hídrico de la planta, probablemente debido a que mejoran la extracción de humedad del suelo, muy importante en condiciones de sequía, por lo que las plantas inoculadas presentan mayor potencial hídrico en hoja y mayor conductancia estomatal y transpiración (Sarig *et al*., 1988; Michiels *et al*., 1989).

b. Las PGPR y su aplicación en Agricultura

Basado en la variedad de mecanismos de acción detectados, las PGPR son potenciales agentes de control biológico para muchos patógenos del suelo causantes de enfermedades en plantas (Kloepper, 1992), o bien, agentes biofertilizantes y fitoestimuladores. Sin embargo, aún existen muchos impedimentos para una amplia comerzalización y uso de PGPR. Así, aunque en pruebas en laboratorio e invernadero se han detectado resultados reproducibles y efectivos del uso de PGPR, los efectos en campo pueden variar mucho en función de una amplia gama de factores, tanto bióticos como abióticos. En efecto, son numerosos los factores que pueden contribuir al éxito o no de la inoculación de una PGPR dadas las complejas interacciones entre el hospedador, la bacteria, el ambiente y la posible presencia de un patógeno. Uno de los principales factores determinante del éxito parece venir condicionado por la capacidad colonizadora de la bacteria. Si la bacteria permanece libre en el suelo sin unirse a la superficie radical, las sustancias que excreta difunden en la rizosfera, siendo utilizadas por microorganismos nutricionalmente muy versátiles, antes de alcanzar la planta. Por el contrario, si las células bacterianas se encuentran unidas a la raíz, las sustancias secretadas difundirán entre los espacios intercelulares de la corteza radical, beneficiando a la planta, además, la adhesión evitaría el lavado de la bacteria de la rizosfera, y al ocupar potenciales sitios de colonización hace a la planta menos

vulnerable al ataque de patógenos (Bashan & Holguin, 1997). Por otro lado, la correlación entre colonización-efecto beneficioso de la PGPR se ha demostrado, sólo en unos pocos casos, que sea significativa (Schippers *et al.*, 1987; Weller, 1988; Parke, 1990; Bull *et al.*, 1991). En efecto, el nivel de población requerido para observar los efectos beneficiosos de la PGPR no está bien definido para la mayoría de los casos. Otro factor importante vendrá determinado por la capacidad de producción de metabolitos secundarios (que dependerá de las condiciones ambientales) relacionados con los efectos de la PGPR, y la funcionalidad de los mismos, ya que para ser efectivos, por ejemplo en control biológico, debe coincidir producción de metabolitos con el período en el cual la planta es suceptible o vulnerable al ataque por patógenos (Weller & Thomashow, 1994). Es más, elevadas concentraciones de ciertos metabolitos pueden resultar también fitotóxicas (Shanahan, 1992).

La primera generación de inoculantes PGPR está siendo introducida lentamente y a pequeña escala en el mercado agrícola (Fages, 1992; Okon & Lavandera-González, 1994; Tang, 1994; Bashan, 1998). El principal factor limitante de su uso a gran escala es la inconsistencia e impredicibilidad de los resultados hasta ahora obtenidos, deficiencias que se hacen patentes desde los primeros días tras la inoculación y que desaniman a su uso comercial. La evaluación de datos experimentales obtenidos durante 20 años (Bashan & Holguin, 1997), muestra resultados positivos en un 60-70% de los casos, con incrementos de cosecha de entre el 5-30%. Al parecer, el principal factor responsable del éxito de la inoculación es la cuidadosa aplicación de células viables y el control de las condiciones experimentales (Okon & Labandera-González, 1994), situaciones muy difíciles de mantener en producciones agrícolas. Sin una solución práctica adecuada es muy difícil que podamos aplicar en estos momentos inoculantes basados en PGPR a gran escala, aunque se prospera en aspectos prácticos para lograr dicha aplicación.

Por otro lado, si se pretende usar estos inoculantes a escala agronómica, hay que tener en cuenta las prácticas agrícolas habituales, que podrían tener efectos negativos sobre la aplicación de este tipo de organismos. Así la aplicación de determinados herbicidas, insecticidas y fungicidas pueden ejercer un efecto negativo sobre el desarrollo y función de los inoculantes aplicados. La toxicidad va a variar dependiendo del tipo de producto (los insecticidas en general parecen resultar menos tóxicos), de la dosis aplicada y de la bacteria en cuestión (Bashan & Holguin, 1997).

Hasta ahora los inoculantes preparados se basan en el encapsulamiento de células vivas en pellets de alginato, que aunque con el tiempo se reduce la viabilidad de la gran mayoría de células originales, permanece un número que parece suficiente como para servir de inoculante (Paul *et al.*, 1993). Otros tipos de inoculantes se basan en la utilización de turba y cultivos líquidos que no han resultado demasiado eficientes. Así pues, el desarrollo de nuevos vehículos como portadores de las bacterias parece ser uno de los principales objetivos en este campo (Carrillo & Bashan, 1997; Bashan, 1998).

3.3.2.3. Hongos beneficiosos

Los hongos saprófitos son componentes comunes e importantes de la rizosfera, debido principalmente a la gran cantidad de biomasa microbiana que aportan al suelo. Presentan un denso empaquetamiento de la biomasa ocupando un mínimo espacio libre alrededor de la raíz, lo que efectivamente es insufienciente para que algunos hongos puedan acceder a la raíz. La importancia de estos hongos radica en el papel que desempeñan en la descomposición de materia orgánica, y en algunos casos están implicados en complejas interacciones donde la antibiosis, la fungistasis y el micoparasitismo pueden tener lugar (Jeffries, 1997). *Trichoderma* y *Gliocladium* son hongos saprofíticos frecuentemente encontrados en suelos y que han mostrado capacidad como agentes de control biológico frente a otros hongos causantes de

enfermedades en raíces, y gracias a la capacidad de interaccionar con estos mediante los mecanismos anteriormente señalados, han dado como resultado una mejora del crecimiento vegetal (Baker, 1989; Datnoff *et al.*, 1995). Numerosas especies de *Trichoderma* han resultado ser eficientes antagonistas frente a una amplia variedad de patógenos vegetales presentes en el suelo, entre los que podemos incluir *Verticillum* spp. (Calvet *et al.*, 1992), los hongos de la marchitez (Trillas-Gay *et al.*, 1986) y los hongos causantes del "damping-off" (Kwok *et al.*, 1987), entre otros.

a. Mecanismos de acción

La inhibición de la colonización o de ataque por hongos patógenos puede ser ejercida bien de forma directa, lo que implica la interacción entre los dos hongos (micoparasitismo y producción de compuestos antimicrobianos), o bien de forma indirecta mediante la inducción de mecanismos de defensa en la planta (Wyss *et al.*, 1992; Jeffries, 1997).

Mecanismos directos

- *Producción de sustancias antimicrobianas.* Entre ellas cabe destacar la producción de antibióticos estructuralmente complejos como la gliovirina y la gliotoxina (Howell *et al.*, 1993).

-*Micoparasitismo.* Muchos *Trichoderma* son capaces de parasitar hongos patógenos de plantas. El parásito extiende hifas alrededor del otro hongo, se enrolla a él y se une formando una especie de apresorio y perfora su micelio (Goldman *et al.*, 1994; Jeffries, 1997). La digestión de las paredes celulares del hongo va acompañada de la excreción de una batería enzimática, donde se incluyen proteasas, quitinasas y glucanasas. Para evaluar el papel que ejercen cada uno de estos compuestos en control biológico es necesario disponer de mutantes carentes de dichas actividades, pero en este caso es muy difícil, ya que algunas especies pueden contener varias

isoformas de un mismo enzima, como es el caso de *T. harzianum* (una de las especies más estudiadas), que produce al menos tres quitinasas distintas (de la Cruz *et al.*, 1992), así como enzimas proteolíticos y glucanolíticos.

Un ejemplo muy significativo de micoparasitismo es el descrito recientemente por Rousseau *et al.* (1996), donde *Trichoderma* es capaz de proliferar sobre esporas de hongos de la micorriza, penetrar a través de su pared celular mediante una hidrólisis parcial de los polímeros de la misma, y proliferar activamente dentro de ella para posteriormente salir a través de las hifas moribundas.

Mecanismos indirectos

Se basan fundamentalmente en la inducción de mecanismos de defensa de la planta, cuyas respuestas más generalizadas se traducen en modificaciones de su pared celular para restringir la infección por patógenos, aumento en la producción de metabolitos secundarios de carácter antimicrobiano, como las fitoalexinas o sus precursores, y acumulación de proteínas o enzimas relacionadas con la defensa (Pathogenic Related Proteins) como son las glucanasas y quitinasas. Este tipo de reacciones son las mismas que se desencadenarían tras el ataque o invasión por cualquier patógeno (Kombrink & Somssich, 1995).

3.3.3. Simbiontes mutualistas

3.3.3.1. Conceptos generales

Se trata de microorganismos que colonizan las raíces de plantas donde encuentran sustratos carbonados que utilizan para su nutrición, a cambio, benefician el desarrollo y nutrición de la planta aportándoles nutrientes minerales, o bien en determinadas ocasiones aparecen implicados en otros procesos no relacionados con la nutrición. A veces, en el caso de este tipo de asociaciones se llega a un grado de

especialización tal, que existe obligatoriedad e interdependencia, y aún cuando ambos componentes de la simbiosis (microsimbionte y macrosimbionte o fitobionte), puedan vivir separados, determinadas actividades fisiológicas sólo van a poder llevarse a cabo en simbiosis. Las simbiosis mutualistas más importantes son las responsables de la fijación biológica del nitrógeno y las micorrizas, tal como se describe en los apartados siguientes.

3.3.3.2. Hongos formadores de micorriza

Son el componente microsimbiótico de las asociaciones denominadas "Micorrizas". Por ser éste aspecto clave del presente trabajo, se les dedica un estudio especial dentro de este capítulo de *Introducción.*

MICORRIZAS

a. Conceptos generales y tipos de micorrizas

La inmensa mayoría de plantas que crecen sobre la corteza terrestre viven asociadas, en forma de simbiosis mutualista, a ciertos hongos del suelo dándo lugar a las llamadas micorrizas. Sólo en unas pocas familias botánicas hay especies que no forman micorrizas. Los ejemplos más significativos de especies no micorrizables los tenemos dentro de las Ciperáceas, Crucíferas y Quenopodiáceas.

La universalidad de esta simbiosis implica una gran diversidad taxonómica. Existen diferencias considerables en la morfología y fisiología de las micorrizas, lo que permite clasificarlas en 7 tipos diferentes: micorrizas arbusculares (MA), ectomicorrizas, arbutoides, ericoides, orquidoides, monotropoides y ectendomicorrizas (Harley & Smith, 1983), siendo las micorrizas arbusculares las propias de plantas de interés agronómico y de las de tipo arbustivo y herbáceo de los

ecosistemas naturales. Law y Lewis (1983) estimaron que el número de especies vegetales capaces de formar micorrizas arbusculares es aproximadamente 225000 (pertenecientes a 11000 géneros), en cambio el número de especies del hongo micorrícico (clase Zigomicotina, orden Glomales), se sitúa en torno a unas 150 repartidas en sólo 6 géneros: *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Scutellospora* y *Sclerocystis*. Incluso se duda si esta última ha de ser considerada o no en la clasificación (Morton & Bentivenga, 1994). La clasificación actual de los hongos formadores de la MA se basa en las características morfológicas de sus esporas, aunque hoy se sabe que aislados morfológicamente idénticos pueden ser distintos (Sanders *et al.*, 1996). De hecho, análisis de isoenzimas revelan que las diferencias ocurren no sólo a nivel de especies, sino también de aislados (Hepper *et al.*, 1988b; Rosendahl *et al.*, 1994).

La simbiosis se inicia con la germinación de las esporas del hongo, o bien a partir de otras formas de propágulos tales como fragmentos radicales colonizados presentes en el suelo procedentes de cultivos anteriores, siendo este tipo de propágulos los más agresivos a la hora de colonizar nuevas raíces (Barea *et al.*, 1991). Cuando el hongo alcanza la rizosfera se estimula su desarrollo, y cuando conecta con una raíz suceptible de ser micorrizada, se produce un engrosamiento de las hifas y se forman los llamados "apresorios" que dan lugar a "puntos de entrada" del hongo en la raíz. El hongo coloniza la corteza radical, llegando a ser parte integrante de dicho órgano, donde forma estructuras intracelulares especializadas como son los ovillos ("coils") formados por enrollamiento de sus hifas, las "vesículas", consideradas estructuras de almacenamiento y que sólo aparecen en determinados tipos de MA, y los "arbúsculos", estructuras intercelulares en forma de arborescente situadas en la parte del córtex más próxima al cilindro vascular. Los arbúsculos se originan por ramificaciones dicotómicas repetidas de la hifa fúngica, siempre envueltas por el plasmalema de la célula vegetal. Dado que a nivel del arbúsculo la pared del hongo es

prácticamente inexistente, se "crea" una estructura de doble membrana donde tiene lugar el intercambio de metabolitos entre ambos componentes de la simbiosis (Smith & Gianinazzi-Pearson, 1988; Barea *et al.*, 1997; Barea & Olivares, 1998; Azcón-Aguilar *et al.*, 1999). El hongo, suministra a la planta los nutrientes que ha captado del suelo, mientras que la planta a cambio cede al hongo fotosintatos. Es obvio que cualquier factor que afecte a la fotosíntesis puede afectar al desarrollo de la micorriza. Las hifas del hongo desarrollan un extenso micelio externo en el suelo, colonizando y explorando de forma más eficaz que las raíces los microhábitats del mismo, y a modo de sistema radical complementario, ayuda a la planta a captar nutrientes minerales y agua del suelo, siendo su función más crítica para los nutrientes poco móviles, particularmente fosfato, amonio y algunos micronutrientes. De hecho, esta simbiosis se considera la parte metabólicamente más activa de los órganos de adquisición de nutrientes por las plantas. Un factor importante que determina la efectividad del hongo en cuanto a aumentar el crecimiento de la planta será la capacidad de éste para desarrollar una gran cantidad de micelio externo, característica que es inherente al endofito en cuestión (Dodd, 1994). Determinados compuestos liberados por las raíces de la planta parecen afectar el establecimiento de la asociación actuando sobre estadíos de pre-colonización, tales como germinación de las esporas, tasa y dirección de crecimiento del tubo de germinación hacia la raíz de un hospedador, desarrollo y ramificación de la hifa, etc (Koske & Gemma, 1992; Giovannetti *et al.*, 1996; Azcón-Aguilar *et al.*, 1999).

Los hongos formadores de la micorriza son simbiontes obligados, es decir, no completan su ciclo vital a menos que colonizen la raíz de una planta. En principio se pensó que los hongos MA no eran capaces de desarrollarse en medio de cultivo debido a deficiencias bioquímicas o a un bloqueo metabólico. Hoy, a pesar que existen evidencias que demuestran la existencia de un sistema metabólico funcional, está claro que las esporas del hongo no portan los factores biológicos necesarios para

mantener un crecimiento contínuo a menos que formen parte de una relación simbiótica con las raíces de una planta. La ausencia de estos factores hace que se den fenómenos de autolisis en los tubos de germinación en condiciones axénicas (Bago *et al.*, 1998). Una de las hipótesis más aceptadas para explicar la incapacidad de los hongos MA para desarrollarse *in vitro* es la basada en el hecho de que sólo una estructura absorbente activa intraradical (probablemente el arbúsculo) sería capaz de intercambiar nutrientes gracias a su estructura y permeabilidad, su equipo enzimático para el transporte de nutrientes y/o el ambiente físico-químico en el que se ha desarrollado. Ninguna de estas peculiaridades es reproducible i*n vitro*.

En esta simbiosis no existe especificidad, en el sentido estricto del término, por lo que una misma planta puede ser colonizada por varias especies del hongo, y un mismo hongo colonizar distintas especies vegetales, aunque los resultados de cada colonización van a variar en cuanto a eficacia, lo que sugiere una gran variación funcional entre especies de macro y microsimbiontes. El tamaño, nivel de crecimiento, geometría y distribución del sistema radical, la extensión de la red de micelio externo, el recambio de arbúsculos, el funcionamiento fisiológico de la simbiosis, etc, varían en función de la combinación hongo-planta, por lo que se habla de "compatibilidad funcional" (Gianinazzi-Pearson, 1984), concepto que relaciona compatibilidad de las partes asociadas con efectividad simbiótica. Por otro lado, la infectividad y efectividad de cada endofito parecen ser mayores en el suelo del cual se han aislado, al que se hallan perfectamente adaptados (Adelman & Morton, 1986; Henkel *et al.*, 1989; Weinbaum *et al.*, 1996). Cuando las plantas crecen en hábitats donde más de un hongo micorrícico está presente (situación normal en la naturaleza), pueden surgir fenómenos de competitividad, pudiendo, en algunos casos, la colonización inicial de un hongo reducir la colonización por otros e incluso llegar a inhibirla totalmente (Sanders *et al.*, 1999).

b. Efecto de las micorrizas en el crecimiento y nutrición de las plantas

El efecto de las micorrizas más ampliamente descrito es aquel sobre el crecimiento, desarrollo y nutrición de las plantas. Hay mucha información publicada que indica que la micorrización puede aumentar el desarrollo de las plantas, gracias a que provocan un incremento en la capacidad de captación de nutrientes del suelo, lo que resulta en una mejora de la nutrición mineral. Este efecto es atribuible principalmente a un incremento en la captación de P del suelo.

Entre un 95-99% del P en suelo se encuentra en forma no disponible para las plantas (Bieleski, 1973). Los iones fosfato además de encontrarse en muy baja concentración difunden muy lentamente al estar formando parte de compuestos insolubles, ligados a Ca, Fe o Al, o adsorbidos a coloides del suelo. Una vez que el ión fosfato llega a la superficie de la raíz, las plantas lo toman mucho más rápido de lo que estos iones pueden difundir hacia la superficie radical. Consecuentemente, se desarrollan zonas de agotamiento de P alrededor de los órganos de absorción de la planta. La micorriza arbuscular puede aumentar la captación de P gracias a la capacidad del hongo para (a) incrementar los sitios de absorción de P, al explorar la red de micelio externo mucho más volumen de suelo; (b) transportar los iones fosfato a través del micelio desde relativamente grandes distancias y, (c) transferir el nutriente a la planta en las células corticales de la raíz a través de los arbúsculos (Gianinazzi-Pearson & Azcón-Aguilar, 1991). El P es transportado a las estructuras internas del hongo en forma de gránulos de polifosfatos contenidos en el interior de vacuolas, contribuyendo al almacenamiento de este elemento (Gianinazzi-Pearson & Azcón-Aguilar, 1991; Barea *et al.*, 1993). También se ha descrito actividad fosfatasa alcalina específica de la micorriza (Gianinazzi-Pearson & Gianinazzi, 1983; 1986; Gianinazzi-Pearson & Azcón-Aguilar, 1991), sugiriéndose que estas fosfatasas pueden jugar un papel clave en la translocación activa y/o mecanismos de transferencia de P en las MA. Hoy día existe evidencia genética de su existencia

(Harrison et al., 1998). Así, cuando la disponibilidad de P limita el crecimiento y reproducción de la planta, la micorriza puede ejercer un papel importante a la hora de salvar esta deficiencia. Algunas especies vegetales son más dependientes del P que otras para su desarrollo (Huenneke *et al.*, 1990), esto, junto a dificultades de las especies inherentes a las características del sistema radical, hacen que la respuesta a la micorriza varie en función de la planta, lo que condiciona el concepto de "dependencia de la planta a la micorriza" (Gerdemann, 1975), que es el grado en el que una planta depende de la micorriza para producir su máximo nivel de crecimiento o cosecha a un nivel dado de fertilidad del suelo. Aquellas especies que muestran un gran grado de dificultad y necesidad para conseguir P, serán las que respondan más favorablemente a la micorrización. En general, las plantas con un sistema radical con raíces tróficas de diámetro inferior a 0.5 mm y carentes de pelos radicales serán las más dependientes de la micorriza (Baylis, 1972).

Por otro lado, las MA han mostrado ser capaces de influir en la captación de N del suelo (Barea *et al.*, 1991; Johansen *et al.*, 1992; Tobar *et al.*, 1994; Ibijbijen *et al.*, 1996), aunque no ha sido demostrado que muestren preferencia por alguna forma determinada de N (Azcón *et al.*, 1992). Dado que el ión nitrato es muy móvil, rara vez se forman zonas de agotamiento de nitratos, por lo que se pensó que la micorriza jugaría un papel más importante cuando en la nutrición nitrogenada el amonio, que es relativamente inmóvil, fuera la fuente de N dominante (Gianinazzi-Pearson & Azcón-Aguilar, 1991). Pero actualmente se ha demostrado la capacidad del micelio fúngico para captar NO_3^-, particularmente en condiciones de baja difusibilidad (escasez de agua) (Tobar *et al.*, 1994b). La actividad enzimática responsable de su asimilación (NR) también se incrementa en plantas micorrizadas (Ruíz-Lozano & Azcón, 1996; Azcón & Tobar, 1998). Recientemente se han encontrado evidencias genéticas que identifican NR de origen fúngico (Kaldorf *et al.*, 1994). El N puede ser transportado vía hifa de la micorriza de una planta a otra planta (Frey & Schüepp, 1993), o captado

por la hifa de la micorriza de una planta no leguminosa cuando es excretado a la rizosfera por una planta leguminosa, procedente de la fijación (Jeffries & Barea, 1999), lo que resulta interesante a la hora de mejorar la producción de cultivos mixtos. Pero la función de la micorriza en el ciclo del N no debe ser entendida exclusivamente como captación de N y transporte del mismo a través de sus hifas, sino que debe considerarse también en el proceso dinámico que resulta de la inmobilización temporal del N en su biomasa y posterior mineralización en las fases de descomposición del micelio. Además, las poblaciones de microorganismos implicados en el ciclado de N en el suelo (amonificantes, nitrificantes, desnitrificantes, etc) son influenciados como consecuencia de la micorrización (Amora *et al*., 1998).

El efecto de la micorriza sobre la captación de otros nutrientes es difícil de evaluar, no pudiéndose saber si se trata de un efecto directo o bien indirecto, mediado por la mejor captación de P. Aún así se ha descrito un aumento en la concentración de Zn y Cu en tejidos vegetales de plantas micorrizadas (Thompson, 1990; Kothari *et al*., 1990) así como en la captación de Fe (Rai, 1988) y Mg (Arines & Vilariño, 1989).

La micorriza no sólo incrementa la biomasa vegetal, sino que también influye en la partición del material entre parte aérea y raíces. El aumento en la captación de nutrientes y su subsecuente translocación a la parte aérea de la planta hace que se incremente relativamente la utilización de fotosintatos en la misma, por lo que la cantidad de fotosintatos transferidos a raíces es relativamente menor. En consecuencia la relación peso de raíz/parte aérea es generalmente más baja en plantas micorrizadas, comparativamente con sus respectivos controles no micorrizados (Smith, 1980; Azcón-Aguilar & Barea, 1997).

También han sido descritos efectos adversos de la micorriza sobre el crecimiento de la planta (Smith, 1980; Barea & Azcón-Aguilar, 1983). En algunos

casos esta depresión es meramente transitoria, causada por una competición entre el hongo y la planta por los fotosintetizados disponibles en estadíos tempranos de la colonización, o bajo condiciones fotosintéticas subóptimas (baja temperatura, baja luz, etc), ya que el hongo viene a consumir entre 10-20% de los fotosintatos producidos por la planta (Jakobsen & Rosendahl, 1990). Pueden ocurrir depresiones persistentes cuando la concentración de P tanto en los tejidos de la planta como en suelo es muy elevada, de modo que la planta no necesita la actividad del hongo, y a cambio, tiene que mantenerlo, como a un patógeno biotrofo.

c. Otros efectos de las micorrizas sobre el desarrollo y salud de las plantas

Aparte de los efectos de las micorrizas sobre la nutrición de las plantas, también se ha descrito que esta simbiosis juega un papel destacado en otros aspectos de la vida de las plantas. Entre estos:

- Contribuyen a mejorar la estructura del suelo participando en la formación de agregados hidroestables (Barea & Olivares, 1998; Wring & Upadhyaya, 1998). En este proceso, como en otros que ocurren en la naturaleza, todos los componentes bióticos interactúan en la formación de su matriz abiótica. Mientras que cada microorganismo del suelo tiene un papel en la formación de la estructura del mismo, los hongos y los actinomicetos filamentosos han mostrado ser los más efectivos en la formación de agregados (Harris *et al.*, 1966). La contribución de las hifas de la micorriza a la formación de agregados puede quedar resumida de la siguiente forma (Miller & Jastrow, 1994): a) crecimiento de las hifas en el suelo, creando un esqueleto al cual se unen las primeras partículas; b) las raíces e hifas crean las condiciones físicas y químicas para la producción de un material orgánico amorfo al cual se unirán las partículas; c) este material favorece la unión de microagregados para terminar formando macroagregados, merced a la cooperación de las hifas de la micorriza y a la acción cementante de los productos de origen microbiano (mucílagos, polisacáridos)

y vegetal. Estos agregados, almacén de C y nutrientes (Cambardella & Elliott, 1993; 1994), constituyen un microhábitat para otros microorganismos del suelo (Foster, 1994). La formación de estos agregados es un proceso muy importante en suelos erosionados y degradados.

- Cambios en el estado fisiológico y hormonal de la planta (Azcón-Aguilar & Bago, 1994; Smith *et al.*, 1994). Se ha descrito la capacidad de estos hongos para sintetizar fitohormonas tales como auxinas, giberelinas y citoquinas *in vitro* (Gianinazzi-Pearson & Azcón-Aguilar, 1991), y otras sustancias que pueden alterar la morfología y fisiología de la raíz (Schellenbaum *et al.*, 1991; Atkinson *et al.*, 1994; Berta *et al.*, 1995). Como resultado, se produce una modificación en la composición de los exudados radicales, lo que da lugar a la llamada "micorrizosfera" o zona de la rizosfera bajo la influencia de la micorriza (Linderman, 1988). En la micorrizosfera la población microbiana difiere de la que se desarrolla en la propia rizosfera, no sólo cuantitativamente, sino cualitativamente (Azcón-Aguilar & Barea, 1992; Linderman, 1992; Barea, 1997; Andrade *et al.*, 1997; 1998a; 1998b; Amora-Lazcano *et al.*, 1998). En el Apartado 4 de esta introducción se amplia este aspecto de relaciones rizosféricas.

- Incremento de resistencia/tolerancia a estreses abióticos. Tal es el caso de la tolerancia al estrés hídrico de las plantas micorrizadas. Se ha sugerido que la actividad de la MA en este sentido puede ser ejercida por alteración de los siguientes factores: potencial hídrico en hoja, nivel de fotosíntesis, conductancia en los estomas, mecanismos hormonales u otra serie de cambios fisiológicos, e incluso se ha llegado a sugerir que este efecto se debe a que la micorriza ayuda a captar nutrientes de baja movilidad, cuya difusión es aún mucho más baja en condiciones de sequía (Barea *et al.*, 1993). Algunos estudios (Hardie, 1985; Ruíz-Lozano & Azcón, 1995) han comprobado la capacidad del micelio fúngico para la captación directa de agua del medio. Otro tipo de estrés que la micorriza ayuda a superar es el estrés salino. El

exceso de Na y Cl en las capas arables de suelos agrícolas como consecuencia de la aplicación de fertilizantes interfiere con la absorción de nitratos y fosfatos, así como cambian los niveles de absorción de Ca y Mg (Barea *et al.*, 1993). Por último las micorrizas contribuyen a mitigar la toxicidad de metales pesados (Weisennhorn *et al.*, 1995; Díaz *et al.*, 1996), al parecer mediante la formación de complejos y precipitados con los mismos (Barea *et al.*, 1993).

- Control biológico de patógenos del sistema radical. Este efecto puede ser ejercido por los siguientes mecanismos: mejora de la nutrición de la planta, compensación de daños, competición por los fotosintetizados, competición por sitios de colonización/infección, producción de cambios morfológicos y anatómicos en el sistema radical e inducción de cambios en las poblaciones microbianas de la micorrizosfera (Linderman, 1994; Azcón-Aguilar & Barea, 1996) así como por una activación de mecanismos de defensa de la planta (Gianinazzi-Pearson, 1996; Pozo *et al.*, 1998; 1999).

UNIVERSIDAD DE GRANADA
2 8 JUN. 1999
COMISION DE DOCTORADO

d. Ecología de las micorrizas

Los hongos formadores de la MA están presentes prácticamente en todos los suelos, pero sus niveles poblacionales pueden variar en función de las condiciones ecológicas y por las prácticas agronómicas (Gavito & Miller, 1998), como son una elevada fertilización y tratamientos con biocidas.

Se hace difícil llegar a conclusiones firmes que permitan explicar el efecto de los distintos factores ambientales sobre las poblaciones de micorrizas arbusculares (Brundrett, 1991). Esto se debe a: a) la gran diversidad de factores implicados, los cuales rara vez actúan de manera independiente; b) muchos de los estudios para ver el efecto del ambiente se centran en procesos individuales del ciclo vital del hongo, y no suelen considerar interacciones entre procesos; c) la capacidad del hongo para

adaptarse a un amplio rango de ambientes, característica que a su vez permite su distribución mundial, el desarrollo de distintos ecotipos y probablemente su diferente comportamiento, y d) problemas para cuantificar el número y actividad de propágulos compatibles en un determinado sistema suelo-planta, y también la dificultad para valorar la cantidad de micelio externo y distinguir que cantidad del mismo es funcionalmente activo. Por otro lado, el hecho de que estos hongos sean simbiontes obligados dificulta aún más el estudio de su ecología.

Los hongos MA se concentran fundamentalmente en las capas más superficiales del suelo o capa arable, a unos 15-20 cm de la superficie, aunque en determinadas circunstancias también pueden aparecer a mayor profundidad (Brundrett, 1991). El número de propágulos no va a depender únicamente de los factores ambientales que a continuación se mencionan, sino que también está sujeto a variaciones de tipo estacional, pudiendo afectarse la micorrización no sólo por el tipo de planta presente, sino también por los ciclos vegetativos de las mismas.

La estructura y diversidad de la comunidad de hongos micorrícicos puede contribuir a la conformación de la comunidad vegetal (Francis & Read, 1994; van der Heijden *et al.*, 1998a; 1998b), del mismo modo que ésta a su vez puede influenciar sobre las poblaciones microbianas; así, Johnson *et al.* (1991) observan que diferentes comunidades de hongos micorrícicos se desarrollan a lo largo del tiempo en función de la planta. Estos resultados sugieren que puede ocurrir alguna preferencia o selectividad de las especies del hongo por determinados hospedadores. La presencia de una planta no hospedadora, el sistema de cultivo (monocultivo, cultivo mixto, rotación de cultivos), períodos de barbecho, etc, afectan a la población de MA tanto cuantitativa como cualitativamente (Harinikumar & Bagyaraj, 1988; Sieverding, 1991).

La aplicación de fertilizantes, práctica habitual en agricultura, tiene efecto sobre el desarrollo y función de las MA. Hay mucha información publicada que muestra que la aplicación de niveles excesivos de fertilizantes fosforados solubles, por lo general disminuye el número de puntos de entrada, el nivel de colonización por el hongo, la cantidad de micelio externo, así como la densidad de arbúsculos (Morton *et al*., 1990; Sieverding, 1991; Barea *et al*., 1993). Este efecto parece ser mediado por el nivel de P en la planta más que por efecto directo de la concentración de P en suelo. Cuando mayor es la concentración de P en la planta, mayor es la utilización de fotosintatos en la parte aérea y menor el contenido de carbohidratos solubles en las raíces y exudados, lo que afecta negativamente la formación de puntos de entrada. En cualquier caso, es difícil generalizar ya que los resultados van a variar dependiendo de las características del suelo, del tipo de planta (que varían en sus requerimientos de P), de la capacidad de las raíces para captar P y del endofito en cuestión (Barea *et al*., 1993). En circunstancias en las cuales deban aplicarse niveles relativamente altos de P, se aconseja el empleo de fertilizantes de lenta liberación, así como la selección de ecotipos tolerantes a niveles altos de P. En este sentido el uso de fosfato de roca podría resultar interesante, ya que podría mantener un "stock" de P en suelo, y además no reduce el nivel de colonización como lo hace el P soluble (Toro, 1996). Por otro lado, la capacidad de la micorriza de cargar y descargar gránulos de polifosfato (Smith & Gianinazzi-Pearson, 1988) puede constituir un mecanismo de regulación de la acumulación de P en formas osmóticamente inactivas, cuando el P se encuentre en exceso, y tranferirlo a la planta cuando ésta lo necesite.

Los fertilizantes nitrogenados también pueden afectar la formación y actividad de la micorriza, pero como en el caso del P, los resultados en campo son impredecibles y dependen del nivel inicial del nutriente en el suelo, así como de la capacidad de adaptación del endofito. Obviamente los efectos de los fertilizantes

NPK serán mucho más complejos y dependerán de multitud de variables (Barea *et al.*, 1993).

Otra práctica agrícola habitual que también podría ejercer efecto sobre la micorriza es la aplicación de biocidas. La información disponible no es concluyente en relación a los efectos que la aplicación de agroquímicos pueden tener sobre el establecimiento y eficiencia de las MA. En general, el empleo de fungicidas es perjudicial para el desarrollo de la micorriza, y en algunos casos puede llegar incluso a eliminar el efecto beneficioso que pueden tener sobre el crecimiento vegetal (Sukarno *et al.*, 1993; 1996; Schreider & Bethlenfalvay, 1997; Fontanet *et al.*, 1998; Sukarno *et al.*, 1998).

Además de los efectos que la aplicación de agroquímicos pueden tener sobre la respuesta de la micorriza, otras prácticas agrícolas, como la intensidad de cultivo, transplantes, aplicación de materia orgánica, rotaciones, períodos de barbecho, riego, contenido en metales pesados, etc, pueden afectar también la actividad, diversidad y distribución de los hongos formadores de la micorriza, pudiendo alterar tanto el número de esporas como la composición de especies (Sieverding, 1991; Johnson & Pfleger, 1992).

El pH del suelo, la temperatura y el régimen hídrico son otros factores que juegan un papel importante en el desarrollo de la asociación entre el hospedador y el hongo. Así, cuando las condiciones ambientales son adversas, el hongo desarrolla mecanismos de resistencia (Tommerup, 1987), la espora no germina, o bien si ya lo ha hecho tiene la capacidad de retraer la hifa de germinación si no encuentra hospedador o si las condiciones para su desarrollo no son adecuadas. Este proceso de interrupción en la germinación puede ocurrir varias veces hasta que las condiciones sean las favorables o exista un hospedador suceptible a la colonización (Koske, 1988).

e. Micorrizas y su aplicación en agricultura

Debido a los efectos beneficiosos, ampliamente descritos, de los hongos de la MA sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas, es obvio el interés despertado por su uso a escala agrícola con el fin de mejorar la producción de los cultivos.

Antes de considerar una aplicación práctica en campo de las micorrizas, hay que tener en cuenta una serie de factores que determinarán el beneficio que la planta puede obtener de la inoculación. Entre ellos: a) grado de dependencia del cultivo a la micorriza, b) nivel de fertilidad del suelo, c) tamaño y efectividad de las poblaciones nativas de micorriza, y d) prácticas culturales (Azcón-Aguilar & Barea, 1997). En general se considera recomendable una aplicación de micorrizas cuando la población indígena de un suelo sea muy baja e incluso inexistente, o bien cuando ésta presente baja efectividad, en cuyo caso el éxito de la inoculación dependerá de los métodos empleados de producción de inóculo, así como de las técnicas de inoculación.

Un paso crítico en el proceso de inoculación será la selección apropiada del hongo, para lo que se propone tener en cuenta como principales aspectos, la efectividad del mismo a la hora de mejorar el crecimiento vegetal y proteger a las plantas frente a patógenos y estreses abióticos (Lovato *et al.*, 1995). Una vez seleccionado el endofito en cuestión, el siguiente paso será la producción a gran escala de inoculante, que por lo general está constituído por esporas, fragmentos de raíces colonizadas e hifas en un sustrato determinado. El material a inocuolar serán semillas, plántulas, esquejes y plantas micropropagadas. Considerando la variabilidad genética tanto de la planta como del hongo, es necesario la realización de bioensayos que determinen la compatibilidad funcional entre ambos simbiontes. Otros factores críticos a considerar serán dosis y tiempo de inoculación.

Al ser las micorrizas simbiontes obligados, sólo pueden completar su ciclo vital en simbiosis con la planta, lo que hace que estos inóculos no sean practicables a

escala agrícola en cultivos arables extensivos, debido a la gran masa de inóculo necesaria, a la dificultad de su obtención y al posible riesgo de contaminación por fitopatógenos, centrándose su aplicación actualmente a cultivos que tienen fase de transplante como práctica habitual, así ocurre en horticultura, cultivo de frutales o reforestación (Barea, 1998).

Los distintos procesos existentes para producción de inóculo, tipo de inoculantes y usos potenciales de los mismos, quedan resumidos en el siguiente esquema (Azcón-Aguilar & Barea, 1997):

Tipo de inóculo	Inóculo basado en suelo	Inóculo basado en otros sustratos distintos de suelo (arcilla expandida, turba, vermiculita, perlita, arena, etc)	Propágulos MA esterilizados en superficie (pellets; cultivos hidropónicos, aeropónicos y de raíces)
Desventajas	- Sustrato indefinido - Voluminoso y pesado - Requiere esterilización del suelo	Control cuidadoso del riego y aplicaciones de fertilizantes	- Requiere tecnología altamente especializada - Relativamente caro
Ventajas	- Puede almacenarse durante meses/años - Util en transplantes	- Pesa menos que el suelo - Composición uniforme - Puede secarse y almacenarse	- Utilización de raíces colonizadas desarrolladas aeropónicamente - Mantenimiento libre de microorganismos extraños - Puede secarse y almacenarse
Aplicaciones	HORTICULTURA Cultivo de frutales SILVICULTURA Matorrales AJARDINAMIENTO	AGRICULTURA Cultivos con fase de siembra HORTICULTURA Floricultura Cultivos vegetales SILVICULTURA Matorrales AJARDINAMIENTO	INVESTIGACION Interacciones planta-hongo HORTICULTURA Micropropagación AJARDINAMIENTO "Hydroseeding"

Algunos de los sistemas de producción de inóculo se han patentado (Gianinazzi *et al*., 1990; Sieverding & Barea, 1991; Mulongoy *et al*., 1992; Jarstfer & Sylvia, 1992; Sylvia & Jarstfer, 1994; Thompson, 1994; Lovato *et al*., 1995), pero el más interesante parece ser el que usa agregados de arcilla expandida como sustrato, al ser un material poroso que permite la fácil separación de las raíces del hospedador y proporcionar un nicho adecuado donde se alojan micelio infectivo y esporas. Los

agregados pueden ser esterilizados en superficie y aplicados a cultivos en campo en pequeñas cantidades (50-150 kg/ha) (Azcón-Aguilar *et al*., 1997).

Hasta ahora han sido varios los intentos de producción de inóculo de MA a escala comercial (Jeffreis & Dodd, 1991; Mulongoy *et al*., 1992; Sylvia & Jarstfer, 1994; Lovato *et al*., 1995). El poco éxito obtenido hasta el momento parece radicar en: a) falta de conocimientos sobre la biología del hongo, b) escasa información en relación a las ventajas de las micorrizas, lo que da como resultado una baja demanda del producto, e incluso muchos consumidores potenciales actualmente aplican prácticas de cultivo que interfieren con el desarrollo y función de las MA, (p.e., aplicación de grandes cantidades de fertilizantes y fungicidas) c) impredicibilidad de resultados (Wood, 1991). La principal limitación que actualmente presenta la comercialización de los inóculos ya existentes radica en toda la problemática legal que la liberación de cualquier microorganismo al medio implica.

3.3.3.3. Bacterias fijadoras de Nitrógeno

Dada la incidencia de estas bacterias en el presente estudio, se dedica un apartado especial al proceso de Fijación de Nitrógeno.

FIJACION DE NITROGENO

a. Conceptos generales

El N es un elemento esencial para la vida. Es la piedra angular de los requerida para la formación de los aminoácidos, bases para la síntesis de péptidos celulares y proteínas, forma parte integral del material genético celular o ácidos nucleicos, así como de importantes componentes biológicos como la quitina y los mucopéptidos.

A pesar de ser el N un elemento mayoritario en el ambiente donde se desarrollan las plantas (representa aproximadamente el 80% de los gases de la atmósfera terrestre), a menudo es factor limitante para su crecimiento, y, en general, el aporte de este elemento, más que el de cualquier otro, es el que limita la productividad de los cultivos a nivel mundial. Debido a ello anualmente se aplican unos 40 millones de toneladas de N como fertilizante para incrementar la productividad. Dada la problemática del uso de fertilizantes, especialmente nitrogenados, junto con la situación actual de crisis energética se hace necesario un mayor aprovechamiento de los recursos órgano-biológicos, así la fijación de N por bacterias supone un aporte a los ecosistemas terrestres de unos 140 millones de toneladas de N, casi el doble de lo que conjuntamente aportan fertilizantes nitrogenados y fijación química.

La Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) es uno de los procesos cruciales dentro del ciclo del N en la naturaleza, y el mecanismo biológico fundamental para la incorporación de N al suelo. El nitrógeno molecular, N_2 o dinitrógeno, no es directamente asimilable por los vegetales que lo utilizan preferentemente como nitrato o amonio. Por FBN se entiende la reducción de este elemento llevada a cabo por numerosos organismos, todos ellos procarióticos, con el concurso de la enzima nitrogenasa. De esta forma el nitrógeno molecular atmosférico es incorporado a la biosfera y utilizado directa o indirectamente por las plantas a través de la fijación simbiótica o libre, respectivamente.

Básicamente, la fijación de N ocurre bien en simbiosis mediante sistemas tales como las asociaciones *Rhizobium*-leguminosa, actinomicetos (*Frankia*) con angiospermas no leguminosas en alrededor de unas 160 especies fundamentalmente de interés ecológico (actinorrizas) y de cianobacterias con ciertos helechos, o bien en sistemas no simbióticos por bacteriaspertenecientes a los géneros *Azotobacter*, *Clostridium*, *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Bacillus*, *Mycobacterium* y *Pseudomonas*.

De todos estos sistemas, el más complejo y eficiente, y por tanto el más estudiado y de mayor interés es la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.

b. Fijación simbiótica de Nitrógeno en leguminosas

Los fijadores simbióticos de nitrógeno reducen su actividad a una única familia de interés agronómico, las leguminosas, con especies implicadas en producción de grano, en pastizales, sistemas agroforestales y en ecosistemas naturales. La familia de las Leguminosas comprende dos subfamilias: Mimosoideas y Papilionoideas, cada una de las cuales contiene géneros capaces de formar nódulos cuando se asocian simbióticamente con microorganismos específicos. Esta capacidad la adquieren a través de una relación simbiótica con bacterias del suelo Gram-negativas que se conocen colectivamente como *Rhizobium*, aunque en realidad existen cuatro géneros de bacterias que viven en simbiosis con las leguminosas: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Sinorhizobium*. Existe una considerable especificidad en la simbiosis, aunque hay especies de *Rhizobium* capaces de nodular especies de plantas diferentes y algunas especies de plantas que pueden ser noduladas por varias especies de bacterias.

Como se ha indicado, *Rhizobium*, es el nombre genérico que se usa cuando se habla de fijación biológica de N en simbiosis. Son bacterias heterótrofas que viven de forma libre en el suelo, particularmente en suelo rizosférico donde son estimuladas por el flujo de C procedente de la raíz de la planta. Esta estimulación no está restringida únicamente a raíces de leguminosas y ocurre bajo un amplio rango de condiciones, aunque la nodulación efectiva sólo se produce con la leguminosa específica.

c. FBN en la asociación Rhizobium-*leguminosa*

La asociación entre la raíz de una leguminosa y *Rhizobium* es iniciada por la leguminosa, la cual envía una señal química (flavonoide especifico) que reconocen las bacterias que se mueven libremente en el suelo. La presencia de *Rhizobium* causa en los pelos radicales una especie de curvamiento o rizo previo a la invasión, y aunque las bacterias pueden infectar las raíces de leguminosas a través de la epidermis mediante heridas producidas, la forma más común de infección es a través de los pelos radicales.

Cuando la infección ocurre a través de pelos radicales, el primer hecho que se aprecia es la elongación y ramificación de los mismos. El período de suceptibilidad a la infección es corto y transcurre durante la curvatura de los pelos. La infección empieza con un proceso de invaginación en el pelo radical. Tal invaginación va a dar lugar a la formación del cordón de infección, por donde *Rhizobium* alcanza el citoplasma de las células corticales. Una vez allí tienen lugar una serie de reacciones enzimáticas que acabarán por romper el cordón, quedando las células libres en el citoplasma de la célula huésped. Cuando el cordón de infección alcanza el córtex de la raíz, las células de éste son estimuladas en su ritmo de división y a partir de ellas se desarrollará el nódulo, aunque sólo un porcentaje relativamente bajo de infecciones darán lugar a nódulos. En el tejido central del nódulo las bacterias se transforman en bacteroides, perdiendo su movilidad y es donde tiene lugar la fijación de nitrógeno. El resto de tejidos (zona no infectada del nódulo) formarán la corteza y un rudimentario sistema vascular que conecta con el floema y xilema de la raíz. Todos estos pasos están gobernados por genes *nod*.

Los bacteroides difieren de las células normales en su morfología, en que poseen alteraciones en los citocromos y otros componentes de la cadena de transporte electrónico y que contienen nitrogenasa activa, enzima responsable, en última instancia, de la reducción del nitrógeno atmosférico hasta NH_4^+ (primer compuesto estable resultante de la reducción del N_2), el cual pasa a la célula hospedadora y del

nódulo al xilema, siendo así transportado para su utilización por la planta. El nitrógeno fijado es translocado a la planta en forma de ureidos o amidas (según el tipo de nódulo, determinado o indeterminado), estando íntimamente ligado a C orgánico.

Para que la nitrogenasa pueda ser activa, los bacteroides han de estar rodeados de una atmósfera microaeróbica y disponer de ATP, iones Mg^{2+} y una fuente de poder reductor. La nitrogenasa no es una enzima específica para N_2, pudiendo reducir otros sustratos distintos, perdiéndose por tanto parte de la energía aportada en estos otros procesos secundarios. La fijación de N en los nódulos de leguminosas es, por tanto, un proceso con alta demanda energética que requiere la transferencia de varios electrones por molécula de N fijada, así como la reducción de varios moles de ATP. Como consecuencia de la inespecifidad anteriormente señalada, se estima que la eficiencia de la simbiosis va de 6 a 12 kg de carbohidratos por kg de N fijado (Barea & Olivares, 1998).

En la simbiosis la planta envuelve a los bacteroides mediante la denominada membrana peribacteroidal para que puedan cubrirse y vivir aisladas en el interior de las células del nódulo. La planta además suministra al nódulo los fotosintatos necesarios en forma de energía (ATP), para que la fijación de nitrogeno pueda realizarse.

El desarrollo y función de los nódulos implica la expresión de proteínas específicas llamadas nodulinas. Algunas de ellas se sintetizan antes del comienzo de la fijación de nitrógeno (nodulinas tempranas), mientras que otras se sintetizan al finalizar el proceso (nodulinas tardías). Dentro de estas últimas se encuentra la leghemoglobina, proteína mayoritaria del nódulo que regula la concentración de oxígeno en las células infectadas, siendo éste el sistema de protección de la nitrogenasa, y a ella se debe el color rojizo de los nódulos efectivos.

El nitrógeno fijado mediante este proceso es en parte devuelto al suelo a través de compuestos exudados de los nódulos, y a través de la descomposición de raíces, quedando disponible este elemento para el siguiente cultivo.

La fijación simbiótica de N puede determinarse a través de distintos métodos: a) evaluación del número de nódulos y biomasa (indicativo); b) determinación de la concentración de leghemoglobina en nódulos (estimativo) c) determinación de la diferencia en cosecha (indirecto, estimativo); d) evaluación de la reducción de acetileno (indirecto, para comparaciones relativas) y e) empleo de isótopos ^{15}N (la única que permite medidas directas cuali y cuantitativas).

Así, la aplicación de pequeñas cantidades de fertilizante inorgánico enriquecido en ^{15}N y el uso de un cultivo de referencia no fijador, son la base de un método directo que nos permite ver la contribución relativa de las distintas fuentes de N en un cultivo fijador: suelo, atmósfera (organismos fijadores) y fertilizantes (Danso, 1988). La composición isotópica de la atmósfera, y en general de los materiales naturales se mantiene casi constante, hablándose de abundancia natural que se establece en 0,366 % para el ^{15}N y 99,634% para el ^{14}N, aproximadamente. El nitrógeno atmosférico (1 (representa aproximadamente el 80% de los gases de la atmósfera terrestre(^{14}N) que es asimilado, diluye al marcado (^{15}N) que es captado por la planta, si se aplica como fertilizante (incapaz de distinguir entre ^{15}N y ^{14}N) y la medida de la dilución isotópica se usa para estimar que proporción de N que la planta obtiene, deriva de la atmósfera. Cuando sólo se precisan estimaciones cualitativas del nivel de fijación de N, este tipo de metodología no precisa de una planta no fijadora de referencia, minimizando errores y ahorrando material. Este método se basa en la aplicación de una cantidad determinada de ^{15}N a todos los tratamientos y, al cosechar, se determina la composición isotópica $^{15}N/^{14}N$. Cuanto menor sea la relación $^{15}N/^{14}N$ en los tejidos vegetales, más activo es el sistema fijador, pudiendose determinar de esta forma el efecto de un tratamiento dado sobre la fijación de

nitrógeno o sobre cualquiera de las otras fuentes. El hecho de que el ^{15}N no sea radiactivo (isótopo estable) facilita su uso sin riesgos, considerándose esta técnica de dilución isotópica el método más útil para medir FBN.

d. Factores limitantes de la FBN simbiótica

La cantidad de N que un sistema simbiótico puede fijar va a depender de multiples factores tales como el genotipo de los simbiontes, condiciones ambientales, tratamientos químicos, fisicoquímicos y biológicos, prácticas agronómicas, etc.

El desarrollo del nódulo puede quedar limitado por el desarrollo de la planta, especialmente si ésta crece en condiciones de estrés que origina falta de fotosintatos y por tanto de energía para fijar nitrógeno, luego cualquier factor que afecta a la fotosíntesis actúa de forma directa sobre la fijación de nitrógeno. Un factor muy importante a este respecto es la disponibilidad de P, cuya deficiencia limita el potencial de FBN, tanto a nivel de formación de nódulos como a nivel de fijación de N_2 en sentido estricto (Giller & Cadisch, 1995). Se sabe que cuando la concentración de P en la planta no llega al 0,2% con respecto al peso seco de ésta, la nodulación y la actividad nitrogenasa se afectan drásticamente, e incluso no se forman nódulos cuando la concentración de P cae por debajo de 0,15% (Mosse *et al.*, 1976).

Un factor limitante de gran interés es el efecto negativo de dosis moderadas o altas de N combinado, que no sólo puede inhibir el establecimiento de la simbiosis, sino también su rendimiento, impidiendo la nodulación, o bien en el caso de que esta llegara a producirse, la fijación (Streeter, 1988). La aplicación de determinadas concentraciones de nitrato a las leguminosas origina una caída de la actividad nitrogenasa así como de los enzimas responsables de la asimilación de N. La teoría más aceptada actualmente para explicar este fenómeno se fundamenta en que la disminución de la nitrogenasa se debe al aumento de la resistencia a la difusión de

oxígeno desde el interior (de Lorenzo *et al.*, 1993). Los costes energéticos de la fijación de N_2 son tan elevados para el vegetal, que el nitrogeno disponible en suelo es preferido por la leguminosa. La adición de fertilizantes nitrogenados, por tanto, probablemente resulta más inhibitorio para la FBN que cualquier otro factor en suelo. Aunque la aplicación racional de N, en momento y forma adecuados, dependiendo del ecosistema, puede incrementar la cosecha sin afectar la FBN.

Otros factores que pueden limitar la potencialidad de la simbiosis, así como los niveles poblacionales de *Rhizobium* en suelo, son: la acidez del suelo (pH), la salinidad (Lluch *et al.*, 1994), falta o exceso de agua, elevadas concentraciones de Al, temperatura, nivel de C disponible, nivel de oxigenación, contenido en materia orgánica y arcilla, irradiación luminosa, presencia de leguminosas adecuadas, etc (Lluch & Ocaña, 1997).

e. Aplicaciones prácticas de la FBN en agricultura

La FBN es, cuantitativamente, el proceso más importante de todos los implicados en el aporte de N al suelo. Mientras que los fertilizantes nitrogenados suministran al suelo anualmente 60 millones de Tn de N y la fijación química natural representa unos 30 millones, la FBN supone 140 millones de Tn, de las cuales, algo más de la mitad se deben a la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, lo que constituye una alternativa ecológicamente limpia y de bajo coste para el agricultor. Como ejemplo de los enormes beneficios que este tipo de asociación puede aportar, tenemos el caso de Brasil, donde hace algunos años se producía una media anual de 12 toneladas de soja sin necesidad de emplear ningún fertilizante nitrogenado, gracias a la fijación biológica de nitrógeno; de no haber sido así la cantidad de fertilizante nitrogenado necesario para conseguir tal producción se situaría en torno a los 5 millones de Tn, cuya fabricación supondría el gasto de unos 35 millones de barriles de petróleo.

Los beneficios netos que este tipo de práctica basada en el uso de leguminosas y en la FBN, pueden tener sobre el cultivo siguiente (cereal, por ejemplo) en un sistema de rotación, no sólo se basan en el aporte de N, sino que además hay que tener en cuenta que este N sólo es utilizable después de su mineralización, por lo que se evitan las pérdidas por lavado que ocurren tras la aplicación del fertilizante mineral. Tambien se obtendrá beneficio directo de la asociacón en el caso de cultivos mixtos donde haya una planta fijadora implicada. En este caso los mecanismos propuesto para explicar la transferencia de N entre plantas se basan en una excreción o exudación directa de compuestos nitrogenados por parte de la leguminosa, o bien en una descomposición de nódulos.

Desde el punto de vista ecológico, las bacterias fijadoras son de suma importancia, ya que son capaces de incorporar a la biosfera prácticamente la misma cantidad de N que pasa a la atmósfera por desnitrificación, con lo que se mantiene un equilibrio aceptable dentro del ciclo biogeoquímico de este elemento.

A pesar de todo esto, existen ciertas limitaciones para la manipulación de sistemas fijadores (Bohlool *et al*., 1992). Tales limitaciones vienen determinadas por consideraciones de tipo medioambiental, biológico, metodológico a nivel de producción y sociocultural, aún cuando se han llegado a reunir un importante cúmulo de datos a distintos niveles de estudio, que permite preveer unos resultados óptimos de su uso a escala productiva. Como ejemplo de una de estas limitaciones está el hecho de que las cepas nativas tengan mayor capacidad para nodular que las introducidas, que resultan incapaces de sobrevivir y crecer en el suelo donde se inoculan, o bien incapaces de colonizar raíces y formar nódulos (Alexander, 1984), lo que determina a menudo el fracaso de la práctica de inoculación (Barea & Olivares, 1998). El problema se acentúa cuando las cepas nativas sean de baja efectividad (baja capacidad fijadora), pero resulten más competitivas, siendo difícilmente desplazables por otras de nueva introducción más eficaces (Pauu, 1989). Es posible la co-

ocupación de nódulos (Thies *et al.*, 1992), lo que conlleva a que un mismo nódulo pueda estar ocupado tanto por la raza nativa como por la inoculada, lo que afecta también a la efectividad de la FBN. Para intentar solventar estos problemas se han descrito y analizado genes implicados en la competitividad de *R. meliloti* (Sanjuan & Olivares, 1989; Soto *et al.*, 1993) y se han manipulado otros del sistema regulador de la fijación de N_2, de forma que se incremente la expresión de esta característica (Sanjuan & Olivares, 1991). Una estrategia interesante para aplicar un inóculo en un sistema suelo-planta, sería elegir una raza competitiva y efectiva dentro de las nativas de ese suelo, minimizándose así los problemas anteriormente mencionados.

4. Interacciones de las micorrizas con microorganismos rizosféricos

Los organismos en la naturaleza no existen como entes aislados, sino que forman parte de comunidades interactivas; de hecho, la diversidad natural existente en los distintos ecosistemas puede ser crucial para el mantenimiento de la productividad y estabilidad de los mismos (Kennedy & Smith, 1995). Las interacciones microbio-microbio son claves en el desarrollo y función de la rizosfera. Así, las poblaciones de microorganismos pueden actuar de manera sinérgica o aditiva o bien antagónica (Stoztky, 1972).

Teniendo en cuenta que la mayoría de las plantas de interés agronómico, pascícola y forestal, están micorrizadas, y dada la universalidad de esta simbiosis, es lógico pensar que siempre van a haber interacciones en las cuales los hongos de la micorriza estén involucrados. Muchos estudios ponen de manifiesto que los hongos formadores de micorriza pueden alterar la microbiota del suelo (Ames *et al.*, 1984; Meyer & Linderman, 1986; Secilia & Bagyaraj, 1987; Linderman, 1992; Christensen & Jakobsen, 1993; Andrade *et al.*, 1997; 1998a; 1998b), ya sea por estimular o bien por reducir el número total de microorganismos o de un determinado grupo de ellos.

La principal razón que justifica los cambios cuantitativos y/o cualitativos en las poblaciones rizosféricas es la modificación de los exudados radicales como consecuencia de la micorrización, dando lugar a la formación de la llamada micorizosfera (Linderman, 1992). Del mismo modo, los microorganismos del suelo pueden favorecer (Ames, 1989; Azcón *et al*., 1990; Staley *et al*., 1992; Vejsadová *et al*., 1993; Balota *et al*., 1995; 1997; Ratti & Janardhanan, 1996; Bashan & Holguin, 1997) o bien antagonizar (Azcón *et al*., 1990; Dhillon, 1992; Germida & Walley, 1996) el desarrollo y función de la micorriza, actuando sobre la formación de puntos de entrada, sobre las raíces de la planta hospedadora, o sobre el desarrollo y efecto de la simbiosis.

La estimulación de la formación y función de las MA puede ser como consecuencia de la actividad microbiana en la rizosfera mediante la alteración de la disponibilidad de nutrientes para la planta, debido a reacciones bioquímicas. Al mismo tiempo los microorganismos producen sustancias biológicamente activas reguladoras del crecimiento vegetal como vitaminas, enzimas, aminoácidos, hormonas vegetales y otros compuestos orgánicos (Lynch, 1990; Glick, 1995; Bashan & Holguin, 1997). Entre estas sustancias existen compuestos que incrementan la permeabilidad celular, que mediante distensión de las paredes celulares pueden incrementar el nivel de exudación radical, lo cual podría estimular al hongo MA en la rizosfera y facilitar la colonización de la raíz.

Un tipo de interacción que va a resultar especialmente beneficiosa en los sistemas suelo-planta, es aquella en la que estén implicados microorganismos que ejercen algún tipo de antagonismo sobre otros microorganismos patógenos de la planta, beneficiando, indirectamente, el desarrollo vegetal.

5. Biotecnología y Biología molecular aplicada a la obtención de nuevos inoculantes (OMGs)

Teóricamente, es factible la manipulación de las propiedades biológicas de la rizosfera mediante ciertas prácticas agronómicas tales como la rotación de cultivos, estrategias de laboreo, adición de materia orgánica (de resíduos en general), solarización, etc. Sin embargo, la realidad es que resulta difícil dirigir tales prácticas a estimular actividades beneficiosas y a deprimir otras detrimentales, por lo que los resultados netos son impredecibles.

Como ya se mencionó anteriormente en el Apartado 3.3, una manera de actuar más dirigida es la que se basa en la utilización de inóculos microbianos, formulando preparaciones (inóculantes) a base de microorganismos beneficiosos. La aplicación de tales inoculantes, sigue demandando contraste y validación agronómicos en la mayoría de los casos, pero posee un claro carácter de práctica "prometedora". La necesidad de reducir el uso de fertilizantes químicos y productos fitosanitarios de síntesis ha dado vigencia a la temática de la inoculación microbiana. En efecto, la demanda impuesta por la sostenibilidad está conduciendo a la aplicación de estrategias alternativas que mantengan una producción competitiva y protejan al medio ambiente. En este contexto, las técnicas basadas en el uso de ADN recombinante (es decir la ingeniería genética) y una biotecnología innovadora se están aplicando para generar organismos modificados genéticamente (OMGs) con el fin de mejorar la producción de cultivos y controlar toda una serie de condiciones adversas entre las que se incluyen agentes fitopatogénicos, causantes de entre 25-75% de reducciones en las cosechas. A tal efecto, se dirige el desarrollo de plantas transgénicas (como se citó anteriormente en el Apartado 2.2 en el contexto de agricultura sostenible) y el uso de microorganismos que mejorados genéticamente puedan suprimir o prevenir efectos no deseados.

La importancia de muchos microorganismos relacionados con la nutrición vegetal y el control de plagas y enfermedades, los hace un blanco obvio para la manipulación genética relacionada con sus capacidades. De esta manera, se pretende mejorar funciones ya existentes, así como crear otras nuevas mediante adición de uno o varios genes a estos microorganismos. Ejemplos de ello son las modificaciones genéticas que impliquen mejoras en la capacidad colonizadora y/o en la efectividad de ciertas razas de *Rhizobium* (Sanjuan & Olivares, 1989; 1991; Soto *et al.*, 1993; Weller & Thomashow, 1994); aumento de la versatilidad metabólica que les proporciona ventajas frente a otros microorganismos (Dowling *et al.*, 1992); adición de proteínas anticongelantes que les permita persistir y proliferar a bajas temperaturas (Glick, 1995); construcción de agentes de control biológico mejorados genéticamente que tengan mayor capacidad antagonista para el crecimiento de patógenos (Dowling *et al.*, 1994; Dowling & O'Gara, 1996).

Cuando se introducen genes en un microorganismo, es esencial establecer la existencia de un fenotipo detectable para poder distinguir entre el microorganismo introducido y la población autóctona. Así, resultan muy útiles genes metabólicos que permitan al microorganismo crecer en una serie de compuestos diferenciales respecto a otros microorganismos relacionados, genes de resistencia a compuestos tóxicos como antibióticos o metales pesados, etc, aunque actualmente la introducción de genes de resistencia a antibióticos en el medio ambiente está siendo sometida a debate (Dowling *et al.*, 1994).

Para evitar problemas futuros derivados de la naturalización de las cepas inoculadas o para poder utilizar inóculos de nueva generación, se hace necesario el uso de un sistema de contención (suicida) que elimine a la bacteria inoculada una vez haya cumplido su misión. De esta forma, al mismo tiempo que se controla la competitividad se evitan efectos colaterales perjudiciales para el entorno derivados de la diseminación de OMGs (Barea & Olivares, 1998). Así, la limitada capacidad de

Material y Métodos

Material y Métodos

1. Características de los suelos empleados

Suelo A: Procedió de la finca experimental de la EEZ (CSIC, Granada). Se trata de un suelo franco que presenta las siguientes características: pH, 7.9; materia orgánica, 2.1%; N, 1.3 g/l; P, 9 mg/l; K 82 mg/l; arena 38%; margas 43%; arcilla 19%. Para la realización de los ensayos en microcosmos, éste suelo se tamizó (0.4 cm) y mezcló con arena de cuarzo en proporción 1:1 (v:v), constituyendo lo que denominaremos "sustrato A".

Suelo B: Procedió de la zona del Parque de Invierno (Granada). Se trata de un suelo calcáreo pardo-rojizo que presenta las siguientes características: pH, 7.4; materia orgánica, 1.23%; P, 4.5 mg/l; arena 18.2%; margas 18.2%; arcilla 42%. Este suelo se utilizó para la realización de determinados ensayos en microcosmos, para lo cual se tamizó (0.4 cm) y mezcló con arena de cuarzo en proporción 5 suelo: 2 arena (v:v), constituyendo lo que denominaremos "sustrato B".

Cuando así se requirió, los sustratos fueron pasteurizados a 100ºC, 1 h durante 3 días consecutivos y reinoculados con un filtrado (Whatman® nº1) de una suspensión acuosa de suelo natural o del inóculo de la micorriza empleado, que contenía la microbiota normal, a excepción de los propágulos de la MA.

2. Tipos y características de los inoculantes microbianos empleados.

El tipo de inoculante, la procedencia, características y medio de cultivo empleados para cada una de las cepas utilizadas, se exponen en las Tablas 1-4.

Especie/cepa	S/MG	Medio de cultivo	Características	Función	Referencia
R. meliloti					
GR4	S	Ty	Aislada de la finca experimental de la EEZ. Cepa Nod^+ Fix^+	Biofertilizante	Este laboratorio
GR4(pCK3)	MG	Ty	Derivado de GR4 con copias extra del gen nif A, que confiere mayor capacidad competitiva para la nodulación	Biofertilizante	Sanjuan & Olivares, 1991
R. leguminosarum					
RLV113	S	Ty	Aislada del suelo de la finca expiremental de la EEZ. Biovar viciae.	Biofertilizante	Este laboratorio
RLV113H	MG	Ty	Derivado de RLV. Tiene insertado genes hup que permiten un aumento de la actividad deshidrogenasa, y por tanto una mayor efectividad en la fijación de N atmosférico.	Biofertilizante	Este laboratorio

Tabla 1. Tipos y características de los disitntos inoculantes de *Rhizobium* empleados.

Especie/cepa	S/MG	Medio de cultivo	Características	Función	Referencia
***Enterobacter* sp.**	S	R&C	Aislado de un suelo prodecente de la localidad de Güejar Sierra (Granada)	Solubilizador de P	Toro, 1996
***B. subtilis* sp.**	S	R&C	Aislado de un suelo prodecente de la localidad de Güejar Sierra (Granada)	Solubilizador de P	Toro, 1996

Tabla 2. Tipos y características de los disitntos inoculantes solubilizadores de P empleados.

Especie/cepa	S/MG	Medio de cultivo	Características	Función	Referencia
A. brasilense					
Sp245	S	YEP, LB	Aislada de la superficie de raíces esterilizadas de trigo. Produce 8.5-14 µg AIA/ml medio mínimo en presencia de triptófano (100 µg/ml)	Fitoestimulador	Baldani *et al.*, 1983
Sp245b	MG	YEP-Km25, LB-Km25	Mutante derivado de Sp245 que tiene insertado un cassette de resistencia a kanamicina (Km25) en el gen *ipdC*, que codifica para el enzima ácido indol-3-pirúvico descarboxilasa, enzima clave para la biosíntesis de AIA. Debido a que en *A. brasilense* ésta no es la única vía de producción de AIA, éste mutante es capaz de producir bajas cantidades de dicha fitohormona. Actualmente se conoce como FAJ0009	Fitoestimulador	Costacurta *et al.*, 1994 Vande Broek *et al.*, 1999
Sp7	S	YEP, LB	Aislada de raíces de *Digitaria decumbens*. Produce 35-41 µg AIA/ml medio mínimo en presencia de triptófano (100 µg/ml)	Fitoestimulador	Tarrand *et al.*, 1978
A. lipoferum					
RG20a	S	YEP, LB	Aislada de raíces de trigo. Produce 2.5-5.8 µg AIA/ml medio mínimo en presencia de tritófano (100 µg/ml).	Fitoestimulador	Tarrand *et al.*, 1978
A. irakense					
KBC1	S	YEP, LB	Aislada de raíces de arroz. Produce 1.6-1.8 µg AIA/ml medio mínimo en presencia de triptófano (100 µg/ml).	Fitoestimulador	Khammas *et al.*, 1989

Tabla 3. Tipos y características de los disitntos inoculantes de *Azospirillum* empleados.

Especie/cepa	S/MG	Medio de cultivo	Características	Función	Referencia
P. fluorescens					
F113Rif100	S	LB, SA	Mutante espontáneo de F113, resistente a Rif100 (100µg/ml).	Biocontrol	Carroll *et al.*, 1995
F113pAF3Tc50	MG	LB	Mutante derivado de F113 quecontiene el plásmido pAF3, donde se halla insertado un fragmento EcoRI de 8Kb con el locus que codifica para la biosíntesis de diacetofluoroglucinol (DAPG). Resistente a Tc (50µg/ml)	Biocontrol	Dunne, 1998
F113Rif:pMEPG	MG	LB, SA	Mutante derivado de F113 que sobreproduce diacetofluoroglucinol (DAPG) gracias a la presencia de copias extras del locus para la biosíntesis de DAPG en un vector portador basado en pME6010. Tiene marcador genético *gus A* y resistencia espontánea a Rif 100.	Biocontrol	unpublished
WCS365	S	LB	Eficiente colonizador de rizosfera de patata. Agente de control biológico en el sistema pepino/*Phytium*	Biocontrol	Geels & Schippers, 1983 de Weger *et al.*, 1986
CHA0Rif100	S	LB	Mutante espontáneo de CHA0 (aislado en raíces de tabaco y muy eficaz en suprimir la putrefacción causada por Thielaviopsis basicola), resistente a Rif100. No difiere en propiedades a la cepa salvaje (CHA0). Produce DAPG.	Biocontrol	Natsch *et al.*, 1994
CHA96Rif100	MG	LB	Mutante espontáneo, resistente a Rif100, de CHA96, mutante a su vez derivado de CHA0, que contiene una fusión translacional gacA'-'lacZ introducida en el cromosoma por reemplazamiento de genes. No produce el metabolito secundario DAPG.	Biocontrol	Natsch *et al.*, 1994 Laville *et al.*, 1992
P. chlororaphis					
PCL1391	S	LB	Produce fenacina	Biocontrol	Chin-A-Woeng *et al.*, 1998
W38	MG	LB	Mutante derivado de PCL1391, con el transposon Tn5 en el operón de biosíntesis de fenacina	Biocontrol	Chin-A-Woeng *et al.*, 1998

Tabla 4. Tipos y características de los distintos inoculantes de *Pseudomonas* empleados.

Las cepas de *Trichoderma* empleadas fueron: *T. harzianum* TH1 (IMI 275950), T4 (IMI 298372), T12 (IMI 298373) y *Trichoderma* spp. N47 (IMI 288110), PS2DN. Todas ellas se crecieron en PDA de manera rutinaria, y en MYA cuando se requirió producción abundante de esporas. La mayoría de ellas se proparon en ensayos en microcosmos y demostraron ser eficaces agentes de control biológico frente a *Phytium* (Nasseby *et al.*, 1999).

Como inóculos de MA se emplearon *G. mosseae* (Nicol & Gerd.) Gerdeman & Trappe, *G. deserticola* (Trappe, Bloss & Menge) y *G. fasciculatum* (Thax. sensu Gerd.) Trappe & Gerd., procedentes de una colección de cultivos de este laboratorio.

3. Medios de cultivo

Una vez preparados se esterilizaron a 121ºC durante 20 min. En determinadas ocasiones fué necesaria la adición de algún componente tras esterilización ("post-autoclave"), en cuyo caso éste fué previamente esterilizado por filtración antes de ser añadido al medio de cultivo. Entre estos componentes se incluyen también los antibióticos y otra serie de marcadores empleados, cuya concentración y tipo dependerán de la cepa en cuestión a cultivar.

3.1. Medio Ty

Triptona	0.5%
$CaCl_2$	0.05%
Extracto de levadura	0.3%
Agar	1.2%

UNIVERSIDAD DE GRANADA
28 JUN. 1999
COMISION DE DOCTORADO

3.2. Medio R&C (Ramos & Callao, 1967)

Caldo nutritivo (nutrient broth)	0.8%	
Glucosa	2%	
Extracto de levadura	0.2%	
Roca fosfórica	0.2%	
Agar	1.2%	pH 7.0

El medio se prepara con extracto de suelo (en proporción 1 suelo: 10 agua), previamente filtrado.

3.3. Medio YEP (Extracto de levadura-peptona)

Bactopeptona	1%
NaCl	0.5%
Extracto de levadura	1%
Agar	1.2%

3.4. Medio RC (Rojo Congo) (Rodríguez-Cáceres, 1982)

K_2HPO_4	0.05%	
$MgSO_4.7H_2O$	0.02%	
NaCl	0.01%	
Extracto de levadura	0.05%	
$FeCl_3.6H_2O$	0.0015%	
DL-ácido málico	0.5%	
KOH	0.48%	Ajustar pH a 7.0 con 0.1 N KOH
Agar	1.2%	

Solución de Rojo Congo 1:400 estéril

El rojo congo es un colorante específico para polisacáridos con enlaces ß.

3.5. Medio LB (Luria Bertani)

Triptona	1%	
NaCl	0.5%	
Extracto de levadura	0.5%	
Agar	1.2%	

3.6. Medio SA (Sacarosa-Asparagina)

Sacarosa	2%	
L-Asparagina	0.2%	
K_2HPO_4	0.1%	
Agar	1.2%	
$MgSO_4.7H_2O$ 10%	0.5%	Post-autoclave

3.7. Medio S1

Sacarosa	1%	
Glicerol	1%	
casaminoácidos	0.5%	
N-Lauroylsarcosina sódico	0.12%	
$NaHCO_3$	0.1%	
K_2HPO_4	0.23%	
Agar	1.2%	
$MgSO_4.7H_2O$ 10%	1%	Post-autoclave

3.8. Medio PDA (Agar-Patata-Dextrosa) a 3.9 %

3.9. Medio MYA (Agar-Extracto de Levadura-Extrato de Malta)

Extracto de Levadura	0.4%
Extracto de Malta	1%
Glucosa	0.4%
Agar	1.2%

4. Soluciones

4.1. Solución nutritiva Hewitt (1952)

Se trata de una solución adaptada a leguminosas, libre de N y 1/10 de P (se puede modificar en función de necesidades).

Solución Hewitt para leguminosas

	Soluciones madre (g/l)	ml/1000 ml solución
K_2SO_4	40.5	10
$CaCl_2$	70.8	10
$MgSO_4.7H_2O$	18.4	20
Fe-EDTA	2.5	10
$MnSO_4$	2.23	1
$CuSO_4.5H_2O$	2.4	0.1
$ZnSO_4.7H_2O$	2.9	0.1
H_3BO_3	18.6	0.1
$(NH_4)6Mo_7O_{24}.4H_2O$	0.35	0.1
$NaH_2PO_4.2H_2O$	20.8	1
dH_2O		hasta 1000 ml

4.2. Solución Ringers

NaCl	0.85%
$CaCl_2$	0.03%
KCl	0.025%
$NaHCO_3$	0.02%

4.3. Soluciones de antibióticos y otros marcadores

Antibiótico	**Concentración Sol. madre**	**Solvente**
Ap (Ampicilina)	25 mg/ml	agua
Tc (Tetraciclina)	1 mg/ml	etanol 50%
Rif (Rifampicina)	20 mg/ml	dimetilsulfóxido
Kanamicina	5 mg/ml + 30%	agua
Cicloheximida	10 mg/ml	agua
Otros marcadores		
X-GlcA (ácido 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil-ß-D-glucurónico)	20 mg/ml	N_2N-Dimetilformamida

5. Obtención de inoculantes

En el caso de inoculantes bacterianos, una vez obtenida la suspensión bacteriana, según se indica en los sucesivos subapartados (Apartados 5.1, 5.2, 5.3 y 5.4), ésta se centrifugó a 7000 r.p.m. durante 8 min, se eliminó el sobrenadante y el "pellet" resultante se resuspendió en agua destilada estéril o solución Ringers estéril (sólo *Pseudomonas* y ensayos en mesocosmos en general). La suspensión fué centrifugada y resuspendida 2 veces más. La D.O. de esta suspensión bacteriana se determinó a 600nm en un espectrofotómetro.

5.1. *Rhizobium*

Se crecieron en caldo Ty, con los antibióticos correspondientes en caso que fuera preciso, durante 48h a 27ºC en agitación a 200 r.p.m.

5.2. Solubilizadores de P (*Enterobacter* sp., *B. subtilis*)

Se crecieron en caldo R&C durante 48h a 27ºC en agitación a 200 r.p.m.

5.3. *Azospirillum*

Se crecieron en caldo YEP, con los antibióticos correspondientes en caso que fuera preciso, durante 24h a 27ºC en agitación.

5.4. *Pseudomonas*

Se crecieron en caldo LB, con los antibióticos correspondientes en el caso que fuera preciso, durante 24h a 27ºC en agitación.

5.5. *Trichoderma*

Se creció en medio en MYA (medio que permite abundante producción de esporas) en tubos en pico de flauta o en placas petri durante 8 días, tras los cuales se añadió agua estéril al medio, y agitando vigorosamente en el caso de tener tubos o pasando una asa de vidrio en el caso de que el cultivo se realizara en placa, se obtuvieron las esporas o conidios. El número de conidios presentes por ml en la suspensión acuosa así obtenida, se determinó mediante recuento en la cámara de Neubauer. Para el caso de cepas de *Trichoderma* que habían formado un bajo número de esporas se recurrió a la inoculación a partir de una suspensión de micelio, ayudándonos de un asa de siembra para extraer el mismo de la superficie del agar.

6. Semillas

6.1. Tipos de semillas

- Alfalfa: *Medicago sativa*: variedades Nolana, Rigidula, Rotata y Aragón

- Tomate: *Lycopersicum esculentum* L. var. Margrobe

- Maíz: *Zea mays* L. var. Potro

6.2. Esterilización de las semillas

Todas las semillas empleadas fueron esterilizadas durante 30 min en lejía comercial al 10%, tras lo cual se lavaron en abundante agua destilada estéril y se dejaron en imbibición un tiempo variable en función del tipo de semilla (Alfalfa 30 min; Tomate 4-5 h; Maíz 4 h).

6.3. Germinación de las semillas

- Alfalfa: una vez esterilizadas e imbibidas las semillas fueron transferidas a placas de Petri con papel de filtro estéril humedecido. Se mantuvieron a 28ºC en oscuridad hasta que contaban con radículas de tamaño considerable (2-3 cm), siendo entonces utilizadas para la realización de los ensayos.

- Tomate: una vez esterilizadas e imbibidas, las semillas se transfieron a un semillero con vermiculita estéril como sustrato, en el caso de que fueran a ser empleadas en ensayos en microcosmos, y a placas Petri con papel de filtro estéril, en el caso de ser usadas en mesocosmos. Se mantuvieron a 28ºC en oscuridad, y cuando contaban con aproximadamente 1 cm de radícula, se emplearon para la realización de los ensayos.

- Maíz: una vez esterilizadas e imbibidas las semillas se transfirieron a placas de Petri con papel filtro estéril, y se mantuvieron a 28ºC en oscuridad. Una vez germinadas se emplearon para la realización de los ensayos.

7. Inoculación de microorganismos

7.1. Inoculación de micorrizas

Se realizó a partir de inóculos que se habían mantenido 3-6 meses en bolsas de polietileno a 4ºC. El inóculo consistió en una mezcla de suelo que contenía esporas, hifas y fragmentos radicales micorrizados. La cantidad y tipo de inóculo aplicado varió en función del tipo de ensayo.

7.2. Inoculación de bacterias (*Rhizobium*, Solubilizadores de P, *Azospirillum* y *Pseudomonas*)

Se realizó de 3 formas diferentes:

a) En suelo:

- Aplicando 1 ml del inoculante sobre las radículas de las plantas

- Distribuyendo el inoculante de forma homogénea en el suelo

b) En semillas:

- Maíz: Se dejaron 4 g de semillas pregerminadas, equivalente a 16 semillas, en agitación durante 10min en 10 ml de la suspensión bacteriana.

- Tomate: Se dejaron 0.25 g se semillas pregerminadas, equivalente a 90 semillas, en agitación durante 10 min. en 10 ml de la suspensión bacteriana.

En el caso de que la inoculación se realizara en semillas, para mayor homogeneidad en el proceso, las semillas correspondientes al tratamiento control se dejaron en agitación en el mismo tiempo y en la misma proporción en solución Ringers estéril. Una vez inoculadas las semillas fueron transferidas al campo en los contenedores correspondientes.

7.3. Inoculación de hongos saprófitos (*Trichoderma*)

El inóculo se aplicó en forma de suspensión acuosa en el suelo próximo al cuello de la planta.

8. Cuantificación de microorganismos en semillas, raíces y suelo rizosférico mediante el método de dilución y recuento en placas

Las bacterias inoculadas tanto en los ensayos de microcosmos, como en los ensayos de campo, pueden ser recuperadas para comprobar su persistencia tanto en rizoplana como en rizosfera. También resulta interesante cuantificar la población de microorganismos totales (bacterias y hongos) cultivables. Cuando la inoculación de bacterias se hizo en semillas se cuantificó en número de ufc/semilla.

8.1. Cuantificación del número de ufc del inoculante/semilla

Una vez inoculadas, se tomaron 10 semillas y se introdujen en tubos de ensayo con 10ml de solución Ringers estéril (3 repeticiones/inoculante). Se agitaron durante 2 min, pasados los cuales se hicieron las diluciones seriadas apropiadas y se sembraron en placas con el medio correspondiente en función del tipo de inoculante (mismo medio que el empleado para su cultivo). Los resultados se refirieron a log ufc/semilla.

8.2. Recuperación de los inoculantes a partir de raíces

Una vez obtenidas las raíces y sacudidas para eliminar el exceso de suelo adherido, se transfirieron 10g de las mismas a matraces que contenían 90 ml de Solución Ringers estéril, se dejaron agitando durante 30 min, y se sonicaron en un baño de sonicación durante 1 min. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas y sembraron en placas que contenían un medio selectivo para la bacteria en cuestión que se pretendía aislar. En la siguiente Tabla (Tabla 5) se presentan los medios de cultivos específicos para el aislamiento de cada género y cepa objeto de estudio, así como temperaturas y tiempos de incubación de las placas para detectarlos.

Microorganismo a aislar	Medio de cultivo	Tª incubación	Tiempo de incubación
***Azospirillum* spp.**	RC	28ºC	72 h
***Pseudomonas* fluorescentes**	S1	28ºC	48 h
***P. fluorescens* F113Rif100**	LB-Rif100 ó SA-Rif100-Ap50	28ºC	48 h
***P. fluorescens* pAF3Tc50**	LB-Tc50	28ºC	48 h
P. fluorescens F113Rif100:pMEGP	SA-Rif100-XGlcA50-Ap50	28ºC	48h

Tabla 5. Medios de cultivo, temperaturas y tiempos de incubación empleados para la recuperación y detección de distintos inoculantes.

Si la bacteria presentaba algún tipo de marcador característico como resistencia a antibióticos, presencia de gus A, etc, también se añadió el mismo al medio de cultivo y a la concentración indicada según el microorganismo. Todos los medios de cultivo para recuperación de bacterias se adicionaron con cicloheximida a una concentración de 100 µg/ml. Una vez transcurrido el tiempo de incubación señalado se contaron el número de unidades formadoras de colonia (ufc) del microorganismo en cuestión, y los resultados obtenidos se refirieron a gramo seco de raíz. Las colonias de *Azospirillum* spp. crecidas en RC se distinguían por presentar color rojo escarlata, abundante crecimiento, consistencia seca, diámetro de 1.5-2 mm, forma redondeada, borde festoneado y superficie rugosa irradiada desde el centro de la colonia (Rodríguez-Cáceres, 1982). El medio S1 es específico para *Pseudomonas* fluorescens, y aunque algunas *Pseudomonas* no fluorescentes pueden también crecer, éstas se diferencian de las primeras en que las fluorescentes emiten fluorescencia característica una vez crecidas sobre este medio. En el resto de los casos, al estar el medio adicionado de antibiótico u otro marcador (X-GlcA, colonias azules) característico de la cepa en cuestión que se pretende aislar, se obtienen aislados prácticamente puros.

8.3. Recuperación de los inoculantes a partir de suelo

Una vez obtenidas las raíces y eliminada la mayor parte del suelo, se seleccionó aquel que estaba más íntimamente asociado a la raíz o suelo rizosférico, transfiriéndose 1 g del mismo a tubos que contenían 9 ml de Solución Ringers estéril. Los tubos se agitaron por un período de 2 min, tras el cual se realizan diluciones seriadas de los mismos, continuando el proceso del mismo modo que el descrito para el caso de recuperación del inoculante a partir de raíces (Apartado 8.2). En este caso el número de ufc resultantes se refirió a gramo seco de suelo.

8.4. Cuantificación del número total de microorganismos (bacterias y hongos) cultivables en suelo

Para la cuantificación del nº total de bacterias y hongos en suelo se realizó el mismo procedimiento que el descrito en el apartado anterior (Apartado 8.3), utilizando como medio de cultivo agar-patata-dextrosa. En el caso de recuento de bacterias se añadió cicloheximida al medio de cultivo (100 µg/ml de medio) para evitar el crecimiento de hongos. Los resultados en este caso también se refirieron a gramo de suelo seco.

9. Obtención de esporas y esporocarpos mediante la técnica del tamizado húmedo y decantación.

La obtención de esporas mediante la técnica del tamizado húmedo y decantación (Gerdeman & Nicolson, 1963) consiste en realizar una suspensión de 50-100 g de suelo en aproximadamente 1l de agua. Tras dejar decantar la mezcla unos instantes se procede a su tamizado a través de una serie de tamices de diámetro de poro decreciente. De esta forma, las esporas y esporocarpos del hongo (si los hubiera), que se mantienen en suspensión más tiempo que el resto de las partículas del suelo, serán retenidas, según su tamaño en los distintos tamices empleados. En

concreto se utilizaron 3 tamices superpuestos de 500, 250 y 50 µm de diámetro de poro, en cada uno de los cuales quedará retenida una fracción distinta de la suspensión, así en el tamiz superior (500 µm) quedan restos de material vegetal (raíces) y fragmentos grandes del suelo; en el intermedio (250 µm) quedan raíces muy finas, esporas unidas al micelio del hongo y esporocarpos en el caso de que el hongo los produjera; mientras que en le tamiz inferior (50 µm) se retienen las esporas aisladas.

El tamizado se realiza varias veces, agitando y decantando sucesivamente. Las esporas y esporocarpos recogidos de sus respectivos tamices se obtendrán con ayuda de un microscopio estereoscópico y unas pinzas de relojero. Una vez obtenidas se transferirán a placas petri con papel de filtro humedecido y se conservarán a 4ºC hasta posterior uso.

10. Identificación de esporas

Tras la extracción de las esporas del suelo, mediante el método del tamizado húmedo y decantación, se colocaron en agua y examinaron con la ayuda de un microscopio estereoscópico con luz reflejada. Las esporas se separaron en tipos distintos en función de su morfología, color, tamaño, organización, etc. Una vez realizada una separación inicial, las esporas se toman con unas pinzas de relojero y se depositan en portaobjetos con una gota de medio de montaje. Por lo general se utilizan dos tipos de medios: PVLG y Melzer-PVLG en proporción 1:1 (Tabla 6).

PVLG		**Reactivo de Meltzer**	
Alcohol de polivinilo (APV)	1.66 g	IK	1.5 g
Acido láctico	10 ml	Yodo	0.5 g
Glicerina	1 ml	Hidrato de Cloral	100 g
H_2O	10 ml	H_2O	22 ml

Tabla 6. Medios de montaje empleados para la observación de esporas en microscopio óptico.

La observación al microscopio óptico permitirá ver número de capas de la espora, las características de las mismas, color, si da reacción en presencia del reactivo de Melzer, morfología de la hifa de sustentación, si presentan sáculo esporogénico, cicatrices, etc. Para la identificación de las especies en aquellos casos en los que ésta fue posible se utilizaron las claves contenidas en la página web del INVAM (International Culture Colection of arbuscular and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi) (http: //w.w.w.invam.caf.wvu.edu/).

11. Estudios de biodiversidad de hongos MA

Una vez identificados los distintos tipos de esporas de hongos MA presentes en un suelo objeto de estudio, se procederá al estudio poblacional de los mismos, mediante la utilización de los siguientes parámetros:

N° total de esporas

Densidad relativa

$$Di = \frac{ni}{N}$$

donde "ni" es el n° de esporas del tipo i y "N" es el n° total de esporas

Riqueza media de especies (S): Es el número total de especies encontrado en cada muestra objeto de estudio.

Indice de diversidad de Shanon-Wiener (H')

$$H' = -S\left(\sum_{i=1}^{s} \frac{ni}{N} . Ln \frac{ni}{N}\right)$$

12. Ensayo de germinación de esporas de MA *in vitro*.

Para este tipo de ensayo se utilizó *G. mosseae* prodecente de la colección de este laboratorio, como hongo MA, gracias a su capacidad para formar espocarpos, los cuales, una vez obtenidos mediante la técnica del tamizado húmedo y decantación

descrita anteriomente, se rompieron para extraer las esporas de su interior y usarlas en el proceso.

12.1. Esterilización de esporas

Una vez obtenidas las esporas, se esterilizan en superficie según el método descrito por Mosse (1962), que consiste en colocar las esporas sobre un papel de filtro en el portafiltros de un quitasato, y hacer pasar a través del mismo una solución que contiene estreptomicina 0.04%, cloramina T 2% y Tween 80 0.1%, durante 18 min, transcurridos los cuales se lavan lentamente con 500 ml de agua destilada estéril para eliminar el exceso de detergente. Una vez finalizado el proceso, se extrae el papel de filtro con las esporas en superficie y se coloca sobre una placa de Petri estéril, quedando así disponibles para su posterior uso.

12.2. Medio para cultivo *in vitro* de esporas de MA: Medio Agar-Agua-Mes (AAM)

El medio se basa en el utilizado por Carr & Hinkley (1985), y fué empleado para los experimentos de germinación *in vitro* de esporas de MA en placas de Petri de 90 mm Ø, a una razón exacta de 20 ml/placa.

La composición del medio fué al 0.8% de agar en solución MES 10 mM pH 7, cuya composición es:

Solución MES 10 mM pH 7.0	
MES (ácido 2-(N-Morfolino) etanosulfónico)	0.195 g
NaOH 1M	0.876 ml
NaCl 1M	0.124 ml
H_2O destilada	100 ml

Una vez preparado se esterilizó en autoclave a 121ºC durante 20 min.

12.3. Germinación de esporas

Una vez esterilizadas las esporas y sembrados los distintos tratamientos bacterianos en el caso que los hubiera, se inoculan en las placas de Petri a razón de 5 esporas/placa, colocadas ocupando las posiciones de los vértices de un pentágono (Fig. 1). Las placas se sellaron con parafilm y se dejaron a incubar en oscuridad a 25ºC.

El proceso de germinación se inicia por lo general a los 3 días de incubación, realizandose observaciones al microscopio óptico en los días anteriores para evitar contaminaciones, y en los posteriores y de forma periódica (4, 7, 10, 15, 20 y 30 días) para evaluar el porcentaje de germinación de las mismas. Una espora se consideró germinada cuando se detectó la aparición del tubo germinativo.

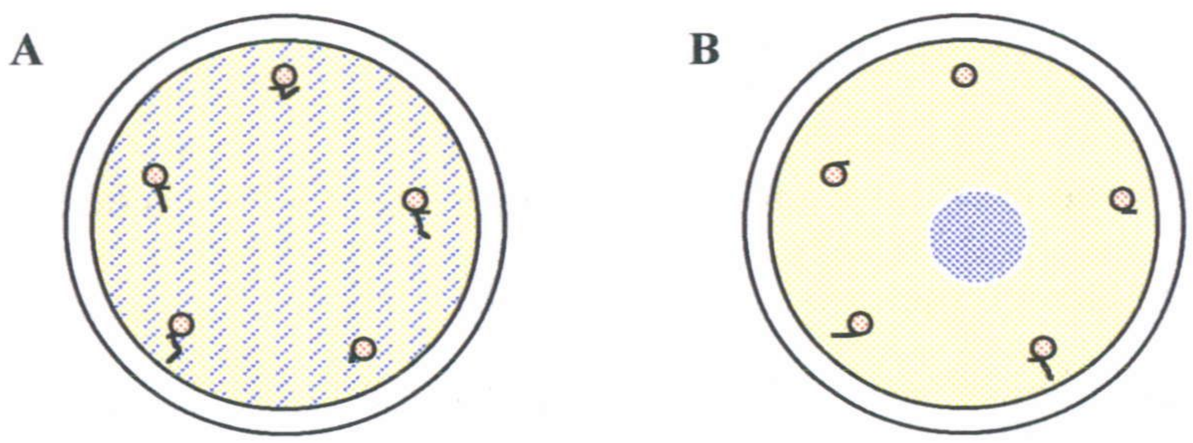

Fig. 1. Disposición de las esporas de G. mosseae en placas de Petri para el estudio de su germinación in vitro. (A) Siembra homogénea de bacterias por toda la placa, (B) Inoculación de la suspensión bacteriana en forma de gota central.

12.4. Desarrollo del micelio

La cuantificación de la extensión de micelio se realizó mediante tinción con azul tripan al 0.05% en ácido láctico y posterior observación al microscopio óptico,

contándose el número de intersecciones de la hifa en una cuadrícula de 0.5 mm de lado, según el sistema propuesto por Marsh (1971).

12.5. Análisis estadístico de los resultados

Los datos de germinación de esporas en cada tratamiento se sometieron a un test de hipótesis frente a los resultados de los respectivos controles. El estadístico "Z" calculado se comparó con el valor tabulado para un nivel de significación del 5%.

El análisis estadístico para el desarrollo de micelio se llevó a cabo mediante al análisis de la varianza (ANOVA) y un test de media de Duncan a un nivel de significación del 5%.

13. Cuantificación del porcentaje de micorrización

13.1. Tinción de raíces

13.1.1. *Tinción con azul tripán* (TB)

La extensión de la colonización radical por parte del hongo de la micorriza fué determinada mediante el método de tinción de Phillips & Hayman (1970) que consiste en calentar la raíces en KOH al 10% durante 20 min al baño maría, pasados los cuales se lavan con agua en abundancia y se acidifican con ClH al 1% durante 10 min. Una vez eliminado el ClH se adiciona una solución de azul tripán al 0.05% en ácido lactico y se mantienen nuevamente al baño maría durante 10 min, se elimina el exceso de colorante y las raíces se conservan en ácido láctico hasta posterior observación. De esta forma se tiñen los componentes del hongo del interior de la raíz, permaneciendo ésta sin colorarse.

13.1.2. *Tinción vital de succinato dehidrogenasa* (SDH)

Revela la cantidad de hongo MA vivo. Las raíces una vez cortadas se dejaron incubando en solución incubadora a 37ºC durante 16-18 h. Transcurrido este tiempo se eliminó la solución incubadora, las raíces se cubrieron con hidrato de cloral al 75% y se dejaron durante 15 min al baño maría. En lugar de hidrato de cloral se puede usar hipoclorito sódico al 3% de cloro activo, en cuyo caso, después de eliminar la solución incubadora, las raíces se lavan y se dejan en la solución de hipoclorito a temperatura ambiente durante 15-20 min, pasados los cuales se eliminará el hipoclorito y lavarán las raíces nuevamente. Las raíces se conservan en ácido láctico no más de un par de semanas.

Solución incubadora tinción SDH (50 ml)	
Succinato de sodio 2.5 M	5 ml
Azul de tetrazolio (4 mg/ml)	12.5 ml
Tris-ClH 0.2 M pH 7.0	12.5 ml
$MgCl_2$ 5 mM	5 ml
Agua destilada	15 ml

13.1.3. *Tinción vital de fosfatasa alcalina* (ALP)

Revela la cantidad de hongo MA activo. Las raíces una vez cortadas se dejaron incubando en solución incubadora a 37ºC durante 16-18 h. Transcurrido este tiempo se eliminó la solución incubadora, se lavaron las raíces y se dejaron cubiertas con hipoclorito sódico al 1% de cloro activo durante 15-20 min en la solución de hipoclorito, pasados los cuales se eliminará el hipoclorito y lavarán las raíces nuevamente. Las raíces se conservan en ácido láctico no más de un par de semanas.

Solución incubadora tinción ALP	
Tris/ácido cítrico 0.05M pH 9.2	
ácido α-naftil-fosfato	0.001%
"Fast Blue RR"	0.001%
$MgCl_2$ anhidro	0.05%
$MnCl_2$	0.05%

Filtrar una vez preparado

13.2. Cuantificación del porcentaje de infección

La cuantificación del porcentaje de longitud radical micorrizada se realiza mediante una modificación del método de Trouvelot *et al.* (1986), que consiste en colocar fragmentos radicales de aproximadamente 1 cm de longitud, teñidos según las técnicas anteriormente especificadas (Apartado 13.1), sobre un portaobjetos, y posterior observación al microscopio. La cuantificación de la extensión de la infección se realiza tanto en longitud de cada uno de los fragmentos radicales, dándole un valor de 0 a 10, como en anchura de los mismos, dándole también valores de 0 a 10. Multiplicando el valor obtenido en longitud por el obtenido en anchura, tendremos el porcentage de raíz micorrizada. Se analizaron unos 100 fragmentos radicales por planta estudiada. En los casos en los que además de intensidad de colonización (%M), se presenten también resultados de frecuencia de colonización (%F) y frecuencia de arbúsculos (%A), se utilizó el método de Trouvelot *et al.* (1986) sin modificar.

14. Determinación de la fijación de N mediante la técnica de la dilución isotópica (^{15}N).

Para los estudios de fijación de N_2 se utilizó una aproximación cualitativa (Danso, 1988) de la técnica de dilución del isótopo ^{15}N (Hardarson & Danso, 1990). Después de 10 días de crecimiento de la planta, cada contenedor recibió una solución

de $(^{15}NH_4)_2SO_4$ con un 10% de exceso atómico ^{15}N, lo cual suministró 2 mg N/kg de suelo, equivalente a 10 kg de N/ha.

Una vez cosechadas las plantas y procesadas las muestras vegetales para análisis de nutrientes en sus tejidos (Lachica *et al.*, 1973), se tomó una alícuota de cada muestra para analizar la composición isotópica de N, que se analizó por espectrometría de masas de razones isotópicas utilizando para ello un espectrómetro FINNIGAN MAT 251 acoplado a un analizador elemental FISONS NA 1500 NC. La muestra seca y pulverizada se mineraliza en el analizador elemental hasta producir N_2, CO_2 y H_2O. El CO_2 y el H_2O son eliminados, y el N_2 se introduce en el espectrómetro de masas. Este procedimiento es conocido como método Dumas (Hardarson, 1990). Se asume que cuando se está estudiando el efecto de varios tratamientos sobre la fijación de N_2, bajo la misma exposición de fertilizante marcado con ^{15}N y con el mismo enriquecimiento en ^{15}N, los tratamientos más efectivos en mejorar la fijación de N_2 serán aquellos que presenten un menor porcentaje de exceso atómico ^{15}N en una muestra de tejido vegetal (Danso, 1988).

15. Determinación de la captación y utilización de P mediante la técnica de la dilución isotópica (^{32}P).

La técnica de dilución isotópica (Zapata & Axmann, 1995) se usó para el estudio con ^{32}P. A cada maceta se añadió una alicuota que contenía 925 kBq ^{32}P, para obtener suficiente actividad en el material vegetal. Para preparar la solución portadora marcada con ^{32}P, se añadió éste, libre de portador a un volumen conocido de solución portadora (KH_2PO_4) con 10 ppm de P (Zapata, 1990). El marcaje del suelo con ^{32}P se realizó mezclando cuidadosamente éste con 10 ml de una solución que contenía los iones ^{32}P justo antes de sembrar.

La actividad del ^{32}P en el material vegetal se midió en un contador de centelleo líquido Packard Tri-Carb 300, por el efecto Cerenkov. El resultado se corrigió por la eficiencia del contador (50%), y se expresó en desintegraciones por minuto (dpm). La actividad específica (A.E.) de la muestra se calculó considerando la radiactividad por contenido total de P en la planta, y se expresó en dpm/mg P.

16. Valoración de Prolina en hoja

El contenido foliar de prolina se determinó por colorimetría (Bates *et al.*, 1973). Para ello se homogeneizó 0.5-1 g de material vegetal fresco en 10-20 ml de solución acuosa de ácido sulfosalicílico al 3% en una "Sorvall onnimixer" a 10000 rpm durante 3 min. El homogenado resultante se filtró a través de papel Whatman® nº2. Alícuotas de 1 ml del filtrado se hicieron reaccionar con 1 ml de ninhidrina ácida (se prepara calentando 1.25 g de ninhidrina en 20 ml de ácido fosfórico 6M y 30 ml de ácido acético glacial; la mezcla resultante, de color amarillento, se conserva a 4ºC durante no más de 24 h) y 1 ml de ácido acético glacial durante 1 h a 100ºC. La reacción se detuvo introduciendo los tubos en un baño de hielo picado. La mezcla de reacción se extrae con 2 ml de tolueno, agitando vigorosamente durante 20 segundos en un agitador mecánico, tras lo cual el cromóforo obtenido, ahora en el tolueno, se deja a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 530 nm, utilizando tolueno como blanco. La concentración de prolina se determina a partir de una curva patrón de la misma de concentraciones conocidas y valoradas del mismo modo que las muestras problema.

17. Determinación de la actividad nitrato reductasa (NR) (EC 1.6.6.1) en hojas y raíces

17.1. Extracción del enzima NR

En el momento de la cosecha, 1 g de material vegetal fresco, tomado 6 h después de haber comenzado el fotoperíodo, para evitar fluctuaciones diurnas, se usó para la extracción del enzima NR. El material se homogeneizó en 10 ml de tampón de extracción utilizando una "Sorvall onnimixer", a 10000 rpm durante 3 min en un baño de hielo picado. El homogenado se filtró a través de una gasa doble y se centrifugó a 3000 g durante 5 min a 4ºC. El sobrenadante se volvió a centrifugar a 30000 g durante 20 min a 4ºC, tomándose de nuevo el sobrenadante, que se congeló en alícuotas de 1 ml a -70ºC, hasta posterior determinación de la actividad.

Tampón de extracción NR		
Tris pH 8.0	50 mM	
Edta-Na	3 mM	
Sacarosa	250 mM	
$Na_2MoO_4.2H_2O$	1 µM	
Cisteína	10 mM	
FAD	5 µM	*
DTT	2 µM	*
PMSF	1.5 mM	*
PVPP	3%(p/v)	#

* Añadir al tampón justo en el momento de usar.

Añadir en el momento de hacer el homogenado

17.2. Cuantificación de la actividad NR

Se valoró determinando la aparición de nitritos en el medio según la metodología empleada por Kaiser & Lewis (1984) y Becana *et al.* (1985), modificada por Caba *et al.* (1990). La mezcla de reacción, en un volumen final de 2 ml contenía:

Mezcla de reacción NR	
Tampón PK 100 mM pH 7.8	0.6 ml
NO_3K 100 mM	0.2 ml
Cisteína 10 mM	0.2 ml
NADH 2 mM	0.4 ml
Extracto problema	0.6 ml

La reacción se inicia con la adición del extracto (que contiene el enzima). Los tubos así preparados se incubaron en un baño termostatizado a 30ºC durante 30 min. La reacción se detiene mediante la adición a los tubos de 0.1 ml de acetato de zinc 1 M, agitando vigorosamente para asegurar al completa oxidación del NADH residual. El blanco se obtiene sustituyendo el enzima por medio de extracción, y los controles a tiempo 0 deteniendo la reacción inmediatamente antes de la incubación.

Una vez detenida la reacción, se centrifugaron los tubos a 3500 g durante 15 min. En alícuotas de 1 ml de sobrenadante se determinó la cantidad de nitrito formado mediante la reacción de diazotación del nitrito (Snell & Snell, 1949). Para ello, a las alícuotas de 1 ml de sobrenadante se les añade 1 ml de sulfanilamida (disolver 1 g sulfanilamida en 20 ml de ClH concentrado y completar hasta 100 ml con agua destilada) y 1 ml de N 1-naftil-etilendiamina diclorohidrato (NNEDA) (disolver 20 mg de NNEDA en 100 ml de agua destilada y conservar en frasco topacio a 4ºC). La mezcla se completa con agua destilada hasta un volumen de 5 ml, y tras agitar vigorosamente, se deja desarrollar el color durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente se mide la absorbancia debida al color a 540 nm.

Para la cuantificación del nitrito formado se confeccionó una curva patrón con concentraciones conocidas de NO_2^- obtenidas a partir de una solución de NO_2K.

La determinación de proteínas presentes en los extractos vegetales se realizó según método de Bradford (1976), utilizando el reactivo de cuantificación de proteínas de BIO-RAD, y albúmina bovina (SIGMA) como proteína patrón.

18. Estudio de la estructura del sistema radical

La estructura radical se determinó una vez obtenido el sistema radical completo y teñido mediante la técnica de Phillips & Hayman (1970) (Apartado 12.1.1) y consistió en colocar cada una de las raíces sobre una lámina de acetato, y tras obtener una copia en papel de la misma, determinar con un curvímetro la longitud de cada uno de los distintos componentes.

El grado de ramificación (ºBranching), la frecuencia de raíces laterales, así como la longitud específica de la raíz se calcularon según las siguientes fórmulas:

$$\text{ºBranching} = \frac{\text{nº total de raíces}}{\text{longitud radical total (cm)}}$$

$$\text{FRL orden n} = \frac{\text{nº raíces de orden n}}{\text{longitud raíces (n-1) (cm)}}$$

$$\text{LER} = \frac{\text{longitud radical total (cm)}}{\text{peso seco radical (g)}}$$

19. Detección de isoenzimas

19.1. Extracción de proteínas de los tejidos vegetales

Para el estudio de isoenzimas se congelaron parte aérea y raíces (lavadas en agua fría para evitar pérdida de actividad enzimática) en nitrógeno líquido, y se molturaron hasta polvo fino en un mortero de cerámica. Una vez pulverizada la

muestra se añadió PVPP (polivinil polipirrolidona) en proporción 0.01g/g material vegetal, para evitar que los fenoles inhiban la actividad enzimática, PMSF 1.5mM (en etanol), para inhibir proteasas, y tampón de extracción (Tris 10mM; $NaHCO_3$ 10mM; $MgCl_2$ 10 mM; Na-EDTA 0.1 mM; ß-mercaptoetanol 10mM) en proporción 1:1, v:p para el caso de partes aéreas y 1:2 para el caso de raíces. Una vez obtenido el extracto se transfiere a tubos eppendorf y se centrifuga a 10000 r.p.m. durante 20 min a 4ºC. El sobrenadante resultante se almacenó a -20ºC hasta su posterior utilización.

19.2. Extracción de proteínas de las esporas de la MA

Para la extracción de proteínas de las esporas se utilizaron unas 500 esporas obtenidas mediante el método de tamizado húmedo y decantación anteriormente descrito, las cuales una vez recogidas en un tubo eppendorf con 10 µl de tampón de extracción, se aplastaron con un pistilo de vidrio fabricado con una pipeta Pasteur y posteriormente se les dio un único pulso de unos pocos segundos en la centrífuga a 10000 r.p.m. a 4ºC, e inmediatamente fueron empleadas para la electroforesis (Apartado 17.5).

19.3. Extracción de proteínas bacterianas

Para la extracción de proteínas de los inoculantes bacterianos, se cultivaron las distintas cepas utilizadas hasta fase estacionaria en el medio de cultivo apropiado. Una vez crecidos los cultivos, se centrifugaron a 7000 r.p.m. durante 8 min, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en agua destilada estéril y se congelaron a -80ºC durante 30 min, con el fin de someter las células a un choque osmótico. A continuación se transfirió una alícuota de 0.5 ml de cada cepa a un tubo eppendorf introducido en hielo, y se lisaron por ultrasonido mediante 4 pulsos de 15 segundos a 40 v de potencia, con 15 segundos de descanso entre pulso y pulso. Las muestras así obtenidas se conservaron a -20ºC hasta su posterior utilización.

19.4. Determinación del contenido proteico de los distintos extractos obtenidos

El contenido proteico se determinó de acuerdo con el método de Bradford (1976) utilizando el reactivo para cuantificación de proteínas de BIO-RAD, y albúmina bovina (SIGMA) como proteína patrón.

19.5. Separación de proteínas mediante electroforesis

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida utilizando el sistema de electroforesis de Hoeffer "Mighty Small 250 System" (0.75 mm x 10 cm x 7 cm ó alternativamente 0.75 mm x 10 cm x 10.5 cm). La acrilamida del gel de resolución se preparó al 8.2% y la del gel de concentración al 4%. Las cantidades y descripción de los productos se resumen en la Tabla 7. El tampón de electroforesis fue Tris-Glicina pH 8.3 (Tris 0.3%; Glicina 1.44%). Se cargaron 10 mg de proteína por pocillo. A cada muestra se le adicionó tampón de carga en proporción 1µl/10µl de extracto proteico. El tampón de carga se preparó mezclando sacarosa 15%, Tritón X-100 0.1% y azul de bromofenol 0.01%. La electroforesis se realizó a voltaje constante (20 mA/gel) hasta que el azul de bromofenol alcanzó el extremo del gel y difundió al tampón de electroforesis.

	Gel de resolución (8.2% acrilamida)	**Gel de acumulación** (4% acrilamida)
Acrilamida 40% (BIORAD)	2.52 ml	0.6 ml
bis-Acrialmida 2% (BIORAD)	1.42 ml	0.3 ml
Solución B *	3.1 ml	-
Solución C **	-	1.6 ml
dH_2O	5.7 ml	3.7 ml
2% Tritón X-100	0.3 ml	162.5 µl
Persulfato amónico	12.5 mg	5 mg
TEMED	12.5 µl	7.5 µl

*Solución B: Tris-ClH 3M, pH8.8. Esterilizar por filtración.
** Solución C: Tris-ClH 0.5M, pH6.8. Esterilizar por filtración.
Para el caso de los geles para quitinasas y glucanasas se añadió 0.1 ml y 1 ml de sustrato enzimático respectivamente y se redujo en la misma proporción la cantidad de agua a añadir.

Tabla 7. Composición de los geles de acrilamida para electroforesis de proteínas.

19.6. Detección de las actividades isoenzimáticas: tinción de los geles

Los distintos enzimas estudiados se detectaron posteriormente mediante tinciones específicas. Un estudio realizado previamente reveló que para las plantas de maíz empleadas y con el tiempo de desarrollo que presentaban, de un total de 15 actividades enzimáticas estudiadas (malato dehidrogenasa, MDH ó E.C. 1.1.1.37; esterasa ó EST; Superóxido dismutasa, SOD ó E.C. 1.15.1.1; Aspartato Amino Transferasa, AAT ó E.C. 2.6.1.1; Sorbitol dehidrogenasa, SDH ó E.C. 1.1.1.14; lactato dehidrogenasa, LDH ó E.C. 1.1.1.27; Alcohol dehidrogenasa, ADH ó E.C. 1.1.1.1; catalasa, CAT ó E.C. 1.11.1.6; glutámico dehidrogenasa, GDH ó E.C. 1.4.1.2-4; Peroxidasa, PER ó E.C. 1.11.1.7; Glucosa-6-P dehidrogenasa, G6PDH ó E.C. 1.1.1.49; Glucoquinasa, GK ó E.C. 2.7.1.2; Glucosa-P isomerasa, GPI ó E.C. 5.3.1.9; Enzima málico, ME ó E.C. 1.1.1.40; Fosfatasa alcalina, AKP ó 3.1.3.1), sólo las actividades MDH, EST, GDH, SOD y PER mostraron la presencia de bandas de forma clara, con lo cual fueron éstas las actividades seleccionadas para realizar el estudio. En los casos en los que se presuponía la inducción de sistemas de defensa en la planta por parte de alguno de los tratamientos también se determinaron las actividades quitinasas y glucanasas (la composición de estos geles se resume al pie de la tabla 6). Las soluciones de tinción se muestran en la Tabla 8.

19.7. Cuantificación de la actividad enzimática

La cuantificación de la actividad enzimática se realizó en aquellos casos en los cuales se observaron diferencias considerables entre los distintos tratamientos ensayados, y más que cuantificación como tal, se trató de comparar los efectos de los distintos tratamientos sobre un parámetro conocido como volumen de banda. La cuantificación de los volúmenes de banda se realizó mediante el programa de análisis de imagen "Imagen Master 1D Software" (Pharmacia biotech software, Newcastle, England).

	Soluciones de tinción
MDH	Acido málico 0.6% en solución C, pH 8.0. Añadir NAD^+ 0.02%, azul de tetrazolio (NBT) 0.02%, fenacina metosulfato (PMS) 0.012%.
EST	100 ml Solución C diluída 1:5, pH 7.1. Disolver 0.04g α-naftil acetato y 0.04g ß-naftil acetato en 4 ml acetona 50% y verter sobre la solución anterior. Añadir 0.1g de "Fast Blue RR". Filtrar la solución a través de papel Whatman® n°1. Incubar el gel a 37°C.
GDH	Tris 0.045M, ácido bórico 0.025 M, EDTA 0.001M, pH 8.7. Acido glutámico 0.2%, NAD+ 0.02%, MTT 0.01%, PMS 0.003%.
SOD	Incubar el gel 20 min a 25°C en una solución de azul de tetrazolio (NBT) 2.45 mM en tampón PK 50mM pH 7.8. Retirar la solución anterior e incubar 15 min a 25°C en una solución que contiene Riboflavina 28 µM, TEMED 0.42%, en tampón PK50 mM pH 7.8. Eliminar la solución anterior, lavar 2 veces con tampón PK 50 mM e iluminar el gel en el último tampón, con luz solar hasta aparición de bandas.
PER	Añadir 0.48 ml de H_2O_2 33% p/v y 10mg de cloronaftol disuelto en 1 ml de metanol a 100 ml Tris 0.1 M pH 7.6.
Glucanasas	Lavar el gel 20 min en tampón acetato-Na 50 mM pH 5. Eliminar tampón e incubar en uno nuevo de 3-5h. Eliminar tampón de incubación y teñir con calcofluor 0.01% en Tris-ClH 0.3M pH 8.9 durante 5 min. Lavar en agua destilada hasta que aparezcan bandas en el transiluminador U.V.
Quitinasas	Lavar e incubar el gel del mismo modo que se indica para el caso de las glucanasas. Teñir con azul de anilina al 0.05% en K_2HPO_4 150 mM pH 8.6, durante 20 min. Eliminar solución de tinción y observar bandas en el transiluminador U.V.

Tabla 8. Soluciones de tinción de los distintos enzimas ensayados.

20. Determinación de la actividad enzimática del suelo

Los métodos de detección de los distintos enzimas que se describen a continuación se realizaron sobre muestras de suelo rizosférico previamente aireado para eliminar exceso de humedad si la hubiera, y conservados a 4°C hasta su utilización. A pesar de ello los resultados se expresarán por gramo de suelo seco, a efectos comparativos. Para cada determinación se añadieron controles autoclavados (120°C, 20 min) que permitieron deducir la descomposición no enzimática del suelo, valor que se le restará al obtenido para cada problema. La concentración del producto

de la hidrólisis enzimática se determinó leyendo la densidad óptica, a la longitud de onda que posteriormente se señala para cada actividad, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-160 y comparando los resultados con los obtenidos para una curva patrón de concentraciones conocidas.

20.1. Determinación de la actividad esterasa

El método utilizado para determinar la actividad esterasa mediante la hidrólisis del diacetato de fluoresceína y liberación de fluoresceína fué el propuesto por Schnurer & Rosswall (1982) y modificado por Inbar *et al.* (1991). Se colocaron 0.1 g de suelo de las distintas muestras en tubos de ensayo de 25 ml de capacidad, a los que se añadieron 10 ml de tampón PK estéril (60mM, pH 7.6). La reacción se inició mediante la adición de 1ml de una solución de diacetato de fluoresceína (1mg/ml en acetona). Los tubos se cerraron para evitar la evaporación de la acetona y se incubaron a 37ºC durante 4h. La reacción se paró mediante la adición de 10 ml de acetona. El contenido de los tubos se transfirió a tubos de centrífuga y se centrifugaron a 3200 r.p.m. durante 10 min. La densidad óptica del sobrenadante se determinó a 490 nm.

20.2. Determinación de las actividades fosfatasa y quitinasa

Ambas actividades se analizaron siguiendo un protocolo común basado en la metodología adaptada de Beam (1971). El proceso es el mismo para ambos enzimas, variando el sustrato de la reacción. Se pesaron 0.1g de suelo de las distintas muestras para la fosfatasa y 1g para la quitinasa, en tubos de ensayo de 20 ml de capacidad, a los que se añadieron 2 ml del sustrato enzimático (p-nitrofenil-P para la fosfatasa y p-nitrofenil-ß-acetil glucosamina para la quitinasa) a una concentración de 1mg/ml. Los tubos se taparon y se dejaron en incubación a 37ºC durante 4h. La reacción se paró mediante la adicción de 6ml de etanol y el contenido de los mismos fué transferido a tubos de centrífuga. Tras centrifugar a 3500 r.p.m. durante 10 min, se pipetearon 2 ml

del sobrenadante en tubos que contenían 8 ml de agua destilada, y el color se desarrolló mediante la adicción de 1 ml de NaOH 0.2N. La cantidad de p-nitrofenil liberada fue determinada leyendo la densidad óptica a 420 nm y comparando con una curva patrón realizada con p-nitrofenol.

20.3. Deteminación de la actividad trealasa

El método usado para determinar la actividad trealasa fué el propuesto por Smith & Rodríguez-Kábana (1982). La actividad trealasa fue expresada como liberación de grupos reducidos (glucosa) después de la incubación con trealosa. Se pesó 1 g de suelo de las distintas muestras en tubos de ensayo de 20 ml de capacidad, a los que se añadieron 2 ml de trealosa al 2%. Los tubos se taparon e incubaron a 37ºC durante 3h, pasadas las cuales se les añadieron 10ml de agua destilada y la suspensión se centrifugó a 3200 r.p.m. durante 20 min. El análisis de los azúcares reductores (cantidad de glucosa liberada) se llevó a cabo con 1 ml de sobrenadante siguiendo el método de Nelson (1944) para cuantificación de azúcares reductores.

Método de Nelson

Se colocó 1 ml de sobrenadante en un tubo de ensayo que contenía 1 ml de reactivo de cobre y se dejó 20 min al baño María a 100ºC. Los tubos se enfriaron transfiriéndolos a un baño de agua fría, se les añadió 1 ml de reactivo de arsenomolibdato y tras mezclar se diluyó con agua hasta 25ml. La densidad óptica se determinó a 720 nm.

- Reactivo de cobre: Está formado por 25 partes de solución A y 1 parte de solución B (v:v).

- **Solución A**: Na_2CO_3 2.5%, $NaHCO_3$ 2%, $C_4H_4KNaO_6$ (sal de Rochelle) 2.5%, Na_2SO_4 20%.

- **Solución B**: $CuSO_4.5H_2O$ 15%, con 1 ml/l de H_2SO_4 concentrado.

- Reactivo de arsenomolibdato: Disolver 25g $(NH_4)_6$ Mo_7O_{24}. $4H_2O$ en 450 ml de agua destilada y 21 ml H_2SO_4 concentrado. Añadir 3g de $Na_2HAsO_4.7H_2O$ disueltos en 25 ml agua. Incubar la mezcla a 37ºC hasta que se obtenga un líquido de color amarillo pálido. Almacenar el reactivo en una botella de vidrio oscuro.

21. Tipos de ensayos realizados

21.1. Ensayos en microcosmos bajo condiciones controladas

El tamaño de los contenedores para cultivo de las plantas en este tipo de ensayos nunca excedieron de 1.5 l. En todos ellos las plantas crecieron bajo condiciones de invernadero con temperaturas entre 19-25ºC, fotoperíodo de 16/8 luz/oscuridad y humedad relativa de 70-90%, y fueron regadas diariamente según necesidades, a excepción de aquellos ensayos en los cuales se pretendió estudiar el efecto del estrés hídrico, en cuyo caso las macetas se pesaron y regaron diariamente ajustándose la cantidad de agua a 80% y 100% de la capacidad de campo, según tratamientos.

21.2. Ensayos en microcosmos bajo condiciones de campo

Todos ellos, independientemente del tipo de microorganismo empleado, presentaron una serie de características comunes que se describen a continuación.

Los experimentos se llevaron a cabo bajo condiciones de campo en la finca experimental de la EEZ (Granada). En dicha parcela se practicaron perforaciones en las cuales se introdujeron contenedores de 6l de capacidad, usados como sistema para cultivo, y que posteriormente fueron rellenados con el suelo previamente extraído. Los contenedores quedaban pues enterrados salvo 2-3 cm de su borde superior. La distancia entre contenedores fué de 0.5 m (Fig. 2).

Las características del suelo se corresponden a las del suelo tipo A.

Las plantas crecieron bajo condiciones de campo, por un período de dos meses, durante Junio y Julio, y fueron regadas según necesidades.

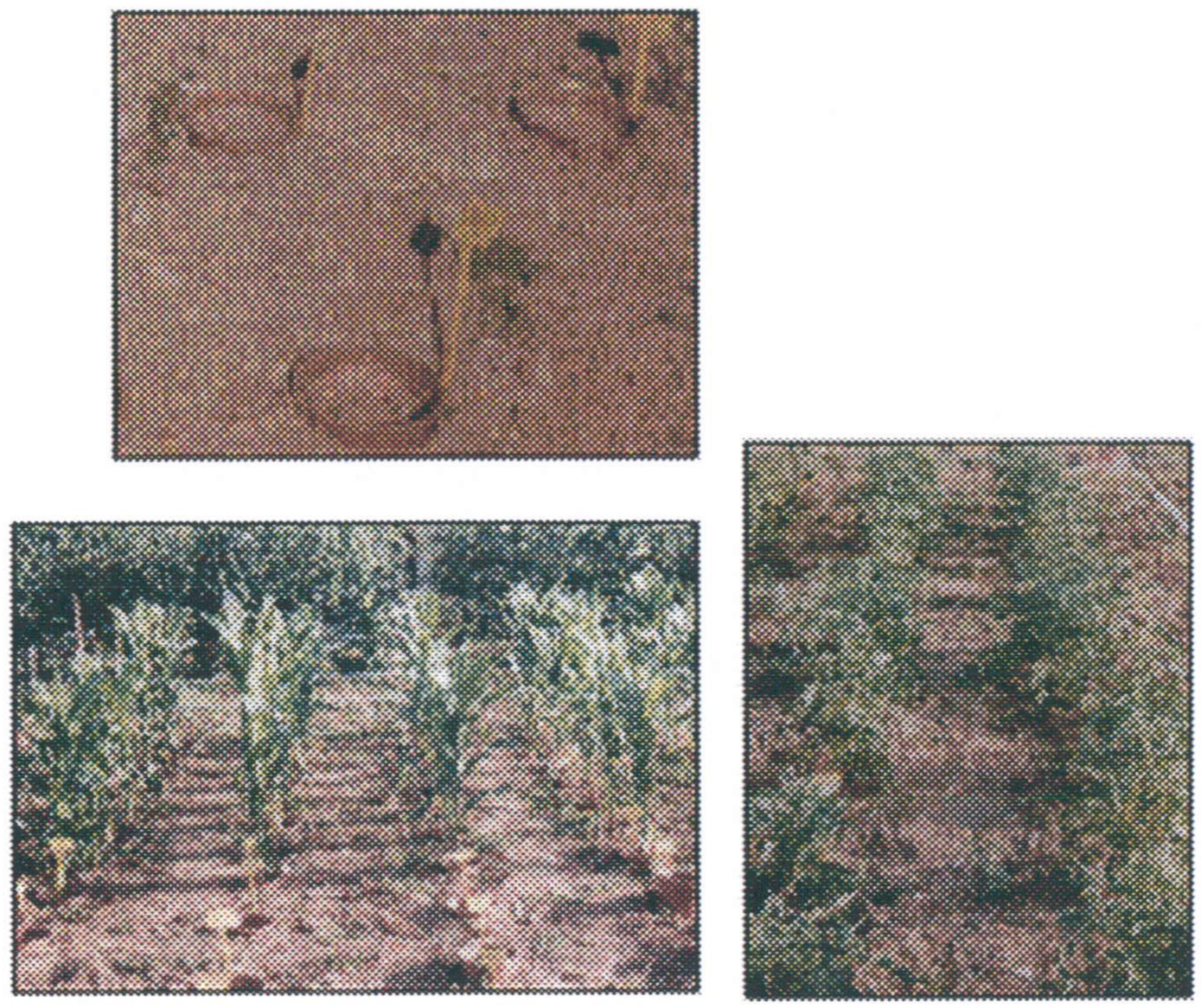

Fig. 2. Ubicación y distribución de los contenedores en la parcela experimental. Aspecto de las plantas de maíz y tomate creciendo en este tipo de sistema experimental

21.3. Ensayo de campo

Realizado durante los años 97, 98 y 99, con la pretensión de estudiar el efecto de la inoculación de microorganismos (*Rhizobium* y *Pseudomonas*) (S vs. MG) y el uso de practicas agrícolas normales (aplicación de fungicidas y rotación de cultivos) sobre las poblaciones naturales (diversidad y función) de hongos MA, en el contexto de bioseguridad de los inoculantes. La descripción correspondiente a este tipo de ensayo se detalla en su Capítulo correspondiente.

22. Análisis estadístico de los resultados

Los efectos de los distintos tratamientos sobre cada una de las variables analizadas en cada uno de los experimentos realizados fueron estimados mediante un análisis de la varianza (ANOVA) con un número de vías variable en función de la fuentes de variación del experimento, así por ejemplo cuando existieron dos fuentes de variación (p.e. micorriza y estrés hídrico) se aplicó un ANOVA2, etc. Cuando la probabilidad fué $P \leq 0.05$ se consideró que existieron diferencias significativas según el test de las míminas diferencias significativas (LSD-Fisher).

Los datos correspondientes a variables experimentales que se expresan en % se representan como tales en las gráficas, pero el análisis estadístico de los mismos se efectúa tras su transformación (inversa del seno). El número total de esporas también se transfromó (log) antes del análisis estadístico.

Interacciones MA-Azospirillum

Interacciones MA-*Azospirillum*

Introducción

Las bacterias pertenecientes al género *Azospirillum* han sido catalogadas como PGPR por ser colonizadoras de la rizosfera y beneficiar el crecimiento y desarrollo vegetal, como se describió ampliamente en el capítulo introductorio. Como se indicó anteriormente, los efectos de la PGPR pueden ser ejercidos a través de la producción de compuestos antagonistas de patógenos de plantas, de compuestos biológicamente activos tales como vitaminas, hormonas, enzimas, etc, o porque intervengan directamente en los ciclos de nutrientes, ya sea como fijadores de N, o como solubilizadores de P (Glick, 1995). En el caso de *Azospirillum*, son dos los mecanismos que principalmente operan: (a) fijación de N, aunque no se considera cuantitativamente importante (Hong *et al.*, 1991), y (b) producción de fitohormonas (Bashan & Holguin, 1997), que pueden estimular el desarrollo vegetal. En general, la producción de fitohormonas va a dar lugar a un mayor desarrollo del sistema radical, pudiendo afectar tanto morfología, como geometría y fisiología. Esto puede tener consecuencias tanto sobre el desarrollo de la planta como sobre la formación y función de la MA, que indirectamente también va a redundar en beneficio de la planta (Linderman, 1992).

La liberación de fitohormonas por *Azospirillum* podría estimular la suceptibilidad de la planta a la micorrización, la geminación de las esporas o el desarrollo de micelio, lo que aumenta, en definitiva, la posibilidad de contacto entre la planta y el hongo, incrementando así los niveles de colonización radical por parte del hongo de la MA (Balota *et al.*, 1995).

Otros efectos mediados por *Azospirillum* se basan en la secreción de compuestos de bajo peso molecular (Glick *et al.*, 1994), entre los cuales se podrían incluir determinadas fitohormonas, que producen alteraciones en el metabolismo de la planta inoculada, lo que puede afectar a los niveles de expresión de determinadas actividades metabólicas relacionadas con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, como es el caso de la malato dehidrogenasa o MDH (Hadas & Okon, 1987; Michiels *et al.*, 1989), o bien enzimas relacionados con la glicolisis, síntesis de aminoácidos aromáticos, así como de otra serie de rutas metabólicas (Michiels *et al.*, 1989).

Teniendo en cuenta que determinadas actividades enzimáticas pueden alterarse como consecuencia de la inoculación con *Azospirillum*, se considera oportuno hacer unos breves comentarios sobre la relación de ciertas actividades enzimáticas con actividades microbianas. En efecto, la actividad enzimática de un suelo se usa frecuentemente como índice de actividad microbiana total en ese suelo, y como índice de la fertilidad del mismo (Dhruva Kumar *et al.*, 1992). Así, algunos cambios cuantitativos y cualitativos en las poblaciones microbianas en suelo rizosférico ocasionados, bien por micorrizas o bien por la introducción de determinados inoculantes, puede estimarse a través de los cambios en la actividad enzimática en dicho suelo. Así, la esterasa (E.C. 3.1.1.1) ha sido utilizada como marcador de la actividad catabólica en suelo, directamente correlacionada con la actividad microbiana (Inbar *et al.*, 1991). Igual sucede con la trealasa (E.C. 3.2.1.28), enzima que cataliza la hidrólisis de trealosa, azúcar muy común en insectos, hongos y bacterias, pero poco frecuente en plantas superiores, incluso es índice de toxicidad para determinadas especies vegetales; sin embargo es un azúcar muy común en simbiosis (Mellor, 1992). Otros enzimas que pueden ser usados como marcadores son la fosfatasa (E.C. 3.1.3.1), que interviene en la liberación al suelo de fósforo inorgánico a partir de fosfatos orgánicos (Dhruva Kumar *et al.*, 1992), y la quitinasa (E.C. 3.2.1.14) que cataliza la degradación de la quitina, componente principal de la mayoría de paredes

celulares fúngicas, pudiendo, por tanto, estar implicada en mecanismos de defensa de la planta frente a la invasión o ataque por hongos patógenos (Spanu *et al.*, 1989).

En este capítulo se va a investigar el efecto de varias cepas de *Azospirillum,* capaces de producir cantidades variables de la fitohormona ácido indolacético (AIA), sobre distintos aspectos de la fisiología del vegetal, el desarrollo y función de la MA, así como sobre la actividad microbiana en la rizosfera medida a través de los niveles de esterasa, fosfatasa, quitinasa y trealasa.

Ensayos de interacciones

1. Ensayo *in vitro*

1.1. Efecto de *A. brasilense* Sp 245 (S) y Sp 245b (MG) sobre la germinación de esporas y desarrollo del micelio de *G. mosseae in vitro*.

Material y Métodos

Las cepas bacterianas empleadas se seleccionaron en función de su capacidad o no para producir determinadas cantidades de ácido indolacético (AIA). Así, se utilizaron las cepas Sp245 o cepa silvestre (S) y la cepa Sp245b o cepa modificada genéticamente (MG). Las características de ambos microorganismos se recogen en la Tabla 3 (Apartado 2, Capítulo *Material y Métodos*).

Una vez obtenidos los inoculantes bacterianos (DO_{600} = 0.4, equivalente a 1.6 x 10^8 ufc/ml) se hicieron diluciones seriadas de los mismos en agua destilada estéril, y se utilizaron para el ensayo de germinación las diluciones 10^{-4}, 10^{-5} y 10^{-6}, las cuales fueron sembradas en medio AAM de dos formas distintas: 100 µl de suspensión extendidos por toda la placa mediante un asa de siembra de vidrio, o bien depositando 100 µl de suspensión bacteriana, en forma de gota en el centro de la placa (sólo para la dilución 10^{-4} de cada uno de los cultivos). Se prepararon 7 repeticiones de cada

tratamiento, resultando un total de 63 placas, en cada una de las cuales se colocaron 5 esporas de *G. mosseae* siguiendo la metodología descrita en el Apartado 11 del Capítulo *Material y Métodos*.

Resultados

A los 10 días de incubación todos los tratamientos aplicados ejercieron un efecto positivo sobre la germinación, con respecto al control (Fig. 1). En cambio al final de la experiencia (30 días), no había efectos positivos, e incluso algunos tratamientos con mayor densidad de bacterias afectaban negativamente la germinación. Mientras que con la cepa productora de AIA (S) las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} redujeron la germinación, con la cepa baja productora de AIA (MG), sólo se produjo tal efecto a la dilución 10^{-4}.

Todos los tratamientos aplicados y para cualquiera de las diluciones empleadas (Fig. 2) estimulan el desarrollo del micelio del hongo *G. mosseae*, así como el número de esporas secundarias que se forman sobre el mismo. Ambas variables experimentales (longitud de micelio y número de esporas secundarias) están positivamente correlacionados, y al igual que ocurría sobre la tasa de germinación las diluciones más bajas y para las dos cepas de *Azospirillum*, son las más efectivas.

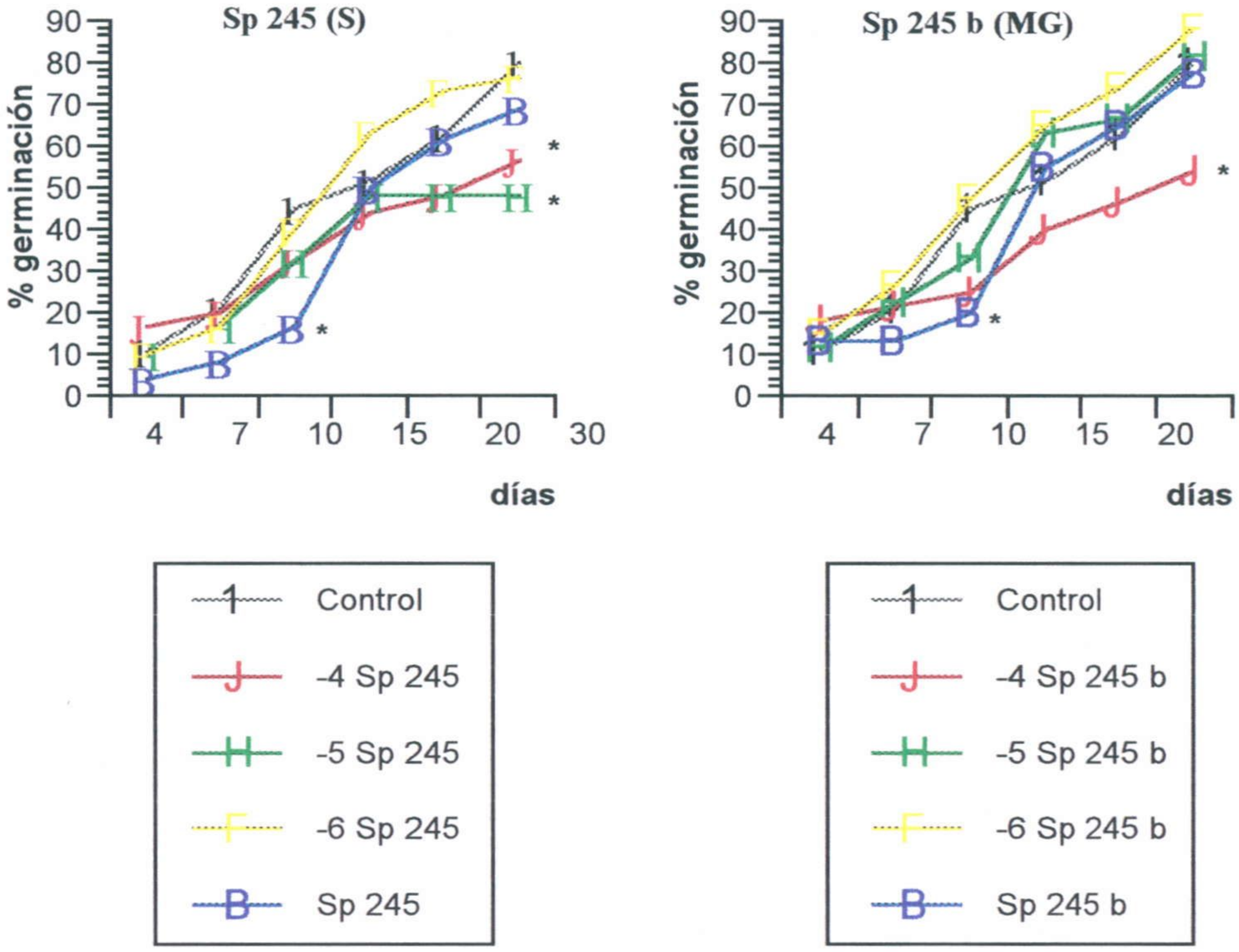

Fig. 1. Efecto de *A. brasilense* sobre la germinación de esporas de *G. mosseae*. Símbolos con * para valores correspondientes a un mismo tiempo de muestreo indican que existen diferencias significativas ($P \leq 0.05$) según el test Z.

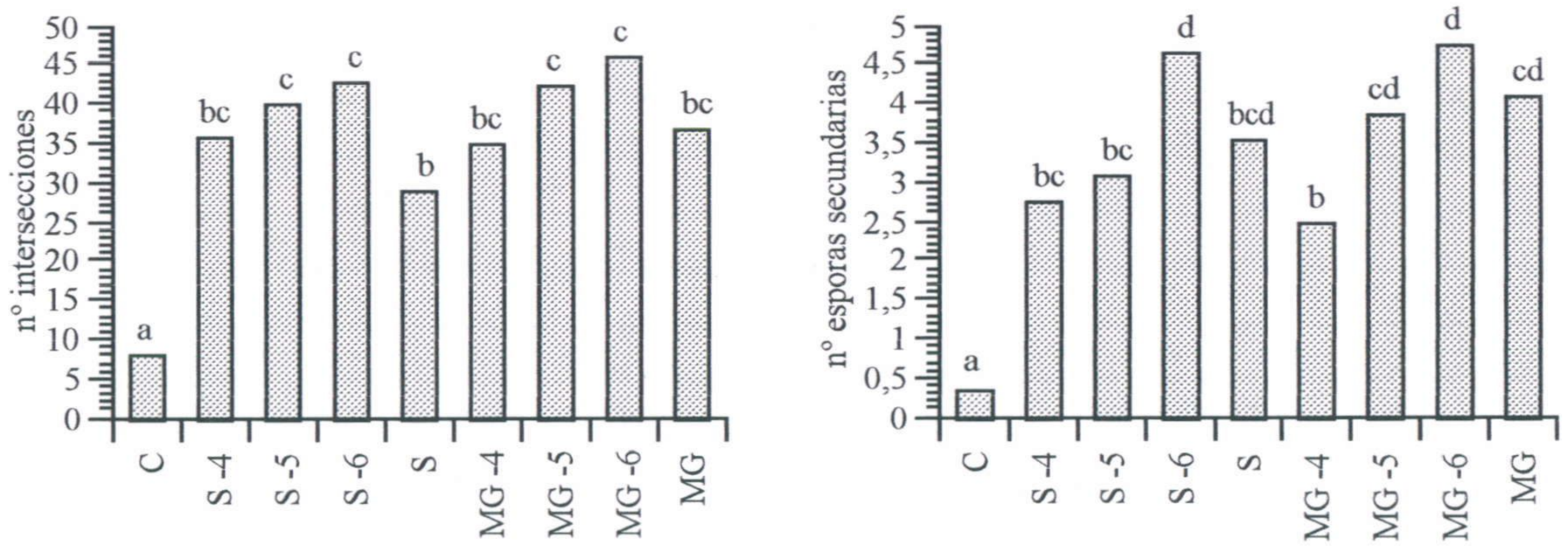

Fig. 2. Efecto de *A. brasilense* Sp 245 (S) y Sp 245b (MG) sobre el desarrollo de micelio y la formación de esporas secundarias a partir de esporas germinadas de *G. mosseae*. Valores que comparten la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($P \leq 0.05$).

2. Ensayos en microcosmos bajo condiciones controladas

2.1. Efecto de *A. brasilense* Sp 245 (S) y Sp 245b (MG) sobre la infectividad de *G. mosseae* y el desarrollo del sistema radical de tomate en dos estadíos distintos del ciclo de cultivo (2 y 4 semanas).

Material y Métodos

Sistema y diseño experimentales

El experimento se diseñó con dos factores de variación. El primero, el factor MA, contenía 3 tratamientos: Control sin micorrizar (C), inoculación con *G. mosseae* y los endofitos naturales. El segundo factor fué en la presencia o no de *Azospirillum*, y contenía otros 3 tratamientos: inoculación con *A. brasilense* Sp 245 (cepa silvestre o S), *A. brasilense* Sp 245b (cepa modificada genéticamente o MG), y un control no inoculado (C). Ello dió lugar a un total de 9 tratamientos diferentes, con 10 repeticiones de cada uno, que hacen un total de 90 macetas. Los contenedores usados como sistema para cultivo fueron bolsas negras de polietileno de 20.5 x 13.5 cm., con capacidad para 1 l de suelo.

Características del suelo

Se utilizó sustrato A pasteurizado y reinoculado con un filtrado de suelo natural.

Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos

Tomate fué la planta elegida para la realización de este experimento. Las semillas pregerminadas se transfirieron a los contenedores previamente preparados donde el sustrato había recibido, en su caso los tratamientos micorrícicos. Se cultivó una plántula por contenedor. En los tratamientos micorrizados se adicionaron al sustrato 20g por contenedor de un inóculo de *G. mosseae*. Los inoculantes bacterianos

(DO_{600} = 1.2, equivalente a $1.25x10^9$ ufc/ml) se aplicaron a las radículas de las plantas, inoculándose 1ml de la suspensión bacteriana por planta.

Determinaciones

Las plantas se cosecharon a dos tiempos distintos de crecimiento vegetal: 2 y 4 semanas, utilizándose la mitad de las repeticiones de cada tratamiento para cada cosecha (5 repeticiones/tratamiento/cosecha). Una vez cosechadas se determinó el peso seco de parte aérea y raíces tras secar cada planta en un horno a 65ºC durante 48h, la extensión de la colonización radical por parte del hongo de la micorriza (% micorrización) y la estructura radical (longitud y número de raíces de los distintos órdenes, grado de ramificación, frecuencia de raíces laterales, longitud específica de la raíz).

Resultados

En la Tabla 1 se resumen los resultados del análisis estadístico realizado con los datos obtenidos tras el primer muestreo (14 días). Se puede comprobar que las diferencias observadas se deben exclusivamente al factor MA, sin que la inoculación con *Azospirillum*, ni la interacción entre ambos factores afecten las distintos variables experimentales analizadas. Los valores medios de los resultados obtenidos para las variables de la planta en cada tratamiento se muestran en las Figuras 3 y 4, y para las variables de la MA en la Figura 6.

Respuesta	Fuente de variación		
	MA	***Azospirillum***	**MA x *Azospirillum***
Variables de la planta			
Peso seco parte aérea	0,0001	0,2803	0,3435
Peso seco raíz	0,0112	0,4461	0,9703
Longitud raíz principal	0,6862	0,5786	0,8267
Longitud raíz 1er orden	0,0036	0,6169	0,9653
Longitud raíz 2^{o} orden	0,7805	0,3364	0,2374
Longitud radical total	0,0144	0,5132	0,9238
N^{o} raíces 1er orden	0,0066	0,2573	0,4669
N^{a} raíces 2^{o} orden	0,0830	0,9173	0,2649
N^{o} total raíces	0,0018	0,6431	0,4505
Indice de Ramificación	0,0577	0,8648	0,4529
Frec. laterales 1er orden	0,0160	0,8832	0,3857
Frec. laterales 2^{o} orden	0,6690	0,9101	0,2131
LER	0,1202	0,8002	0,9647
Variables de la MA			
N^{o} puntos de entrada	0,0001	0,9562	0,9988
N^{o} PE/cm raíz	0,0001	0,9315	0,8177
% micorrización	0,0001	0,1182	0,4863

Tabla 1. Resultados de un ANOVA (valor P) de dos vías realizado para las distintas variables analizadas tras 14 días de crecimiento de plantas de tomate. El factor MA consiste en 3 tratamientos distintos: sin micorriza, con *G. mosseae*, y con los endofitos naturales; el factor *Azospirillum* consiste en tres tratamientos distintos: sin *Azospirillum*, con Sp 245 y con Sp 245b.

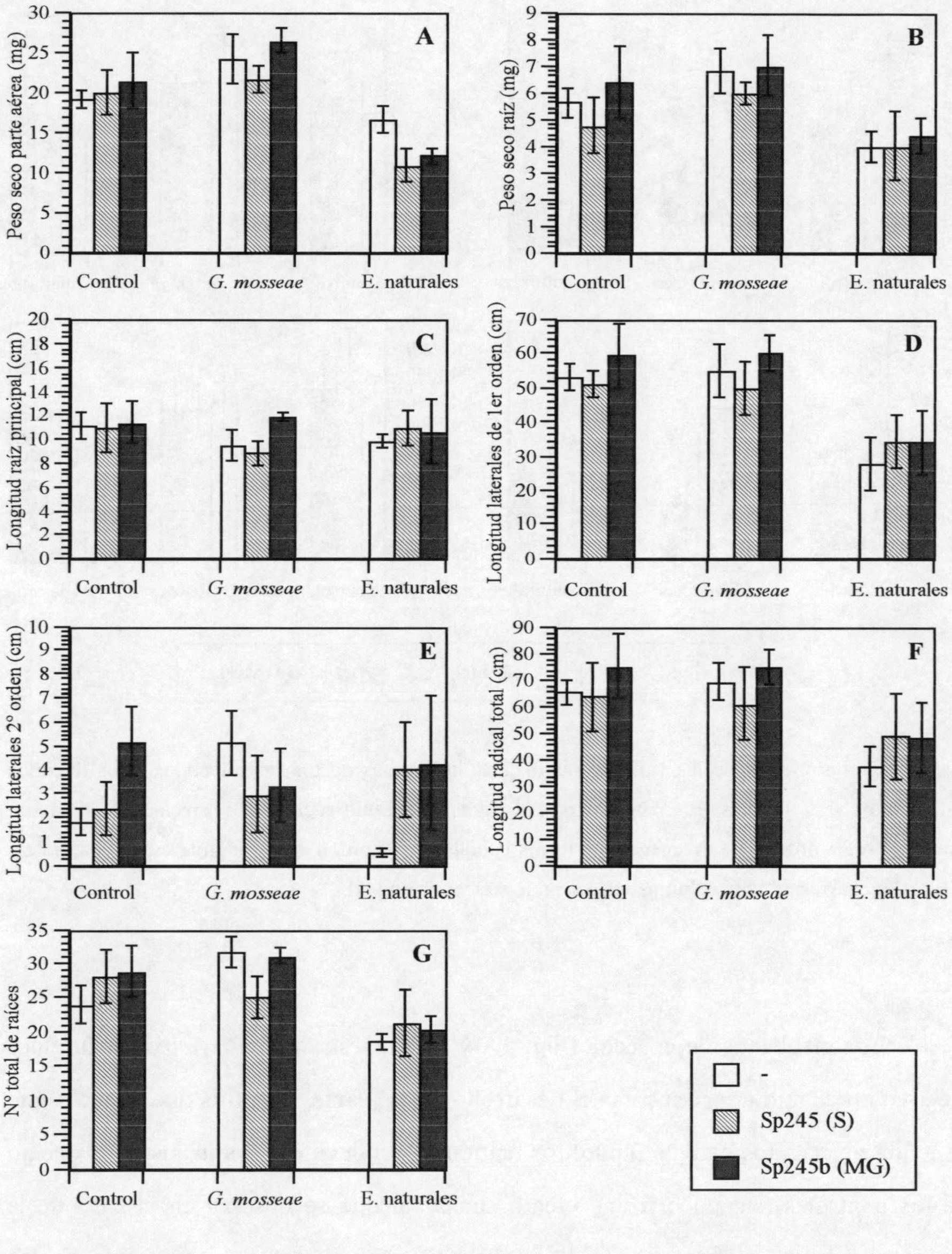

Fig. 3. Valores medios de variables de las plantas sometidas a los distintos tratamientos tras 14 días de crecimiento. (A) Peso seco de la parte aérea, (B) Peso seco de la raíz, (C) Longitud de la raíz principal, (D) Longitud total de raíces de 1er orden, (E) Longitud total de raíces de 2º orden, (F) Longitud radical total, (G) Número total de raíces. Las barras en cada columna representan el error estandard.

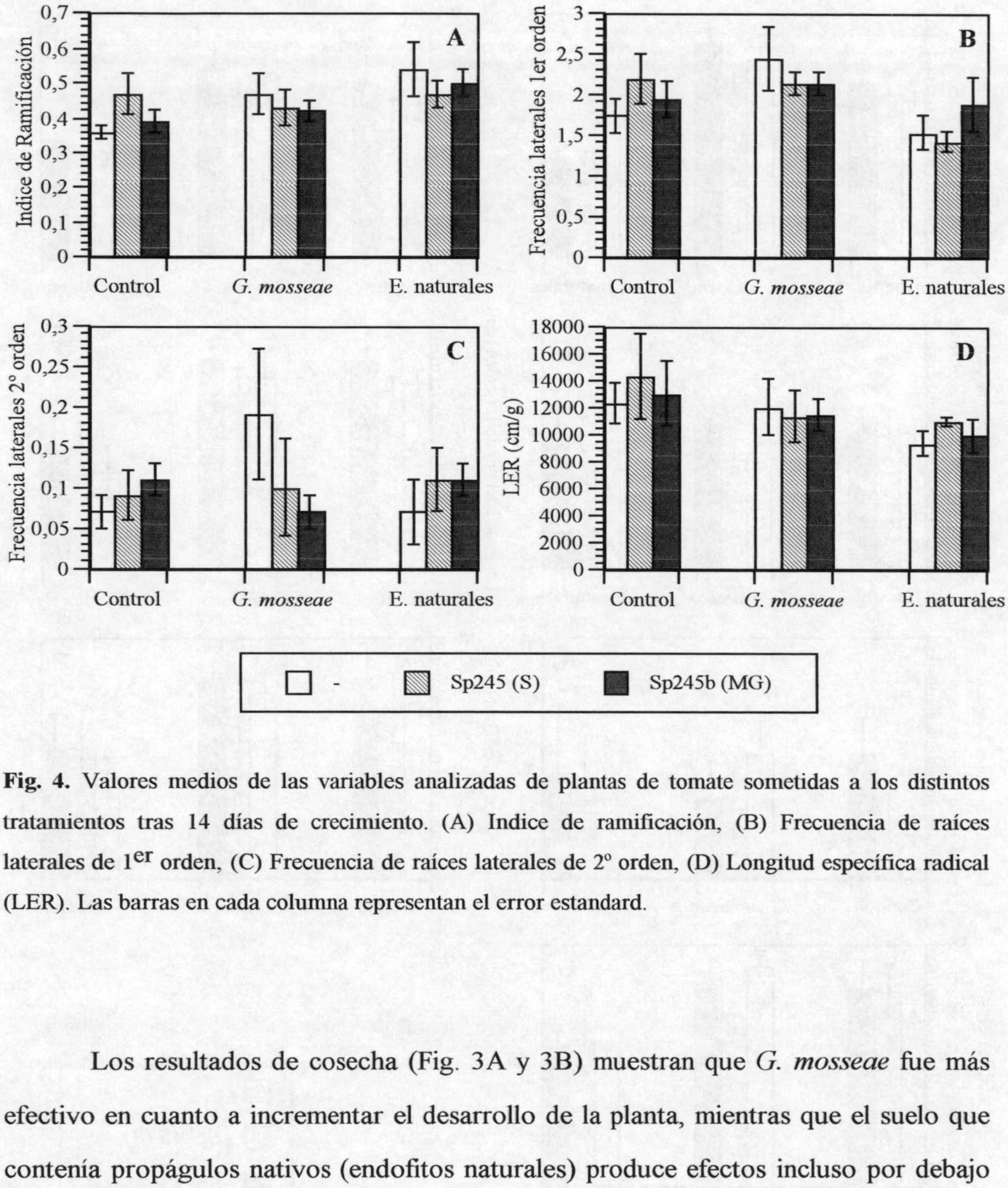

Fig. 4. Valores medios de las variables analizadas de plantas de tomate sometidas a los distintos tratamientos tras 14 días de crecimiento. (A) Indice de ramificación, (B) Frecuencia de raíces laterales de 1er orden, (C) Frecuencia de raíces laterales de 2^{o} orden, (D) Longitud específica radical (LER). Las barras en cada columna representan el error estandard.

Los resultados de cosecha (Fig. 3A y 3B) muestran que *G. mosseae* fue más efectivo en cuanto a incrementar el desarrollo de la planta, mientras que el suelo que contenía propágulos nativos (endofitos naturales) produce efectos incluso por debajo de los controles (sin micorrizar), efecto similar al que se observa en el caso de la frecuencia de raíces laterales de 1er orden (Fig 4B). Este efecto negativo de los endofitos naturales se puede apreciar también tanto en el caso de la longitud de raíces de 1er orden (Fig. 3D) como en el caso de longitud radical total (Fig. 3F) y número total de raíces (Fig. 3G), sin que la inoculación con *G. mosseae* aporte beneficios en lo

que se referie a estas tres últimas variables experimentales, en relación a sus respectivos controles sin inocular. Del mismo modo que el número total de raíces es afectado por el factor MA, también lo va estar la proporción relativa de raíces de cada orden (Fig. 5). Como consecuencia de esta serie de alteraciones tanto en longitud como en número de raíces, el índice de Ramificación de la raíz es afectado (Fig. 4A), siendo los endofitos naturales los más efectivos.

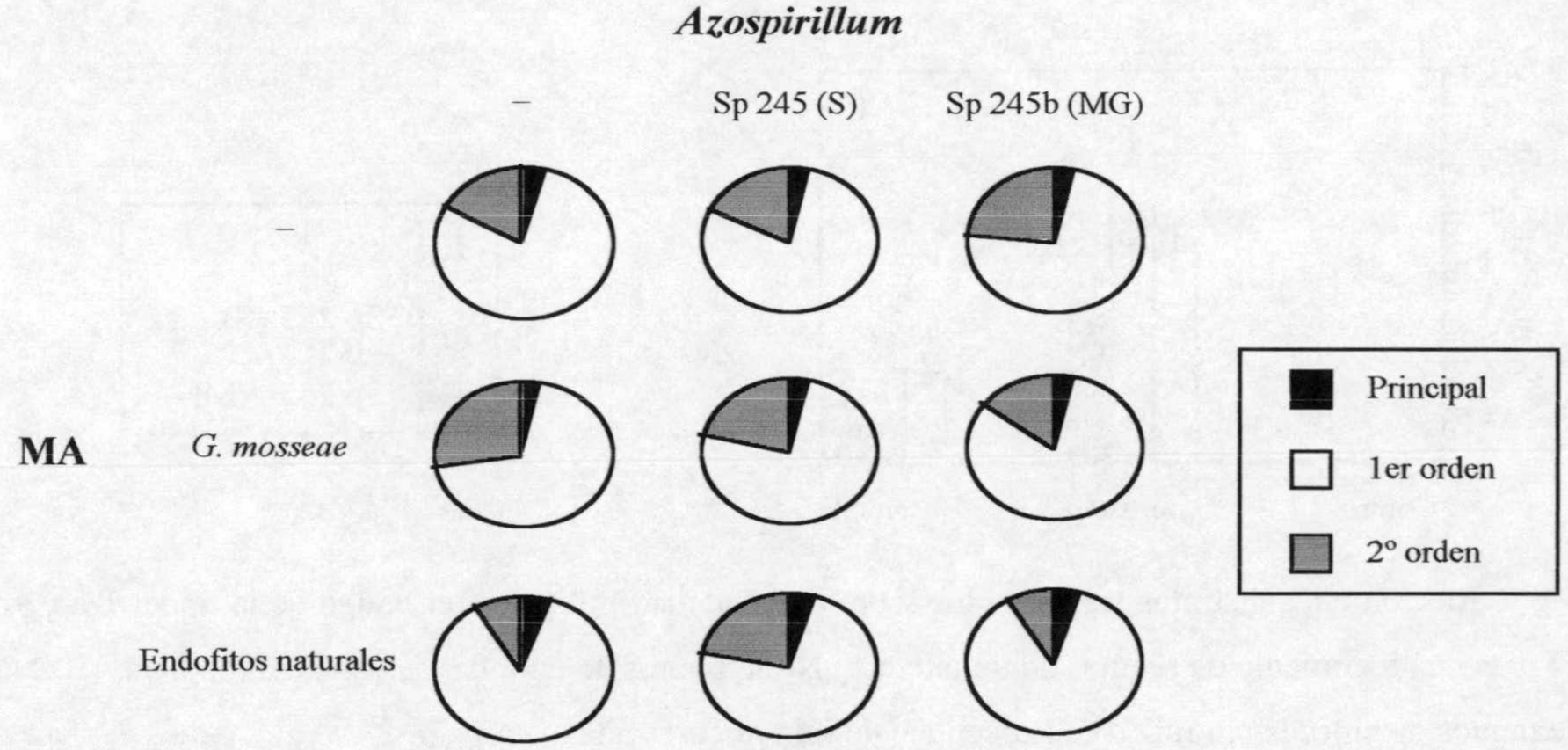

Fig. 5. Efecto de los distintos tratamientos sobre las proporciones relativas de las raíces de distintos órdenes (principal, laterales de 1er orden y laterales de 2^{o} orden) en plantas de tomate tras 14 días de crecimiento.

La capacidad colonizadora del hongo de la micorriza tampoco es afectada, en ninguno de los casos, por la inoculación con *Azospirillum*. Los valores de micorrización obtenidos fueron siempre mayores en el caso de raíces inoculadas con *G. mosseae* que en el caso de raíces de plantas crecidas en el suelo donde los endofitos naturales estaban presentes (Fig. 6).

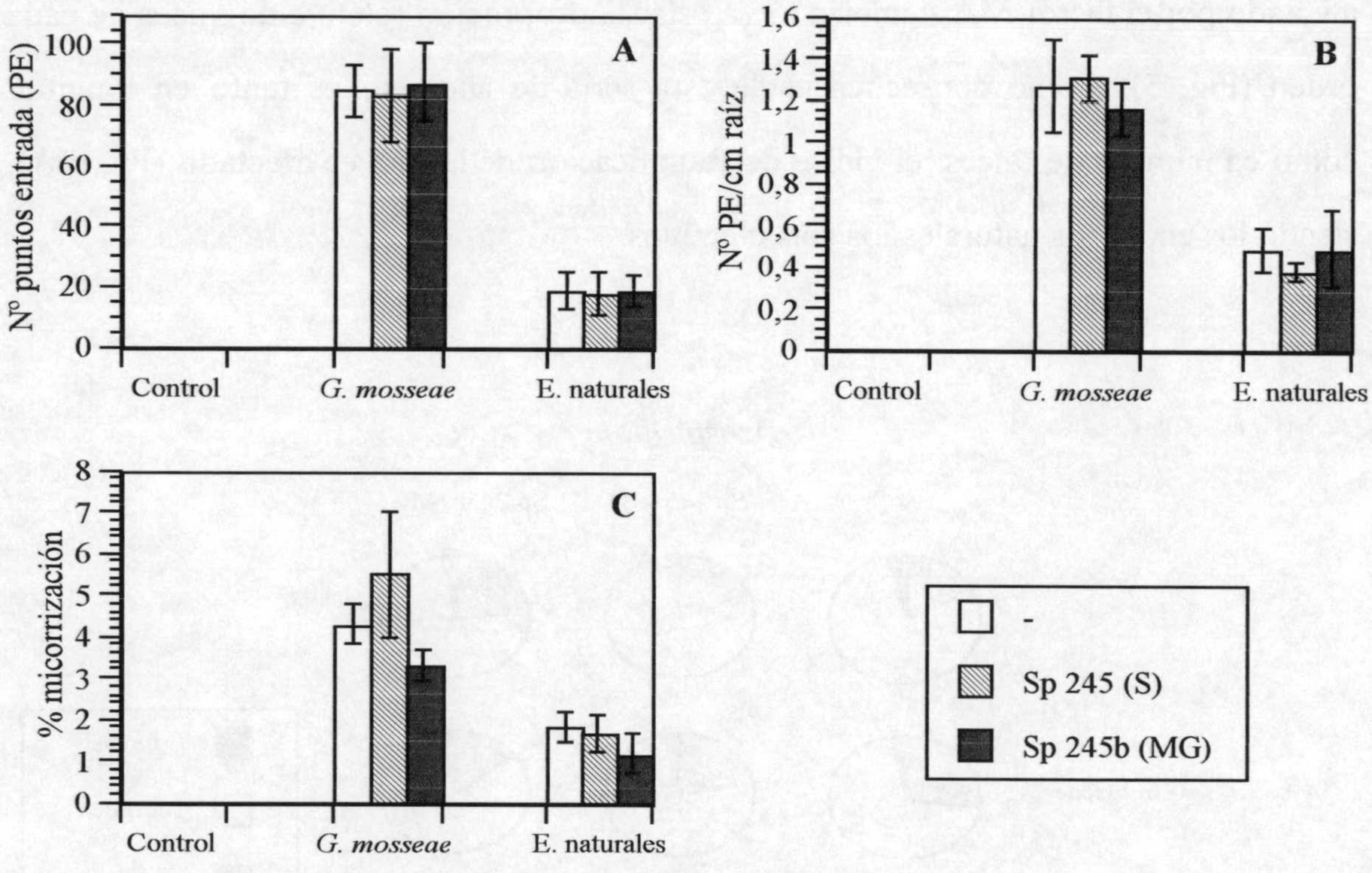

Fig 6. Efecto de los distintos tratamientos sobre la capacidad infectiva del hongo de la micorriza tras 14 días de crecimiento de plantas de tomate. (A) Nº de puntos de entrada en el sistema radical, (B) Nº de puntos de entrada/cm raíz, (C) Porcentaje de raíz micorrizada.

En el segundo muestreo (28 días), si se observan ya diferencias debidas a la inoculación de *Azospirillum* (Tabla 2). Los valores medios correpondientes a este muestreo quedan recogidos en las Figuras 7, 8 y 9 para las variables de la planta, y en la Figura 11, para las variables del hongo.

Respuesta	Fuente de variación		
	MA	***Azospirillum***	**MA x *Azospirillum***
Variables de la planta			
Peso seco parte aérea	0,0130	0,0316	0,0833
Peso seco raíz	0,0565	0,0322	0,0666
Longitud raíz principal	0,9901	0,2406	0,9235
Longitud raíz 1er orden	0,8655	0,5923	0,5037
Longitud raíz 2º orden	0,4572	0,2755	0,0810
Longitud raír 3er orden	0,0137	0,0644	0,1097
Longitud radical total	0,5989	0,3036	0,1648
Nº raíces 1er orden	0,0885	0,4651	0,8481
Nª raíces 2º orden	0,1011	0,3449	0,1789
Nº raíces 3er orden	0,0431	0,666	0,1184
Nº total raíces	0,0820	0,1639	0,1594
Indice de Ramificación	0,0038	0,0432	0,8117
Frec. laterales 1er orden	0,1839	0,0644	0,6626
Frec. laterales 2º orden	0,0225	0,1746	0,0776
Frec. laterales 3er orden	0,0326	0,0242	0,7904
LER	0,2313	0,7886	0,6862
Variables de la MA			
Nº puntos de entrada	0,0001	0,6324	0,1212
Nº PE/cm raíz	0,0001	0,2531	0,6378
% micorrización	0,0001	0,7035	0,6198

Tabla 2. Resultados de un ANOVA (valor P) de dos vías realizado para las distintas variables analizadas tras 28 días de crecimiento de plantas de tomate. El factor MA consiste en 3 tratamientos distintos: sin micorriza, con *G. mosseae*, y con los endofitos naturales; el factor *Azospirillum* consiste en tres tratamientos distintos: sin *Azospirillum*, con Sp 245 y con Sp 245b.

Los datos de cosecha (Fig. 7) muestran las mismas tendencias que las observadas en el primer muestreo en lo referente al factor MA, siendo los tratamientos con *G. mosseae* los más efectivos. La inoculación con *Azospirillum* supone aumentos considerables en la cosecha, salvo en aquellas plantas que habían sido también inoculadas con *G. mosseae*, donde ésta no parece ejercer efecto alguno. En el caso de plantas crecidas en suelo natural se llegan incluso a duplicar los valores obtenidos con respecto a sus controles respectivos, y en el caso del suelo sin micorriza, la cepa MG resultó más beneficiosa que la cepa S a este respecto.

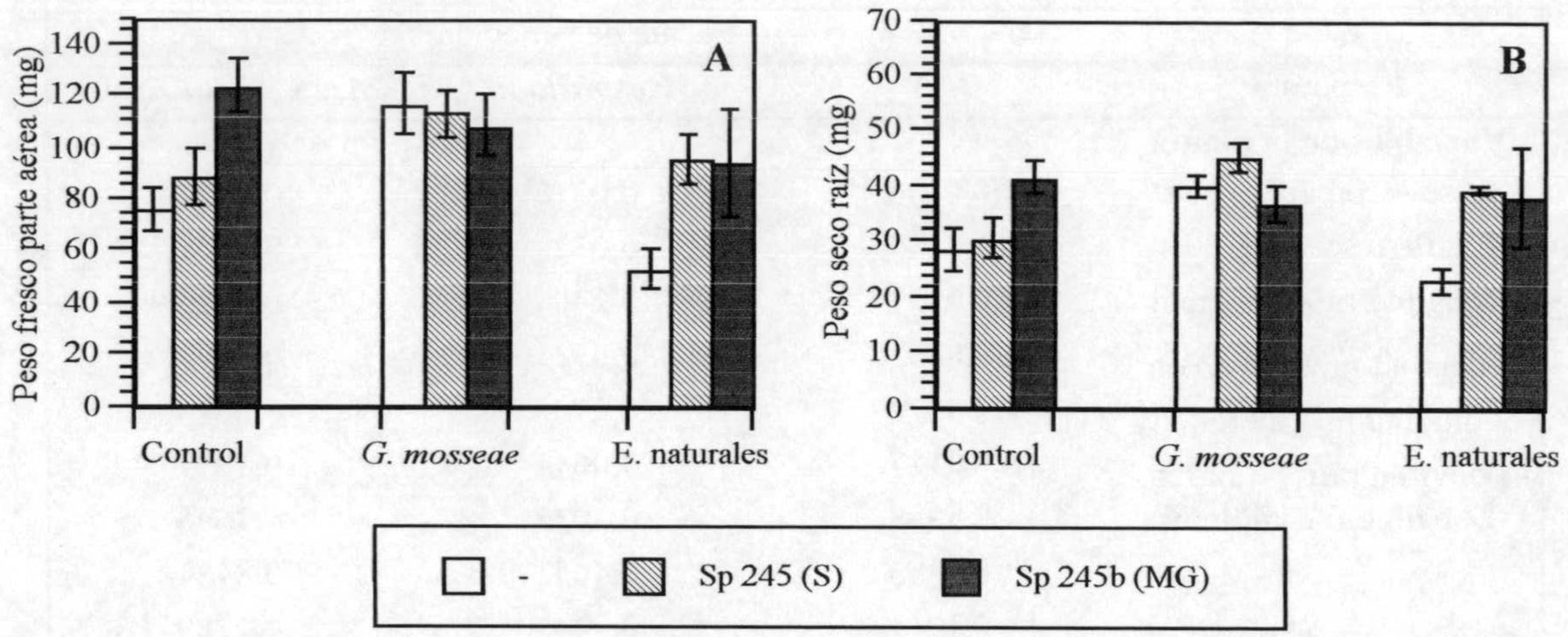

Fig 7. Valores medios de cosecha de las plantas de tomate sometidas a los distintos tratamientos tras 28 días de crecimiento. (A) Peso seco de la parte aérea, (B) Peso seco de la raíz. Las barras en cada columna representan el error estandard.

La morfología del sistema radical también está influenciada tanto por la micorrización como por la inoculación con *Azospirillum*. En este caso, y a diferencia de lo observado en el primer muestreo, serán las raíces secundarias y terciarias las principales afectadas, especialmente éstas últimas, tanto en longitud (Fig. 8D) como en número (Fig. 10), presentando las plantas micorrizadas por cualquiera de los endofitos ensayados, valores superiores y significativamente diferentes ($P<0.05$) en relación al control sin micorrizar, no existiendo diferencias entre ambos endofitos. Los efectos de *Azospirillum* se hace especialmente significativos en el caso de plantas crecidas en el suelo que contenía los endofitos naturales, donde la presencia de la cepa S, duplica la longitud de raíces secundarias respecto al control (Fig. 8C) y aumenta la proporción de las mismas (Fig. 10), así como cuadruplica dichos efectos para el caso de longitud de raíces terciarias (Fig. 8D) y duplica la proporción de las mismas (Fig. 10). A pesar de estas diferencias, tanto la longitud radical total (Fig. 8E) como el número total de raíces (Fig. 8F) no van a afectarse significativamente (Tabla 2) por ninguno de los

factores implicados (MA y *Azospirillum*), aunque se observan las mismas tendencias que las citadas anteriormente.

Las modificaciones señaladas para ambos parámetros, longitud y número de raíces, tienen consecuencias tanto sobre el índice de ramificación como sobre la frecuencia de raíces laterales. Así, el índice de ramificación va a resultar afectado significativamente ($P<0.05$) por ambos factores implicados (MA y *Azospirillum*), siendo los tratamientos inoculados con *G. mosseae*, así como aquellos inoculados con la cepa MG, los más efectivos (Fig. 9A). La cepa GM de *Azospirillum* afecta especialmente la frecuencia de raíces primarias (Fig. 9B) y *G. mosseae* la de secundarias (Fig. 9C) y, ambos de forma conjunta, a la frecuencia de terciarias (Fig. 9D), sin que exista interacción entre ambos factores (Tabla 2).

Los resultados referentes a colonización radical por el hongo muestran el mismo patrón que el observado anteriormente, tras 14 días de crecimiento vegetal, sin que la inoculación con *Azospirillum* parezca ejercer efecto alguno a este respecto (Fig. 11).

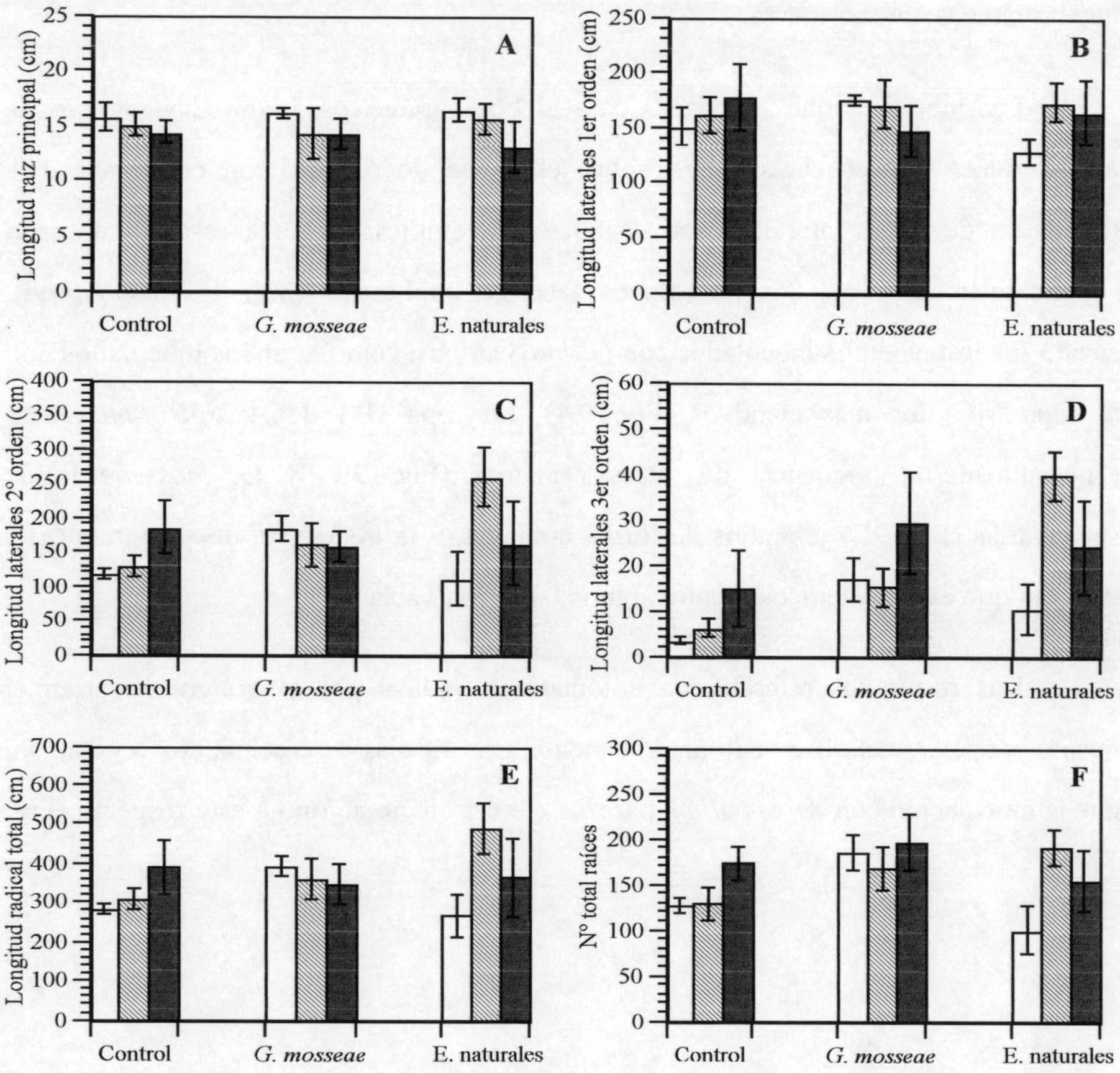

Fig. 8. Valores medios de las variables analizadas de plantas de tomate sometidas a los distintos tratamientos tras 28 días de crecimiento. (A) Longitud de la raíz principal, (B) Longitud total de raíces de 1er orden, (C) Longitud total de raíces de 2º orden, (D) Longitud total de raíces de 3er orden, (E) Longitud radical total, (F) Número total de raíces. Las barras en cada columna representan el error estandard.

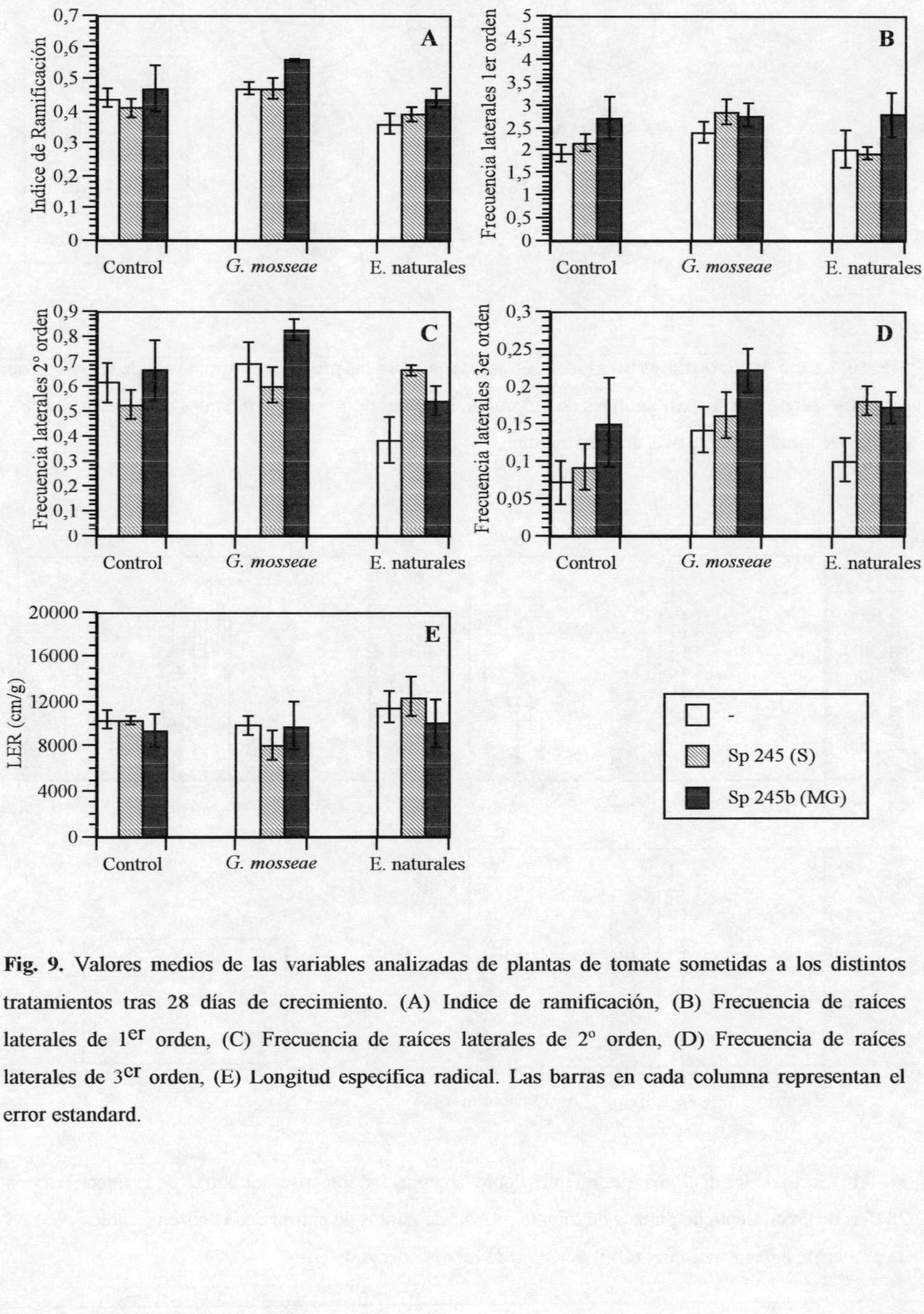

Fig. 9. Valores medios de las variables analizadas de plantas de tomate sometidas a los distintos tratamientos tras 28 días de crecimiento. (A) Indice de ramificación, (B) Frecuencia de raíces laterales de 1er orden, (C) Frecuencia de raíces laterales de 2^{o} orden, (D) Frecuencia de raíces laterales de 3^{cr} orden, (E) Longitud específica radical. Las barras en cada columna representan el error estandard.

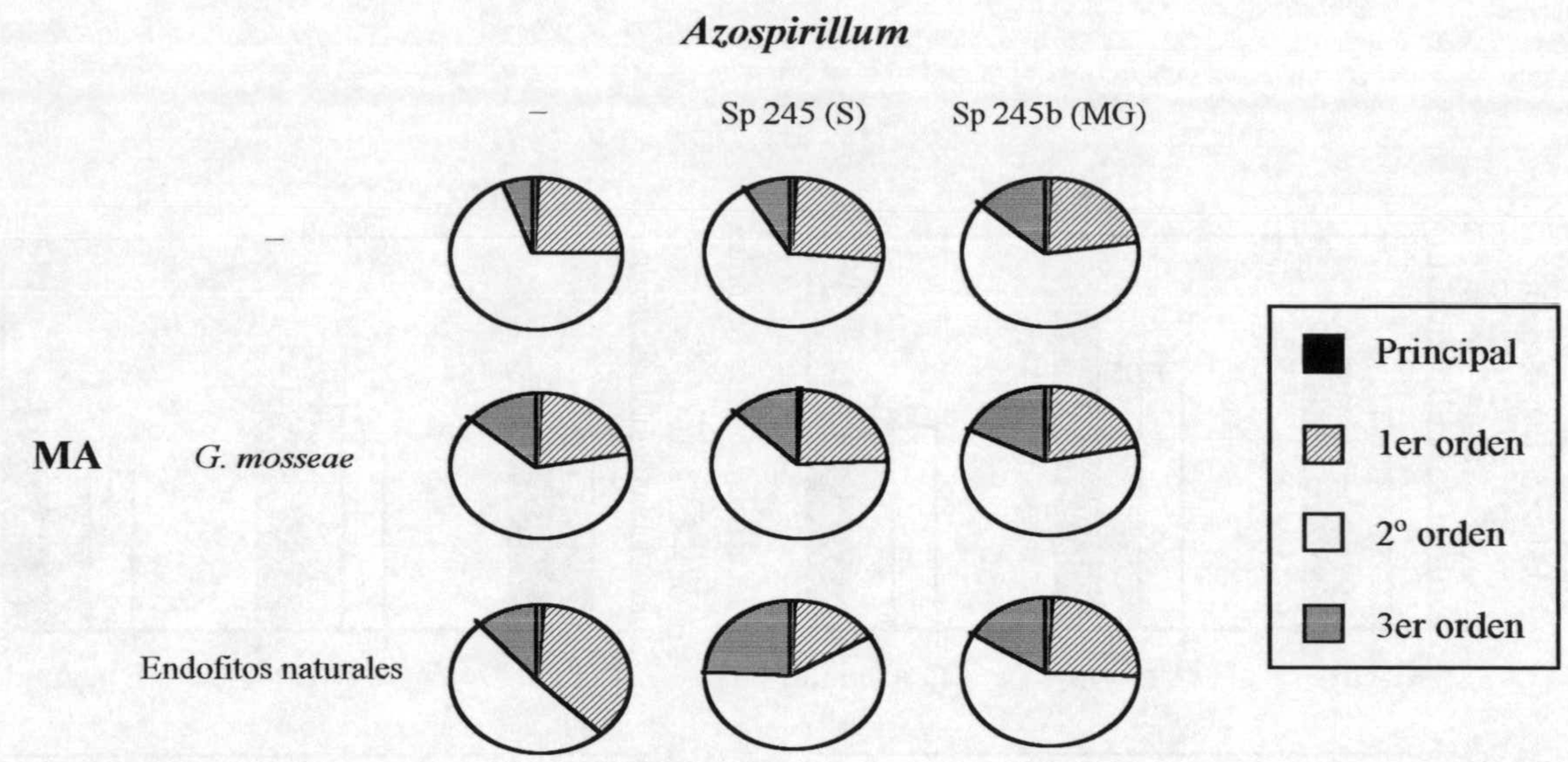

Fig. 10. Efecto de los distintos tratamientos ensayados sobre las proporciones relativas de las raíces de distintos órdenes (principal, laterales de 1er orden, laterales de 2º orden y laterales de tercer orden) en plantas de tomate tras 28 días de crecimiento.

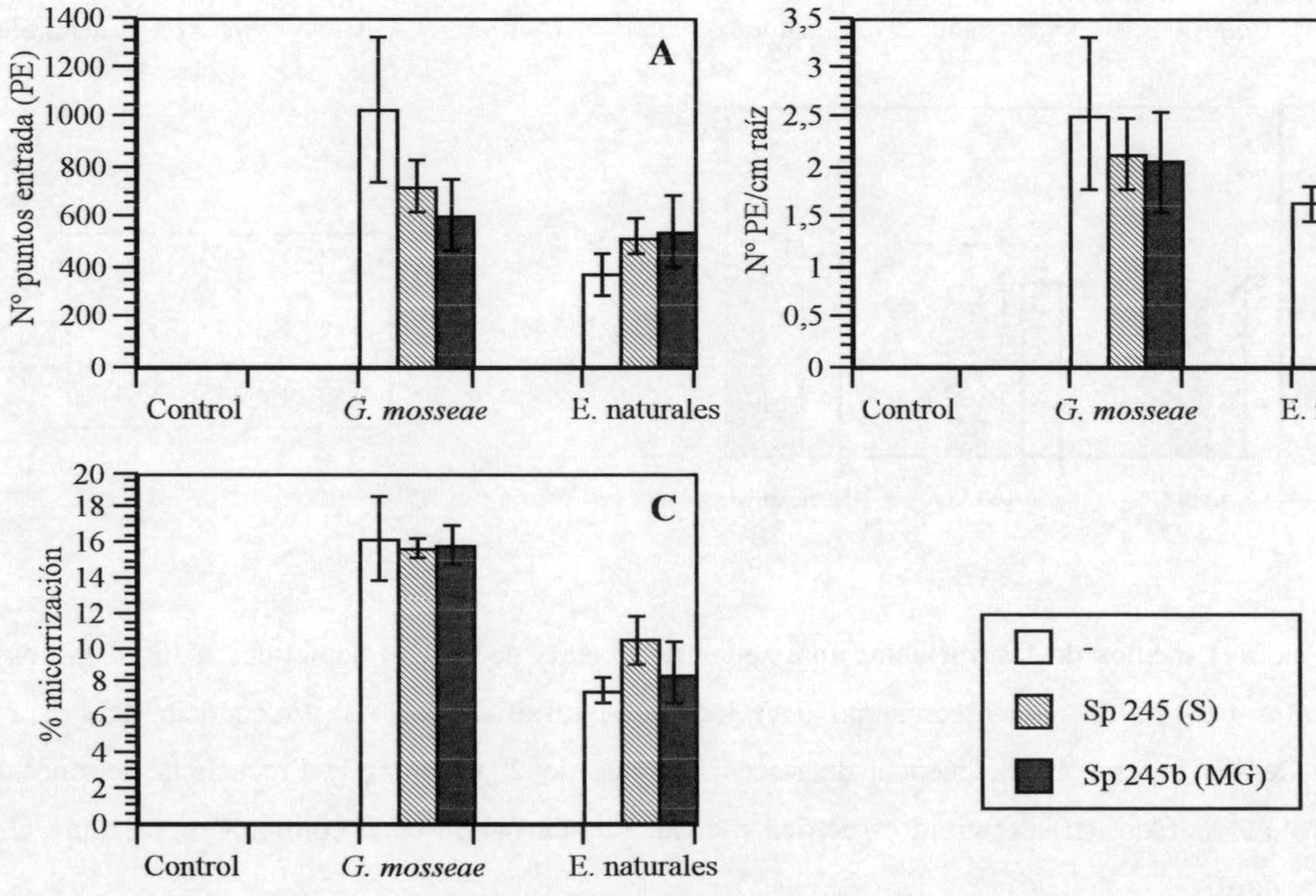

Fig 11. Efecto de los distintos tratamientos sobre la capacidad infectiva del hongo de la micorriza tras 28 días de crecimiento de plantas de tomate. (A) Nº de puntos de entrada en el sistema radical, (B) Nº de puntos de entrada/cm raíz, (C) Porcentaje de raíz micorrizada.

2.2. Efecto de *A. brasilense* Sp 245 (S) y Sp 245b (MG) sobre la infectividad de *G. mosseae*, el desarrollo de la planta y la expresión de determinadas actividades isoenzimáticas en maíz tras 3 y 6 semanas de crecimiento.

Material y Métodos

Sistema y diseño experimentales

El experimento se diseñó teniendo en cuenta dos variables. La primera, el factor MA, que contenía 2 tratamientos: Control sin micorrizar e inoculación con *G. mosseae*. La segunda variable consistió en la presencia o no de *Azospirillum*, y contenía 3 tratamientos: inoculación con *A. brasilense* Sp 245 (cepa silvestre o S), *A. brasilense* Sp 245b (cepa modificada genéticamente o MG), y un control no inoculado. Ello dió lugar a 6 tratamientos diferentes, con 14 repeticiones cada uno, dando un total de 84 macetas. Los contenedores usados como sistema para cultivo fueron bolsas negras de polietileno de 30 x 14 cm, con una capacidad para 1.6l de suelo.

Características del suelo

Se utilizó sustrato A pasteurizado y reinoculado con un filtrado del inóculo de *G. mosseae*.

Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos

Maíz fué la planta elegida para la realización de este experimento. Las semillas pregerminadas se transfirieron a los contenedores previamente preparados con sus respectivos tratamientos microbianos. Se cultivó una plántula por contenedor. Para la micorrización se adicionaron al sustrato 90g por contenedor, uniformemente mezclado, de un inóculo de *G. mosseae*. Los inoculantes bacterianos (DO_{600} = 1.0,

equivalente a $1x10^9$ ufc/ml) se aplicaron directamente en suelo y antes de plantar las semillas pregerminadas, mezclado la suspensión bacteriana previamente obtenida con la proporción adecuada de suelo, resultando finalmente una concentración de 1.4×10^6 ufc/g suelo.

Determinaciones

Las plantas se cosecharon a dos tiempos distintos de crecimiento vegetal: 3 y 6 semanas, utilizándose la mitad de las repeticiones de cada tratamiento para cada cosecha (7 repeticiones/tratamiento/cosecha). Una vez cosechadas se determinaron el peso seco de la parte aérea y de las raíces (tras secar cada planta en un horno a 65ºC durante 48h), la extensión de la colonización radical por parte del hongo de la micorriza (% micorrización) y se estudiaron los isoenzimas MDH, EST, GDH, SOD y PER, en raíces.

Resultados

Los resultados de análisis estadístico realizado para las distintas variables analizadas, tras 3 y 6 semanas de crecimiento de las plantas de maíz, quedan recogidos en las Tablas 3 y 4 respectivamente.

Respuesta	Fuente de variación		
	MA	***Azospirillum***	**MA x *Azospirillum***
Variables de la planta			
Peso seco parte aérea	0,4459	0,0891	0,4078
Peso seco raíz	0,0820	0,0005	0,2724
Variables de la MA			
% micorrización	0,0001	0,1349	0,1349

Tabla 3. Resultados de un ANOVA (valor P) de dos vías realizado para las distintas variables analizadas tras 3 semanas de crecimiento de plantas demaíz. El factor MA consiste en 2 tratamientos distintos: sin micorriza y con *G. mosseae*; el factor *Azospirillum* consiste en tres tratamientos distintos: sin *Azospirillum*, con Sp 245 y con Sp 245b.

La inoculación de *Azospirillum* no sólo no produce efecto positivo alguno sobre la cosecha de plantas de maíz tras 3 semanas de crecimiento, sino que incluso el inoculante MG llega a producir un ligero descenso (Fig. 12A y 12B), que se hace más significativo en el caso de raíz (Tabla 3). Estos efectos negativos se atenuan con el tiempo, llegando incluso a desaparecer tras 6 semanas de crecimiento de las plantas (Tabla 4, Fig. 13A y 13B). En ninguno de los casos la presencia del inoculante bacteriano, ya sea S o MG, produce efecto alguno sobre el porcentage de raíz micorrizada (Fig. 12C y 13C).

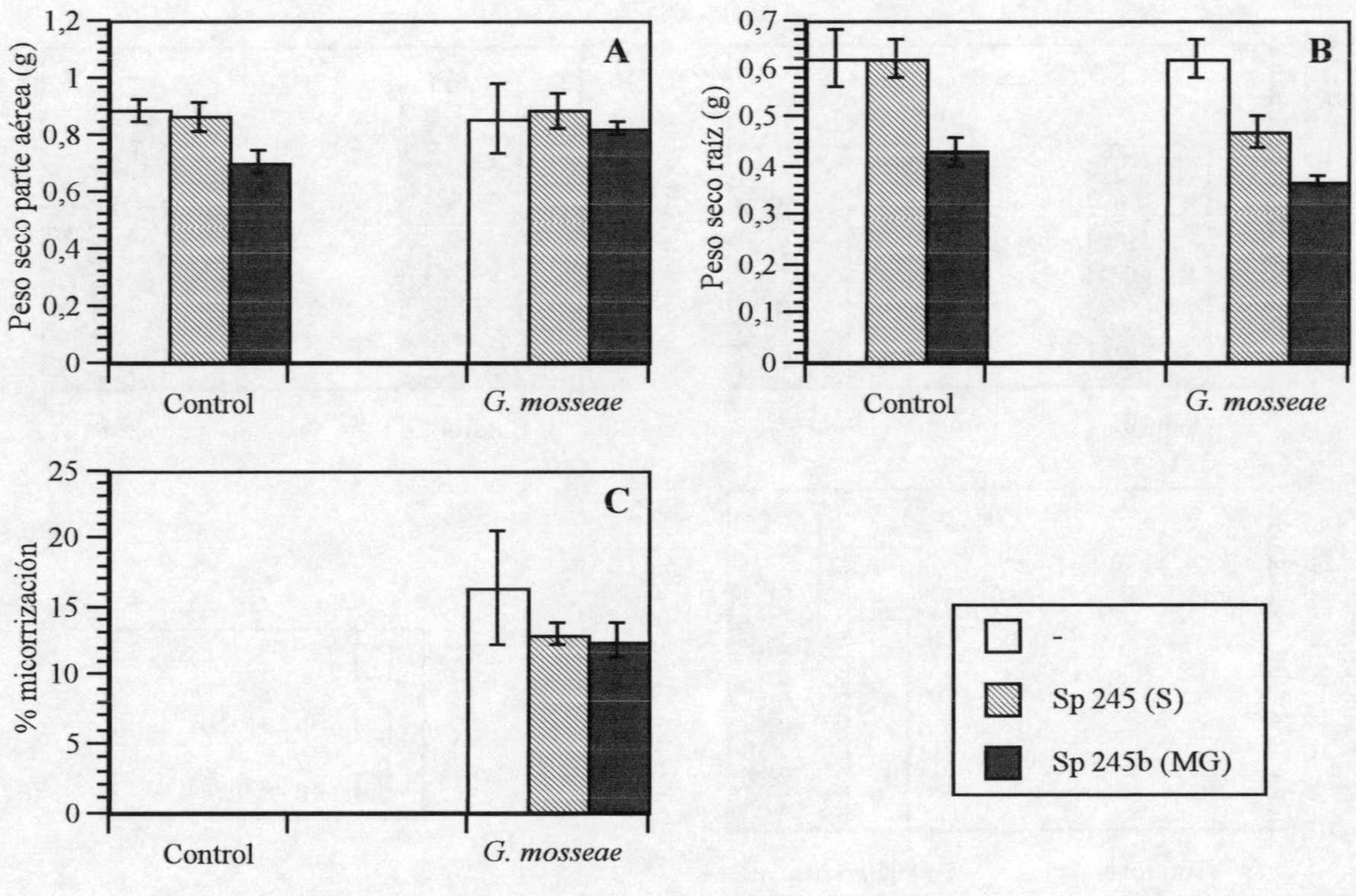

Fig 12. Efecto de los distintos tratamientos ensayados tras 3 semanas de crecimiento de plantas de maíz sobre (A) Peso seco parte aérea, (B) Peso seco de la raíz y (C) Porcentaje de raíz micorrizada.

Respuesta	Fuente de variación		
	MA	***Azospirillum***	**MA x *Azospirillum***
Variables de la planta			
Peso seco parte aérea	0,5376	0,7756	0,6363
Peso seco raíz	0,5075	0,9078	0,1526
Variables de la MA			
% micorrización	0,0001	0,6577	0,6577

Tabla 4. Resultados de un ANOVA (valor P) de dos vías realizado para las distintas variables analizadas tras 6 semanas de crecimiento de la planta. El factor MA consiste en 2 tratamientos distintos: sin micorriza y con *G. mosseae*; el factor *Azospirillum* consiste en tres tratamientos distintos: sin *Azospirillum*, con Sp 245 y con Sp 245b.

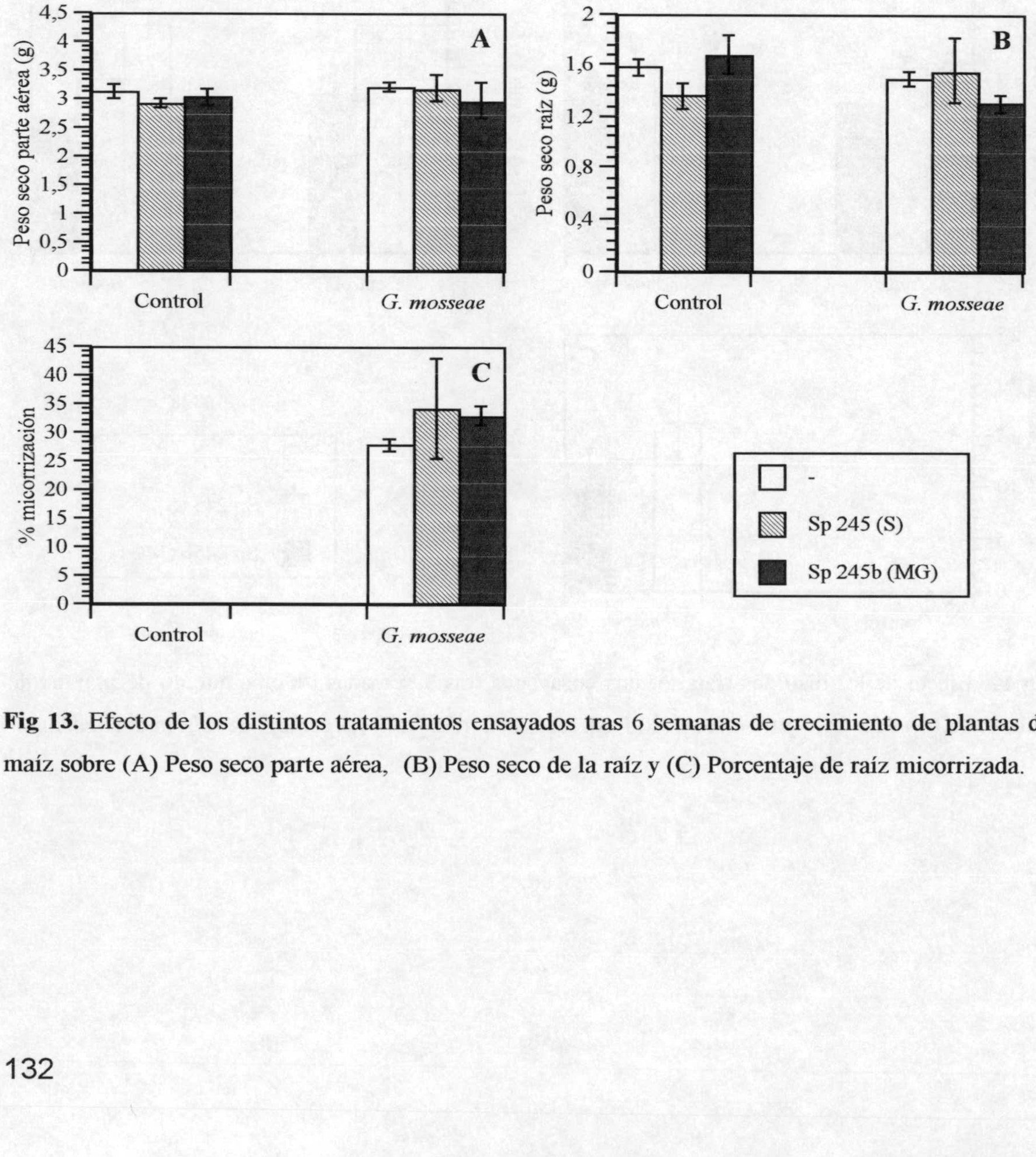

Fig 13. Efecto de los distintos tratamientos ensayados tras 6 semanas de crecimiento de plantas de maíz sobre (A) Peso seco parte aérea, (B) Peso seco de la raíz y (C) Porcentaje de raíz micorrizada.

El estudio de la elicitación de isoenzimas en raíces de maíz después de 3 semanas de crecimiento no muestra diferencias entre tratamientos para ninguno de los isoenzimas estudiados (MDH, EST, GDH, SOD y PER), en cambio tras 6 semanas, si que se observan diferencias en el caso de los enzimas MDH y EST. Sólo se muestran éstos resultados que ofrecían efectos diferenciados. En el caso de la MDH (Fig. 14) se observa la presencia de una banda diferencial en los tratamientos inoculados con *G. mosseae*, banda que no aparece en el extracto obtenido a partir de las esporas de dicho hongo. El enzima EST (Fig. 15), no es afectado por la MA, pero si por el inoculante bacteriano, que parece modular la presencia de una tercera isoforma (marcada con una flecha) en plantas inoculadas con cualquiera de los dos *Azospirillum*, y además esta banda no se observa en el extracto bacteriano. En la Figura 15 se muestra el patrón general o más común de distribución de bandas para cada tratamiento, y en la Tabla 5 la frecuencia de detección de la banda, donde se puede comprobar que ésta es mayor en plantas inoculadas con la cepa S, que con a cepa MG, independientemente que estén micorrizadas o no.

	Tratamientos					
	C	**S**	**MG**	***G. mosseae***	***G. mosseae* + S**	***G. mosseae* + MG**
% plantas con 3ª isoforma	16,67	80	50	16,67	83,33	66,67

Tabla 5. Frecuencia de detección de una tercera isoforma del enzima esterasa (EST) en raíces de plantas de maíz micorrizadas con*G. mosseae* o no, e inoculadas con *A. brasilense* Sp 245 (S), Sp 245b (MG) o no inoculadas, tras 6 semanas de crecimiento vegetal.

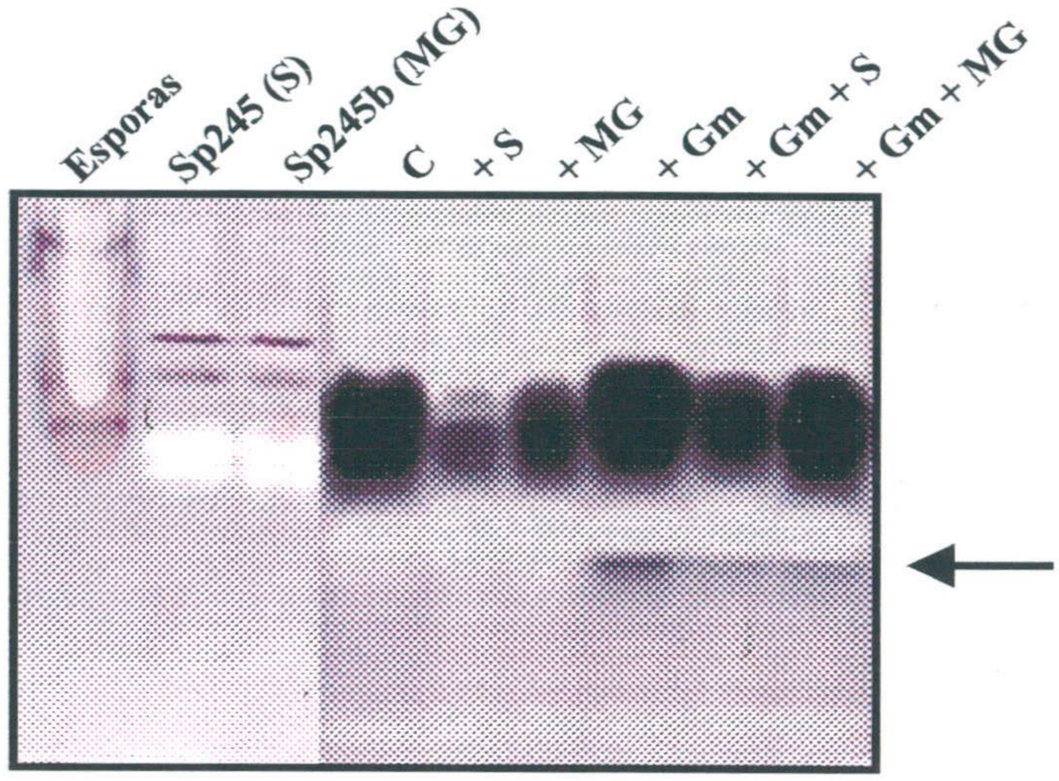

Fig. 14. Actividad MDH en esporas de *G. mosseae*, *A. brasilense* Sp245 (S) y Sp245b (MG) y en raíces de plantas de maízinoculadas conjuntamente o no con *A. brasilense* Sp245 (S), Sp245b (MG) y *G. mosseae* (Gm) o no inoculadas (C).

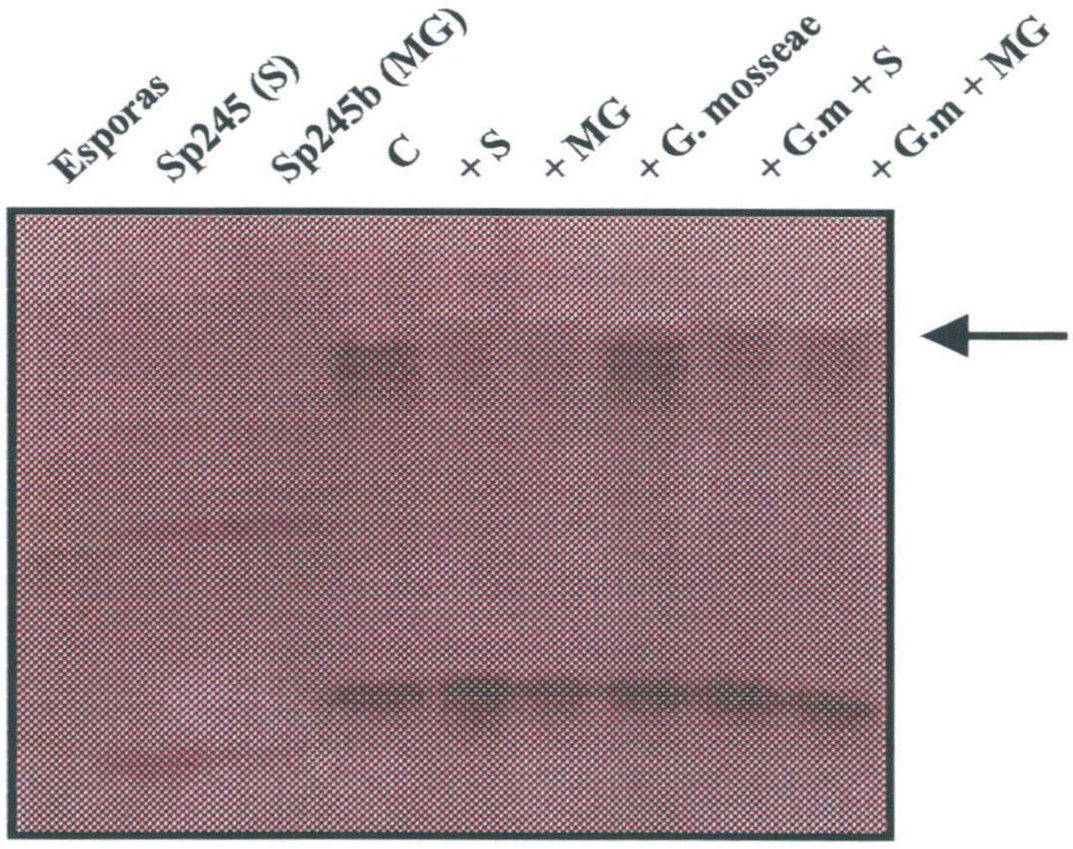

Fig. 15. Patrón general o más común de distribución de bandas para la actividad EST en esporas de *G. mosseae*, *A. brasilense* Sp245 (S) y Sp245b (MG) y en raíces de plantas de maíz inoculadas conjuntamente o no con *A. brasilense* Sp245 (S), Sp245b (MG) y *G. mosseae* (Gm) o no inoculadas (C).

3. Ensayos en mesocosmos bajo condiciones de campo

3.1. Efecto de distintos inoculantes de *Azospirillum* (*A. brasilense* Sp7, *A. brasilense* Sp245, *A. lipoferum* RG20a, *A. irakense* KBC1) sobre el desarrollo de las plantas y de la micorrización en maíz.

Material y Métodos

Diseño experimental

El experimento consistió en 4 tratamientos bacterianos, empleándose como inoculantes 4 cepas de *Azospirillum* (*A. brasilense*: Sp 7, Sp 245; *A. lipoferum* RG20a y *A. irakense* KBC1), cuyas características se exponen en la Tabla 3 del Apartado 2 del Capítulo de *Material y Métodos*; y un control no inoculado (C). Estos 5 tratamientos se aplicaron en 7 repeticiones. Los 35 contenedores se distribuyeron al azar en una subparcela de 4.25 x 5.75 m^2.

Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos

Maíz fué la planta elegida para la realización de este experimento. Las semillas pregerminadas fueron inoculadas con los tratamientos bacterianos correspondientes. Los inoculantes bacterianos (DO_{600} = 1.0, equivalente a $1x10^9$ ufc/ml) se aplicaron directamente sobre las semillas siguiendo el proceso descrito en el Apartado 7 del Capítulo de *Material y Métodos* resultando como media los valores que se indican en la siguiente Tabla:

	Sp7	**Sp245**	**RG20a**	**KBC1**
log ufc/semilla	7.32	7.44	7.64	7.35

Una vez inoculadas las semillas fueron transferidas al campo en los contenedores correspondientes.

Determinaciones

UNIVERSIDAD DE GRANADA
2 8 JUN. 1999
COMISION DE DOCTORADO

Se determinaron el peso seco de la parte aérea y raíces tras secar cada planta en un horno a 65ºC durante 96h, la extensión de la colonización radical del hongo MA, la población total de *Azospirillum* en raíces (ya que el seguimiento de la población de los inoculantes empleados en el tiempo de cosecha no se pudo realizar tal cual, debido a que ninguno de ellos contaba un marcador característico que permitiera su reconocimiento), la población total de bacterias y hongos en suelo, las actividades enzimáticas: esterasa, fosfatasa, quitinasa y trealasa, en suelo, y se estudiaron los isoenzimas MDH y EST en tejidos vegetales (hojas y raíces). La parte aérea de las plantas, una vez seca, se procesó para posterior análisis de N y P en sus tejidos (Lachica *et al.*, 1973).

Resultados

Mientras que el desarrollo de la parte aérea de la planta no se afectada por la presencia de ninguno de los inoculantes bacterianos empleados (Fig. 16A), el desarrollo de la raíz si que resulta afectado por dichos inoculantes, estando este efecto positivamente correlacionado con la capacidad de producción de AIA de los mismos (Fig. 16B). Este efecto, sin embargo, no conlleva consecuencias sobre la capacidad colonizadora de los endofitos presentes en suelo (Fig. 17B), así como sobre el contenido en nutrientes en hojas (datos no mostrados), siendo los niveles de N 2.60-3.0% y los de P 0.30-0.40%.

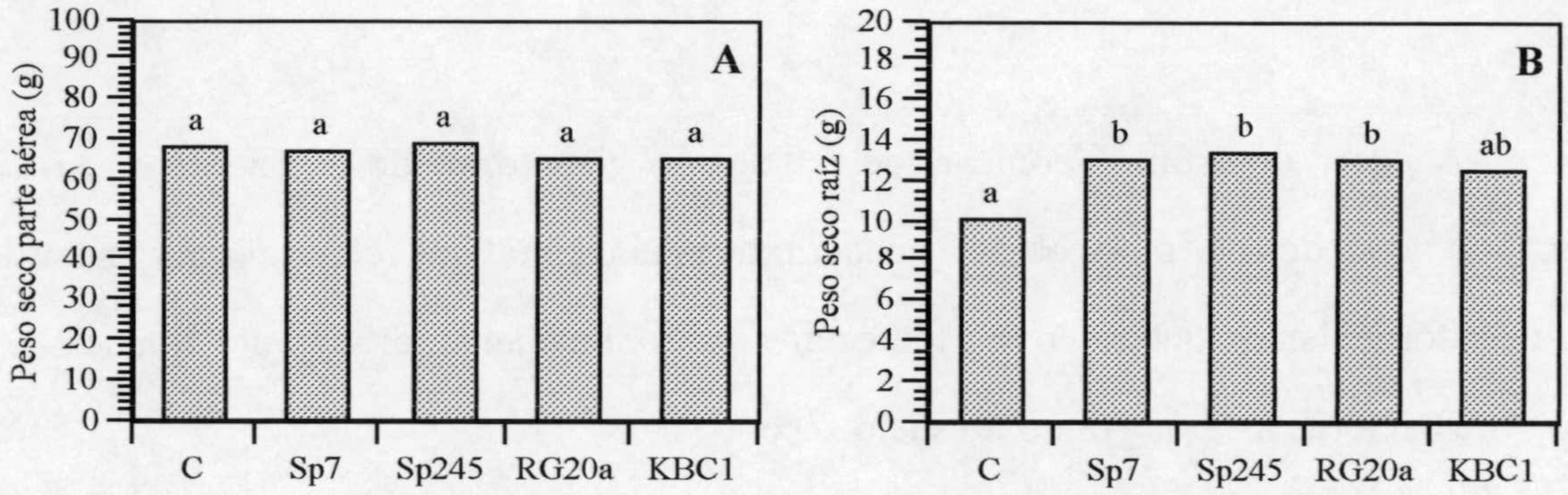

Fig 16. Efecto de distintos inoculantes de *Azospirillum* en plantas de maíz tras 2 meses de crecimiento sobre (A) Peso seco de la parte aérea y (B) Peso seco de la raíz.

La presencia de células de *Azospirillum* en la raíz fue superior en todos los tratamientos inoculados, pero dentro de los mismos se encontraron diferencias a nivel de especies, de modo que los niveles máximos de colonización se alcanzaron cuando el inoculante empleado fue *A. brasilense*, independientemente de la cepa utilizada (Sp7 ó Sp245), mientras que el más bajo, y casi equiparable al control, se obtuvo con *A. lipoferum* (RG20a) (Fig. 17A).

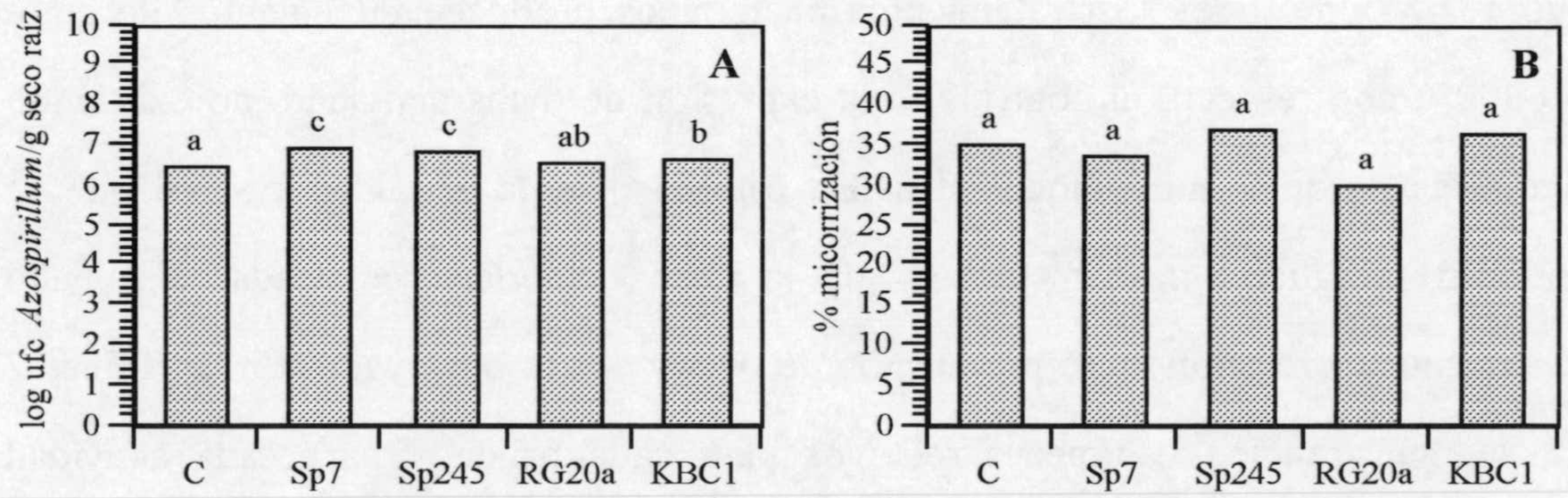

Fig 17. Efecto de distintos inoculantes de *Azospirillum* tras 2 meses de crecimiento de plantas de maíz sobre (A) logaritmo del número de ufc de *Azospirillum* spp. y (B) Porcentaje de longitud de raíz micorrizada.

A pesar de estas diferencias detectadas en el entorno de la rizoplana, en la rizosfera no se detectaron diferencias cuantitativas ni cualitativas referentes al conjunto de microorganismos del suelo. Se detectaron aproximadamente 5log ufc fúngicas y 7log ufc bacterianas, por gramo de suelo seco.

Además de no detectarse diferencias a nivel poblacional de microorganimos en suelo, tampoco se detectaron diferencias a nivel de enzimas clave de determinados procesos metabólicos en suelo, como son esterasa (130-150 µg fluoresceína/g suelo seco), fosfatasa (350-380 µg p-nitrofenol/g suelo seco), quitinasa (32-36 µg p-nitrofenol/g suelo seco) y trealasa (105-120 µg p-nitrofenol/g suelo seco).

Donde si se detectaron importantes diferencias fue a nivel de isoenzimas en raíz, y al igual que en el experimento anterior (Apartado 3) de este capítulo, se pudo comprobar que existe una regulación de la expresión de determinadas actividades enzimáticas por parte de los inoculantes bacterianos empleados (Fig. 18 y 19).

A pesar de que la actividad esterasa parece tener cierta regulación en alguna de sus isoformas (Fig. 19), los efectos son más notorios para el caso de la actividad MDH (Fig. 18), donde todos los tratamientos bacterianos producen incrementos de entre 250-300% con respecto al control, en la expresión de dicha actividad, no existiendo diferencias notorias entre inoculantes. En cambio para la actividad EST si que se producen modificaciones en función de la cepa bacteriana empleada, existiendo nuevamente correlación entre producción de AIA y efecto observado. En las Tablas 7 y 8 se muestran los volúmenes relativos para cada banda y para cada actividad estudiada.

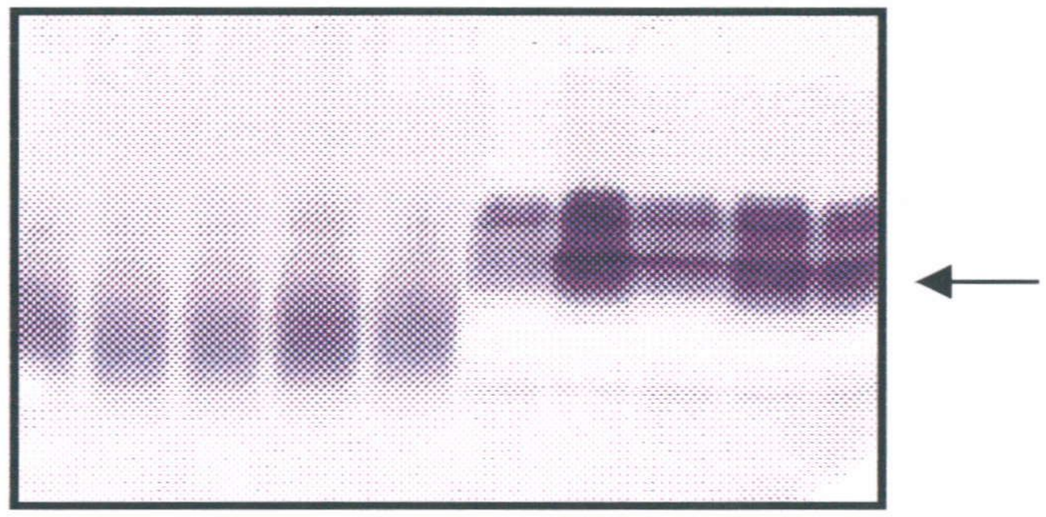

Fig. 18. Actividad MDH en hojas y raíces de plantas de maíz, crecidas en suelo natural, no inoculadas (C) o inoculadas con distintos *Azospirillum* (*A. brasilense* Sp7, *A. brasilense* Sp245, *A. lipooferum* RG20a y *A. irakense* KBC1)

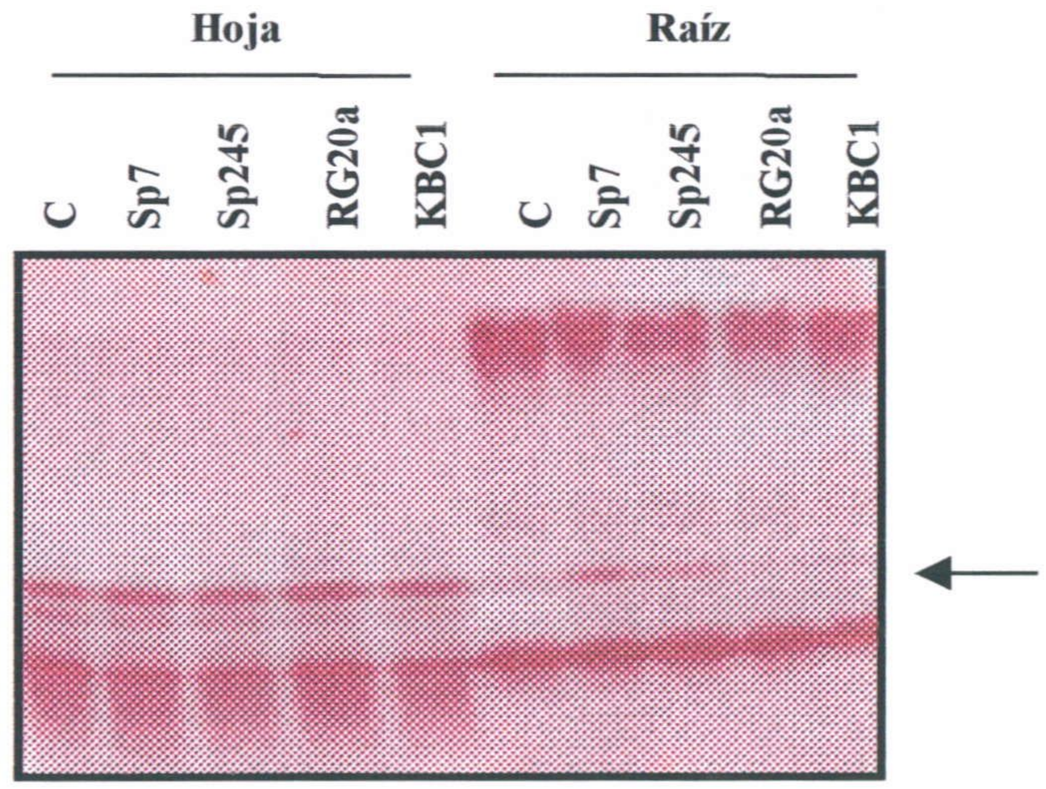

Fig. 19. Actividad EST en hojas y raíces de plantas de maíz, crecidas en suelo natural, no inoculadas (C) o inoculadas con distintos *Azospirillum* (*A. brasilense* Sp7, *A. brasilense* Sp245, *A. lipooferum* RG20a y *A. irakense* KBC1)

	Tratamientos				
	C	**Sp7**	**Sp245**	**RG20a**	**KBC1**
Banda 1	1	2.09	1.32	2.10	2.06
Banda 2	1	1.67	1.28	1.59	1.30
Banda 3	1	3.12	2.46	2.85	2.49
Banda 4	1.29	1	1.41	1.51	1.14

Tabla 7. Volúmenes relativos de las distintas bandas detectadas para la actividad MDH en plantas de maíz inoculadas con distintas cepas de *Azospirillum* (Sp7, Sp245, RG20a, KBC1) o no inoculadas (C), tras 2 meses de crecimiento.

	Tratamientos				
	C	**Sp7**	**Sp245**	**RG20a**	**KBC1**
Banda 1	1.86	1.36	1.42	1.41	1
Banda 2	1.88	1.55	1.72	1	1.31
Banda 3	2.27	5.52	3.71	1	1.14
Banda 4	1.21	1.17	1.23	1.11	1

Tabla 8. Volúmenes relativos de las distintas bandas detectadas para la actividad EST en plantas de maíz inoculadas con distintas cepas de *Azospirillum* (Sp7, Sp245, RG20a, KBC1) o no inoculadas (C), tras 2 meses de crecimiento.

Discusión

La germinación *in vitro* de esporas del hongo de la MA resultó negativamente afectada por la inoculación con *Azospirillum* cuando la bacteria se encontró en elevada densidad y distribuida uniformemente en el medio de cultivo. Este efecto parece depender también de la cantidad de hormona AIA que la bacteria es capaz de producir, ya que el efecto negativo sobre la tasa de germinación se observó a menor densidad celular de la cepa productora de AIA. A diferencia de lo observado en otras ocasiones

(Paulitz & Linderman, 1989) el efecto inhibitorio del inoculante se detectó al final de la experiencia, lo que probablemente coincidió con una mayor acumulación de compuestos liberados por el inoculante al medio de cultivo. El desarrollo de micelio del hongo siguió un patrón similar al descrito anteriormente por Azcón-Aguilar & Barea (1992) y Barea *et al.* (1998), produciendo todos los tratamientos aplicados una estimulación del desarrollo del micelio y consecuentemente del número de esporas secundarias desarrolladas sobre el mismo. También en este caso se observó una mejor respuesta a menor densidad celular del inoculante, no existiendo correlación positiva entre cantidad de AIA secretado y desarrollo de micelio. Gryndler *et al.* (1998) encuentran un efecto "negativo" de determinadas concentraciones de AIA sobre el desarrollo y proliferación de la hifa intraradical de la MA, efecto que se hace notable desde concentraciones de 1 μM en el medio. Teniendo en cuenta que la cepa S produce del orden de 1-1.6 μM de AIA, y que la cepa MG produce una menor cantidad de esta hormona, podríamos atribuir los efectos observados a la producción de AIA, que se acumularía en el medio alcanzando niveles a los cuales se produce inhibición de la germinación de las esporas, y a los cuales la estimulación del desarrollo del micelio y esporas secundarias no es tan significativa como ocurre para dosis de AIA más bajas.

En múltiples ocasiones se ha descrito estimulación en la capacidad colonizadora como consecuencia de la excrección la medio de AIA por parte de la bacteria (Balota *et al.*, 1995; 1997; Bashan & Holguin, 1997; Ratti & Janardhanan, 1996). Si bien en este trabajo se observa una estimulación en el desarrollo del micelio *in vitro*, estudios *in vivo*, tanto en microcosmos como en mesocosmos, no muestran ningún efecto de la inoculación con *Azospirillum* sobrc la capacidad colonizadora del hongo MA.

A pesar de los numerosos trabajos existentes donde se describe una mejora en la cosecha obtenida tras la inoculación con *Azospirillum* bien aplicado de forma

individual (Raverkar & Konde, 1988; Gupta et al., 1995) o bien conjuntamente con MA (Balota *et al.*, 1997; Pacovsky, 1988; Panwar, 1993; Paula *et al.*, 1992; Ratti & Janarhanan, 1996; Singh, 1992; Tilak & Singh, 1988), existen también otra serie de trabajos donde no se detectó efecto alguno de la inoculación (Alvarez-Solís *et al.*, 1996; Pacovsky, 1988), e incluso se ha llegado a describir que bacterias sobreproductoras de AIA pueden inhibir el crecimiento de la planta (Beyeler *et al.*, 1997). Se ha sugerido, por tanto, que el efecto de tales microorganismos productores de AIA, parece depender de las condiciones edáficas y ambientales (Michiels *et al.* 1989). Así, en este estudio se encontró efecto positivo de la inoculación con *Azospirillum* en tomate sólo cuando éste creció en suelo sin micorriza o bien con los endofitos naturales, en cambio con *G. mosseae* no se observó efecto alguno de la inoculación. En maíz o bien no se detectó efecto alguno de la inoculación (ensayo bajo condiciones de campo) o incluso la cepa baja productora de AIA tuvo efecto ligeramente inhibitorio que se atenuó con el tiempo. Tampoco se detectaron increemntos en el contenido de N en plantas inoculadas.

Una de los principales efectos y más descritos es el impacto de bacterias productoras de AIA sobre el desarrollo radical (Baca *et al.*, 1994; Costacurta & Vanderleyden, 1995; Dubrovsky *et al.*, 1994; Patten & Glick, 1996). A veces estas modificaciones llegan a manifestarse en incrementos de la biomasa de la raíz (Gupta *et al.*, 1995), como observamos en plantas de maíz crecidas en mesocosmos bajo condiciones de campo. Otras veces el efecto no se hace patente a este nivel, pudiendo no detectarse diferencias significativas entre tratamientos a nivel de peso de raíz, pero en cambio sí se detectan a nivel de longitud y número de raíces (Bashan & Levanony, 1990; Bashan & Holguin 1997; Dosselaere *et al.*, 1997; Huantela *et al.*, 1988). Tal es el caso de plantas de tomate con 4 semanas de desarrollo, donde fué la longitud de las raíces terciarias la principal incrementada por la inoculación con *Azospirillum*. La producción y secreción de AIA por parte de *Azospirillum* no parece ser factor

determinante en la estimulación del desarrollo radical, ya que no existe efecto neto que muestre que a mayor producción de AIA mejor sea la respuesta vegetal, a diferencia de lo observado por Barbieri *et al.* (1991) y Barbieri & Galli (1993) en raíces de trigo. Luego, a pesar de que los efectos se atribuyen principalmente a la producción de AIA por parte de la bacteria (Dosselaere *et al.*, 1997), la ausencia de un marcado efecto diferencial de la cepa productora de AIA se puede atribuir, bien a la especie vegetal, o bien a que el efecto observado no se debe realmente al AIA producido por la bacteria, sino al producido por la propia planta en respuesta a la estimulación de la PGPR (Glick, 1995), siendo la cepa MG (baja productora de AIA) la que causaría una mayor estimulación en la planta.

También se han descrito cambios morfométricos en la raíz como consecuencia de la micorrización, habiéndose detectado aumentos en el número de raíces laterales en general, aunque los efectos sobre la longitud radical son objeto de controversia, argumentando algunos autores que disminuye como consecuencia de la micorrización (Berta *et al.*, 1990; 1993), y otros que no cambia (Tisserant *et al.*, 1992) o incluso aumenta (Berta *et al.*, 1995; Hooker *et al.*, 1992). En este estudio, si bien no se detectaron aumentos ni en número ni en longitud totales de raíces como consecuencia de la micorrización, sí se detectó aumento del número y longitud de raíces terciarias, que junto con la red de micelio externo proporcionarían mayor superficie de absorción al sistema radical. De aquí que plantas micorrizadas presentes mayor tamaño que controles sin micorrizar, y que en las plantas sin micorrizar, las inoculadas con la cepa MG sean las que mayor biomasa presenten, al ser éstas las que presentan mayor número y longitud de raíces terciarias.

Como ya apuntan Bellone & de Bellone (1995) y Bashan & Holguin (1997), la microbiota natural puede interaccionar con *Azospirillum*, modificando sus efectos, así en este caso los efectos observados parecen estar influenciados por la micorrización, resultando algo más efectiva la cepa MG en ausencia de micorrización o en

inoculación conjunta con *G. mosseae*, y la cepa S en inoculación conjunta con los endofitos naturales.

Las modificaciones detectadas en ambas variables (longitud y número) tienen consecuencias sobre el grado de ramificación, produciendo tanto el endofito de colección *G. mosseae* como la cepa baja productora de AIA un aumento en esta variable, que junto con el aumento en el número de laterales dan lugar a un sistema radical más denso, como decriben Berta *et al.* (1994) y Atkinson *et al.* (1994), observándose el denominado "efecto crecimiento".

Hasta no hace mucho, el diagnóstico de una inoculación exitosa con *Azospirillum* se basaba en análisis de parámetros de cosecha (peso seco, contenido mineral, etc), conociéndose poco a nivel fisiológico de respuesta de la planta, pudiéndo ser estos cambios fisiológicos en la planta más importantes. De hecho, se sabe que *Azospirillum* afecta al metabolismo celular de la planta (Bashan *et al.*, 1991; 1992), pudiendo producir, entre otras, alteraciones en determinadas actividades enzimáticas en raíces de plantas inoculadas, aunque no son muchos los trabajos que recogen tales efectos. La expresión de determinadas activdades enzimáticas depende de numerosos factores, entre los que podemos destacar la edad de la planta y condiciones de cultivo. Así se detectó un incremento en la actividad MDH en raíces de maíz inoculadas con *Azospirillum* sólo después de 2 meses de crecimiento en mesocosmos bajo condiciones de campo. Estas modificaciones podrían no ser debidas directamente a *Azospirillum* como atribuyen Hadas & Okon (1987), sino que podrían deberse más bien a un efecto indirecto como consecuencia de un mayor desarrollo radical en plantas inoculadas, que conferiría un aumento en la edad fisiológica de las mismas. A nuestro conocimiento no existen datos bibiliográficos que muestren el efecto de la inoculación de *Azospirillum* sobre la actividad esterasa, y los cambios observados en la misma parecen guardar cierta relación con la cantidad de AIA secretado por la bacteria, que es capaz de estimular la expresión de determinadas

isoformas, siendo mayor la estimulación a mayor cantidad de AIA secretado. Esta estimulación en la actividad esterasa es indicativa de una mayor actividad catabólica en raíces, lo que indicaría una mayor actividad metabólica en plantas inoculadas, que a la larga podría tener consecuencias sobre el desarrollo vegetal, que no se aprecian en nuestros sistemas experimentales dada la limitación de los mismos.

Se sabe que *A. lipoferum* coloniza preferentemente raíces de plantas C4 (maíz, sorgo, etc), mientras que *A. brasilense* lo hace en C3 (trigo, arroz, etc), y *A. irakense* se encontró asociado a raíces de arroz (Michiels *et al.*, 1989; Bashan & Holguin, 1997). Cuando se estudió la población total de *Azospirillum* en rizoplana de maíz, se observó mayor colonización radical cuando fué *A. brasilense* el inoculante empleado, y menor densidad cuando se trató de *A. lipoferum*. Este fenómeno se podría explicar en términos de competitividad, ya que al estar *A. lipoferum* más adaptado a la colonización de raíces C4 (exudados radicales con malato), competiría más activamente con las cepas naturales presentes en el suelo por la colonización de la raíz, efecto que no se daría en inoculación con *A. brasilense*.

Los resultados obtenidos por Camprubí *et al.* (1995) ponen de manifiesto que la actividad enzimática del suelo dependen fundamentalmente de las características físico-químicas del medio de cultivo, de la disponibilidad de nutrientes y de la microbiota general asociada al sustrato. En nuestro estudio el sustrato empleado no varió entre tratamientos, y a pesar de la inoculación con *Azospirillum* no se detectaron cambios ni a nivel cuantitativo ni cualitativo en las poblaciones de hongos y bacterias en suelo, de modo que consecuentemente las actividades enzimáticas no sufrieron alteraciones por la inoculación.

En resumen, podríamos considerar que la inoculación con *Azospirillum* no afectó al desarrollo y función de la MA. Los cambios fisiológicos observados en raíces inoculadas (estimulación de la expresión de actividades metabólicas implicadas tanto

en rutas anabólicas como catabólicas) podrían ser tanto un efecto indirecto como consecuencia de una estimulación directa del desarrollo radical, como un efecto directo de *Azospirillum* que determinaría, como consecuencia de la estimulación metabólica, un mayor desarrollo radical, ya sea a nivel de biomasa, o a nivel de longitud y número de raíces. En cualquiera de los casos, estos cambios inducidos en raíces no se expresan de forma generalizada a nivel de cosecha, probablemente como consecuencia de la limitación de los sistemas experimentales.

Interacciones MA-Trichoderma

Interacciones MA-*Trichoderma*

Introducción

Numerosas especies del hongo *Trichoderma* han sido descritas como agentes de control biológico, al ser eficientes antagonistas frente a una amplia variedad de patógenos de las plantas presentes en suelo. Su actividad antagonista la ejercen mediante complejas interacciones entre ambos microorganismos, donde la antibiosis, la fungistasis y el micoparasitismo podrían estar implicados (Jeffries, 1997). Como resultado de esta serie de interacciones, la planta se beneficia, mejorando su crecimiento (Datnoff *et al.*, 1995). Además de los mecanismos de actuación antes citados que podríamos denominar directos porque su efecto se ejerce directamente sobre el agente patógeno, existe otro mecanismo de actuación indirecto mediado por la inducción de los sistemas de defensa en la planta, donde una de las principales respuesta es la acumulación de proteínas o enzimas relacionadas con la defensa, tales como glucanasas y quitinasas, siendo este tipo de reacciones las mismas que se desencadenarían tras el ataque o invasión por cualquier patógeno (Kombrink & Somssich, 1995), y las mismas que se han descrito que las micorrizas arbusculares son capaces de ejercer como agentes de control biológico (Pozo *et al.*, 1998; 1999).

El hecho de que *Trichoderma* muestre capacidad antagonista frente a numerosos hongos patógenos presentes en el suelo, hace pensar en el posible efecto que estos hongos pueden ejercer sobre otros beneficiosos, entre los cuales podemos destacar a las micorrizas arbusculares. Pero el resultado de la interacción no tiene porqué ser necesariamente negativo, habiéndose descrito efectos diversos, tanto positivos (Camprubí *et al.*, 1995; Datnoff *et al.*, 1995), como negativos (McGovern *et al.*, 1992; Wyss *et al.*, 1992; Burla *et al.*, 1996; Rousseau *et al.*, 1996), e incluso se

han descrito casos en los que la interacción puede llegar a resultar negativa para ambos microorganismos (McAllister *et al*., 1994b). Algunos autores sugieren que el efecto va a variar dependiendo de los tiempos de inoculación de los microorganismos implicados (McAllister *et al*., 1994a). En los casos de interacción de tipo negativo, se ha sugerido que los efectos puede que no sean debidos únicamente a la interacción hongo-hongo *per se*, sino también a una estimulación de los mecanismos de defensa en la planta (Wyss *et al*., 1992).

Esta variedad de resultados no permite generalizar con respecto al tema, y los resultados parecen depender fundamentalmente del tipo de cepa empleada y de la agresividad de la misma.

Del mismo modo que la inoculación de microorganismos podría tener efectos sobre la formación y desarrollo de la micorriza, también la inoculación de micorriza podría tener efecto sobre las poblaciones microbianas, tanto cuantitativa como cualitativamente, como consecuencia de los cambios inducidos en la composición mineral y fisiología de los tejidos de la planta, así como en la exudación radical (Linderman, 1992). Estos cambios cuantitativos y cualitativos de las poblaciones microbianas en el entorno rizosférico, como consecuencia de la micorrización, se pueden estimar a través de medidas de la actividad enzimática en el suelo, usándose éstas como índice de actividad microbiana total en suelo, así como de su fertilidad (Dhruva Kumar et al., 1992).

A este efecto, en este capítulo se muestran los resultados de los experimentos correspondientes a la interacción micorriza-*Trichoderma*, sus efectos sobre el desarrollo de la planta, así como determinados aspectos fisiológicos de la misma (enzimas glucanasas y quitinasas), sobre las poblaciones microbianas en la rizosfera a nivel cuantitativo, cualitativo y funcional (actividades enzimáticas esterasa, fosfatasa,

quitinasa y trealasa), así como el efecto que *Trichoderma* como tal ejerce sobre la capacidad infectiva del hongo MA.

Ensayos de interacciones

1. Ensayos en microcosmos bajo condiciones controladas

1.1. Efecto de la inoculación de hongos formadores de micorrizas arbusculares (*G. mosseae*, *G. deserticola* y endofitos naturales) y hongos del género *Trichoderma* sobre el desarrollo de la planta y la estructura poblacional y actividad microbiana en la rizosfera de plantas de maíz.

Material y Métodos

Sistema y diseño experimentales

El experimento se diseñó teniendo en cuenta dos variables. La primera, el factor MA, que contenía 4 tratamientos: Control sin micorrizar (C) e inoculación con *G. mosseae*, *G. deserticola* y endofitos naturales. La segunda variable consistió en la inoculación o no con *Trichoderma harzianum* T12. Ello dió lugar a 8 tratamientos diferentes, con 5 repeticiones cada uno, dando un total de 40 macetas. Los contenedores usados como sistema para cultivo fueron macetas con una capacidad para 1.5 l de suelo.

Características del suelo

Se utilizó sustrato A pasteurizado y reinoculado con un filtrado de suelo natural.

Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos

Maíz fué la planta elegida para la realización de este experimento. Las semillas pregerminadas se transfirieron a los contenedores previamente preparados donde el suelo había recibido en su caso los tratamientos micorrícicos. Se cultivó una plántula por contenedor. Para la micorrización se adicionaron al sustrato 20g por contenedor, uniformemente mezclado, de inóculo de micorriza. *Trichoderma* se aplicó a las radículas de las plantas inoculándose 2ml de suspensión acuosa de conidios con una concentración de 1 x 10^9 conidios/ml.

Determinaciones

Las plantas se cosecharon a los dos meses de crecimiento vegetal. Una vez cosechadas se determinaron el peso seco de la parte aérea y de las raíces, tras secar cada planta en un horno a 65ºC durante 48 h, la extensión de la colonización radical por parte del hongo de la micorriza (% micorrización), la población total de bacterias y actividades enzimáticas esterasa, fosfatasa, quitinasa y trealasa en suelo rizosférico.

Resultados

En la Tabla 1 se muestra el resultado del análisis estadístico (valor P) al que fueron sometidas las distintas variables experimentales evaluadas.

La cosecha se incrementó por la micorrización con *G. mosseae* y *G. deserticola*, en cambio los endofitos naturales produjeron un efecto adverso, con valores de cosecha inferiores a los controles (Fig 1A y 1B). La inoculación con *Trichoderma* incrementó la cosecha (parte aérea), fundamentalmente en plantas no micorrizadas, mientras que inoculado conjuntamente con los endofitos *G. mosseae* y *G. deserticola* no ejerció efecto significativo alguno, y con los endofitos naturales ocasionó una pequeña disminución en la cosecha (Fig. 1A).

El porcentaje de colonización radical por los distintos endofitos inoculados no se afectó en ninguno de los casos por la aplicación de *Trichoderma* y la capacidad de colonización varió dependiendo fundamentalmente del endofito en cuestión, así mientras que *G. deserticola* presentó los valores más altos de colonización radical, los endofitos naturales presentaron los más bajos (Fig. 1C).

	Fuente de variación		
Respuesta	**MA**	***Trichoderma***	**MA x *Trichoderma***
Variables de la planta			
Peso seco parte aérea	0,0001	0,1334	0,1201
Peso seco raíz	0,0001	0,9931	0,0870
Variables de la MA			
% micorrización	0,0001	0,8578	0,6289
Variables del suelo			
log ufc saprófitos/g suelo	0,0001	0,0001	0,0003
log ufc bacterias/g suelo	0,0390	0,6329	0,7712
% tipo1	0,0090	0,5543	0,1011
% tipo2	0,0609	0,4182	0,0154
% tipo3	0,0136	0,3427	0,2325
% tipo4	0,0012	0,0633	0,0478
% tipo5	0,0309	0,0550	0,4268
% tipo6	0,3319	0,2668	0,3087
% tipo8	0,3591	0,4911	0,4879
% tipo9	0,0001	0,0420	0,0205
% otros tipos	0,0133	0,0888	0,5121
Actividad esterasa/g suelo	0,0133	0,9137	0,1928
Actividad fosfatasa/g suelo	0,0001	0,0011	0,0827
Actividad quitinasa/g suelo	0,0001	0,0035	0,3817
Actividad trealasa/g suelo	0,0023	0,7479	0,0471

Tabla 1. Resultados de un ANOVA (valor P) de dos vías realizado para las distintas variables analizadas. El factor MA consiste en 4 tratamientos distintos: sin micorriza, con *G. mosseae*, con *G. deserticola* y con los endofitos naturales; el factor *Trichoderma* consiste en la inoculación o no de la cepa *T. harzianum* T12.

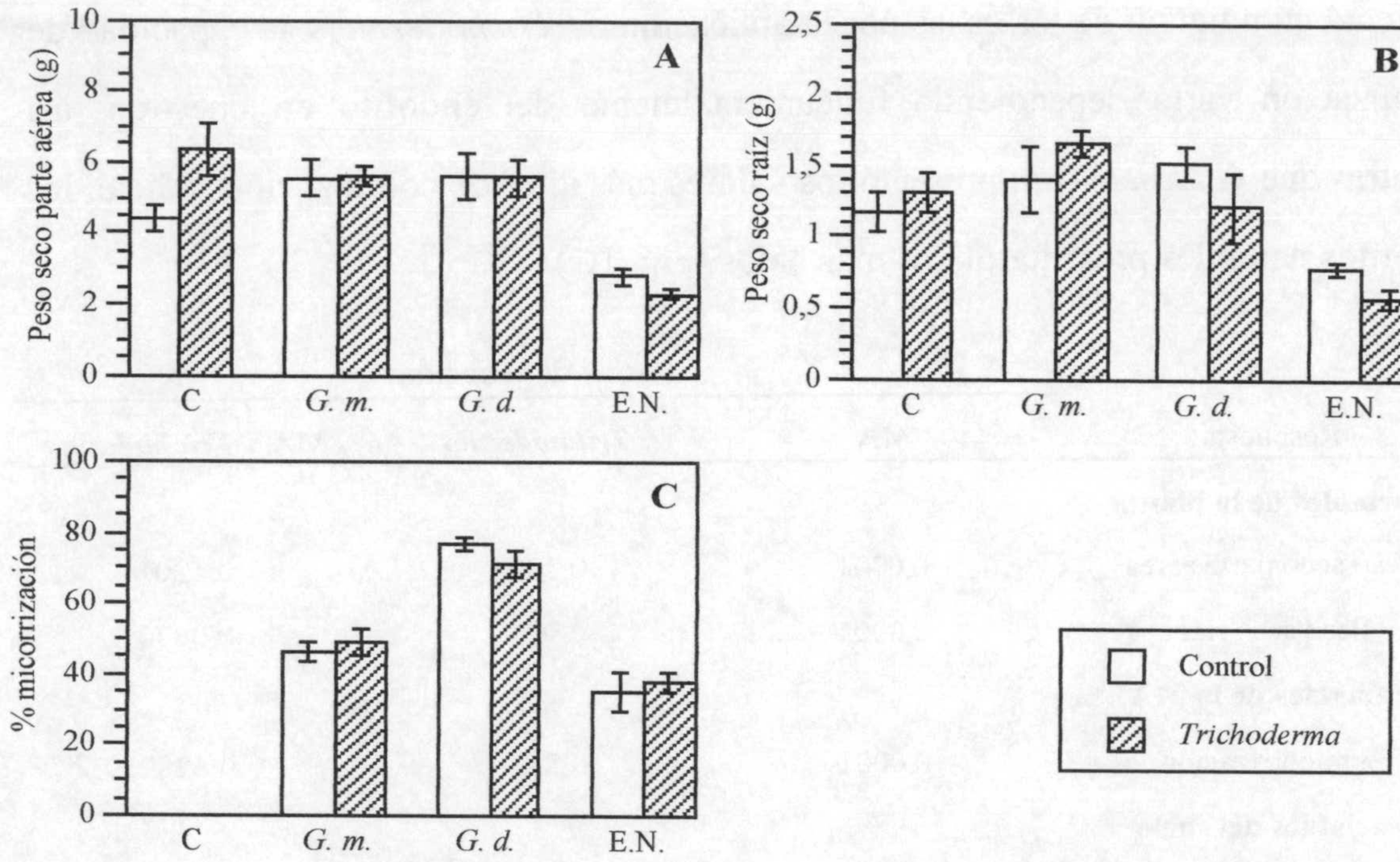

Fig. 1. Efecto de la inoculación de hongos MA (C, control sin inocular; *G.m.*, *G. mosseae*; *G.d.*, *G. deserticola*; E.N., endofitos naturales) y *Trichoderma harzianum* T12 sobre: (A) Peso seco parte aérea (g), (B) Peso seco raíz (g) y (C) % micorrización. Valores medios y error "estándar".

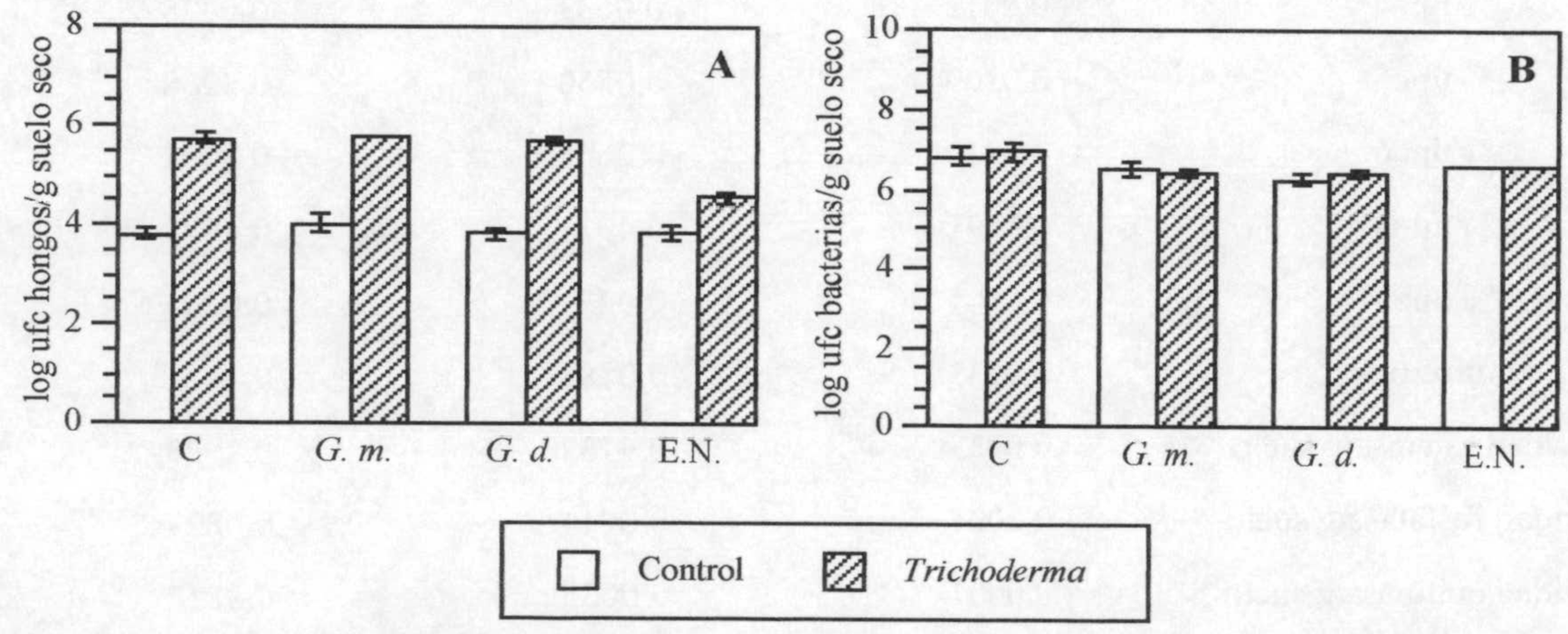

Fig. 2. Efecto de la inoculación de hongos MA (C, control sin inocular; *G.m.*, *G. mosseae*; *G.d.*, *G. deserticola*; E.N., endofitos naturales) y *Trichoderma harzianum* T12 sobre: (A) log ufc hongos totales/g suelo seco, (B) log ufc bacterias cultivables totales/g suelo seco. Valores medios y error "estándar".

El número total de saprobios en suelo incrementó considerablemente cuando se inoculó con *Trichoderma*, independientemente del tratamiento MA aplicado, aunque la inoculación conjunta *Trichoderma*-endofitos MA naturales produjo los valores más bajos (Fig. 2A).

El número total de bacterias rizosféricas cultivables descendió en plantas micorrizadas, siendo este descenso más acusado en presencia de los endofitos de colección (Fig. 2B). La inoculación de *Trichoderma* no afectó significativamente esta variable.

Del mismo modo que se produjeron alteraciones cuantitativas en el total de bacterias rizosféricas cultivables, también se produjeron alteraciones cualitativas, detectándose modificaciones en los niveles poblaciones de los distintos tipos de bacterias encontrados (aún no se han clasificado, luego para distinguirlas se nombraran T1-T9) (Fig. 3). Estas modificaciones se atribuyeron fundamentalmente a la micorrización, y *Trichoderma* sólo ejerció efecto en algunos casos muy concretos y a veces a través de su interacción con la MA (Tabla 1). Sólo las proporciones de T6 y T8 no se afectaron por ninguno de los inoculantes empleados. T1 y T2 disminuyeron considerablemente con la inoculación con *G. deserticola*, y llegaron a niveles casi indetectables en algunos casos en presencia de los endofitos MA naturales. *Trichoderma* dismunuyó la proporción de T1 y aumentó la de T2 con *G. mosseae*, en cambio disminuyó T2 en plantas controles y en aquellas micorrizadas con *G. deserticola*. T3 y T5 disminuyeron sólo en inoculación con los endofitos MA naturales, y en ninguno de los tratamientos se detectó efecto de *Trichoderma* sobre estos tipos poblacionales. T4 y T9 se detectaron casi exclusivamente en rizosfera de plantas micorizadas con *G. mosseae* y endofitos naturales, respectivamente. La inoculación con *Trichoderma* disminuyó los niveles poblacionales de ambos tipos bacterianos (T4 y T9) de manera significativa.

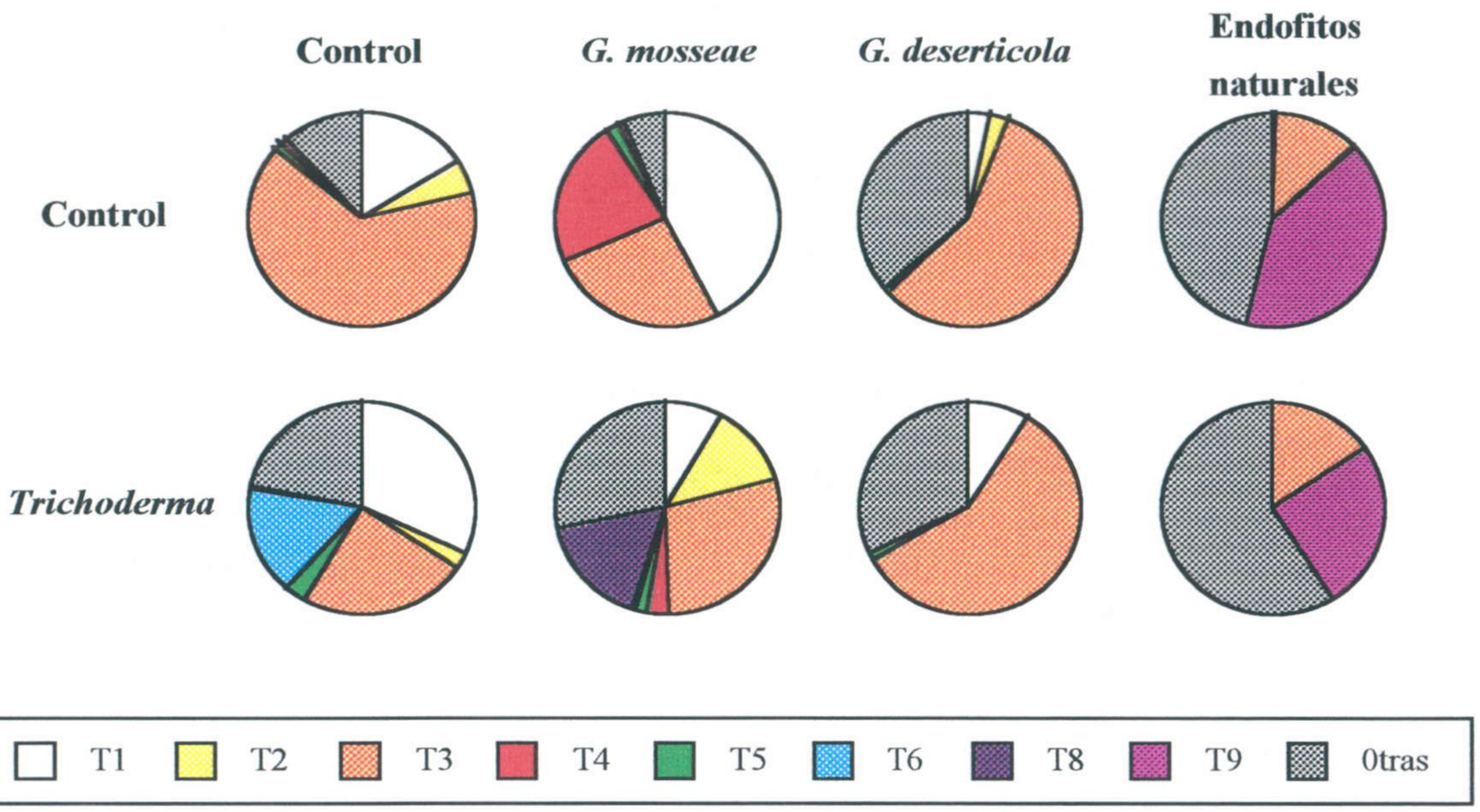

Fig 3. Proporciones de los diferentes tipos bacterianos encontrado en la rizosfera de plantas de maíz inoculadas con hongos MA (Control sin inocular, *G. mosseae*; *G. deserticola*; E.N., endofitos naturales) e inoculadas o no con *Trichoderma harzianum* T12.

Los cambios cuantitativos y cualitativos detectados en grupos microbianos de la rizosfera se manifestaron también en modificaciones funcionales detectadas a través del estudio de enzimas en suelo. La actividad esterasa (Fig. 4A) fué significativamente superior en plantas micorrizadas con *G. mosseae* y ligeramente superiores en aquellas con los endofitos naturales, que llegaron a incrementar de forma global la actividad en un 193 y 151%, respectivamente. A pesar de que la aplicación de *Trichoderma* en plantas micorrizadas con *G. mosseae* provocó un descenso de los niveles de actividad esterasa, no se detectó efecto global significativo de este inoculante. Las actividades fosfatasa y quitinasa fueron también superiores en plantas micorrizadas. En el caso de la fosfatasa (Fig. 4B) el aumento fué significativo cuando se inoculó con los endofitos MA naturales que produjo un incremento en la actividad de un 160% con respecto al control. La aplicación de *Trichoderma* incrementó de forma significativa la actividad fosfatasa en un 122% en inoculación conjunta con *G. mosseae* y en 190% en inoculación conjunta con *G. deserticola*. La actividad quitinasa fué superior en rizosfera de plantas micorrizadas con *G. mosseae* donde se detectó un incremento

donde se detectó un incremento medio de 162%. *G. deserticola* fué el endofito que produjo el incremento más bajo de esta actividad (119%). La aplicación de *Trichoderma* causó incrementos significativos de esta actividad del orden de un 152% en plantas sin micorrizar y del 121% en plantas micorrizadas con los endofitos naturales (Fig. 4C). La actividad trealasa se afectó fundamentalmente por la micorrización siendo *G. deserticola* el endofito que ocasionó mayores incrementos en esta actividad (453%), efecto que desapareció tras la inoculación con *Trichoderma.* Los endofitos MA naturales disminuyeron ésta actividad con respecto a las plantas sin micorrizar (50%) (Fig. 4D).

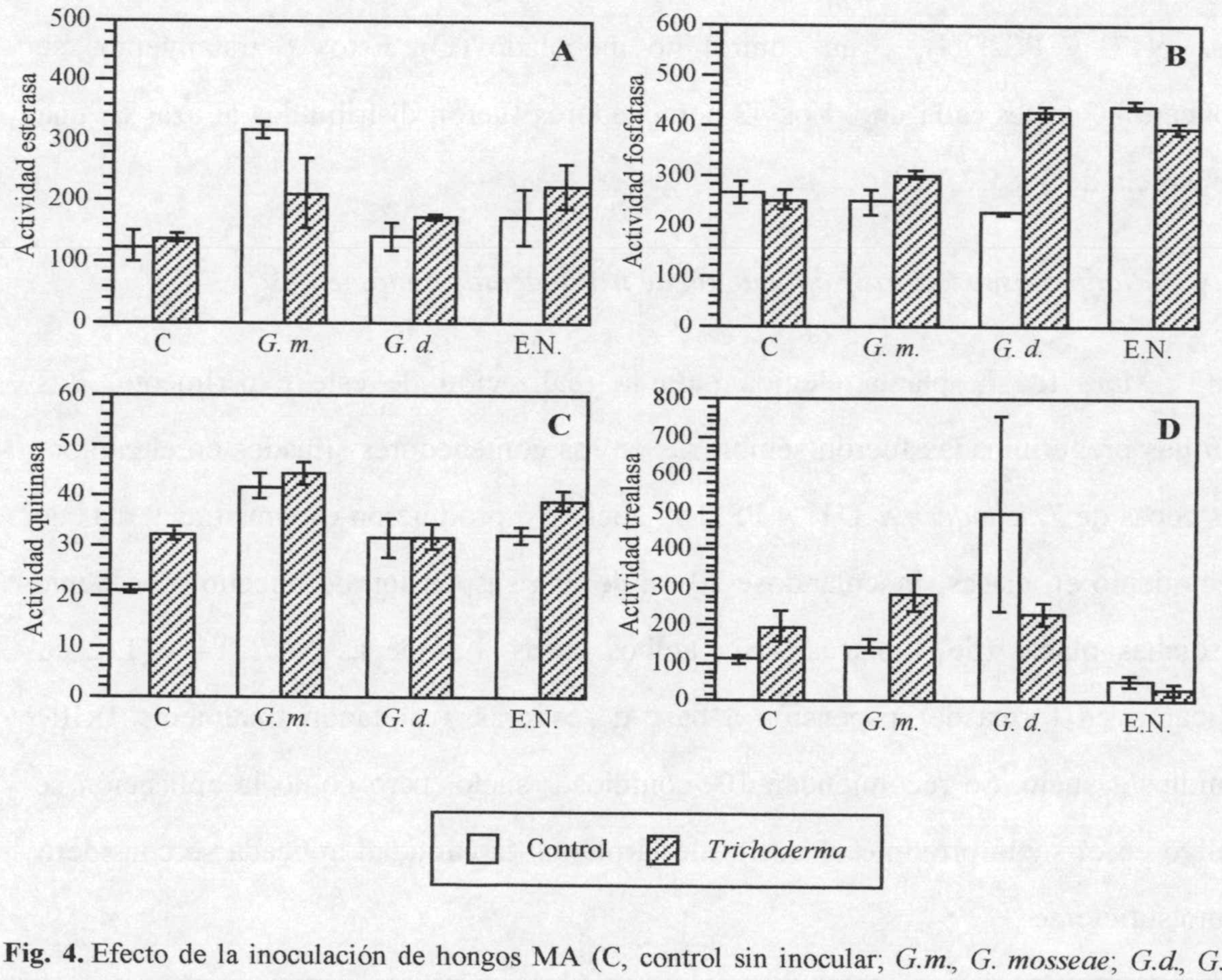

Fig. 4. Efecto de la inoculación de hongos MA (C, control sin inocular; *G.m.*, *G. mosseae*; *G.d.*, *G. deserticola*; E.N., endofitos naturales) y *Trichoderma harzianum* T12 sobre las actividades enzimáticas en suelo rizosférico: (A) Actividad esterasa (µg fluoresceína/g suelo seco), (B) Actividad fosfatasa (µg p-nitrofenol/g suelo seco), (C) Actividad quitinasa (µg p-nitrofenol/g suelo seco) y (D) Actividad trealasa (µg glucosa/g suelo seco). Valores medios y "error estándar".

2. Ensayos en mesocosmos bajo condiciones de campo

2.1. Efecto de distintas cepas de *Trichoderma* (*T. harzianum*: TH1, T4 y T12; *Trichoderma* spp.: N47 y PS2DN) sobre el desarrollo de las plantas y de la micorrización en maíz cultivado en mesocosmos bajo condiciones de campo.

Material y Métodos

Diseño experimental

El experimento consistió en 5 tratamientos inoculados, empleándose como inoculantes 5 cepas de *Trichoderma* (*T. harzianum*: TH1, T4, y T12; *Trichoderma* spp.: N47, y PS2DN), y un control no inoculado (C). Estos 6 tratamientos se replicaron 7 veces cada uno. Los 42 contenedores fueron distribuidos al azar en una subparcela de 5 x 5.75 m^2.

Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos

Maíz fué la planta elegida para la realización de este experimento. Las semillas pregerminadas fueron sembradas en los contenedores situados en el campo. Las cepas de *Trichoderma* TH1 y PS2DN apenas si produjeron esporas tras 9 días de crecimiento en placas, inoculándose 20 ml de una suspensión de micelio procedente de dichas placas (de 4 placas) para ambos casos. Las cepas N47, T4 y T12 se aplicaron en forma de suspensión a base de esporas, resultando finalmente $1x10^5$ conidios/g suelo. Se recomiendan 10^6 conidios/g suelo, pero como la aplicación se realizó en el suelo próximo al cuello de la planta, la cantidad aplicada se consideró como suficiente.

Determinaciones

Se determinaron el peso seco de la parte aérea y raíces tras secar cada planta en un horno a 65ºC durante 96h, la extensión de la colonización radical del hongo

MA, la población total de bacterias y hongos en suelo, las actividades enzimáticas: esterasa, fosfatasa, quitinasa y trealasa, en suelo y las actividades isoenzimáticas quitinasas y glucanasas en raíces.

Resultados

El desarrollo de la planta no resultó afectado en ninguno de los casos por la inoculación de *Trichoderma*, ni en peso de parte aérea ni en el de raíces que presentaron valores entorno a los 60 g y 11 g respectivamente. La micorrización tampoco se alteró por la inoculación de *Trichoderma* siendo el porcentaje de raíz colonizada aproximadamente del 30% en todos los tratamientos. Mientras que el número de unidades formadoras de colonias (ufc) de microorganismos saprofíticos totales no sufrió modificación como consecuencia de la inoculación con *Trichoderma*, obteniéndose valores del orden de 5 log ufc, el número de ufc bacterianas, sí sufrió alteraciones, aunque las diferencias no fueron especialmente significativas comparándolas con el control sin inocular (Fig. 5).

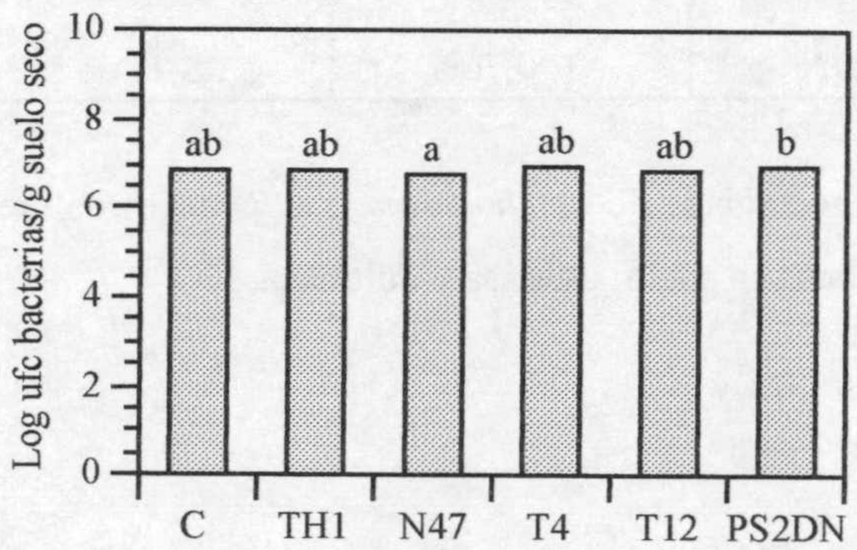

Fig. 5. Efecto de los distintos inoculantes de *Trichoderma* empleados sobre el número de bacterias totales en suelo (Log ufc bacterias/g suelo seco). Valores que comparten la misma letra no son significativamente diferentes según test LSD-Fisher $P \leq 0.05$.

Las actividades enzimáticas estudiadas en suelo rizosférico, muestran sólo pequeñas diferencias a nivel de los enzimas esterasa y quitinasa (Tabla 2), diferencias que no son significativas con respecto al control sin inocular, pero que muestran la existencia de una cierta correlación negativa, en el caso de la esterasa, entre estos resultados y los observados de log ufc bacterianas (Fig. 5) para aquellos inoculantes que mostraron ciertas diferencias, es decir, N47 y PS2DN. La cepa N47 fué la que ofreció mayores valores de actividad quitinasa, mientras que T4 dió los valores más bajos. Las actividades fosfatasa y trealasa presentaron valores entorno a 320 µg p-nitrofenol y 95 µg glucosa por gramo de suelo seco, respectivamente.

	Esterasa (µg fluoresceína/g seco suelo)	**Quitinasa** (µg p-nitrophenol/g seco suelo)
C	145,06 ab	34,51 ab
TH1	149,26 ab	37,31 ab
N47	180,98 b	38,37 b
T4	156,19 ab	30,64 a
T12	163,11 ab	35,94 ab
PS2DN	140,76 a	36,11 ab

Tabla 1. Efecto de distintos inoculantes de *Trichoderma* tras 2 meses de crecimiento de plantas de maíz sobre actividades enzimáticas en suelo: esterasa y quitinasa.

El estudio de elicitación de las actividades enzimáticas quitinasa (Fig. 6) y glucanasa (Fig. 7) en raíces no mostró diferencias en ninguno de los casos.

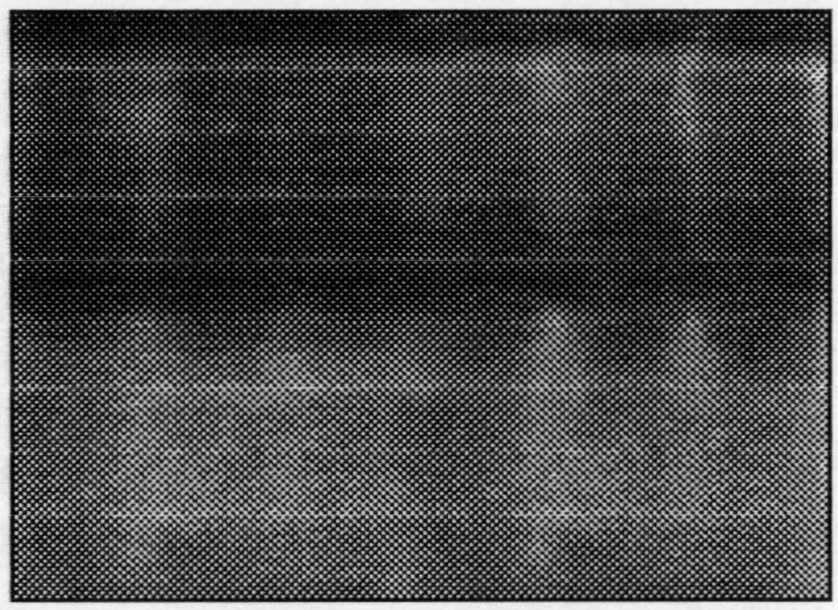

Fig. 6. Actividad quitinasa en raíces de plantas de maíz, crecidas en suelo natural, no inoculadas (C) o inoculadas con distintas cepas de *Trichoderma* (TH1, NH47, T4, T12 y PS2DN).

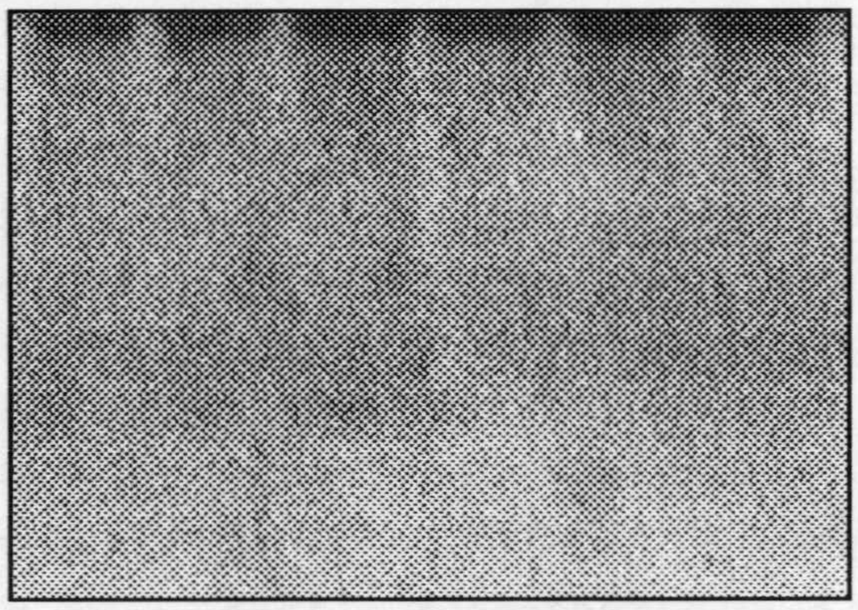

Fig. 7. Actividad glucanasa en raíces de plantas de maíz, crecidas en suelo natural, no inoculadas (C) o inoculadas con distintas cepas de *Trichoderma* (TH1, NH47, T4, T12 y PS2DN).

Discusión

Durante muchos años las especies pertenecientes al género *Trichoderma* han sido el foco de atención debido a su reconocido potencial de actuación como agentes de control biológico frente a una amplio rango de patógenos (Chérif & Benhamou, 1990; Benhamou & Chet, 1993; Datnoff *et al.*, 1995). A pesar de la enorme cantidad de trabajos realizados relacionados con la actividad antimicrobiana de *Trichoderma* spp., la posibilidad de que estos hongos antagonistas interaccionen con otros componentes de la rizosfera no se ha estudiado de forma sistemática. Los mecanismos exactos de las interacciones se desconocen, aunque existen evidencias que correlacionan la presencia de *Trichoderma* en suelo con una disminución en la extensión de la colonización radical por hongos MA (Mc Govern *et al.*, 1992; Wyss *et al.*, 1992; Mc Allister *et al.*, 1994a). En la actualidad la situación no está claramente definida, ya que existen distintos trabajos donde se destaca el efecto positivo de *Trichoderma* sobre la MA (Calvet *et al.*, 1990; 1992; 1993; Datnoff *et al.*, 1995). Rousseae *et al.* (1996) señalan la posibilidad de que el efecto observado se deba fundamental a la agresividad de la cepa de *Trichoderma* en cuestión. En nuestro estudio no se detectó nunca efecto, ni positivo, ni negativo, de la inoculación de *Trichoderma* sobre la simbiosis MA, y el resto de variables analizadas mostraron resultados más patentes bajo condiciones controladas en microcosmos.

Los efectos de la inoculación de *Trichoderma* sobre la cosecha de las plantas no parecen estar del todo claros. Así algunos autores no encuentran efecto de la inoculación (Köhl & Schlösser, 1989; Nemec, 1997), otros detectan mejoras en la cosecha sólo en inoculación conjunta con MA (Calvet *et al.*, 1993; Camprubí *et al.*, 1995) y otros encuentran efectos negativos (Mc Allister *et al.*, 1994a). Nasseby *et al.* (1999) encuentran efecto positivo de la inoculación de *Trichoderma* tanto en presencia del hongo patógeno *Phytium*, como inoculado de manera aislada. En este trabajo se detectó efecto positivo de la inoculación sólo cuando *Trichoderma* se

aplicó de forma aislada. La ausencia de efecto en plantas micorrizadas podría atribuirse a que la micorriza *per se* esté ocasionado ya tales beneficios que cuando se inocula conjuntamente *Trichoderma*, los efectos beneficiosos de este último dejan de hacerse notables.

La micorrización ocasionó una disminución de la población total de bacterias. Este efecto, ampliamente descrito en la bibliografía para determinados grupos bacterianos, parece deberse al hecho de que la micorriza actúa como sumidero de los fotosintatos que llegan a las raíces, cambiando tanto cuantitativamente como cualitativamente la composición de los exudados radicales, lo que en definitiva afecta al establecimiento y función de determinados grupos microbianos en la rizosfera (Linderman, 1992). *Trichoderma* a pesar de no producir cambios cuantitativos en el total de bacterias en suelo, sí ocasionó modificaciones cualitativas en las poblaciones bacterianas, efectó que fué descrito anteriormente por Baker (1988). Como consecuencia de estas modificaciones, es lógico pensar que si las poblaciones microbianas sufrieron alteraciones tanto cuantitativas como cualitativas, las actividades de determinados enzimas en rizosfera también sufrieran alteraciones. Por lo general la mayoría de las actividades enzimáticas estudiadas incrementaron en algún momento por la micorrización, lo que indica una mayor actividad catabólica en el suelo. Especial mención merecen los resultados encontrados de actividades quitinasa y trealasa. Spans *et al.* (1989) encuentran mayor actividad quitinasa en rizosfera de plantas micorrizadas en los primeros días del establecimiento de la simbiosis, efecto que atribuyen a una reacción de estrés de la planta frente a la invasión, y que desaparece cuando la simbiosis está bien establecida. En este estudio la actividad se mantiene, efecto que podría atribuirse a la capacidad de actuación de la micorriza como agente de control biológico, bien por la actividad quitinasa inducida por la MA (Pozo *et al.*, 1998), o bien a través de un aumento en las poblaciones de microorganismos productores de dicho enzima. El aumento detectado en quitinasas

en rizosfera de plantas inoculadas con *Trichoderma*, podría deberse a los mismos factores argumentados anteriormente, al ser capaz el hongo de producir también sus propias quitinasas (Rousseau *et al.*, 1996). La actividad trealasa, típica de simbiosis (Mellor, 1992), incrementó en la rizosfera de plantas micorrizadas, lo que nuevamente conduce a pensar en un efecto micorrizosférico causado por la simbiosis MA. Al ser la trealosa un determinante del establecimiento de asociaciones simbióticas plantas-microorganismos (Mellor, 1992), el establecimiento de la simbiosis MA determinaría por tanto un aumento en los niveles de trealosa en el entorno rizosférico, incrementando consecuentemente los niveles poblaciones de grupos capaces de utilizar éste compuesto, que en definitiva darán lugar a los efectos observados. *Trichoderma* ocasionó una disminución en los niveles de este enzima, y si bien no se detectó que este hongo afectara al establecimiento de la simbiosis MA, podría ocurrir que afectara al establecimiento de otro tipo de asociaciones simbióticas. Así, Burla *et al.* (1996) encuentran una inhibición de la nodulación en raíces de judía como consecuencia de la inoculación con *Trichoderma*.

Interacciones MA-Rhizobium

Interacciones MA-*Rhizobium*

Introducción

Como resultado de la interacción se beneficia la fijación de N, el ciclado de N y la transferancia de N a plantas no fijadoras (**biofertilizantes**). La micorrización en un sistema radical nodulado implica la existencia de una simbiosis tripartita en la que cada uno de sus miembros influirá en el mantenimiento y desarrollo de los demás componentes de la simbiosis. De hecho, el N suministrado por la FBN puede ser crítico para mantener un estado nutricional y fisiológico equilibrado en la planta hospedadora, lo cual es importante para la formación y función de la micorriza (Puppi *et al.*, 1994), además de mejorar el crecimiento de la planta. El aporte de N favorece el enraizamiento, lo que incrementa la superficie radical suceptible de ser colonizada por el hongo, lo cual es importante para un simbionte obligado. Por otro lado, la alta demanda de P para el proceso de fijación de N, que es suministrado por la micorriza sugiere que los efectos de la micorriza sobre la actividad de *Rhizobium* predecen a cualquier otro sobre el crecimiento vegetal. En general las leguminosas que crecen en condiciones naturales se encuentran fuertemente micorrizadas, debido quizás a sus considerables necesidades de P y a la escasez de formas asimilables de este elemento en suelo.

Los nódulos formados generalmente no son invadidos por el hongo MA (Smith *et al.*, 1979), por lo que no existe contacto o interacción directa entre ambos simbiontes, luego el suministro de P debe realizarse a través de las células hospedadoras. Las fosfatasas específicas del hongo MA parecen jugar un papel importante en la transferencia de P al bacteroide (Asimi *et al.*, 1980). De este modo, nodulación y formación de micorriza parecen ser procesos interactivos y aunque la

principal razón para la cooperación entre simbiontes tiene una base nutricional, se han sugerido otros efectos secundarios (Barea *et al.*, 1992). Así, ambos microorganismos como componentes de la rizosfera pueden interaccionar antes de que ocurra la colonización. Como ejemplos de este caso está el hecho de que algunos *Rhizobium* son capaces de estimular el crecimiento micelial de esporas del hongo en condiciones axénicas, o que determinados polisacáridos extracelulares producidos por *Rhizobium* pueden facilitar la formación de micorriza. Así mismo, sobrenadantes libres de células de cultivos de *Rhizobium* también pueden incrementar la colonización por micorrizas de modo similar a la aplicación de auxinas, giberelinas y citoquinas, lo que sugiere la intervención de factores hormonales en el proceso de micorrización.

Los efectos beneficiosos de la doble simbiosis pueden variar dependiendo de la combinación de endofitos y del hospedador en cuestión (Azcón *et al.*, 1991). Así, la doble inoculación con especies convenientes no sólo va a aumentar el contenido en nutrientes en los tejidos vegetales, sino que además parece proporcionar un suministro de nutrientes bien equilibrado, afectando positivamente a los procesos biosintéticos que tienen lugar, mejorando la producción de proteínas que constituyen la base de una cadena trófica de gran importancia en la alimentación animal.

La micorrización podría reducir la formación de pelos radicales, afectando por tanto el proceso de nodulación (Linderman, 1988), pero esto aún está por demostrar. Lo que si se sabe es que bajo determinadas condiciones la micorriza puede cambiar el modelo de distribución de los nódulos en el sistema radical (Patterson *et al.*, 1990) y no hay firmes resultados que permitan concluir que la presencia de la micorriza pueda afectar la competitividad de una cepa dada (Ames & Bethlenfalvay, 1987; Barea *et al.*, 1992).

Aunque se asume que ambos simbiontes no compiten por los sitios de infección, Ruíz-Lozano & Azcón (1993) encuentran en plantas de garbanzo que

cuanto mayor era la nodulación por *Bradyrhizobium*, menor era el desarrollo del hongo *G. fasciculatum*. Algunos autores atribuyen este comportamiento competitivo a una limitación en el nivel de fotosintatos en el hospedador (Bethlenfalvay *et al.*, 1983).

El significado ecológico de esta doble simbiosis mutualística reside en el hecho de que plantas noduladas y micorrizadas están mejor adaptadas a ambientes con baja disponibilidad de N y P, y por tanto pueden jugar un papel fundamental como colonizadores pioneros en suelos deficientes en nutrientes. Además, bajo condiciones ambientales adversas, como sequía, salinidad, o cualquier otro tipo de estrés ambiental la simbiosis tripartita mantiene mayores niveles de actividad fotosintética y nodular, mayores niveles de fijación de N y de transpiración y conductancia que plantas fertilizadas con P, lo que hace que esta simbiosis tenga gran relevancia práctica y ecológica en estas condiciones (Puppi *et al.*, 1994).

Si además de este tipo de interacciones MA-*Rhizobium* en la rizosfera de una leguminosa, consideramos un tercer componentes micorbiológico, como pueden ser los microorganismos solubilizadores de P, la importancia de tales interacciones es de vital interés en el contexto de Agricultura Sostenible. Así como resultado de la interacción se va a producir el ciclado de P y la utilización de fosfatos minerales y orgánicos como fuente alternativa de P (**biofertilizantes**), participando por tanto en el ciclo biogeoquímico del P. Como es sabido, en esto último radica el efecto beneficioso de la interacción de MSP, MA, *Rhizobium*, ya que las hifas de la micorriza pueden alcanzar microhábitats donde la solubilización microbiana de P tiene lugar y que las raíces no pueden alcanzar. Algunos trabajos han demostrado las interacciones sinérgicas entre MA y solubilizadores de P (Barea *et al.*, 1997; Toro *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998), en cuanto a facilitar el uso por la planta de fuentes de P de baja disponibilidad, como es el caso del fosfato de roca. La aplicación de las metodologías de dilución isotópica del ^{32}P han permitido comprobar que plantas doblemente inoculadas muestran una actividad específica $^{32}P/^{31}P$ más baja que sus respectivos

controles, lo que sugiere que dichos tratamientos provocan que las plantas puedan utilizar fuentes de P no disponibles para los controles. Este proceso microbiano puede ser limitado en suelo debido a la reducida disponibilidad de carbohidratos para la bacteria, así como por las dificultades de translocación de los iones P dentro de las raíces.

Ensayos de Interacciones

1. Ensayos en microcosmos bajo condiciones controladas

1.1 Efecto del estrés hídrico y la inoculación combinada de hongos de la micorriza (*G. deserticola* y *G. fasciculatum*) y *Rhizobium meliloti* (S vs. MG), sobre el crecimiento de la planta, la formación y función de la simbiosis.

Material y Métodos

Sistema y diseño experimentales

El experimento se realizó en 2 fases. En la primera de ella se estudió el efecto de la cepa GR4 (S), y en una segunda el efecto de la cepa GR4(pCK3) (MG). En cada estudio se consideraron dos factores de variación. El primero, el factor MA, contenía 3 tratamientos: Control sin micorrizar (C), inoculación con *G. deserticola* e inoculación con *G. fasciculatum*. El segundo factor consistió en someter a la planta a estrés hídrico (80% de la capacidad de campo del suelo) o no (100% de la c.c.). Ello dió lugar a un total de 6 tratamientos diferentes, con 5 repeticiones de cada uno, para cada variedad de planta ensayada, resultando un total de 90 macetas para cada cepa de *Rhizobium* estudiada. Las macetas usadas como sistema para cultivo presentaban una capacidad para 500 ml de suelo.

Características del suelo

Se empleó sustrato B, esterilizado y reinoculado con un filtrado de suelo natural.

Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos.

Se emplearon 3 variedades distintas de *Medicago sativa* (var. Nolana, var. Rigidula y var. Rotata). Las semillas esterilizadas, se sembraron en los contenedores previamente preparados donde el suelo había recibido, en su caso los tratamientos micorrícicos. Se cultivó una plántula por contenedor. En los tratamientos micorrizados se adicionaron al sustrato 10 g por contenedor de un inóculo de *G. mosseae*. Los inoculantes bacterianos (DO_{600} = 0.8, equivalente a 10^9 ufc/ml) se aplicaron a las radículas de las plantas, inoculándose 1ml de la suspensión bacteriana por planta.

Determinaciones

Las plantas se cosecharon a los 2 meses de crecimiento vegetal. Una vez cosechadas se determinaron el número de nódulos en las raíces, el peso seco de la parte aérea y las raíces tras secar cada planta en un horno a 65ºC durante 48h, el contenido de N y P en sus tejidos (Lachica *et al.*, 1973), así como de ^{15}N, la extensión de la colonización radical por parte del hongo de la micorriza (% micorrización) y la cantidad de prolina en parte aérea.

Resultados

Los resultados del análisis estadístico realizado se muestran en las Tablas 1 (cepa S) y 2 (cepa MG).

Respuesta	Fuente de variación								
	Micorriza			Estrés hídrico			Interacción Micorriza x Estrés hídrico		
	Nolana	Rigidula	Rotata	Nolana	Rigidula	Rotata	Nolana	Rigidula	Rotata
Variables de la planta									
Peso seco parte aérea	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0316	0,0563	0,0001
Peso seco raíz	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0083	0,3971	0,0001
Prolina en hoja (nmol/g)	0,0382	0,0001	0,0047	0,0001	0,0001	0,0163	0,4372	0,0001	0,0023
mg N/planta	0,0001	0,0097	0,0001	0,0027	0,0400	0,0001	0,2686	0,3871	0,0040
mg P/planta	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0209	0,0001	0,0001
Variables de la MA									
% micorrización	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0215	0,0024	0,0001	0,2562	0,0195
Variables del inoculante									
nº de nódulos	0,0001	0,0001	0,0003	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,4071	0,0023
% exceso atómico ^{15}N	0,0001	0,0015	0,0183	0,0001	0,0004	0,0001	0,0217	0,8513	0,6867

Tabla 1. Resultados de un ANOVA (valor P) de dos vías realizado para estudiar el efecto de la inoculación de combinada micorriza-*Rhizobium meliloti* GR4 (cepa S).

Respuesta	Fuente de variación								
	Micorriza			Estrés hídrico			Interacción Micorriza x Estrés hídrico		
	Nolana	Rigidula	Rotata	Nolana	Rigidula	Rotata	Nolana	Rigidula	Rotata
Variables de la planta									
Peso seco parte aérea	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0025	0,0057	0,0001	0,0965
Peso seco raíz	0,0001	0,0001	0,0001	0,1006	0,7531	0,0303	0,2230	0,9041	0,0218
Prolina en hoja (nmol/g)	0,0001	0,0001	0,0036	0,0001	0,0001	0,1182	0,0001	0,0001	0,4834
mg N/planta	0,0001	0,0001	0,0003	0,0042	0,0004	0,0057	0,3386	0,5368	0,0986
mg P/planta	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0067	0,0023	0,0001	0,0928
Variables de la MA									
% micorrización	0,0001	0,0001	0,0001	0,0721	0,1612	0,1237	0,2650	0,5962	0,0053
Variables del inoculante									
nº de nódulos	0,0001	0,0001	0,0001	0,1083	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0016
% exceso atómico ^{15}N	0,1502	0,1084	0,0815	0,0225	0,9432	0,4393	0,1458	0,3541	0,2508

Tabla 2. Resultados de un ANOVA (valor P) de dos vías realizado para estudiar el efecto de la inoculación de combinada micorriza-*Rhizobium meliloti* (cepa MG).

De forma general, la cosecha se incrementó gracias a la micorrización, mientras que el estrés hídrico ocasionó disminuciones considerables en esta variable para cualquiera de las tres variedades de *Medicago* ensayadas y con cualquiera de las cepas de *Rhizobium* probadas, aunque la intensidad de respuesta varió en función de la variedad de planta y la cepa de *Rhizobium*. En la variedad Nolana no se produjo efecto diferencial entre los dos endofitos empleados cuando se inoculó conjuntamente con la cepa S de *Rhizobium meliloti*, produciéndose en ambos casos incrementos de cosecha con respecto al control crecido en condiciones óptimas, de aproximadamente un 400% bajo condiciones óptimas de humedad y de un 200% bajo condiciones de sequía (Fig. 1A). En cambio, cuando se inoculó esta variedad (Nolana) con la cepa MG, *G. fasciculatum* fué más efectivo que *G. deserticola*, especialmente bajo condiciones limitantes, llegando a producir incrementos de cosecha con respecto al control crecido en condiciones óptimas de un 340% (Fig. 2A). En ambos casos, en las plantas no micorrizadas la limitación hídrica ocasionó una disminución del crecimiento de aproximadamente 1/3, aunque este efecto fué significativo. En la variedad Rigidula, a pesar de que los dos endofitos se comportaron del mismo modo, el beneficio obtenido por la micorrización fué mayor en plantas coinoculadas con la cepa MG de *Rhizobium*, donde la micorriza incrementó la cosecha en un 500% aproximadamente, bajo condiciones óptimas, y en un 300% bajo condiciones limitantes (Fig. 2B) con respecto al control crecido en condiciones óptimas, frente a incrementos en torno al 160% en condiciones óptimas que se produjo en coinoculación con la cepa S, siendo estas plantas la que menos beneficios obtienen de la micorrización, especialmente en condiciones desfavorables (Fig. 1B). En las plantas sin micorrizar, el estrés hídrico sólo ocasionó efectos significativos cuando éstas habían sido inoculadas con la cepa S. En la variedad Rotata, también se observó diferencia de comportamiento entre endofitos, en este caso en presencia de la cepa S, resultando *G. deserticola* más efectivo (367%) que *G. fasciculatum* (267%) en condiciones óptimas de crecimiento (Fig. 1C). Cuando se practicó coinoculación con la cepa MG ambos endofitos

produjeron incrementos en torno al 430% en condiciones óptimas y al 300% en condiciones limitantes (Fig. 2C). Al igual que se observó en la variedad Nolana la limitación hídrica ocasionó una disminución del crecimiento en las plantas no micorrizadas aunque este efecto no fué significativo. En cuanto al peso de raíz, se mantienen las mismas tendencias que las expresadas anteriormente para parte aérea, aunque los efectos de la limitación hídrica no son tan acusados, llegando incluso a desaparecer en el caso de plantas inoculadas con la cepa MG (Fig. 2D, 2E, 2F).

El contenido foliar de prolina aumentó como consecuencia del estrés hídrico, y el efecto de la micorrización varió en función del *Rhizobium* aplicado y de la variedad de *Medicago* ensayada. Cuando se inoculó con la cepa S, la micorrización no produjo modificaciones en los niveles de prolina en condiciones óptimas de crecimiento en ninguna de las tres variedades ensayadas, en cambio bajo condiciones de estrés aumentó el contenido en éste con respecto al control sólo cuando se trató de las variedades Rigidula y Rotata (Fig. 1G, 1H, 1I). En el caso de plantas inoculadas con la cepa MG, la micorrización disminuyó en todos los casos el contenido en prolina, no existiendo diferencias significativas entre endofitos (Fig. 2G, 2H, 2I).

El contenido en nutrientes en parte aérea (N y P), disminuyó como consecuencia del estrés, siendo este descenso más acusado para el P. La micorrización incrementó ambos elementos tanto en condiciones óptimas como bajo estrés. El comportamiento de cada endofito varió nuevamente en función de la combinación con *Rhizobium* y la variedad de planta. Por lo general, ambos endofitos incrementaron en la misma proporción el contenido en N, a excepción de la variedad Nolana inoculada con la cepa MG de *Rhizobium*, donde *G. fasciculatum* aportó mayores incrementos tanto en condiciones óptimas como de estrés (Fig. 2J).

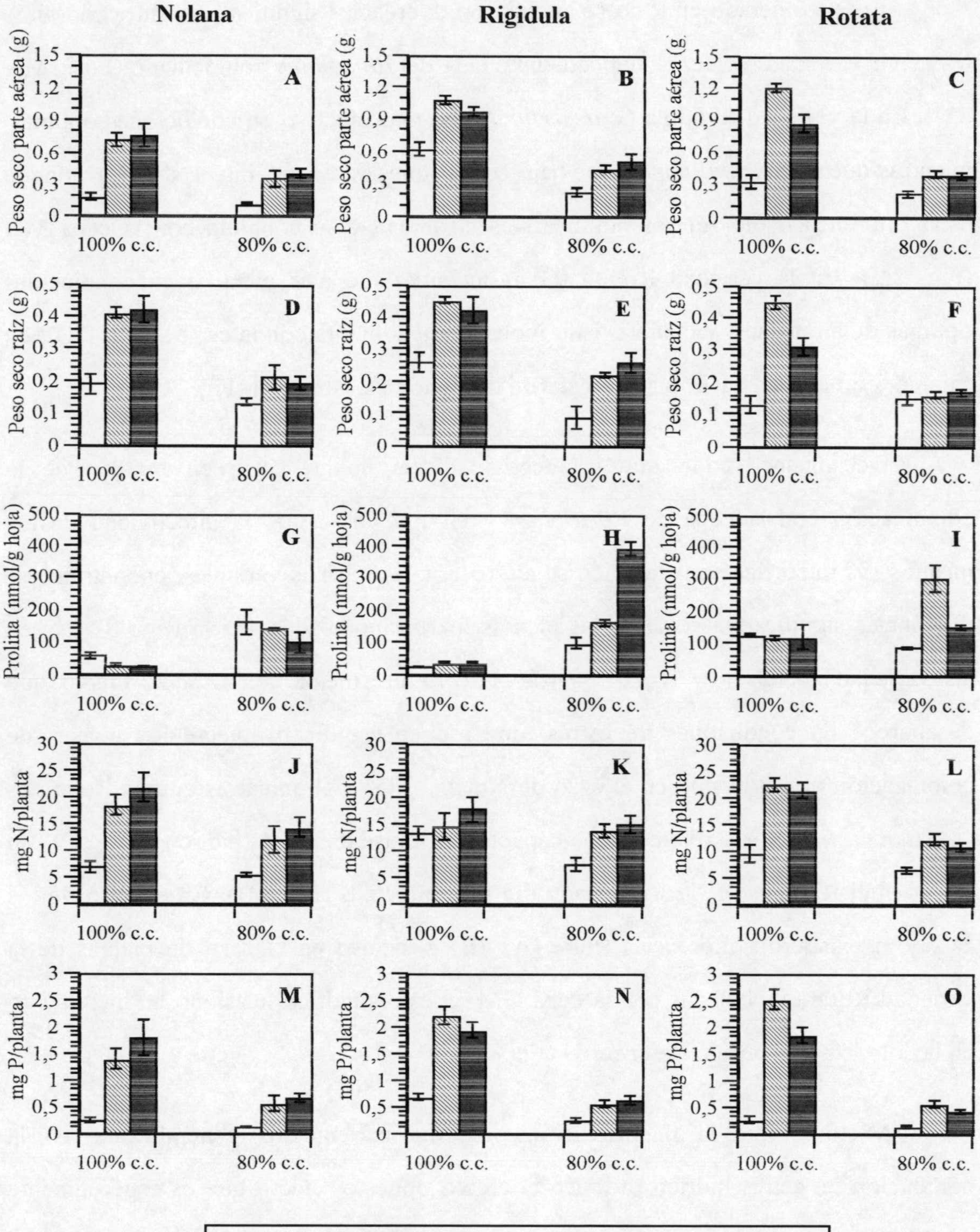

Fig 1. Efecto de la inoculación combinada micorriza-*Rhizobium meliloti* GR4 (S) sobre las distintas variables experimentales analizadas de la planta en las tres variedades de *Medicago sativa* estudiadas (Nolana, Rigidula y Rotata). Las barras en cada columna representan el error estándar.

En el contenido en P no se apreciaron diferencias significativas entre endofitos MA en la variedad Nolana, independientemente del *Rhizobium* coinoculado (Fig. 1M y 2M). En la variedad Rigidula *G. deserticola* fué más efectivo en condiciones óptimas, mientras que *G. fasciculatum* lo fué bajo condiciones de estrés (Fig. 1N y 2N), aunque estas diferencias sólo fueron significativas en inoculación conjunta con la cepa MG (Fig. 2N). En la variedad Rotata, *G. deserticola* fué más efectivo en condiciones óptimas de humedad y cuando existió inoculación conjunta con la cepa S (Fig. 1O), en cambio, con la cepa MG no se detectaron diferencias a este nivel (Fig. 2O).

Del mismo modo que la efectividad del hongo varió en función de la combinación con la cepa de *Rhizobium* y el tipo de planta, la infectividad de los mismos (% micorrización) también se alteró por las mismas variables, encontrándose diferencias significativas cuando las plantas fueron inoculadas con la cepa S. Así, en las variedades Nolana y Rotata *G. deserticola* fué mejor colonizador, efecto que desaparece en condiciones de estrés, que reduce significativamente los niveles de colonización por el mismo en el caso de Nolana (Fig. 3A), mientras que en Rotata es *G. fasciculatum* el que reduce dicha capacidad a causa del estrés hídrico (Fig. 3C). En la variedad Rigidula, *G. fasciculatum* fué más infectivo (Fig. 3B). En el resto de los casos no existieron diferencias (Fig. 4A, 4B) e incluso en el caso de plantas de la variedad Rotata inoculadas con la cepa GM, el estrés hídrico ocasionó un incremento en la colonización por *G. deserticola* (Fig. 4C).

Mientras que la micorrización ocasiona incrementos generalizados en la nodulación, el estrés hídrico produce el efecto opuesto, efecto que es especialmente significativo en plantas micorrizadas. Por lo general no existen diferencias de comportamiento entre endofitos a este respecto, salvo en la variedad Nolana inoculadas con las cepa S (Fig. 3D) y plantas de la variedad Rotata inoculadas con la cepa MG (Fig. 4F) donde *G. deserticola* fué más efectivo.

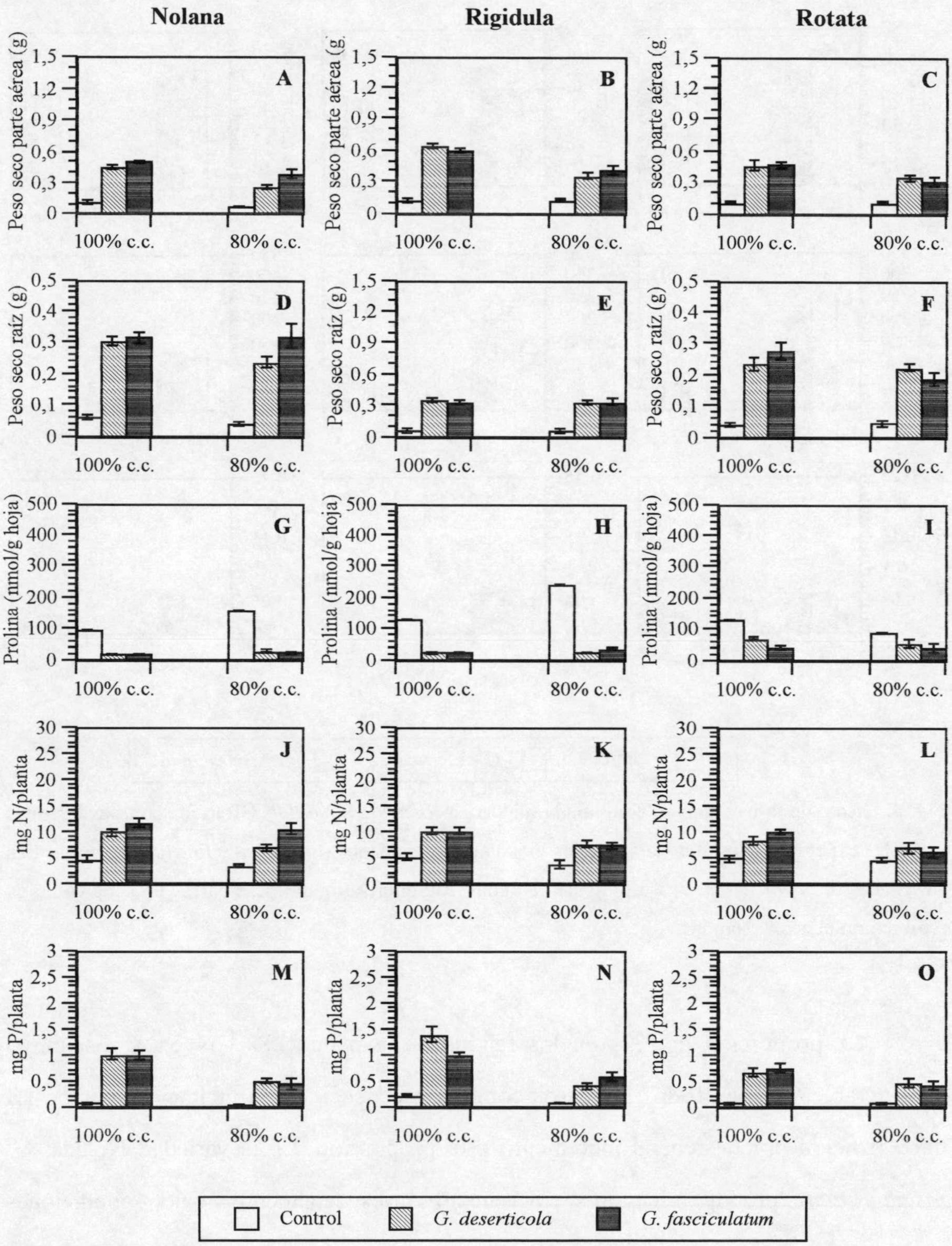

Fig 2. Efecto de la inoculación combinada micorriza-*Rhizobium meliloti* GR4(pCK3) (MG) sobre las distintas variables experimentales analizadas de la planta en las tres variedades de *Medicago sativa* estudiadas (Nolana, Rigidula y Rotata). Las barras en cada columna representan el error estándar.

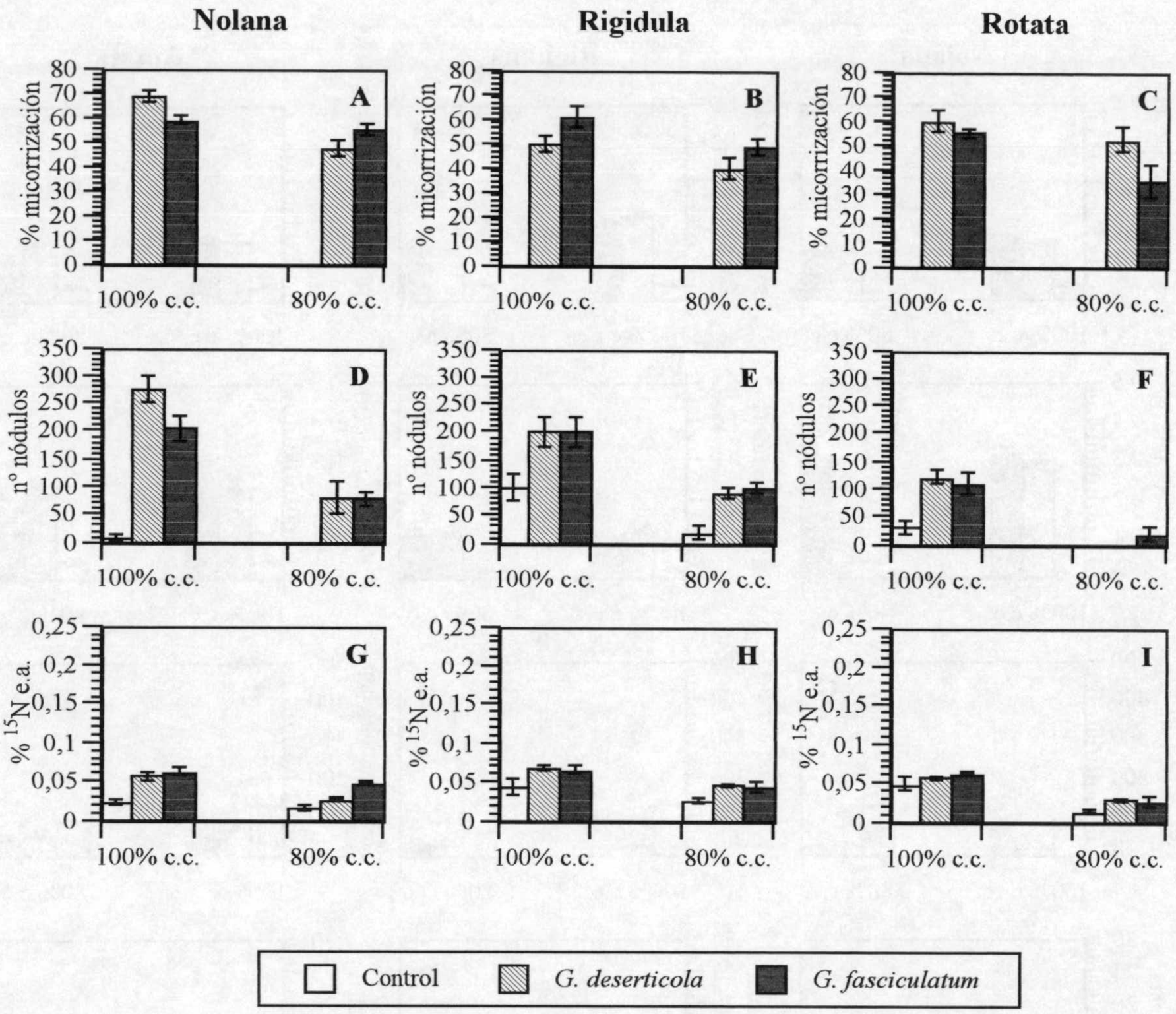

Fig. 3. Efecto de la inoculación combinada micorriza-*Rhizobium meliloti* GR4 (S) sobre las distintas variables experimentales analizadas de los inoculantes empleados (micorriza y *Rhizobium*) en las tres variedades de *Medicago sativa* estudiadas (Nolana, Rigidula y Rotata). Las barras en cada columna representan el error estándar.

La proporción de ^{15}N en los tejidos de la planta (% ^{15}N e.a.), disminuyó considerablemente en todos los casos como consecuencia de la limitación hídrica. La micorrización por lo general incrementó esta proporción. En la variedad Nolana, *G. fasciculatum* produjo mayores incrementos, especialmente bajo condiciones estresantes, que fueron significativos cuando se inoculó con la cepa S (Fig. 3G). En las variedades Rigidula y Rotata no existieron diferencias entre endofitos, y los incrementos que éstos produjeron con respecto al control, fueron menos significativos

que el caso anterior, llegándose a observar incluso una disminución en la proporción de ^{15}N en plantas de la variedad Rotata micorrizadas e inoculadas con la cepa MG, siendo este descenso significativo para $P \leq 0.1$.

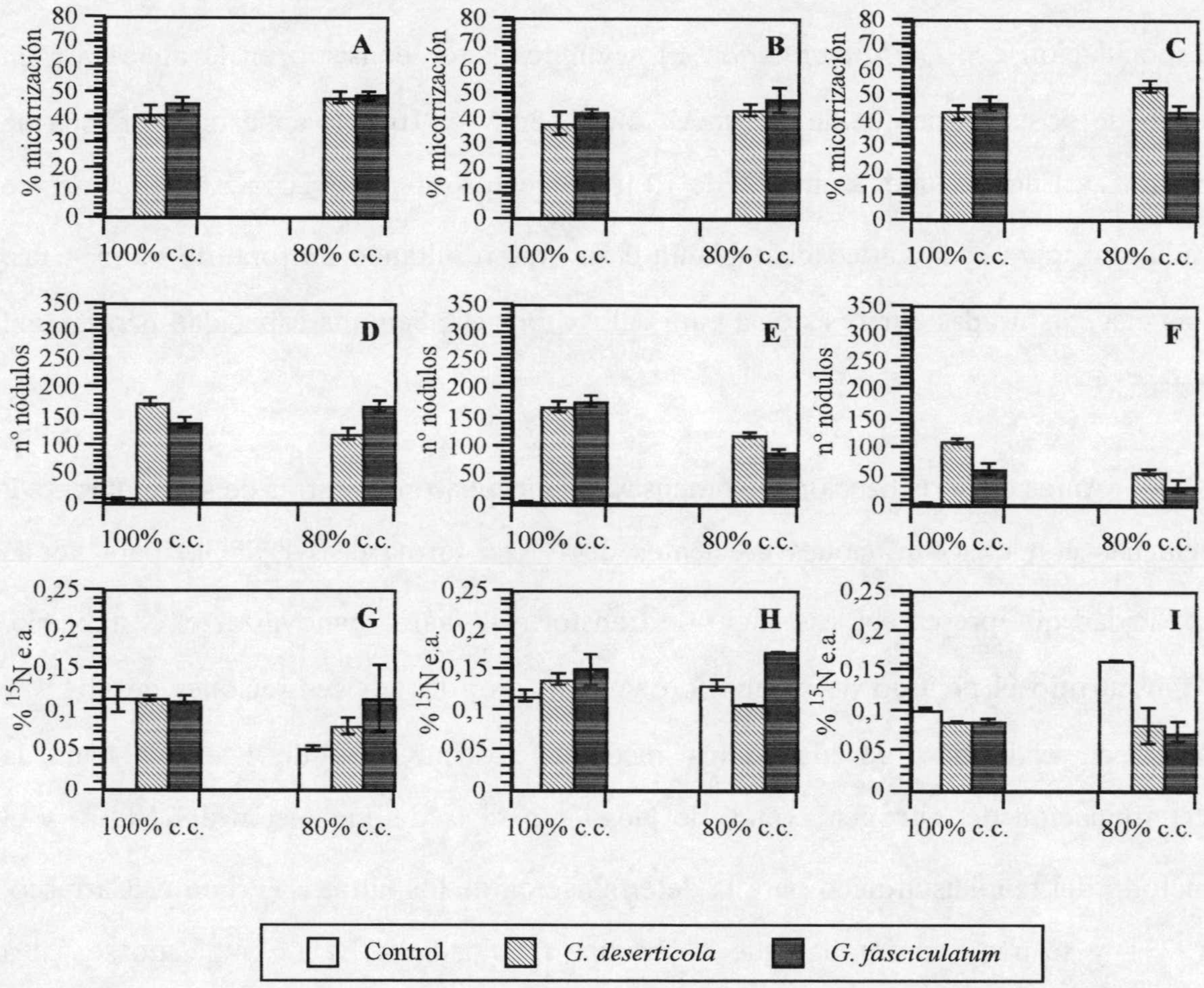

Fig. 4. Efecto de la inoculación combinada micorriza-*Rhizobium meliloti* GR4(pCK3) (MG) sobre las distintas variables experimentales analizadas de los inoculantes empleados (micorriza y *Rhizobium*) en las tres variedades de *Medicago sativa* estudiadas (Nolana, Rigidula y Rotata). Las barras en cada columna representan el error estándar.

1.2. Efecto de dosis crecientes de N (0mM, 4 mM, 8mM y 16 mM) y la inoculación combinada micorriza (*G. mosseae* y *G. fasciculatum*)-*Rhizobium meliloti* (GR4) sobre el crecimiento de la planta, la formación y función de la simbiosis.

Material y Métodos

Sistema y diseño experimentales

En este estudio se consideraron dos factores de variación. El primero, el factor MA, contenía 3 tratamientos: Control sin micorrizar (C), inoculación con *G. mosseae* e inoculación con *G. fasciculatum*. El segundo factor consistió en la aplicación en suelo de dosis crecientes de N (0mM, 4mM, 8mM y 16mM) aplicado en forma de NH_4NO_3. Ello dió lugar a un total de 12 tratamientos diferentes, con 5 repeticiones de cada uno, para cada variedad de planta ensayada, resultando un total de 60 macetas. Las macetas usadas como sistema para cultivo presentaban una capacidad para 500ml de suelo.

Antes de la realización del bioensayo, se incubaron muestras de suelo durante 2 semanas con concentraciones crecientes de N (en forma de NH_4NO_3) para ver la capacidad que presentaba ese suelo de transformar, fijar o inmovilizar el N aplicado. Transcurrido el período de incubación se analizaron las concentraciones de NH^{4+} y NO^{3-} en cada uno de los suelos mediante los métodos de Kjeldahl, para la determinación del nitrógeno total, de Nessler para la determinación del NH_4^+, y el método del fenoldisulfónico para la determinación de los nitratos (Primo & Carrasco, 1973), y se pudo comprobar que la práctica totalidad del NH_4^+ empleado se había transformado en NO_3^-, tal como se puede apreciar en la siguiente Tabla:

Concentraciones tras 2 semanas incubación	**Concentraciones de N en forma de NH_4NO_3 aplicadas en suelo**									
	0mM	**2mM**	**4mM**	**6mM**	**8mM**	**10mM**	**12mM**	**14mM**	**16mM**	**20mM**
NH^{4+}	0,245	0,295	0,294	0,173	0,163	0,178	0,112	0,110	0,122	0,185
NO^{3-}	0,045	0,681	1,969	2,891	3,447	4,434	6,212	7,935	9,143	9,494

Previo a la realización del ensayo definitivo se realizó un pequeño bioensayo donde se probaron los distintos niveles de N seleccionados anteriormente (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 20 mM de N). Las plantas se crecieron en las mismas condiciones en

la que posteriormente se desarrollaría el estudio. Transcurridos 2 meses se analizó la presencia de nódulos en raíces, y los resultados obtenidos fueron los siguientes:

	Concentraciones de N en forma de NH_4NO_3 aplicadas en suelo									
	0mM	**2mM**	**4mM**	**6mM**	**8mM**	**10mM**	**12mM**	**14mM**	**16mM**	**20mM**
nº nódulos	12	6,75	7,6	8	3,5	3,25	1,8	0	-	-

Conforme aumentó la concentración de N en el medio se produjo un descenso de los niveles de nodulación, llegando incluso a inhibirse el desarrollo de las plantas a las concentraciones más elevadas empleadas. En la Tabla se puede apreciar la existencia de una serie de "bloques" diferenciados referentes a nodulación, de modo que el nivel máximo se alcanzó en ausencia de adición de N, y a partir de este valor se detectaron niveles de nodulación moderados (2, 4, 6 mM), bajos (8, 10, 12mM) e incluso ausencia de nodulación (14mM). Se decidió seleccionar las concentraciones 0, 4, 8 y 16 mM para el estudio posterior.

Características del suelo

Se empleó sustrato B esterilizado.

Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos, y de N.

Medicago sativa (var. Aragón) fue la planta elegida para la realización de este estudio. Las semillas esterilizadas, se sembraron en los contenedores previamente preparados donde el suelo había recibido, en su caso el N y los tratamientos micorrícicos. Se cultivó una plántula por contenedor. En los tratamientos micorrizados se adicionaron al sustrato 10g por contenedor de un inóculo de *G. mosseae*. En los tratamientos adicionados de N, éste se aplicó en forma de disolución acuosa de NO_3NH_4, que fué mezclada uniformemente en el suelo para alcanzar las concentraciones deseadas de N en el mismo. Los inoculantes bacterianos (DO_{600} = 0.8, equivalente a 10^9 ufc/ml) se aplicaron a las radículas de las plantas, inoculándose 1ml de la suspensión bacteriana por planta.

Determinaciones

Las plantas se cosecharon a los 2 meses de crecimiento vegetal. Una vez cosechadas se determinaron el número de nódulos en las raíces, el peso seco de parte aérea y raíces tras secar cada planta en un horno a 65ºC durante 48 h, el contenido en N y P en sus tejidos (Lachica *et al.*, 1973), así como de ^{15}N, la extensión de la colonización radical por parte del hongo de la micorriza (% micorrización), la cantidad de proteínas y actividad nitrato reductasa en parte aérea y raíces.

Resultados

En la Tabla 3 se exponen los resultados del análisis estadístico realizado para las distintas variables experimentales analizadas. Así se puede comprobar que la inoculación con micorriza afectó a todos las variables analizadas, y la adición de N a todas a excepción del %P. Del mismo modo existió interacción entre ambos factores en la mayoría de los casos.

La inoculación con cualquiera de los endofitos empleados llego a multiplicar el desarrollo de la planta, tanto parte aérea (Fig. 5A) como raíz (Fig. 5B) aunque *G. fasciculatum* resultó más efectivo. En cambio, la adición de N al medio de cultivo supuso un disminución del desarrollo de las plantas, efecto que se hizo más acusado a mayores concentraciones de N añadido, pero sólo para el caso de plantas micorrizadas, ya que la aplicación de N al medio en el caso de los controles sin micorrizar no supuso alteración alguna. De modo, que los efectos beneficiosos aportados por la micorrización desaparecían en presencia de dosis elevadas de N, no existiendo diferencias en este punto entre los tratamientos micorrizados y los controles sin micorrizar, y mientras que para *G. mosseae* no se produjo beneficio a partir de 8 mM de N aplicado, para *G. fasciculatum* la dosis de N se elevó a 16 mM.

Respuesta	Fuente de variación		
	MA	**Adición de N**	**MA x Adición de N**
Variables de la planta			
Peso seco parte aérea	0,0001	0,0001	0,0147
Peso seco raíz	0,0001	0,0001	0,0001
mg P/planta	0,0001	0,0075	0,0696
mg N/planta	0,0001	0,0004	0,1514
Actividad NR en hoja	0,0001	0,0001	0,0001
Actividad NR en raíz	0,0001	0,0001	0,0001
µg proteína/planta en	0,0001	0,0001	0,0001
µg proteína/planta en raíz	0,0001	0,0001	0,0001
Variables de la MA			
% micorrización	0,0001	0,0227	0,0081
Variables de Fijación N			
nº nódulos	0,0865	0,0001	0,0003
% ^{15}N exceso atómico	0,0001	0,0001	0,0645

Tabla 3. Resultados de un ANOVA (valor P) de dos vías realizado para las distintas variables analizadas tras 2 meses de crecimiento de plantas de alfalfa. El factor MA consiste en 3 tratamientos distintos: sin micorriza, con *G. mosseae*, y con *G. fasciculatum*; el factor N consiste en 4 tratamientos distintos: adición de 0, 4,8 y 16 mM de N en suelo.

Este efecto positivo de la inoculación de micorriza sobre el desarrollo de la planta no tuvo consecuencias en el mismo sentido en cuanto al contenido en P (Fig. 5C), presentado las plantas sin micorrizar, pero adicionadas de 100 ppm P mayores valores de P. La adición de N no tuvo efecto directo sobre el contenido de P en planta, sino más bien fue un efecto indirecto ocasionado por un menor desarrollo de las plantas a altas dosis de N (Fig. 5C). El contenido en N por planta (Fig. 5D) varió en función de ambos factores, micorrización y adición de N, y nuevamente y al igual que ocurrió en el caso del P, como consecuencia del efecto sobre el desarrollo de la planta, siendo *G. fasciculatum* el endofito más efectivo, y 4 mM de N el nivel adicionado que

aportó mayores incrementos. Los valores correspondientes a las plantas control adicionadas de 16 mM en suelo, no se muestran debido a la falta de material vegetal necesario para la realización de los análisis tanto de P como de N.

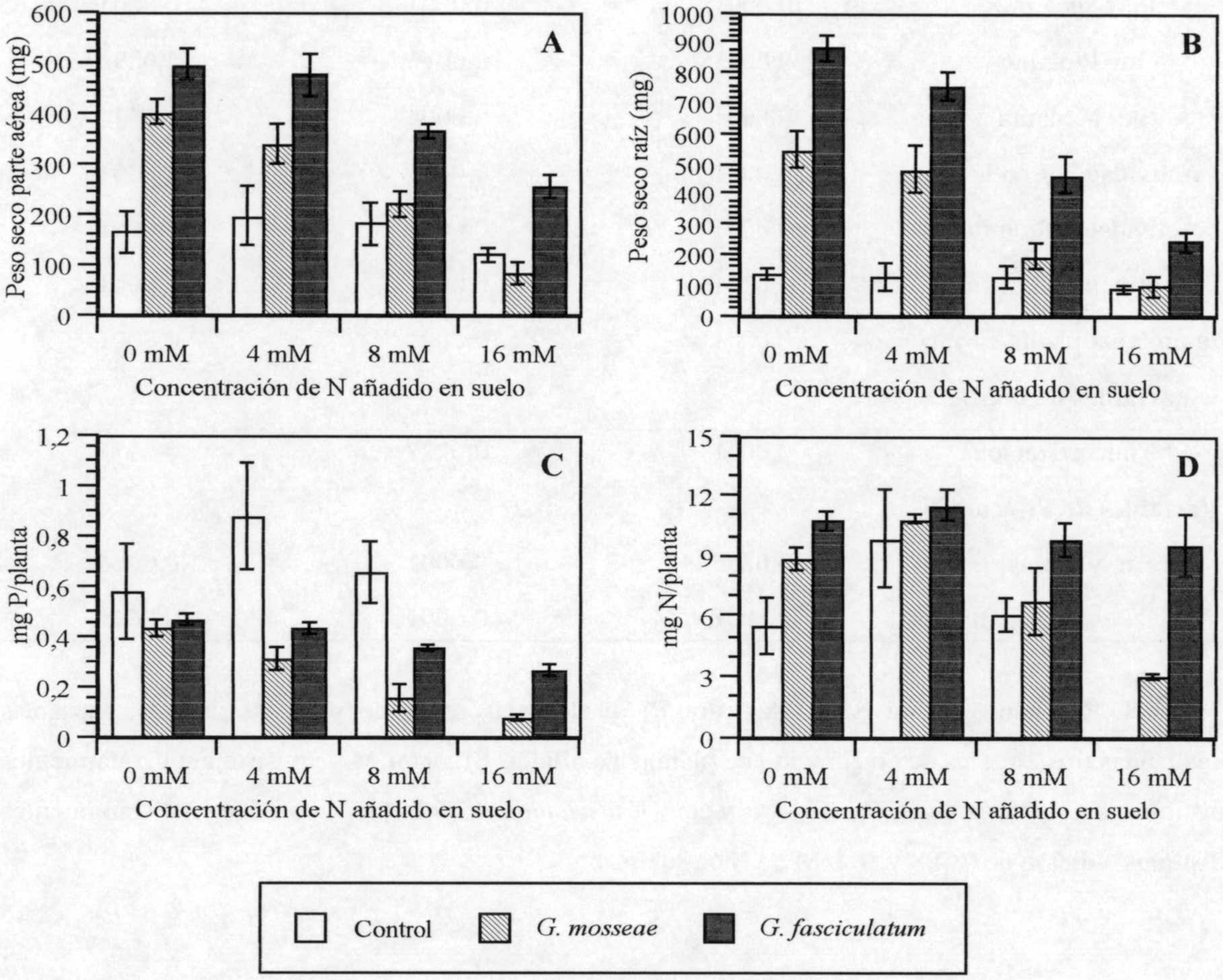

Fig. 5. Efecto de la inoculación combinada micorriza (*G. mosseae* o *G. fasciculatum*)-*Rhizobium* (GR4) sobre el desarrollo de la planta y contenido en nutrientes minerales: (A) Peso seco parte aérea (mg), (B) Peso seco raíz (mg), (C) % P, (D) mg P/planta, (E) % N, (F) mg N/planta. Las barras en cada columna indican el error estándar.

La actividad nitrato reductasa (NR) tanto en hojas como en raíces varió en función de ambos factores (micorriza y adición de N). En hoja, la presencia de cualquiera de los endofitos llegó a duplicar la actividad enzimática en algunos casos (Fig. 6A), del mismo modo que la adición de N también llegó a multiplicar los valores obtenidos para esta variable, observándose los valores más altos a las mayores

concentraciones de N adicionadas (8 y 16 mM), efecto que fue especialmente significativo cuando cualquiera de los endofitos empleados estaba presente. En cambio, en raíz sólo *G. fasciculatum* aportó incrementos en la actividad NR, presentando las plantas micorrizadas con *G. mosseae* valores incluso inferiores al control en algunas ocasiones (Fig. 6B), y al igual que ocurrió en hoja, la actividad fué mayor cuanto mayor fue la cantidad de N aplicada. La distribución relativa de la actividad NR total en la planta se muestra en la Fig. 6C, donde se observa que existe un patrón de distribución de la actividad diferente en función de si existe o no micorrización, y además, mientras las proporciones relativas de actividad en parte aérea y raíces apenas si se alteran por la adición de N en el caso de las plantas control sin micorrizar, en plantas micorrizadas la adición de N supone aumentos en las proporciones relativas de actividad NR en hoja, lo que consecuentemente ocasiona un descenso de dicho valor en raíces. Mientras que en el caso de *G. mosseae* esta modificación en la distribución se hace patente a partir de la adición de 4mM de N, para *G. fasciculatum* será 8mM el valor discriminatorio.

La adición de N ocasionó una disminución del contenido de proteína tanto en parte aérea (Fig. 6D) como en raíz (Fig. 6E), de modo que a mayor concentración de N añadido, menor será la cantidad de proteína registrada, efecto que sólo se observa en plantas micorrizadas. La micorrización supone un incremento de la cantidad de proteína en ambos tejidos vegetales, resultando nuevamente *G. fasciculatum* el endofito que aportó mayores beneficios. La distribución relativa de la cantidad de proteínas en hojas y raíces se muestra en la Fig. 6F, donde se puede comprobar que en general la micorrización duplica la proporción relativa de proteínas en raíces, y en este caso la adición de N, aunque supone una disminución de la proporción relativa de proteínas en raíces, no ocasiona efectos tan pronunciados como los descritos anteriormente para el caso de la actividad NR.

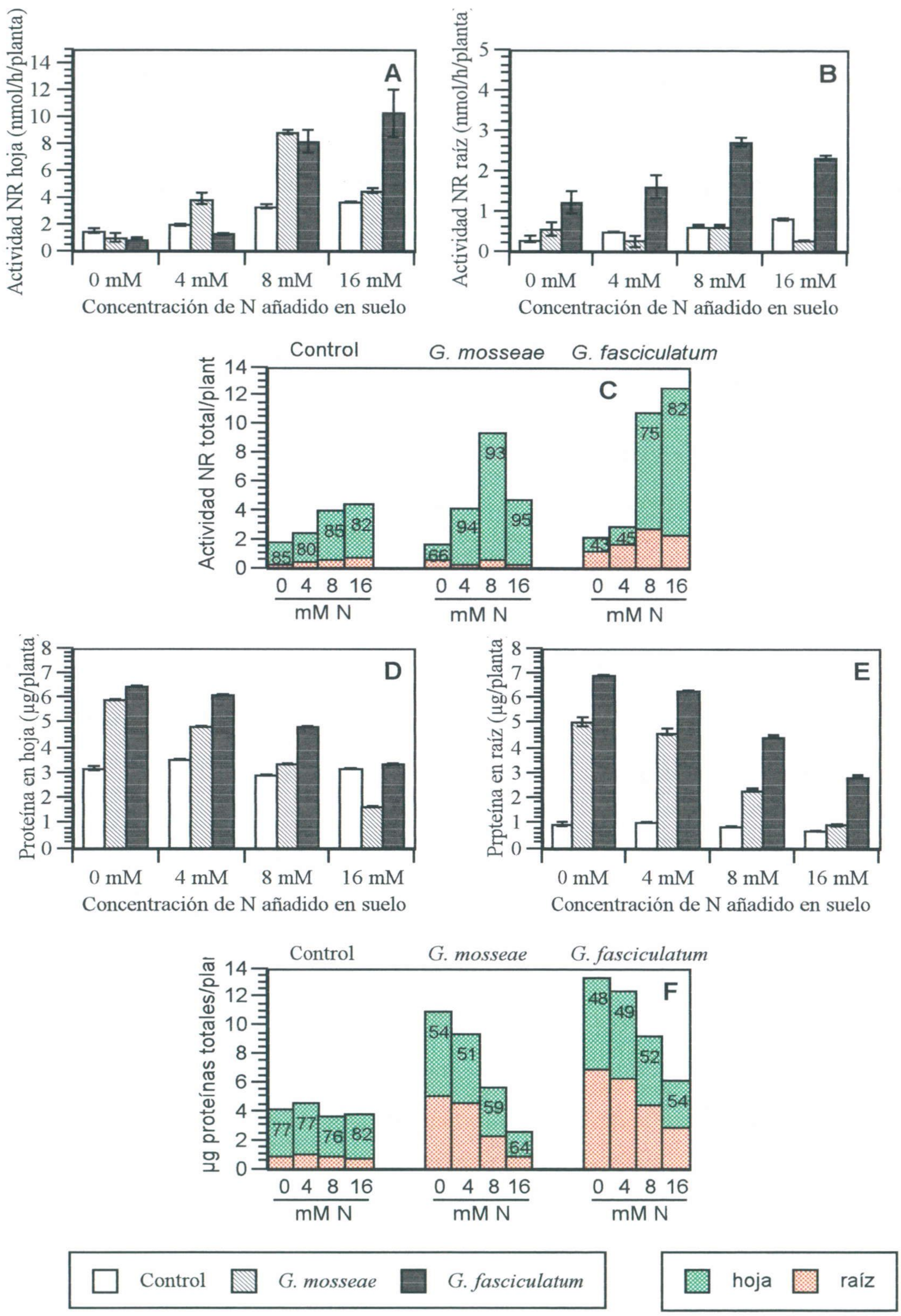

Fig. 6. Efecto de la inoculación combinada micorriza-*Rhizobium* y la adición de N al medio sobrela actividad nitrato reductasa (NR) en hojas (A) y en raíces (B), la distribución de la actividad NR (C), el contenido en proteínas en hoja (D) y en raíces (E) y la distribución de proteínas (F). Las barras en cada columna indican el error estándar. El número dentro de la barra indica la proporción relativa.

El porcentaje de infección de las raíces por la micorriza varió fundamentalmente en función del endofito empleado, siendo *G. fasciculatum* el colonizador más agresivo a todos los niveles de N ensayados. La presencia de 16 mM de N en el medio redujo levemente la colonización por ambos endofitos (Fig. 7A). La micorrización, especialmente con *G. fasciculatum*, incrementó el número de nódulos, en cambio, la presencia de N en el medio produjo una inhibición considerable de la nodulación, que será mayor cuanto mayor sea la dosis de N aplicada (Fig. 7B). El umbral de dosis inhibitoria de N para la nodulación va a variar en función de si las plantas están micorrizadas o no, de modo que en las plantas control se produce nodulación hasta un nivel de 8 mM de N aplicado, mientras que en las micorrizadas este nivel es de 4 mM .

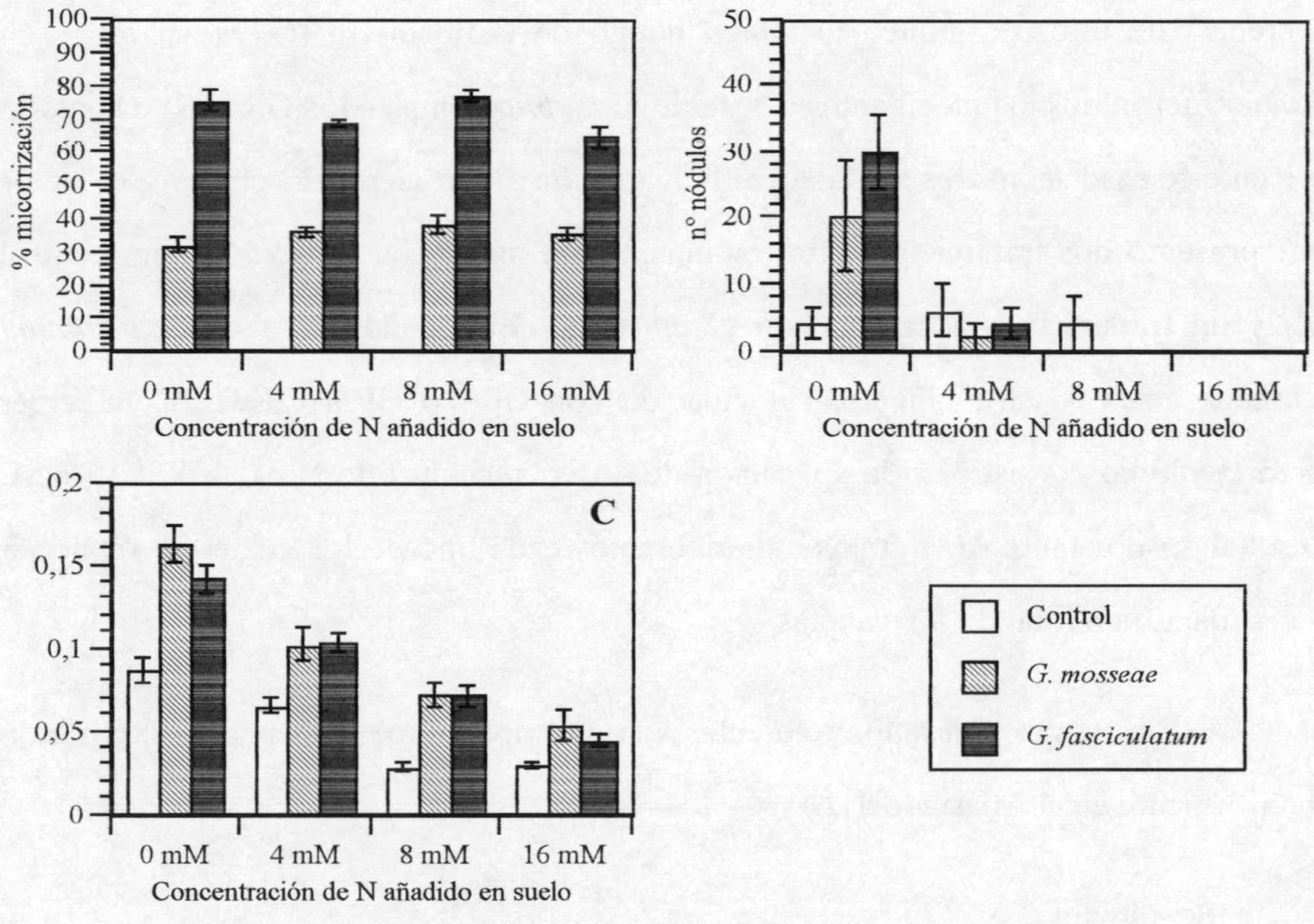

Fig. 7. Efecto de la inoculación combinada micorriza (*G. mosseae* o *G. fasciculatum*)-*Rhizobium* (GR4) y la adición de N al medio sobre: (A) % micorrización, (B) Nº de nódulos, (C) % ^{15}N exceso atómico (e.a.), (D) mg ^{15}N/planta, (E) Relación $^{15}N/^{14}N$ Las barras en cada columna indican el error estándar.

La micorrización aumentó la concentración de ^{15}N en los tejidos de la planta (*G. mosseae* > *G. fasciculatum*) (Fig. 7C). La adición de N diluye la concentración de este elemento en los tejidos vegetales, siendo mayor la dilución a mayor cantidad de N aplicada. Este efecto se hace más patente cuando existe micorrización.

1.3 Efecto de dosis crecientes de N (0mM, 4 mM, 8mM y 16 mM) y la inoculación combinada micorriza (*G. mosseae*)-*Rhizobium meliloti* (S vs. MG) sobre el crecimiento de la planta, la formación y función de la simbiosis.

Material y Métodos

Este estudio se realizó de forma paralela al anterior (Apartado 1.2), pero a diferencia de éste, se empleó un único hongo de la micorriza (*G. mosseae*), y en cambio fueron dos los inoculantes a base de *Rhizobium* empleados GR4 (S). De modo que en este caso serán tres los factores de variación a considerar. El primero, el factor MA presentó dos tratamientos: un tratamiento sin micorrizar utilizado como control (C) y un tratamiento inoculado con *G. mosseae*. El segundo, el factor *Rhizobium* presentó otros dos tratamientos: inoculación con GR4 ó GR4(pCK3). Y un tercer factor y último consistió en la aplicación de dosis crecientes de N: 0, 4, 8 y 16 mM. Resultando por tanto 16 tratamientos diferentes cada uno de los cuales se replicó 5 veces, dando un total de 80 macetas.

Los restantes apartados referentes a la descripción experimental se expusieron anteriormente en el Apartado 1.2.

Resultados

Dado el paralelismo y la simultaneidad entre este estudio y el anterior (Apartado 1.2), algunos resultados de los que se exponen son compartidos en ambos casos.

Respuesta	Fuente de variación						
	Micorriza	***Rhizobium***	**N añadido**	**Mic x *Rhi***	**Mic x N**	***Rhi* x N**	**Mic x *Rhi* x N**
Variables de la planta							
Peso seco parte aérea	0,0001	0,6848	0,0001	0,0908	0,0023	0,7558	0,4558
Peso seco raíz	0,0001	0,6653	0,0001	0,0682	0,0001	0,3511	0,8623
mg P/planta	0,0001	0,5471	0,0840	0,4038	0,1413	0,1473	0,0528
mg N/planta	0,0013	0,5529	0,0003	0,2095	0,4056	0,0490	0,0720
µg proteína/planta en hoja	0,0001	0,0069	0,0001	0,0439	0,0001	0,0001	0,0001
µg proteína/planta en raíz	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0531
Actividad NR en hoja	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Actividad NR en raíz	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Variables de la MA							
% micorrización	0,0001	0,3759	0,8023	0,3759	0,8023	0,0531	0,0531
Variables del inoculante							
nº nódulos	0,0597	0,6597	0,0001	0,4637	0,0001	0,1878	0,9371
% ^{15}N exceso atómico	0,0001	0,2233	0,0001	0,7702	0,0001	0,2092	0,1550

Tabla 4. Resultados de un ANOVA (valor P) de dos vías realizado para estudiar el efecto de la inoculación de combinada micorriza-*Rhizobium* y la adición de N sobre las distintas variables experimentales analizadas.

En la Tabla 4 se exponen los resultados del análisis estadístico al que fueron sometidas las distintas variables experimentales.

El desarrollo de la planta, tanto de parte aérea (Fig. 8) como de raíz (Fig. 9) se afectó fundamentalmente por la micorrización y por la presencia de N en el medio, así como por la interacción entre ambos factores. En general la micorrización supone incrementos importantes en la cosecha, mientras que el aumento de la concentración de N en el medio supone una disminución de estas variables especialmente cuando la micorriza está presente, efecto que se observa a partir de una concentración adicionada al suelo de 8 mM de N para el caso de parte aérea y de 4 mM de N para raíces, mientras que para las plantas control este efecto se observa a 16 mM en ambos casos. De modo que las ventajas aportadas por la micorrización desaparecen a elevadas dosis de fertilización N, resultando las plantas micorrizadas del mismo porte que las no micorrizadas (controles).

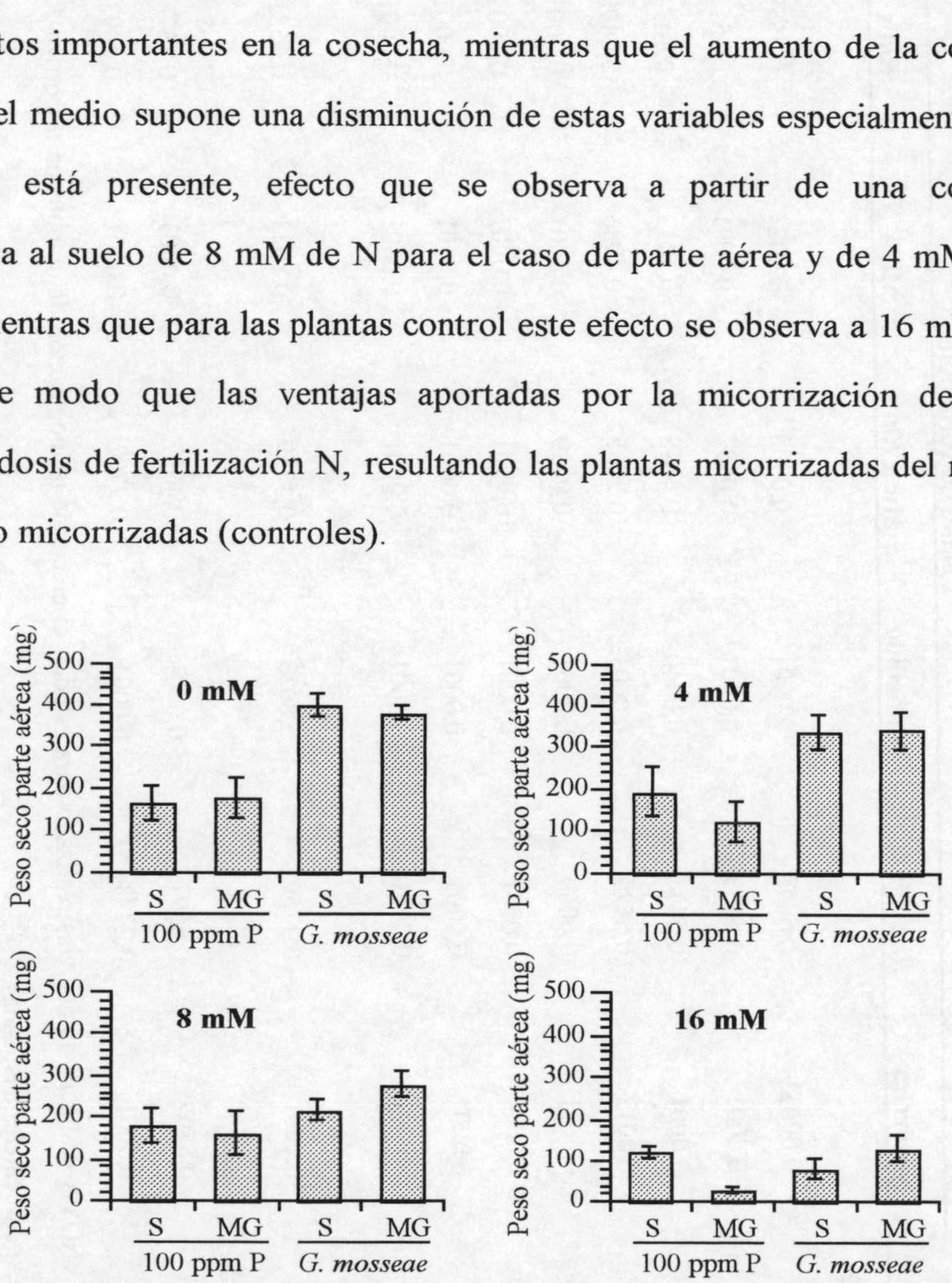

Fig.8. Efecto de la inoculación de *Rhizobium meliloti* (S= GR4, MG= GR4(pCK3)) y la aplicación de dosis crecientes de N en el medio sobre el peso seco de la parte aérea (mg) de plantas de alfalfa no micorrizadas pero suplementadas con P, o inoculadas con *G. mosseae*. Las barras en cada columna indican el error estándar.

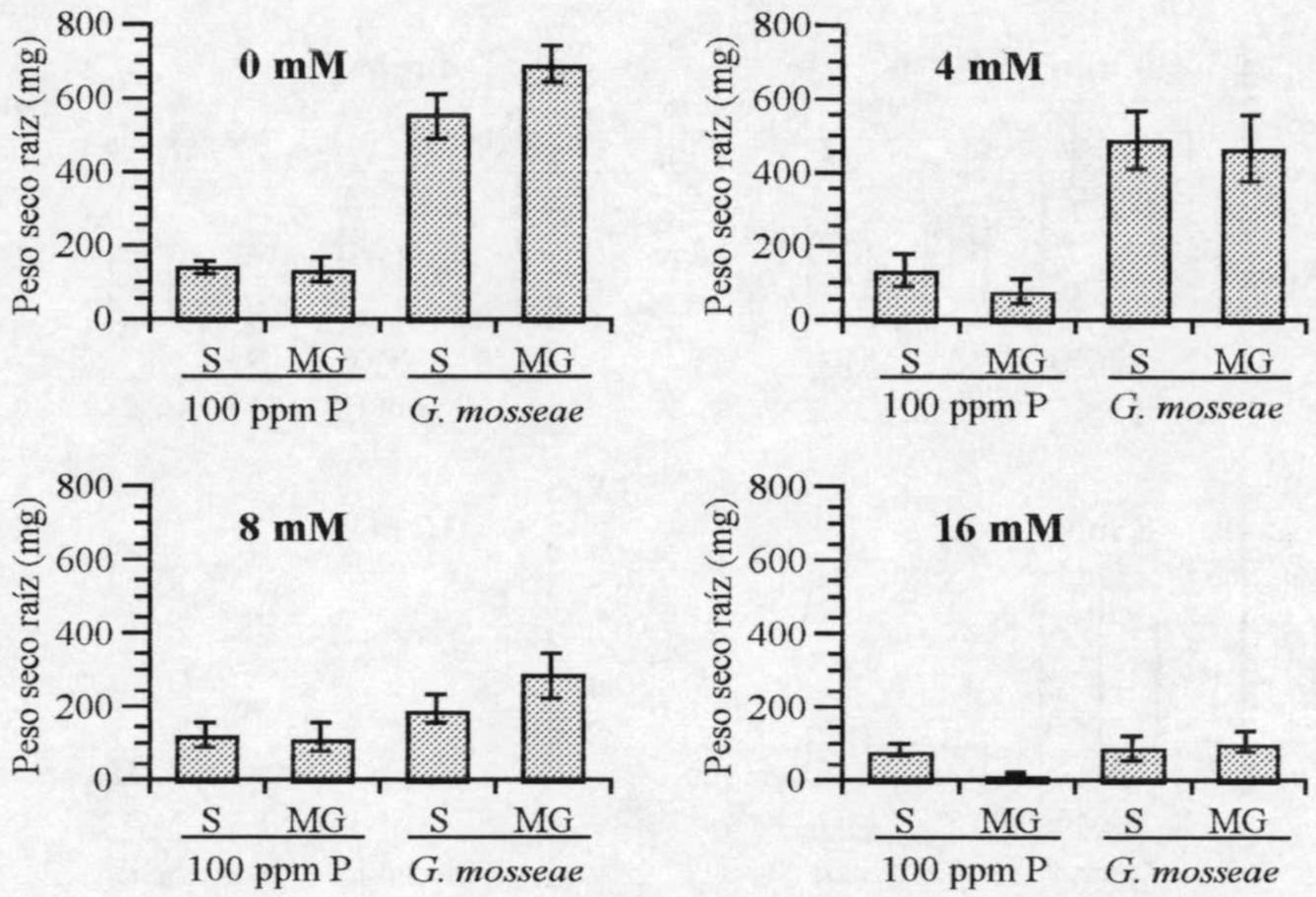

Fig.9. Efecto de la inoculación de *Rhizobium meliloti* (S= GR4, MG= GR4(pCK3)) y la aplicación de dosis crecientes de N en el medio sobre el peso seco de la raíz (mg) de plantas de alfalfa no micorrizadas pero suplementadas con P, o inoculadas con *G. mosseae*. Las barras en cada columna indican el error estándar.

La cantidad de P en los tejidos vegetales (Fig. 10) se modificó fundamentalmente por la micorrización. También se observó efecto de la triple interacción micorriza-*Rhizobium*-N. Las plantas micorrizadas presentaron en general menor proporción de P en sus tejidos que aquellas no micorrizadas, pero adicionadas de P (controles). La adición de N al medio aumentó el contenido en P sólo en el caso de plantas no micorrizadas e inoculadas con la cepa S, en cambio en las plantas micorrizadas, independientemente del tipo de cepa de *Rhizobium* coinoculada el aumento de la concentración de N produjo el efecto opuesto.

Las plantas micorrizadas presentaron mayor contenido en N (Fig. 11). La adición de niveles moderados y altos (8 y 16 mM) de N al medio disminuyó el contenido de N por planta, efecto que se hizo notable a partir de 8 mM cuando se empleó la cepa S y a partir de 16 mM cuando la cepa empleada fué la MG, mientras que la adición de niveles bajos (4 mM) resultó beneficiosa a este respecto.

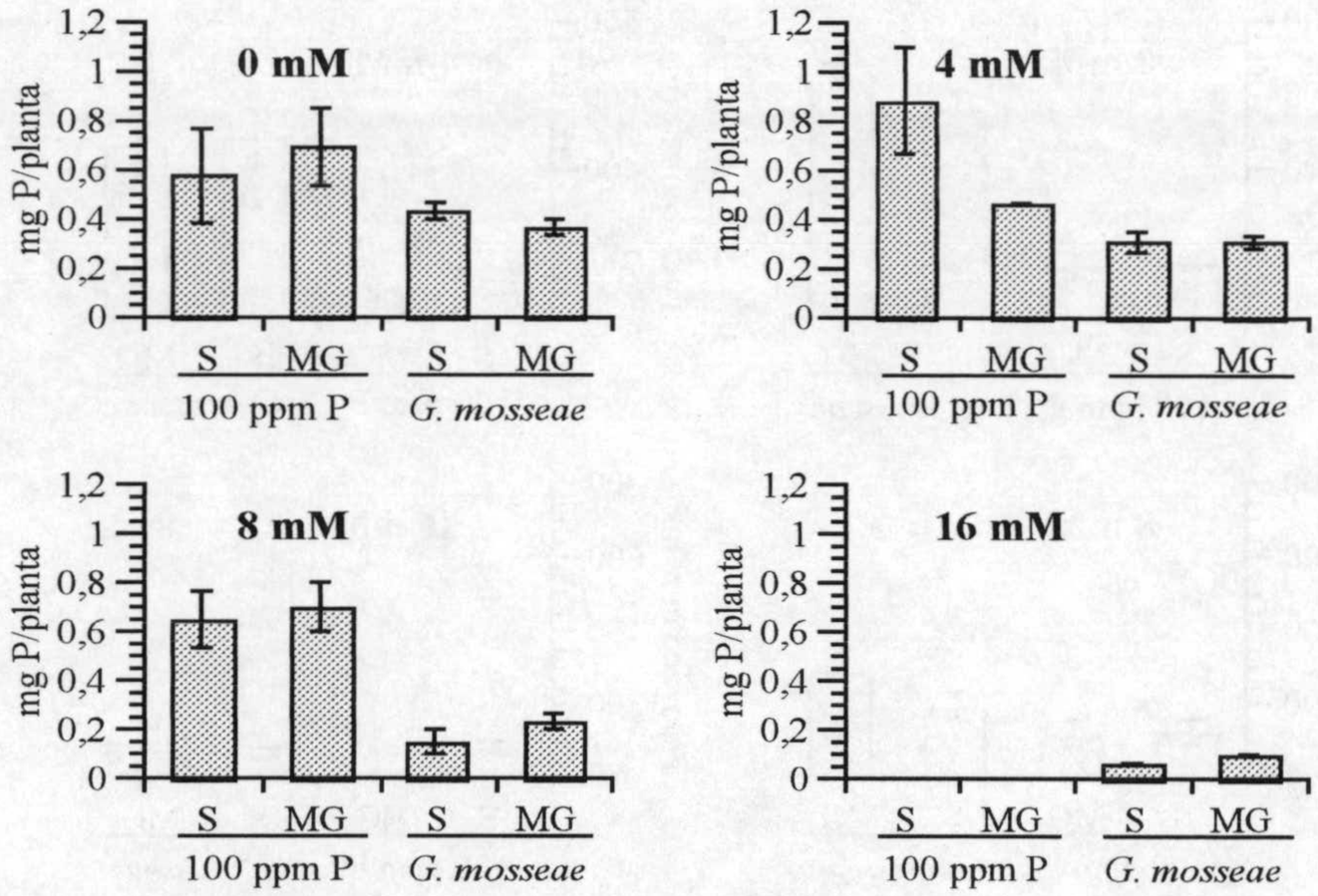

Fig.10. Efecto de la inoculación de *Rhizobium meliloti* (S= GR4, MG= GR4(pCK3)) y la aplicación de dosis crecientes de N en el medio sobre la concentración de P (mg/planta) en hojas de plantas de alfalfa no micorrizadas pero suplementadas con P, o inoculadas con *G. mosseae*. Las barras en cada columna indican el error estándar.

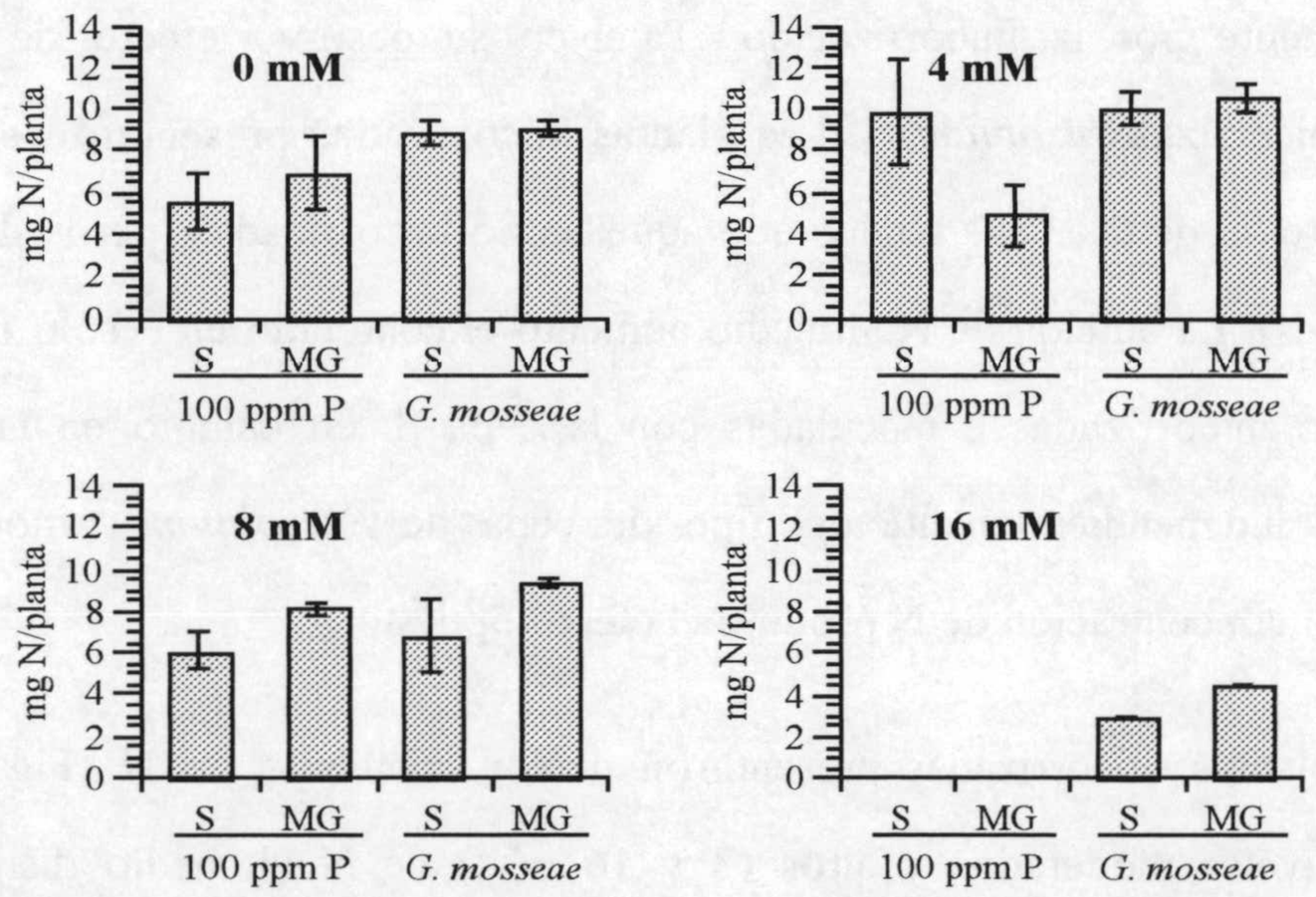

Fig.11. Efecto de la inoculación de *Rhizobium meliloti* (S= GR4, MG= GR4(pCK3)) y la aplicación de dosis crecientes de N en el medio sobre la concentración de N (mg/planta) en hojas de plantas de alfalfa no micorrizadas pero suplementadas con P, o inoculadas con *G. mosseae*. Las barras en cada columna indican el error estándar.

La cantidad de proteínas, tanto de parte aérea (Fig. 12), como de raíz (Fig. 13) se afectó por cualquiera de los factores considerados. Así, la micorrización incrementó el contenido proteico, especialmente en el caso de la raíz, donde éste incremento llegó a alcanzar valores 5 veces superiores a los presentes en las plantas sin micorrizar (Fig. 13). La adición de N al medio disminuyó el contenido proteíco tanto de parte aérea como de raíz, fundamentalmente en el caso de plantas micorrizadas, ya que los controles sin micorrizar apenas si se alteraron, y el efecto fué nuevamente más acusado en el caso de raíz, donde se llegó a perder hasta un 500% del valor alcanzado en ausencia de N añadido. En el caso de *Rhizobium*, mientras que la cepa MG produce un ligero incremento en el contenido proteico en hoja, la cepa S provoca este incremento en raíz.

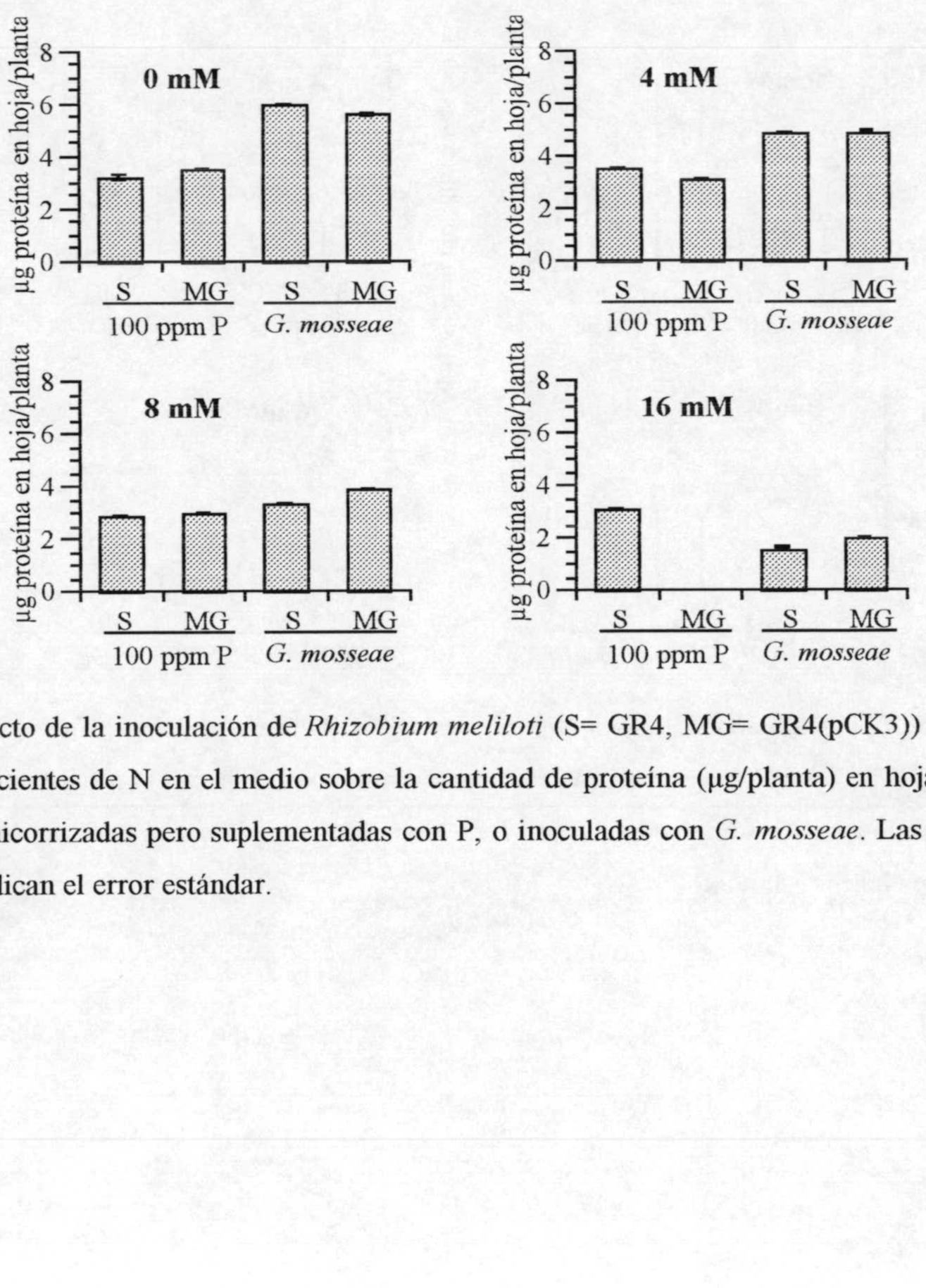

Fig. 12. Efecto de la inoculación de *Rhizobium meliloti* (S= GR4, MG= GR4(pCK3)) y la aplicación de dosis crecientes de N en el medio sobre la cantidad de proteína (µg/planta) en hoja de plantas de alfalfa no micorrizadas pero suplementadas con P, o inoculadas con *G. mosseae*. Las barras en cada columna indican el error estándar.

Al igual que ocurrió con la concentración total de proteína, la actividad NR también se afectó por cualquiera de los tres factores implicados, así como por las distintas interacciones entre los mismos. La actividad NR en hoja varió dependiendo de la micorrización y del tipo de inoculante de *Rhizobium* empleado (Fig. 14), de modo que fué, por lo general, superior en las micorrizadas cuando se empleó la cepa S, y superior en controles cuando fué la cepa MG la que se empleó. La adición de N al medio incrementó la actividad NR en todos los casos, pero el efecto de la aplicación de N también varió en función de la combinación entre microsimbiontes. Así, los valores máximos de actividad en hoja se alcazaron a 8mM para plantas inoculadas con la cepa S, independientemente de que estas estuvieran micorrizadas o no, y a 4 mM para la cepa MG.

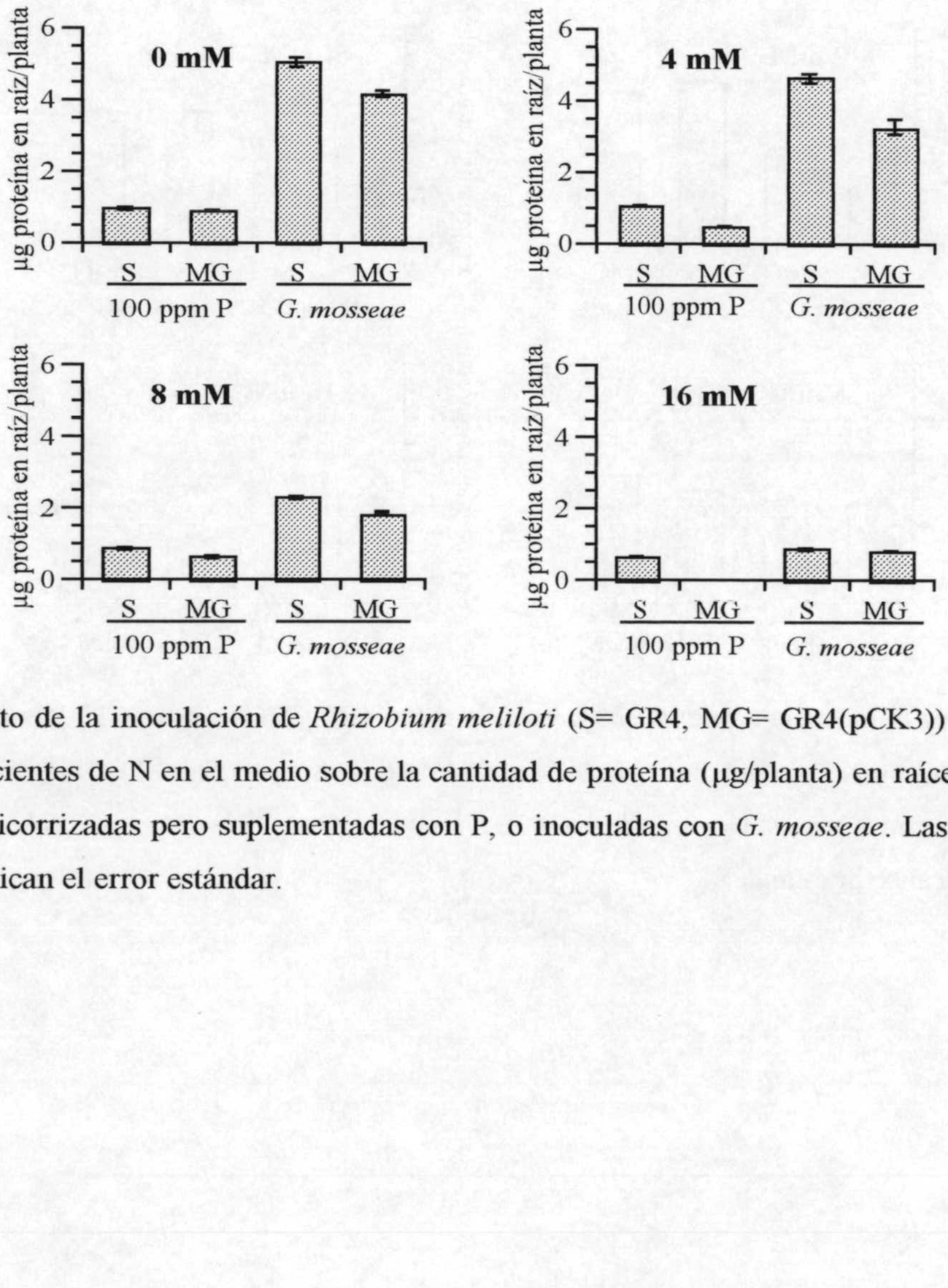

Fig.13. Efecto de la inoculación de *Rhizobium meliloti* (S= GR4, MG= GR4(pCK3)) y la aplicación de dosis crecientes de N en el medio sobre la cantidad de proteína (µg/planta) en raíces de plantas de alfalfa no micorrizadas pero suplementadas con P, o inoculadas con *G. mosseae*. Las barras en cada columna indican el error estándar.

En raíz la actividad NR (Fig. 15) siguió un patrón inverso al descrito anteriormente, es decir, la actividad fué superior en plantas micorrizadas cuando se empleó la cepa MG y ligeramente inferior, sin que apenas existan diferencias cuando fué la cepa S la empleada. El efecto de la adición de N fué similar al descrito anteriormente para actividad NR en hoja, aunque en este caso la actividad apenas si fué alterada por la adición de N cuando la cepa S fué el inoculante empleado.

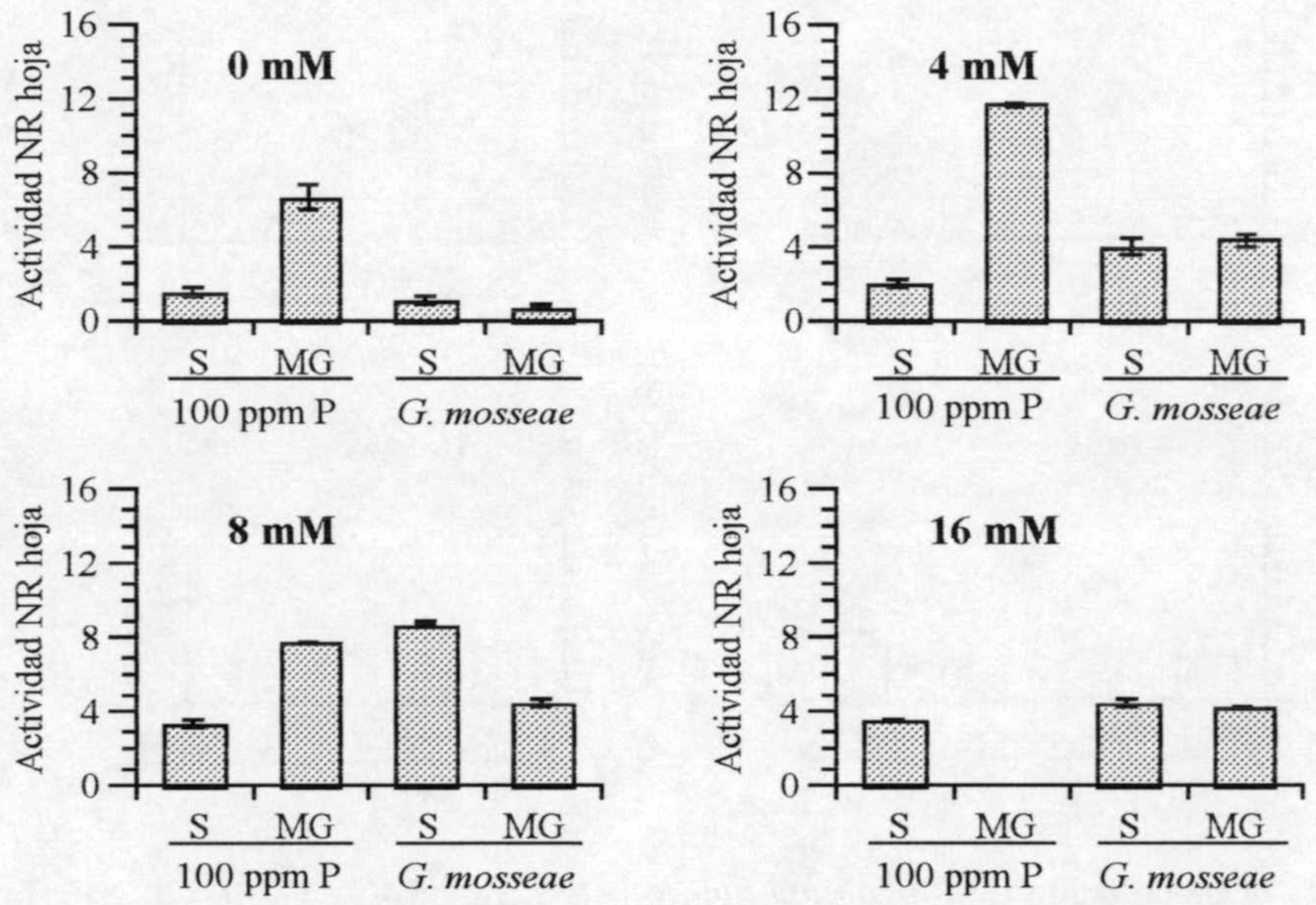

Fig.14. Efecto de la inoculación de *Rhizobium meliloti* (S= GR4, MG= GR4(pCK3)) y la aplicación de dosis crecientes de N en el medio sobre la actividad nitrato reductasa (NR) en hoja (nmol/h/planta) en plantas de alfalfa no micorrizadas pero suplementadas con P, o inoculadas con *G. mosseae*. Las barras en cada columna indican el error estándar.

El patrón de distribución de proteínas, así como de actividad NR (Fig. 16) varió como consecuencia de las modificaciones descritas anteriormente. En el caso de la distribución de la totalidad de las proteínas, independientemente de la cepa de *Rhizobium* empleada, S (Fig. 16A), ó MG (Fig. 16B), la micorrización aumenta la proporción relativa de proteínas en raíces, situándose ésta en torno al 45%, concentración que va disminuyendo en pro de la parte aérea conforme la

concentración de N en el medio fué aumentando. En el caso de plantas control sin micorrizar las proporciones relativas se mantienen prácticamente constantes entre 15-25%, y la cantidad total de proteína no se modifica por la adición de N, efecto opuesto al que se observa en plantas micorrizadas, donde la presencia de N en el medio disminuye progresivamente y conforme aumenta, la cantidad total de proteína por planta.

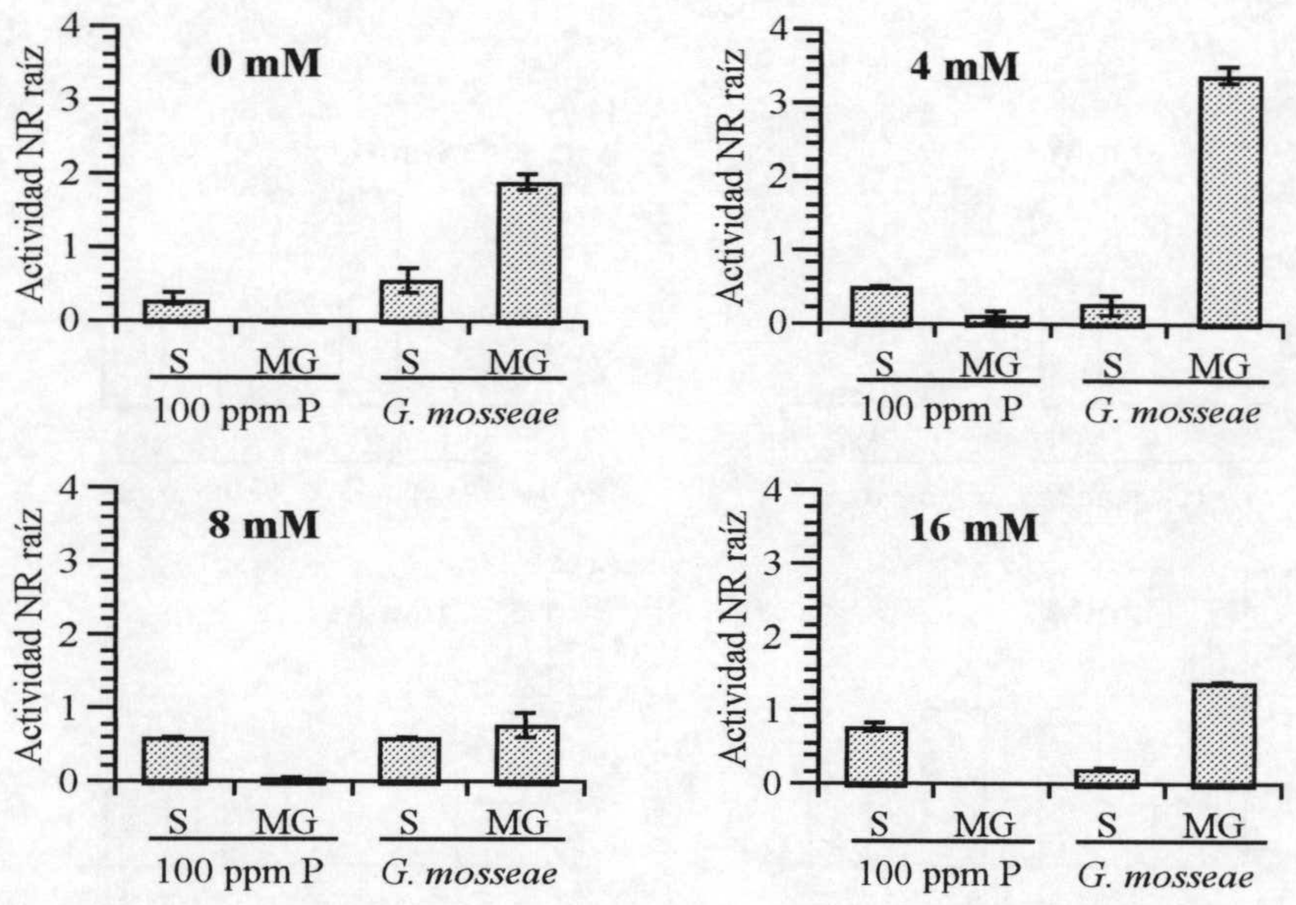

Fig.15. Efecto de la inoculación de *Rhizobium meliloti* (S= GR4, MG= GR4(pCK3)) y la aplicación de dosis crecientes de N en el medio sobre la actividad nitrato reductasa (NR) en raíz (nmol/h/planta) en plantas de alfalfa no micorrizadas pero suplementadas con P, o inoculadas con *G. mosseae*. Las barras en cada columna indican el error estándar.

En el caso de la actividad NR ocurre algo similar a lo descrito para la distribución proteínas, de modo que la distribución de esta actividad entre parte aérea y raíz (Fig. 16C y 16D) se mantiene prácticamente constante para los controles sin micorrizar conforme aumenta la dosis de N en el medio, independientemente de la cepa de *Rhizobium* empleada, aunque cuando se empleó la cepa MG como inoculante, la práctica totalidad de la actividad NR se detectó en parte aérea. En el caso de plantas micorrizadas, 1/3 de la actividad total se detectó en raíces cuando se empleó la cepa S

como inoculante, mientras que esta cantidad ascendió a 3/4 cuando fué la cepa MG la usada como inoculante. En ambos casos la adición de N al medio de cultivo supone incrementos considerables en la proporción relativa de esta actividad en parte aérea, hasta llegar a representar la práctica totalidad de la actividad en el caso de coinoculación con la cepa S, aunque los incrementos fueron más significativos cuando se coinocularon con la cepa MG.

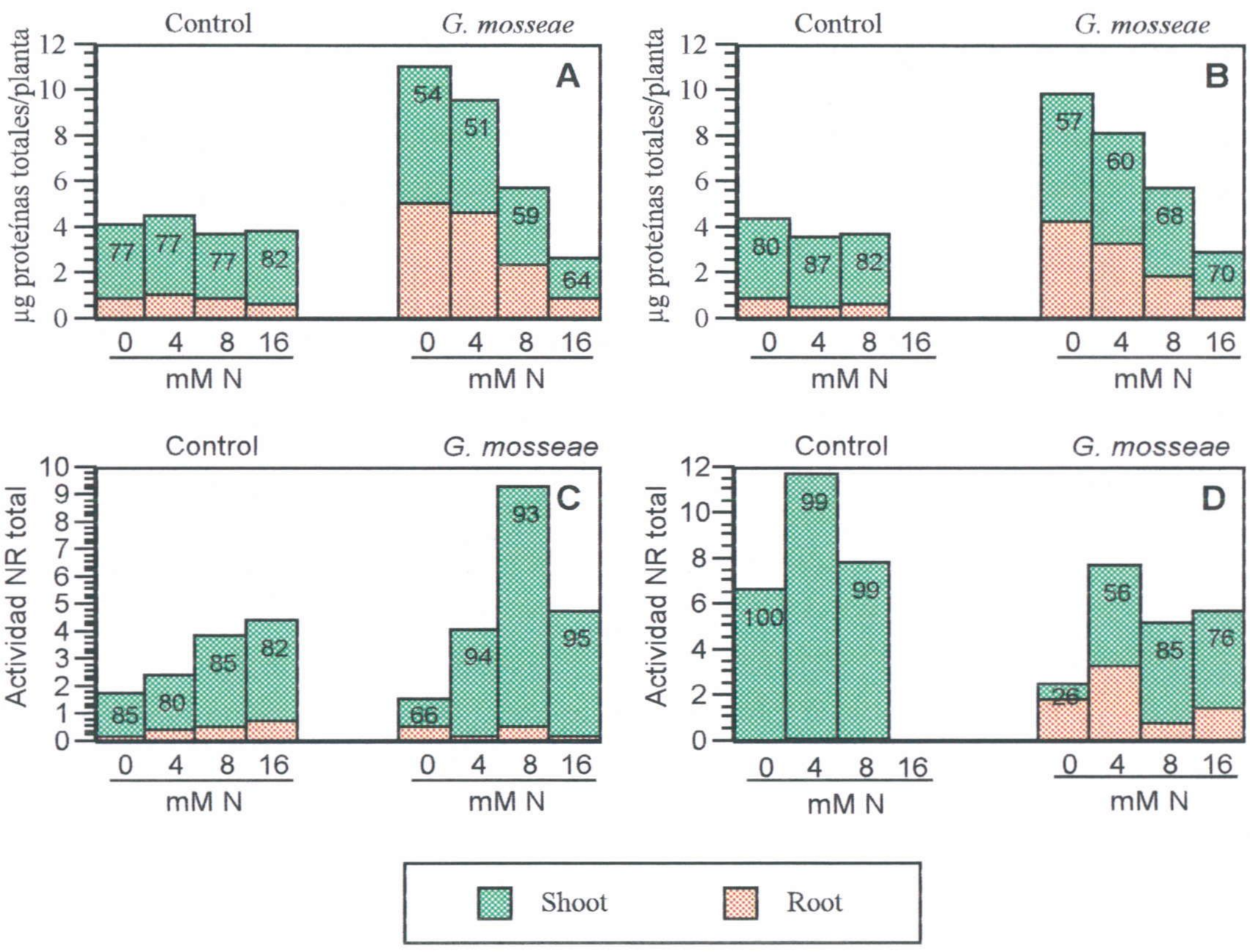

Fig.16. Efecto de la aplicación de dosis crecientes de N en el medio sobre el contenido total en proteínas y su distribución, así como sobre la actividad nitrato reductasa (NR) total y su distribución en plantas de alfalfa no micorrizadas pero suplementadas con P, o inoculadas con *G. mosseae* e inoculadas con *Rhizobium meliloti* S= GR4 (A, C) o MG= GR4(pCK3) (B, D). Las barras en cada columna indican el error estándar. El número en el interior de cada columna representa el porcentaje relativo de cada variable en hoja.

El porcentaje de infección en las raíces por la micorriza no se alteró de forma significativa (Tabla 4) en ninguno de los casos por el tipo de inoculante empleado, ni por la adición de N en el medio, así como por la interacción entre los distintos factores implicados (Fig. 17). En cambio la nodulación sí que se modificó por la adición de N al medio así como por la interacción micorriza-N. Así, la adición de N al medio produce un descenso considerable de la nodulación, y aunque ésta disminuye conforme se produce un aumento progresivo de la concentración de N en el medio, no existen diferencias significativas entre los distintos niveles de N adicionados. Basta la adición de 4mM de N en suelo para que la nodulación descienda en un 620% como valor promedio (Fig. 18). En ausencia de N la cepa MG resultó ser más infectiva que la cepa S tanto en plantas controles como en micorrizadas, aunque la nodulación fué superior en plantas micorrizadas, donde se llegó a aumentar el nº de nódulos un 500% en el caso de la cepa S, y un 375% con respecto al control en el caso de la cepa MG. La adición de 4 mM de N al medio fué suficiente para reducir la nodulación, reducción que fué especialmente significativa en el caso de plantas micorrizadas. La cepa MG resultó ser más sensible a la adición de N en el medio, reduciéndose la nodulación tanto en controles como en plantas micorrizadas, aunque en estas últimas el efecto fué más drástico, llegando a inhibirse totalmente la nodulación a 4mM de N adicionado (Fig. 18).

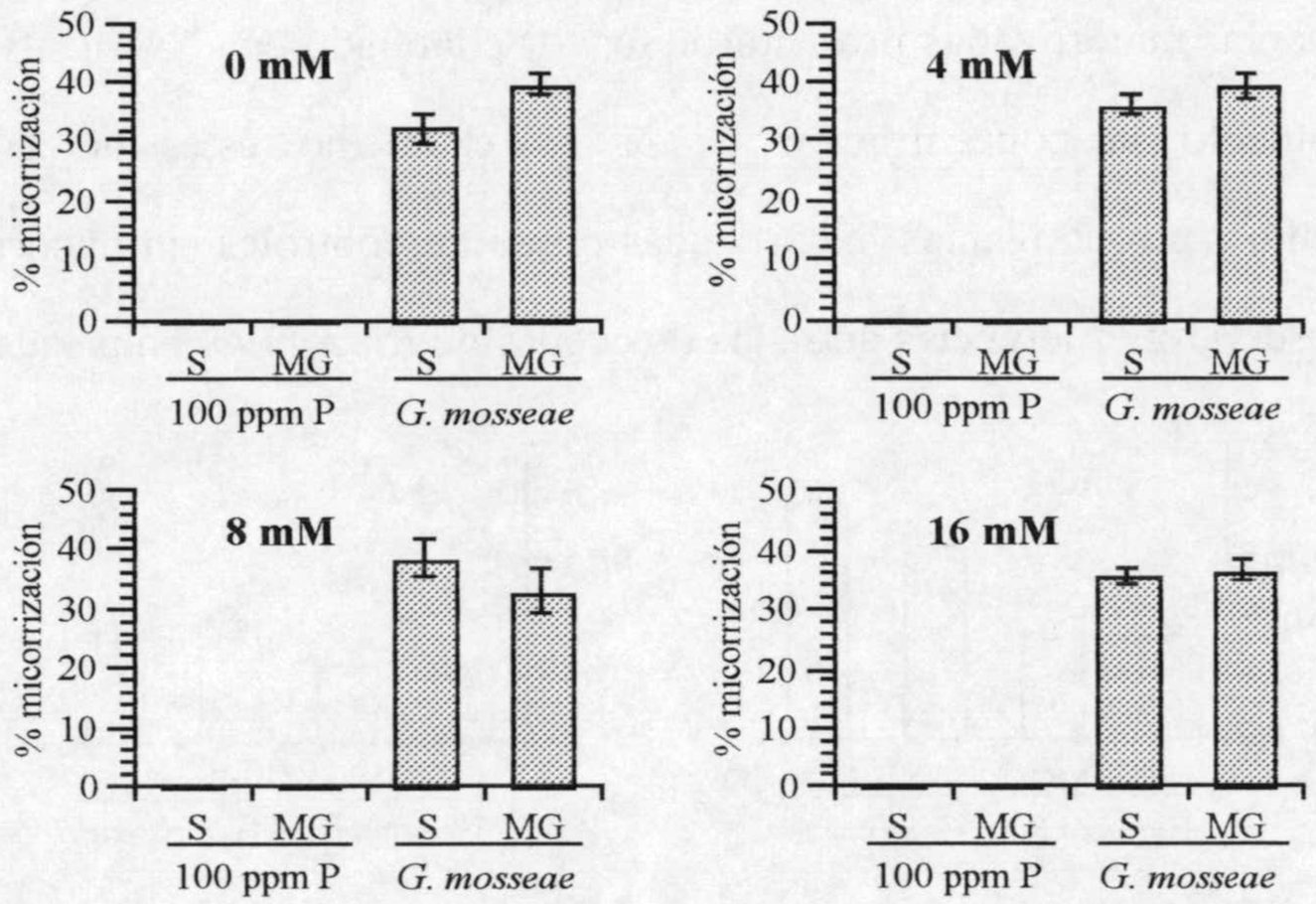

Fig.17. Efecto de la inoculación de *Rhizobium meliloti* (S= GR4, MG= GR4(pCK3)) y la aplicación de dosis crecientes de N en el medio sobre el porcentaje de micorrización en plantas de alfalfa no micorrizadas pero suplementadas con P, o inoculadas con *G. mosseae*. Las barras en cada columna indican el error estándar.

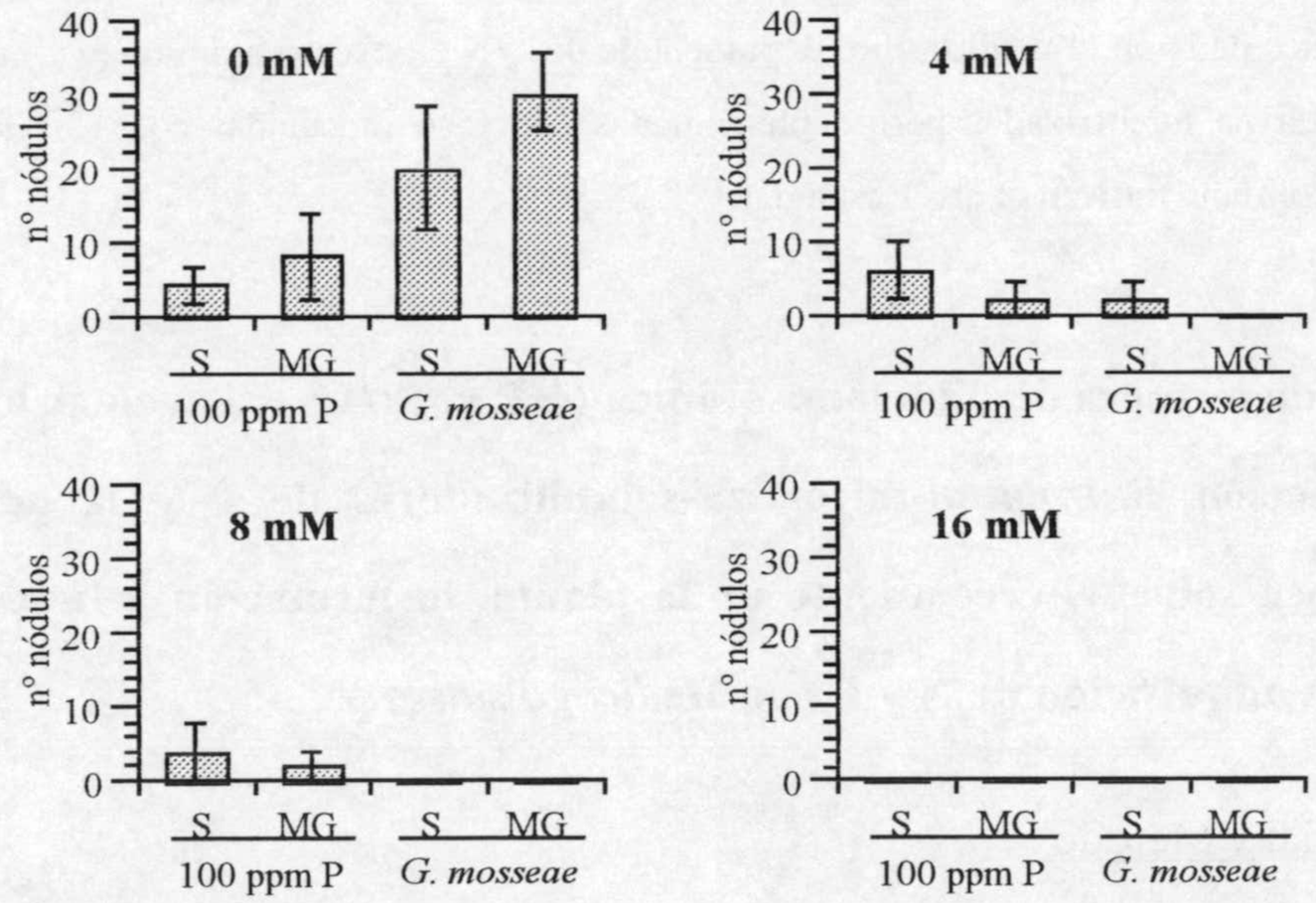

Fig.18. Efecto de la aplicación de dosis crecientes de N en el medio y la micorrización en plantas de alfalfa no micorrizadas pero suplementadas con P, o inoculadas con *G. mosseae* sobre la nodulación por dos cepas de *Rhizobium meliloti* (S= GR4, MG= GR4(pCK3)). Las barras en cada columna indican el error estándar.

Las plantas micorrizadas presentaron mayor contenido en ^{15}N en sus tejidos, y conforme aumentó la concentración de N en el medio éste fué diluyéndose progresivamente tanto en plantas micorrizadas como en controles sin micorrizar (Fig. 19). No se observaron diferencias entre las dos cepas de *Rhizobium* empleadas.

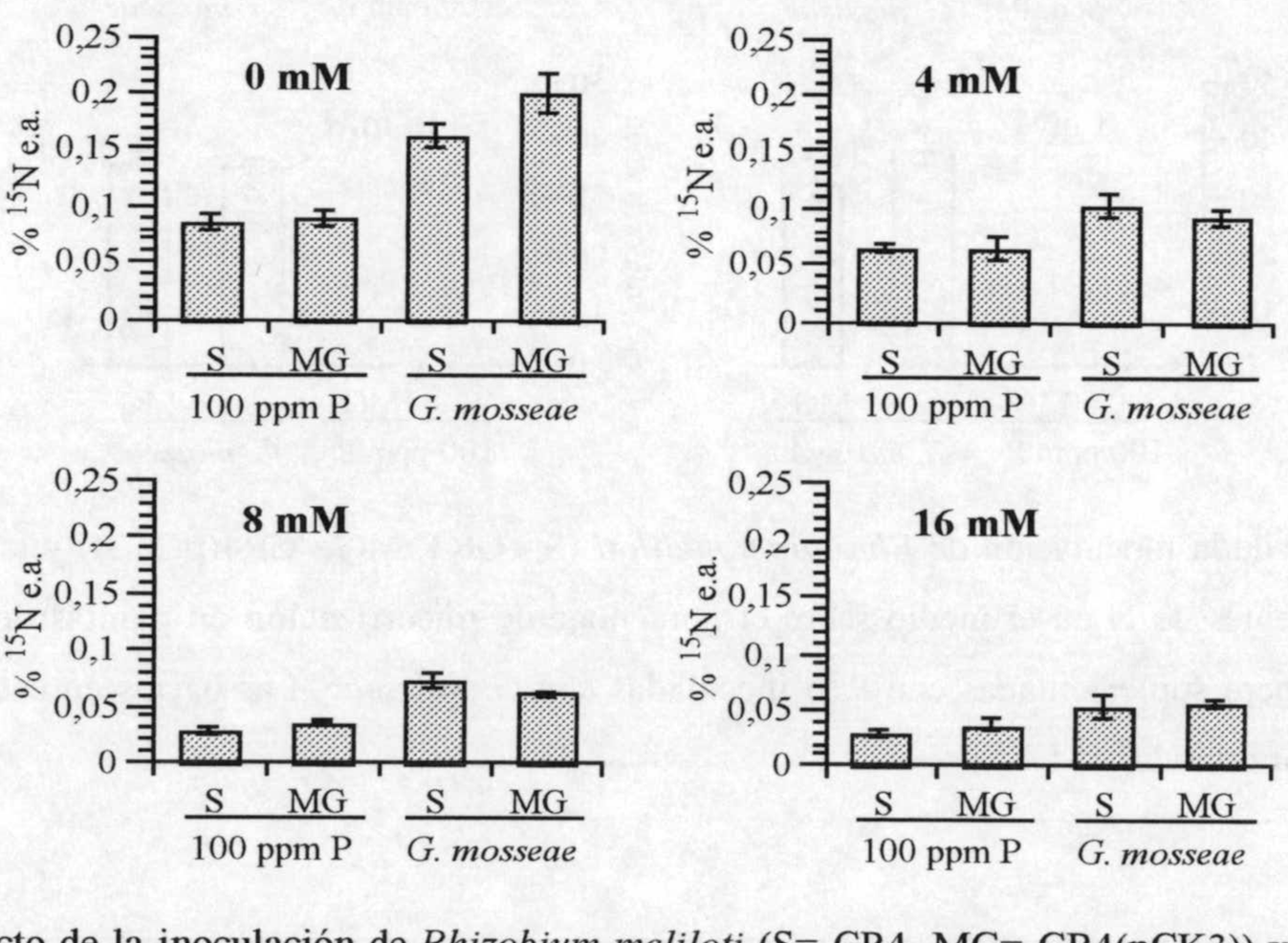

Fig.19. Efecto de la inoculación de *Rhizobium meliloti* (S= GR4, MG= GR4(pCK3)) y la aplicación de dosis crecientes de N en el medio sobre el porcentaje de ^{15}N en exceso atómico (e.a.) en hojas de plantas de alfalfa no micorrizadas pero suplementadas con P, o inoculadas con *G. mosseae*. Las barras en cada columna indican el error estándar.

1.4. Empleo de técnicas de dilución isotópica (^{32}P y ^{15}N) para evaluar los efectos de la interacción *Rhizobium*-micorriza-solubilizadores de P y la adición de fosfato de roca sobre el crecimiento de la planta, la formación y función de la simbiosis y la adquisición de N y P por *Medicago sativa*.

Material y Métodos

Sistema y diseño experimentales

En este estudio se consideraron tres factores de variación. El primero, el factor MA, contenía 2 tratamientos: Control sin micorrizar (C) e inoculación con *G.*

mosseae. El segundo factor que consistió en la inoculación con *Rhizobium meliloti* contó con otros 2 tratamientos: inoculación con GR4 (cepa S), e inoculación con GR4(pCK3) (cepa MG). Por último el tercer factor de variación consistió en la inoculación con solubilizadores de P, donde se aplicaron tres tratamientos: Control sin inocular, inoculación con *Enterobacter* sp., e inoculación con *Bacillus* sp. Las características de cada una de las cepas empleadas quedan recogidas en las Tablas 1 y 2 del Capítulo *Material y Métodos*.

La combinación de los diferentes factores de variación dió lugar a un total de 12 tratamientos diferentes, con 5 repeticiones de cada uno, resultando un total de 60 macetas. Las macetas usadas como sistema para cultivo presentaban una capacidad para 500ml de suelo.

Características del suelo

Se utilizó sustrato A esterilizado.

Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos y del fosfato de roca.

Alfalfa (*Medicago sativa* L., cv. Aragón) fué la planta usada como testigo para la realización de este ensayo. Las semillas esterilizadas, se sembraron en los contenedores previamente preparados donde el suelo había recibido el fosfato de roca y, en su caso los tratamientos micorrícicos. Se cultivó una plántula por contenedor. El fosfato de roca empleado porcedió de Marruecos (fluoroapatita que contenía 12.8% de P total). Se aplicaron 500 mg por maceta una vez tamizado (250 μm). En los tratamientos micorrizados se adicionaron al sustrato 10g por contenedor de un inóculo de *G. mosseae*. Los inoculantes bacterianos (DO_{600} = 1, equivalente a 10^9 ufc/ml) se aplicaron a las radículas de las plantas, inoculándose 1ml de la suspensión bacteriana por planta.

Determinaciones

Las plantas se cosecharon a los 2 meses de crecimiento vegetal. Una vez cosechadas se determinó el peso seco de parte aérea tras secar cada planta en un horno a 65ºC durante 48h. Una vez secas, la parte aérea de las plantas se procesó para posterior análisis de N y P en sus tejidos (Lachica *et al.*, 1973), así como de ^{15}N y ^{32}P. Las plantas se dejaron rebrotar en sus correspondientes macetas realizándose 3 cortes secuenciales más, cada 40 días. En cada una de estas tomas de muestra se secó la parte aérea como se indicó anteriormente y se procesaron para análisis de N y P. La raíz se extrajo después del último corte y se determinaron su peso, nº de nódulos y porcentaje de micorrización.

Resultados

En la Tabla 5 se muestra el resultado del análisis estadístico (valor P) al que fueron sometidos los distintos tratamientos aplicados para las distintas variables experimentales analizadas.

El principal factor que determinó la existencia de importantes diferencias de cosecha en cualquiera de los diferentes cortes realizados fue la micorrización, especialmente cuando las plantas estaban coinoculadas con la cepa S de *Rhizobium* (Fig. 20); mientras que la inoculación con la cepa MG resultó más beneficiosa en aunsencia de micorriza, pero no resultó ser la más efectiva en combinación con la micorriza. Por lo general la inoculación de solubilizadores de P sólo aportó beneficios importantes, cuando las plantas estaban inoculadas con la cepa S de *Rhizobium*, beneficio que fué notorio desde el primer corte en plantas no micorrizadas y que emplezó a hacerse patente en las micorrizadas conforme se avanzó en la secuencia de cortes, siendo la combinación micorriza-cepa S la más efectiva en inoculación conjunta con cualquiera de los solubilizadores empleados al final de la experiencia.

Respuesta	Fuente de variación						
	Micorriza	***Rhizobium***	**SP**	**Mic x *Rhi***	**Mic x SP**	***Rhi* x SP**	**Mic x *Rhi* x SP**
Variables de la planta							
P. s. parte aérea 1er corte	0,0001	0,8642	0,7293	0,0339	0,1277	0,0581	0,9727
P.s. parte aérea 2° corte	0,0002	0,7503	0,2960	0,0184	0,4620	0,3716	0,2450
P. s. parte aérea 3er corte	0,0001	0,9651	0,4832	0,0011	0,0757	0,2408	0,3986
P.s. parte aérea 4° corte	0,0007	0,9552	0,5241	0,0103	0,4387	0,1056	0,2784
Peso seco raíz	0,0001	0,9629	0,0367	0,0001	0,3089	0,4830	0,1989
mg P/planta 1er corte	0,0001	0,8128	0,9319	0,0020	0,2016	0,0158	0,5028
mg P/planta 2° corte	0,0001	0,3908	0,5039	0,0286	0,4293	0,4968	0,4267
mg P/planta 3er corte	0,0001	0,2847	0,9043	0,0189	0,7182	0,4763	0,9254
mg P/plant 4° corte	0,0001	0,4696	0,4008	0,0182	0,3747	0,1172	0,2321
mg N/planta 1er corte	0,0001	0,7276	0,8788	0,0245	0,0368	0,0246	0,6676
mg N/planta 2° corte	0,0002	0,7284	0,3078	0,0876	0,1643	0,8888	0,0928
mg N/planta 3er corte	0,0003	0,5286	0,7563	0,0980	0,7182	0,6055	0,4183
mg N/planta 4° corte	0,0001	0,9005	0,4365	0,0112	0,2099	0,1452	0,1671
Variables de la MA							
% micorrización	0,0001	0,1878	0,3514	0,1878	0,3514	0,2837	0,2837
Variables del *Rhizobium*							
n° nódulos	0,0001	0,9404	0,0001	0,3290	0,0003	0,0211	0,0001
% ^{15}N e.a.	0,1277	0,4762	0,4714	0,1425	0,2395	0,0526	0,5660
Variables de los SP							
A. E. (dpm/mgP)	0,0012	0,0078	0,1477	0,0001	0,0473	0,4723	0,9851

Tabla 5. Resultados de un ANOVA (valor P) de dos vías realizado para estudiar el efecto de la inoculación de combinada micorriza-*Rhizobium*-Solubilizadores de P sobre las distintas variables experimentales analizadas.

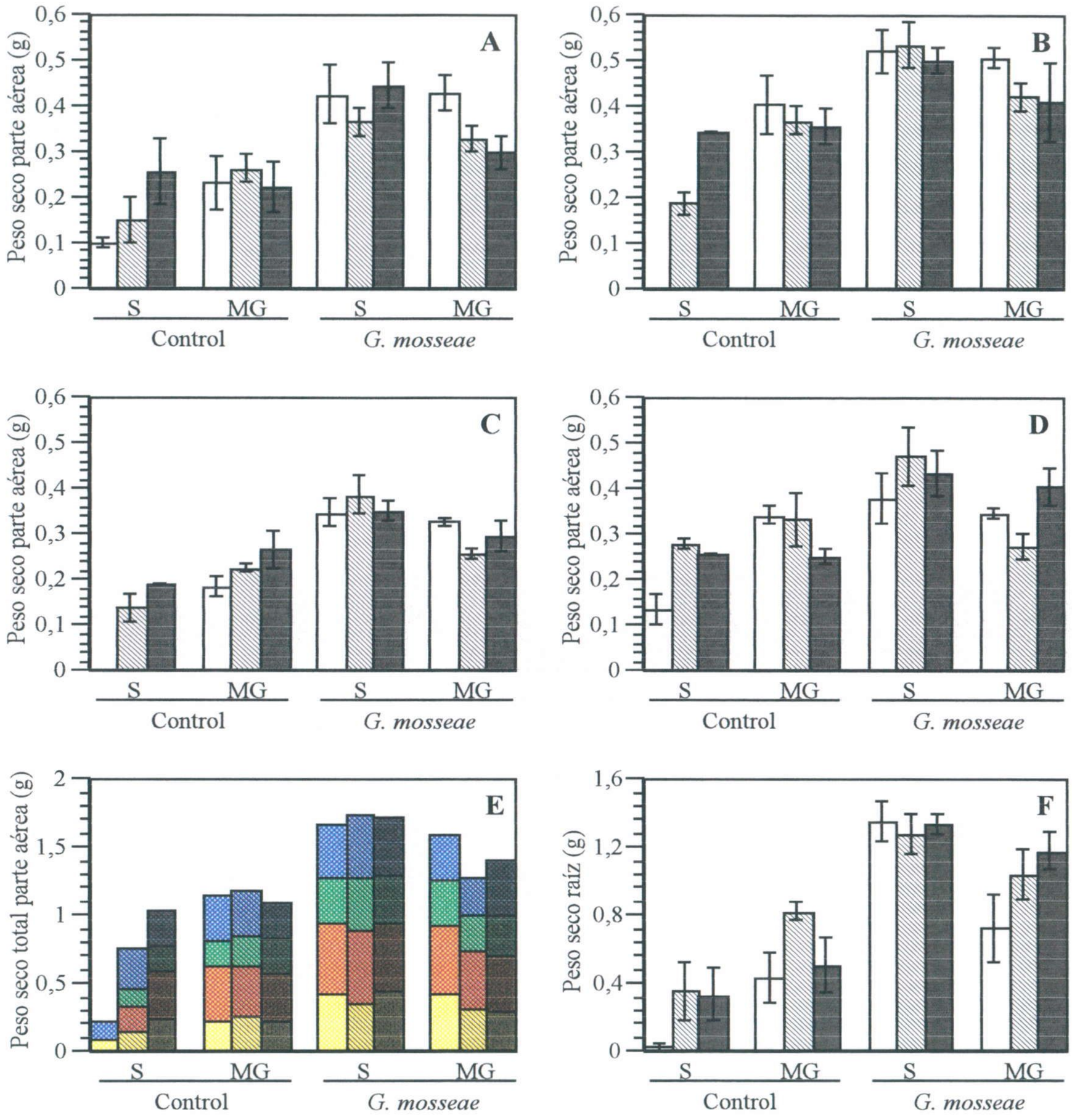

Fig. 20. Efecto de la triple inoculación micorriza-*Rhizobium*-solubilizadores de P sobre la cosecha en los distintos cortes practicados: (A) Peso seco de la parte aérea (g) en el primer corte a los 60 días tras siembra, (B) Peso seco parte aérea (g) a los 40 días tras primer corte, (C) Peso seco parte aérea (g) a los 40 días tras segundo corte, (D) Peso seco parte aérea (g) a los 40 días tras tercer corte, (E) Peso seco total parte aérea cosechado, donde cada color representa el valor medio de cosecha en cada uno de los diferentes cortes practicados, (F) Peso seco de la raíz (g). Las barras en cada columna indican el error estándar.

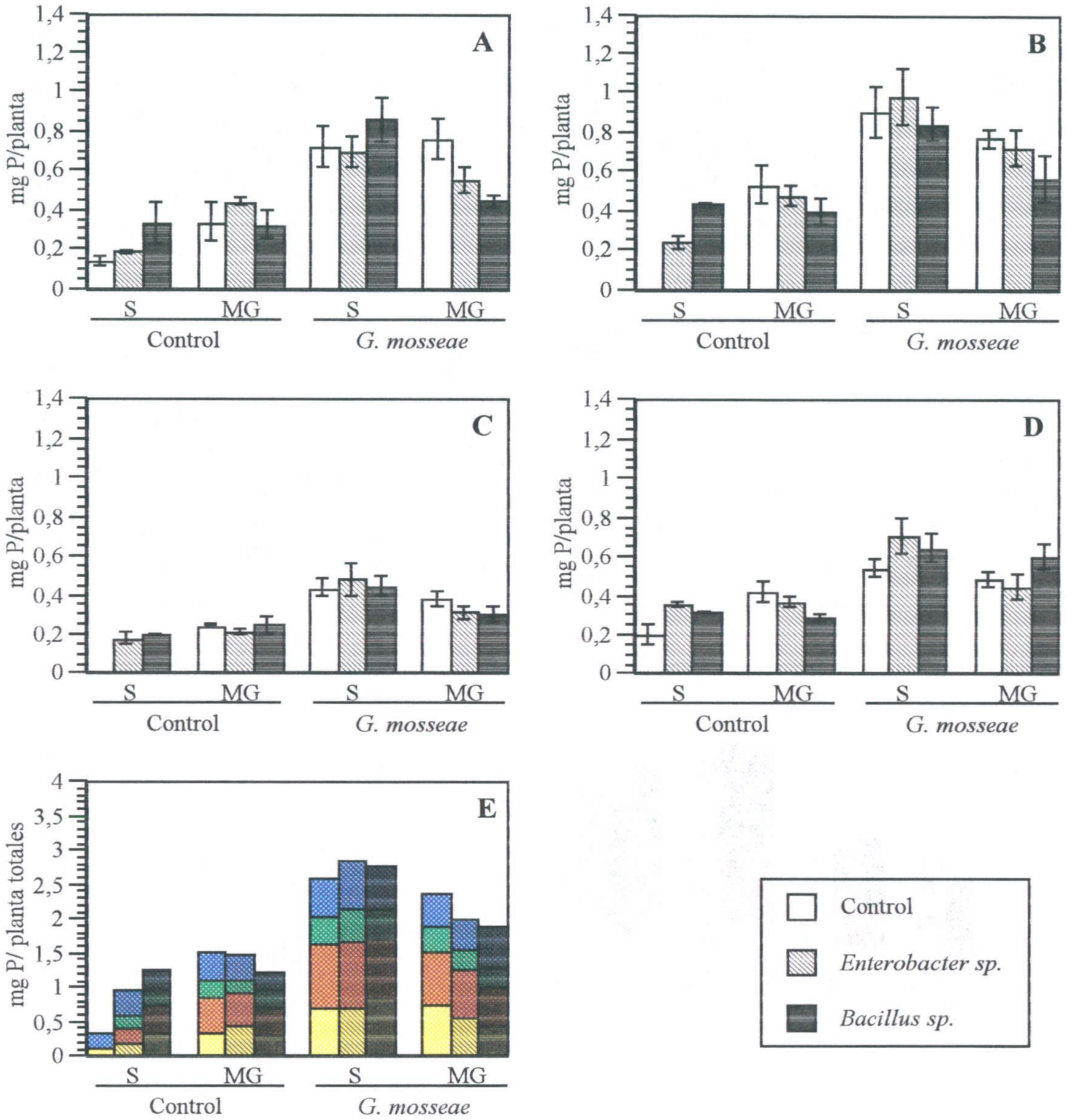

Fig. 21. Efecto de la triple inoculación micorriza-*Rhizobium*-solubilizadores de P sobre la cantidad de P/planta (mg/planta) en los distintos cortes practicados: (A) mg P/planta en el primer corte a los 60 días tras siembra, (B) mg P/planta a los 40 días tras primer corte, (C) Pmg P/planta a los 40 días tras segundo corte, (D) mg P/planta a los 40 días tras tercer corte, (E) mg de P totales/planta, donde cada color representa el valor medio de cosecha en cada uno de los diferentes cortes practicados. Las barras en cada columna indican el error estándar.

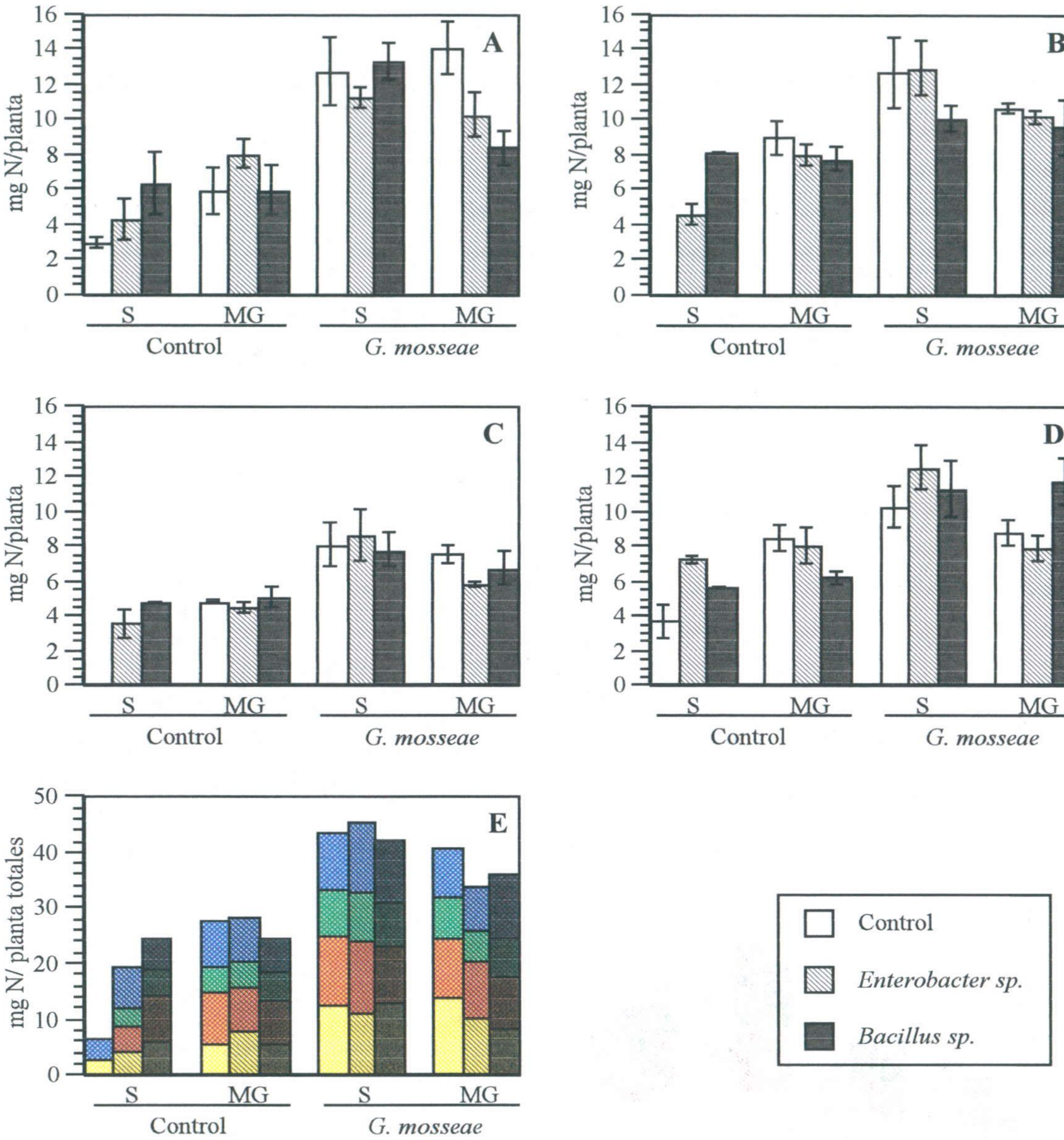

Fig. 22. Efecto de la triple inoculación micorriza-*Rhizobium*-solubilizadores de P sobre la cantidad de N/planta (mg/planta) en los distintos cortes practicados: (A) mg N/planta en el primer corte a los 60 días tras siembra, (B) mg N/planta a los 40 días tras primer corte, (C) mg N/planta a los 40 días tras segundo corte, (D) mg N/planta a los 40 días tras tercer corte, (E) mg de N totales/planta, donde cada color representa el valor medio de cosecha en cada uno de los diferentes cortes practicados. Las barras en cada columna indican el error estándar.

El contenido en nutrientes (N y P) en los tejidos vegetales analizados, siguió un patrón similar al descrito anteriormente para la cosecha, de modo que esta variables

sufrió un incremento como consecuencia fundamentalmente de la micorrización. La inoculación con solubilizadores de P sólo aportó beneficios a estas variables cuando las plantas estaban inoculadas con la cepa S de *Rhizobium*, independiente de si habían sido micorrizadas o no, mientras que cuando se inoculó con la cepa MG se llegó a producir incluso una disminución de los valores detectados en un principio cuando las plantas estaban micorrizadas, a este respecto, la cepa MG resultó más beneficiosa que la cepa S en ausencia de micorrización, mientras que la cepa S resultó ser mejor inoculada conjuntamente con *G. mosseae* (Fig. 21A y 22A). Este efecto de los diferentes inoculantes empleados que se detectó en la primera toma de muestra se mantuvo en los muestreos sucesivos (Fig. 21B, 22B, 21C, 22C, 21D, 22D).

El porcentaje de raíz colonizada por la micorriza no se afectó de forma general por ninguno de los inoculantes bacterianos empleados, aunque se observaron porcentajes ligeramente superiores de colonización cuando se inoculó con la cepa S de *Rhizobium*. La inoculación con solubilizadores de P disminuyó ligeramente el porcentaje de colonización radical, pero estas diferencias no llegaron a ser significativas en ninguno de los casos. Los porcentajes de infección más bajos se detectaron cuando existió inoculación conjunta de cepa MG-*Enterobacter* sp. (Fig. 23A).

El número de nódulos formado sobre las raíces se afectó por el tipo de inoculante de *Rhizobium* empleado, así como por la inoculación con los otros microorganimos empleados, es decir, micorriza y solubilizadores de P. En ausencia de ningún otro tipo de inoculante empleado, salvo *Rhizobium*, la cepa MG formó mayor número de nódulos que la cepa S. Por lo general, la micorrización incrementó de forma significativa la formación de nódulos, especialmente cuando se usó la cepa S de *Rhizobium* como inoculante. Del mismo modo, la inoculación de solubilizadores de P, también ejerció efecto sobre esta variable, aunque el efecto de los solubilizadores varió en función de la combinación micorriza-*Rhizobium* de la que se tratara. Así, en plantas

no micorrizadas, e independientemente de la cepa de *Rhizobium* inoculada, la inoculación con solubilizadores de P aportó incrementos en la nodulación, especialmente cuando se inoculó con *Enterobacter* sp. En cambio, si las plantas estaban micorrizadas, el efecto de los solubilizadores dependió del tipo de cepa de *Rhizobium* empleada, así la inoculación conjunta con solubilizadores de P resultó beneficiosa cuando se usó la cepa MG, y tuvo un efecto opuesto cuando la cepa S fué el inoculante empleado, y no se detectaron diferencias en ninguno de los casos en función del tipo de solubilizador de P empleado (Fig. 23B).

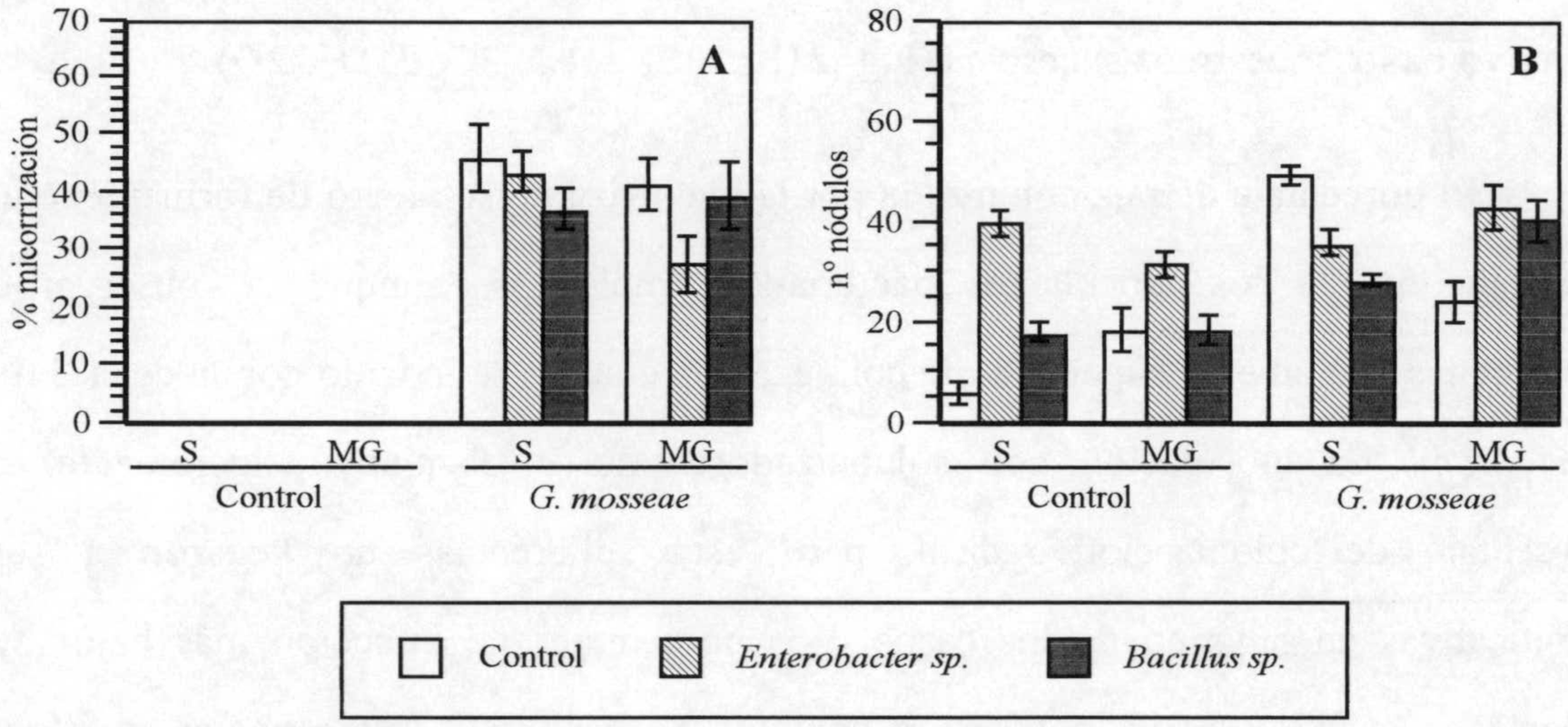

Fig. 23. Efecto de la triple inoculación micorriza-*Rhizobium*-solubilizadores de P sobre la capacidad infectiva de alguno de los microsimbiontes implicados: (A) % micorrización, (B) nº de nódulos. Las barras en cada columna indican el error estándar.

La actividad específica de las muestras fué menor en plantas micorrizadas que en controles (Fig. 24). La inoculación con la cepa MG de *Rhizobium* también ocasionó una disminución de esta variable en relación con la cepa S. La inoculación con solubilizadores de P no aportó modificaciones netas a nivel global, aunque sí se detectaron estas en casos particulares. Así en plantas control, la inoculación de *Bacillus* sp. produjo una disminución significativa, con respecto al control, de la actividad específica, y aunque *Enterobacter* sp. también produjo tal efecto, éste no fué

significativo. El efecto de los solubilizadores de P fué más notorio en plantas inoculadas con la cepa S de *Rhizobium*. En plantas micorrizadas la inoculación con solubilizadores no aportó diferencias importantes.

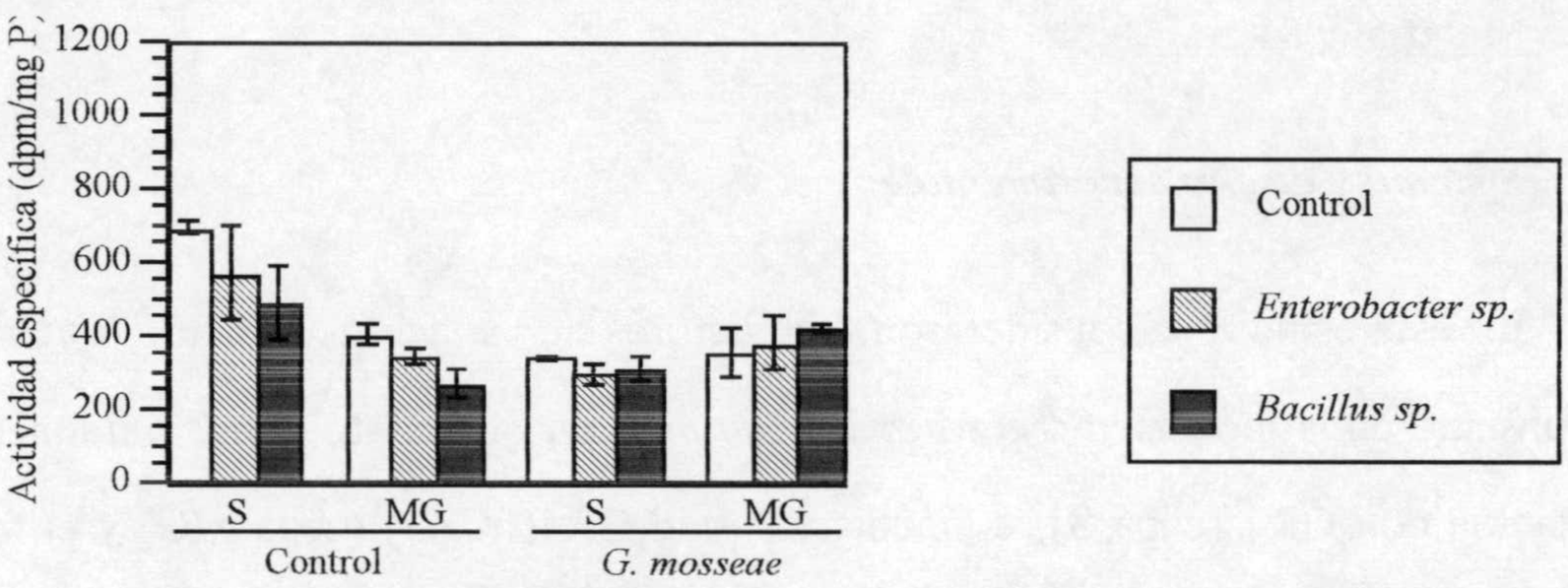

Fig. 24. Efecto de la triple inoculación micorriza-*Rhizobium*-solubilizadores de P sobre la captación de P, medida a través de la dilución del isótopo ^{32}P, en parte aérea de plantas cosechadas a los 60 días tras siembra: (A) Actividad específica de la muestra (dpm/mg P), (B) dpm ^{32}P/planta, (C) µg ^{32}P/planta, (D) Relación $^{32}P/^{31}P$. Las barras en cada columna indican el error estándar.

La proporción de ^{15}N en los tejidos vegetales no se afectó de forma significativa ($P<0.05$) por ninguno de los tratamientos aplicados (Fig. 25).

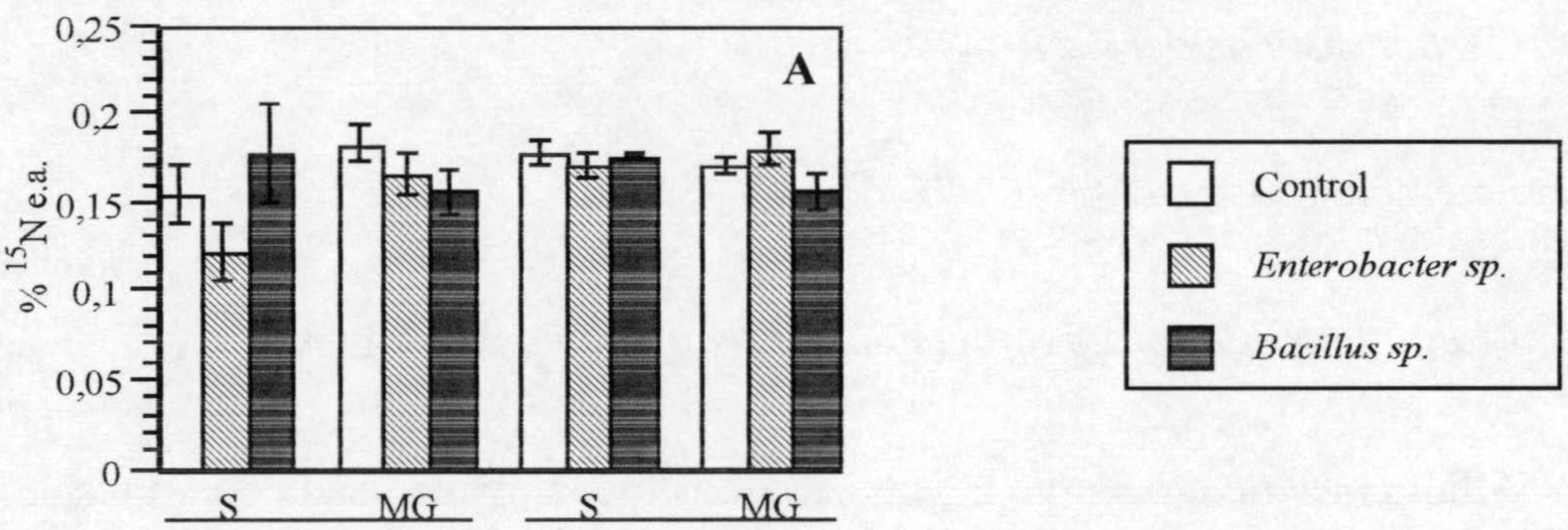

Fig. 25. Efecto de la triple inoculación micorriza-*Rhizobium*-solubilizadores de P sobre la captación de N, medida a través de la dilución del isótopo ^{15}N (% ^{15}N exceso atómico), en parte aérea de plantas cosechadas a los 60 días tras siembra. Las barras en cada columna indican el error estándar.

UNIVERSIDAD DE GRANADA
28 JUN. 1999
COMISION DE DOCTORADO

1.5. Efecto del estrés hídrico y de la inoculación de una cepa de *Rhizobium meliloti* modificada genéticamente sobre las actividades fosfatasa alcalina y succinato dehidrogenasa fúngica en plantas de alfalfa micorrizadas.

Material y Métodos

Sistema y diseño experimentales

En este estudio se consideraron dos factores de variación, el factor *Rhizobium* que consistió en la inoculación con *Rhizobium meliloti* que contó con 2 tratamientos: inoculación con GR4 (cepa S), e inoculación con GR4(pCK3) (cepa MG) y el factor estrés hídrico que contó con otros 2 tratamientos: 100% y 80% de capacidad de campo del suelo. Todas los tratamientos fueron micorrizados con *G. mosseae*. La combinación de los diferentes factores de variación dió lugar a un total de 4 tratamientos diferentes. Se realizaron tomas de muestras a 4 tiempos distintos: 20, 30, 40 y 50 días, con 5 repeticiones de cada tratamiento por tiempo muestreado, resultando un total de 80 macetas. Las macetas usadas como sistema para cultivo presentaban una capacidad para 200ml de suelo.

Características del suelo

Se empleó sustrato A esterilizado.

Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos.

Alfalfa (*Medicago sativa* L., cv. Aragón) fué la planta usada como testigo para la realización de este ensayo. Las semillas esterilizadas, se sembraron en los contenedores previamente preparados donde el suelo había recibido los tratamientos micorrícicos. Se cultivó una plántula por contenedor. Se adicionaron al sustrato 5g por contenedor de un inóculo de *G. mosseae*. Los inoculantes bacterianos (DO_{600} = 0.8,

equivalente a 10^9 ufc/ml) se aplicaron a las radículas de las plantas, inoculándose 1ml de la suspensión bacteriana por planta.

Condiciones de crecimiento

Las plantas crecieron en cámara de cultivo bajo condiciones controladas con temperaturas entre 18-27ºC, fotoperíodo de 14 h y humedad relativa del 50%. Las macetas se pesaron y regaron diariamente ajustándose la cantidad de agua a 80% y 100% de la capacidad de campo, según tratamientos.

Determinaciones

Las plantas se cosecharon después de 20, 30, 40 y 50 días de crecimiento vegetal. Una vez cosechadas se determinó la acumulación de biomasa vegetal (peso seco parte aérea) y la nodulación. Las raíces, una vez extraídas se lavaron cuidadosamente y se dividieron en tres paquetes: uno fué teñido siguiendo la técnica de tinción no vital clásica con azul tripan (TB) (Phillips & Hayman, 1970) y los otros 2 se utilizaron para tinciones vitales histoquímicas (succinato dehidrogenasa, SDH y fosfatasa alcalina, ALP), de esta manera se pudo cuantificar desarrollo total del hongo (TB), vivo (SDH) y funcional (ALP), siguiendo la técnica de cuantificación del porcentaje de colonización radical descrita por Trouvelot *et al.*, 1986.

Resultados

Para cada tiempo de cosecha y cada nivel hídrico, no se encontraron diferencias significativas entre el efecto de las dos cepas de *Rhizobium* ensayadas (S vs. MG) en plantas micorrizadas. La nodulación (resultados no mostrados) siguió el modelo descrito anteriormente por Barea *et al.* (1996), es decir, la cepa MG produjo menos nódulos pero de mayor tamaño que la cepa S.

Las tres variables evaluadas en relación con el desarrollo de la micorriza, es decir, frecuencia de micorrización (%F, Fig. 26), intensidad de colonización (%M, Fig. 27) y frecuencia de arbúsculos (%A, Fig. 28), siguieron un patrón similar para cada tipo de tinción, y para cada cepa de *Rhizobium* y cada nivel hídrico aplicados.

Después de 30 días de inoculación y bajo condiciones hídricas óptimas (100% c.c.), la cantidad total de tejido del hongo (tinción TB) estaba vivo (tinción SDH) y activo (tinción ALP) para las tres variables del hongo analizadas (%F, Fig.26), (%M, Fig. 27), (%A, Fig. 28), situación que también se mantuvo para el porcentaje de arbúsculos (%A) a 80% de capacidad de campo. Sin embargo, el hongo empieza a ser activo (tinción ALP) más tarde bajo condiciones hídricas limitantes (80% c.c.) (Fig. 26, 27 y 28), probablemente debido a un retraso en la formación de arbúsculos bajo condiciones limitantes (Fig. 28).

El porcentaje de colonización estimado mediante tinción TB incrementó a los 40 días, permaneciendo constante hasta el final del ensayo, mientras que las curvas de colonización por el hongo de la MA con tinciones vitales (SDH y ALP) tienden a descender antes (entre 30-40 días) con algunas excepciones notorias: a) la actividad ALP desaparece casi por completo bajo condiciones hídricas limitantes y b) la actividad SDH en plantas inoculadas con la cepa MG de *Rhizobium meliloti* pone de manifiesto que aproximadamente un 80% del micelio intraradical se mantuvo vivo al final del experiento bajo condiciones hídricas óptimas. En contraste, sólo un 10-20% de ese micelio permaneció vivo en plantas inoculadas con la cepa S bajo las mismas condiciones. Ambas cepas de *Rhizobium* se comportaron de manera similar bajo condiciones limitantes de humedad.

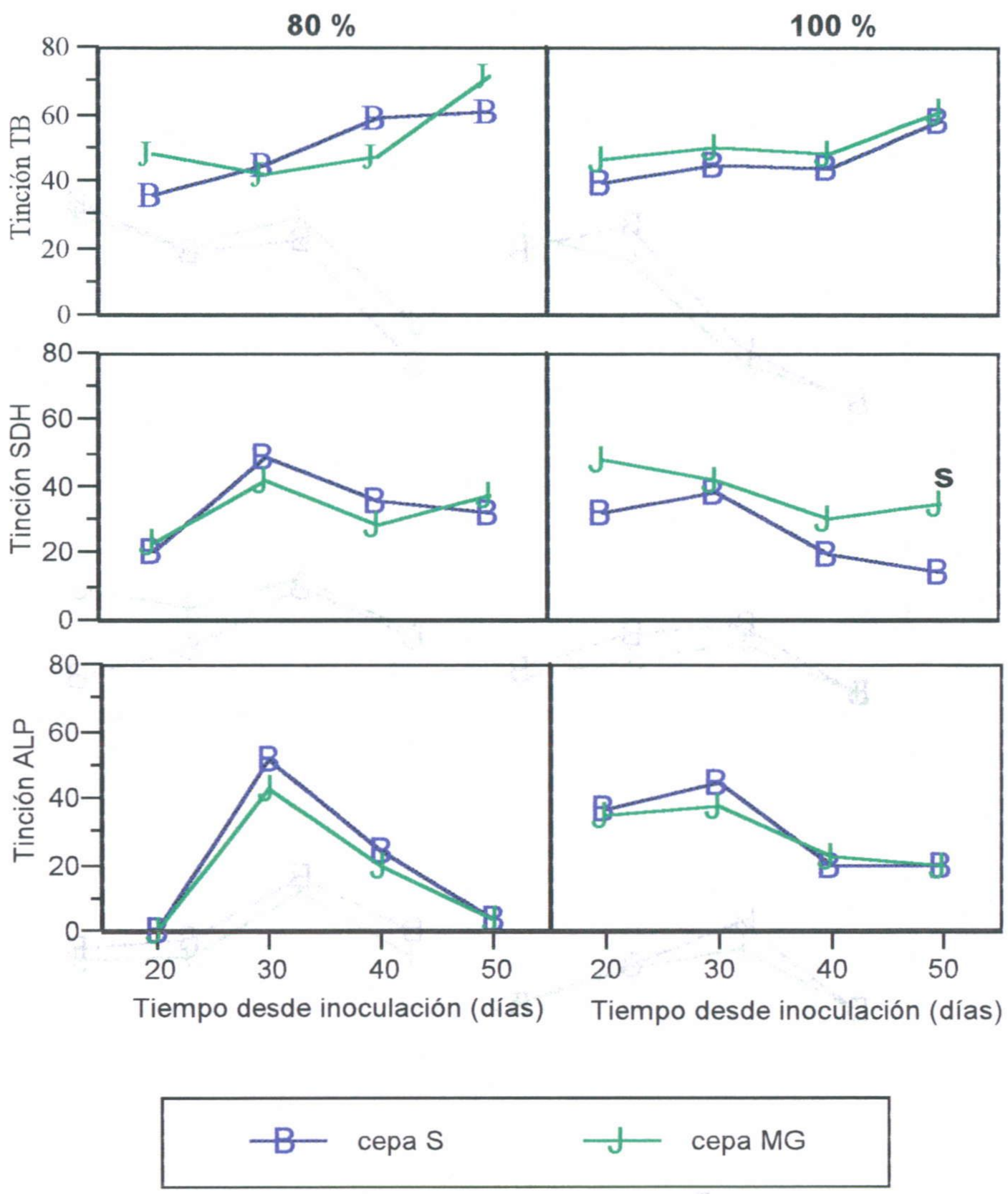

Fig. 26. Efecto de dos cepas de *Rhizobium meliloti,* cepa salvaje (GR4) y su derivado modificado genéticamente (GR4(pCK3)) a dos niveles hídricos en suelo (80% y 100% de capacidad de campo) sobre la frecuencia de colonización de la MA (%F) observada con tinción con azul tripan (TB), y actividades succinato dehidrogenasa (SDH) y fosfatasa alcalina (ALP) durante el desarrollo de la colonización de raíces de *Medicago sativa* con *G. mosseae*. El símbolo **s** indica la existencia de diferencias significativas para un mismo tiempo de muestreo y un mismo nivel hídrico, según test de Duncan ($P<0.05$).

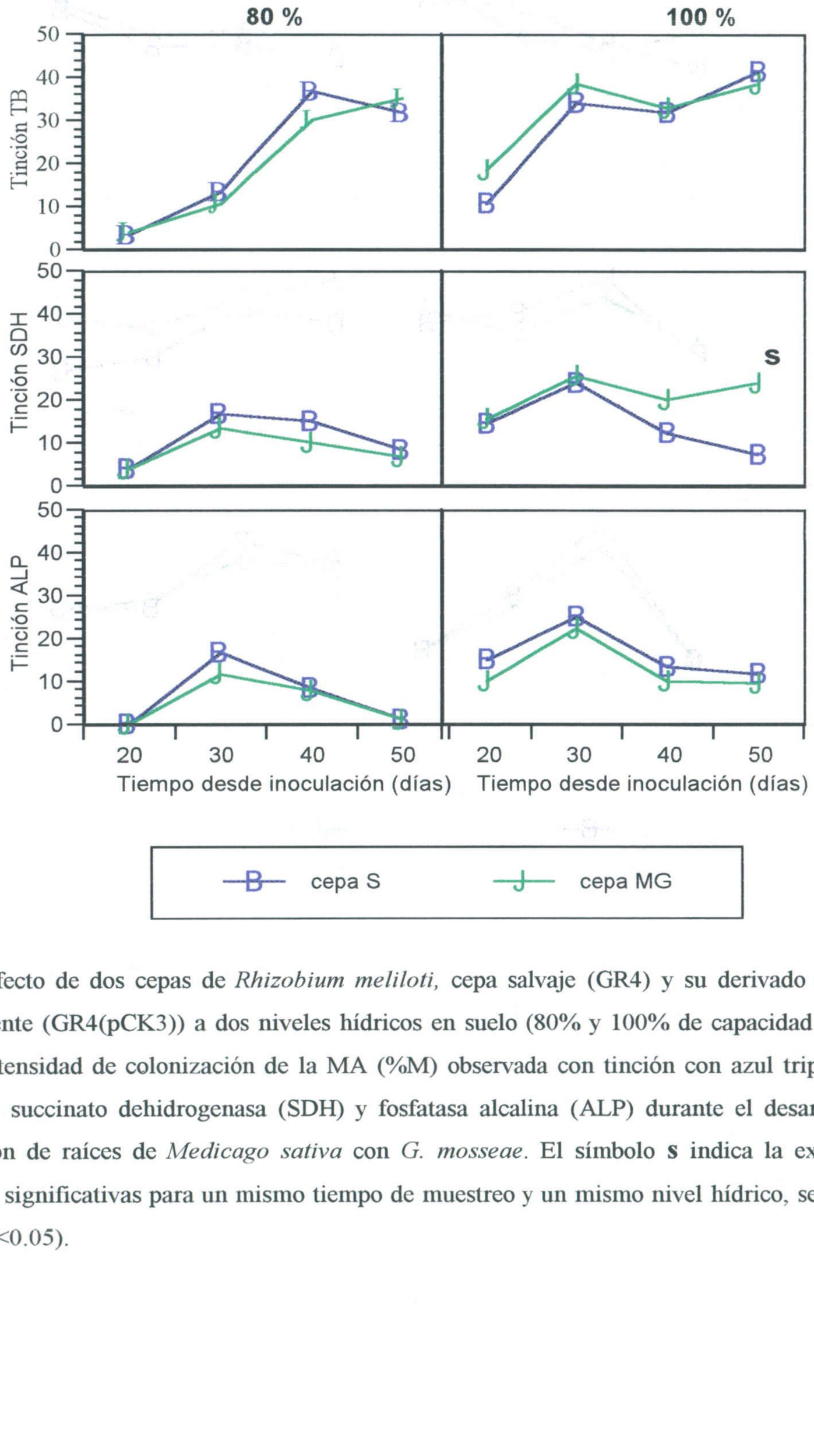

Fig. 27. Efecto de dos cepas de *Rhizobium meliloti,* cepa salvaje (GR4) y su derivado modificado genéticamente (GR4(pCK3)) a dos niveles hídricos en suelo (80% y 100% de capacidad de campo) sobre la intensidad de colonización de la MA (%M) observada con tinción con azul tripan (TB), y actividades succinato dehidrogenasa (SDH) y fosfatasa alcalina (ALP) durante el desarrollo de la colonización de raíces de *Medicago sativa* con *G. mosseae*. El símbolo **s** indica la existencia de diferencias significativas para un mismo tiempo de muestreo y un mismo nivel hídrico, según test de Duncan ($P<0.05$).

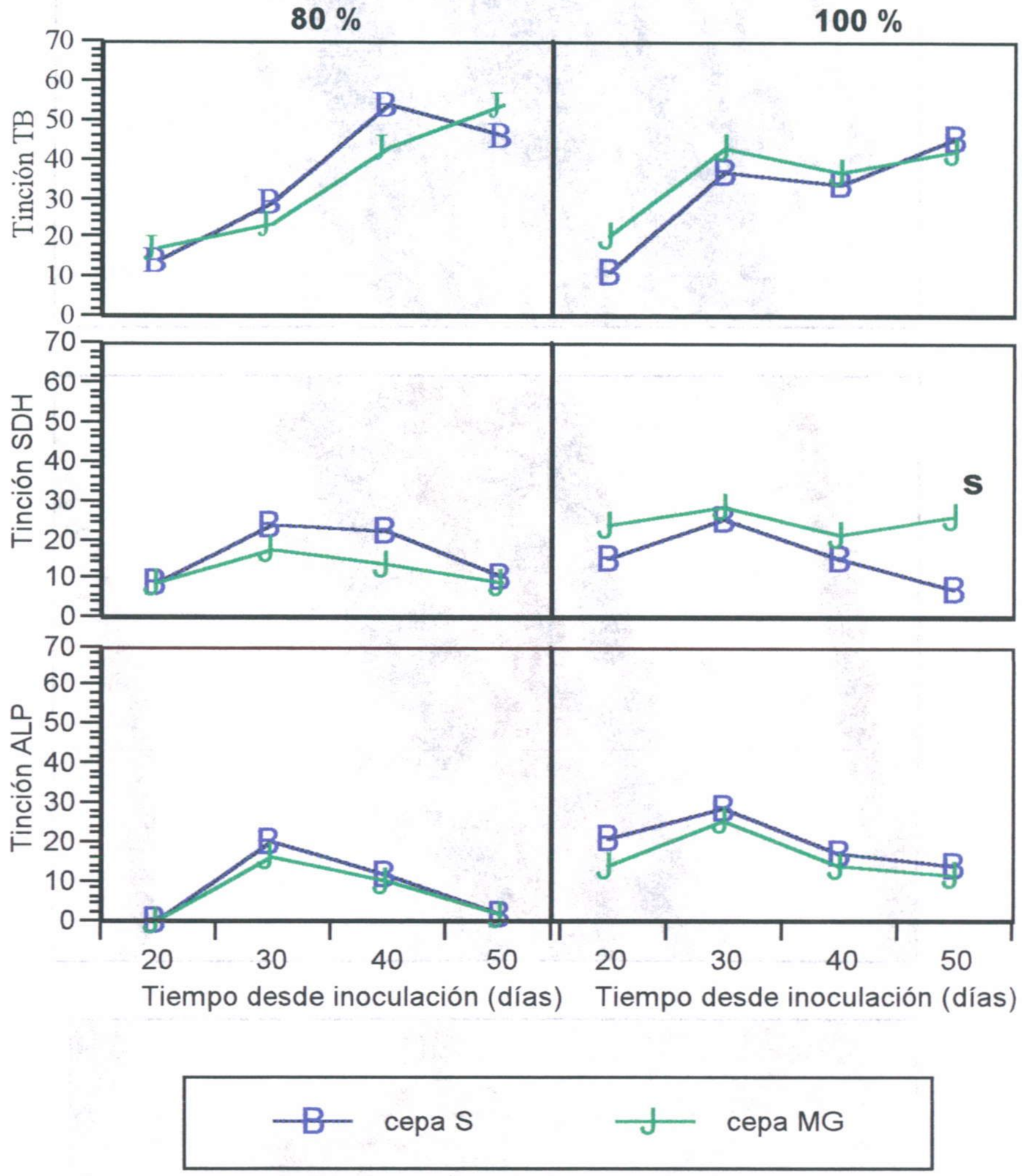

Fig. 28. Efecto de dos cepas de *Rhizobium meliloti,* cepa salvaje (GR4) y su derivado modificado genéticamente (GR4(pCK3)) a dos niveles hídricos en suelo (80% y 100% de capacidad de campo) sobre la frecuencia de arbúsculos de la MA (%A) observada con tinción con azul tripan (TB), y actividades succinato dehidrogenasa (SDH) y fosfatasa alcalina (ALP) durante el desarrollo de la colonización de raíces de *Medicago sativa* con *G. mosseae*. El símbolo **s** indica la existencia de diferencias significativas para un mismo tiempo de muestreo y un mismo nivel hídrico, según test de Duncan ($P<0.05$).

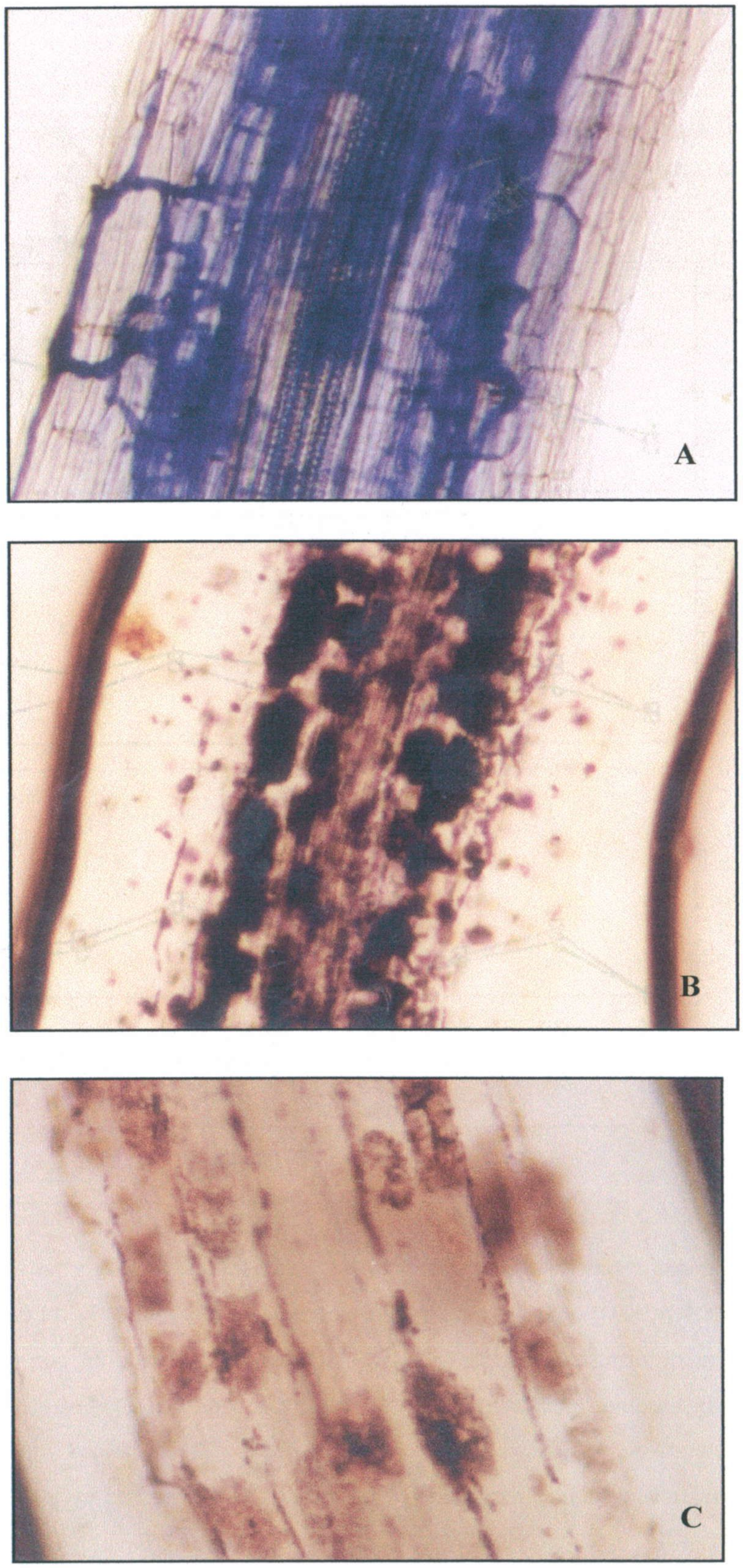

Fig. 29. Aspecto de raíces de alfalfa teñidas mediante: (A) Tinción con azul tripan (TB); (B) Tinción vital de succinato dehidrogenasa (SDH); (C) Tinción vital de fosfatasa alcalina (ALP).

Discusión

Las interacciones microbianas, donde están implicados hongos de la MA y bacterias del género *Rhizobium*, son de particular importancia e interés, ya que ambos microorganimos son capaces de establecer asociaciones simbióticas con un hospedador en común, una leguminosa. El resultado de las interacciones entre ambos microorganimos en relación con la mejora del crecimiento y nutrición vegetal ha sido ampliamente descrito (Barea *et al*., 1992; 1997). En este estudio, todos los endofitos de la MA inoculados produjeron incrementos significativos en cosecha, pero el efecto dependió de la combinación de microsimbiontes y de la variedad de planta empleada. Son numerosos los autores que señalan lo que se denomina "compatibilidad funcional" entre microsimbiontes, de modo que combinaciones específicas entre microsimbiontes son más efectivas que otras, y determinan el efecto sobre la planta (Ames *et al*., 1991; Azcón *et al*., 1991; Thiagarajan *et al*., 1992; Requena *et al*., 1997), aunque los efectos siempre dependen del cultivar en cuestión (Ahmad, 1995). Los efectos que ejerce la MA sobre el crecimiento vegetal se han atribuído, en la mayoría de los casos a una mejora en la nutrición, fundamentalmente debida al incremento en el contenido en P en plantas micorrizadas (Barea, 1998). Ibijbijen *et al*. (1996) señalan la existencia de una correlación positiva entre porcentaje de micorrización y contenido en P en la planta, de modo que a mayor nivel de colonización por la MA mayor será la concentración de P y por tanto mayor la cosecha. Este efecto se observó en determinadas ocasiones en el presente trabajo. Aún así, se ha descrito que en determinadas circunstancias algunos hongos MA no producen incrementos en el contenido en P en plantas micorrizadas (Azcón *et al*., 1991), e incluso que las plantas fertilizadas con P presentan similar o mayor contenido en P que las plantas micorrizadas, a pesar de lo cual las plantas micorrizadas poseen mayor biomasa (Ruíz-Lozano & Azcón, 1996; Ruíz-Lozano *et al*., 1996). En el presente estudio, la micorrización produjo un aumento en el contenido de nutrientes, tanto de N como de P, especialmente este último, y el efecto

igualmente dependió de la combinación MA-*Rhizobium*, del hospedador y de las condiciones de cultivo. Las plantas adicionadas de P tenían un mayor contenido en P que las plantas micorrizadas, a pesar de lo cual la biomasa de las plantas micorrizadas fué siempre superior. Este hecho, junto con los resultados obtenidos anteriormente por Ruíz-Lozano & Azcón (1996) y Ruíz-Lozano *et al.* (1996), demuestra la existencia de otros mecanismos distintos de una simple mejora en la nutrición, que operan bajo determinadas circunstancias para dar como resultado un mayor desarrollo en plantas micorrizadas.

La adición de N al medio de cultivo no tuvo efecto sobre el crecimiento de plantas controles, en cambio en las micorrizadas, conforme aumentó el nivel de N en el medio, se produjo una disminución del desarrollo vegetal. El contenido de N en plantas micorrizadas fué superior al de las plantas control, aunque el aumento de N en el medio de cultivo no supuso un aumento en la misma porporción del contenido de N en las plantas. Johansen *et al.* (1993) encuentran incrementos en biomasa en plantas micorrizadas a todos de los niveles de N que usados, aunque el efecto fué más significativo a los niveles más bajos de N. La adición de N nunca produjo disminución del crecimiento. Los efectos observados los atribuyen a la capacidad de las hifas externas para transportar N a la planta hospedadora, de modo que la hifa transportaría menos N a la planta si el nutriente está presente en elevadas concentraciones en el medio de cultivo, lo que indica que el hongo es capaz de regular la captación de N. En el presente estudio las diferencias debidas al aumento del nivel de N, podrían deberse a que el hongo regularía no sólo la capacidad de transporte a través de su micelio externo, sino también a que el propio hongo limitara la producción de micelio (externo). Ello afectaría por tanto a la captación de otros nutrientes, lo que podría provocar un déficit en P, que en definitiva sería el responsable de los efectos observados.

El efecto de la inoculación de microorganismos solubilizadores de fosfatos sobre el desarrollo de la planta dependió también de la formación de simbiosis, tanto MA como con *Rhizobium*, así como de la interacción entre ambos microorganismos. Toro *et al.* (1998) describen el efecto positivo de la cepa MG vs. S en tratamientos adicionados de fosfato de roca e inoculados con solubilizadores de P, independientemente de que las plantas estuvieran o no micorrizadas. En el presente trabajo, sólo se observó este efecto en plantas no micorrizadas. La inoculación con solubilizadores de P aportó beneficios, especialmente cuando las plantas habían sido inoculadas con la cepa S de *Rhizobium*, siendo éste efecto significativo en las primeras cosechas de plantas no micorrizadas, y en las últimas de plantas micorrizadas. Si consideramos además los resultados referentes a actividad específica del ^{32}P en la planta en los distintos tratamientos (negativamente correlacionados con la cosecha), los datos sugieren que la bacteria solubilizadora provoca el uso del fosfato de roca en la rizosfera, produciéndose liberación de P que la micorriza es capta por su micelio externo, fundamentalmente cuando este elemento empieza a agotarse en el medio. Ello apoya que las hifas externas son capaces de acceder a formas de P no accesibles por las raíces de las plantas no micorrizadas (Toro *et al.*, 1998).

Si bien el estrés hídrico originó afectó negativamente el crecimiento vegetal, la micorrización dió lugar a que las plantas bajo condiciones de estrés produjeran mayor biomasa que los controles sin micorrizar, crecidos bajo condiciones óptimas de hidratación. Una de las principales consecuencias del estrés hídrico fué la disminución en el contenido de P en plantas, independientemente de que éstas estuvieran micorrizadas o no. Aún así, el contenido de P fué siempre superior en plantas micorrizadas. De acuerdo con Herrera *et al.* (1993) este efecto de la MA podría atribuirse a una mejora en el estado nutricional de las plantas.

Una de las respuestas más conocidas al estrés hídrico, y otros estreses en plantas, es la acumulación de solutos solubles de bajo peso molecular, como es la

prolina (Antolín & Sánchez-Díaz, 1992; Tawayara & Saito, 1994; Ruíz-Lozano *et al.*, 1995; 1996; Girousse *et al.*, 1996; Goicoechea *et al.*, 1998). La función de este compuesto se ha atribuido a que aumenta la protección de varios sistemas enzimáticos frente a la deshidratación, ocasionada o bien por sequía o bien por salinidad (Paleg *et al.*, 1984). Ruíz-Lozano *et al.* (1995) describen un aumento en la concentración de prolina en plantas micorrizadas, independientemente de que estas hubieran sido sometidas a estrés o no, mientras que Goicoechea *et al.* (1998) no encuentran efecto de la MA sobre el contenido de prolina. En este estudio sólo se detectaron aumentos en los niveles foliares de prolina como consecuencia del estrés hídrico, y los efectos de la micorriza fueron variables. En inoculación conjunta con la cepa MG, la MA disminuyó los niveles de prolina, no apreciándose diferencias en función de si las plantas habían sido sometidas a estrés o no. En cambio, en inoculación conjunta con la cepa S, la micorriza produjo sólo un incremento en el contenido de prolina bajo condiciones de sequía. Este incremento se correspondería con un mejor ajuste osmótico en estas plantas (Ruíz-Lozano *et al.*, 1995). La disminución de los niveles de prolina en plantas micorrizadas, coinoculadas con la cepa MG, podría ser consecuencia de que estas plantas se afecten menos por el estrés (mejor tolerancia a la sequía), probablemente al presentar menor tamaño que las inoculadas con la cepa S, y por tanto al afectarse en menor grado acumulen menos prolina.

La actividad NR está presente en la mayoría de las plantas, especialmente cuando el nitrato es la fuente de N. Estudios previos mostraron que cuando la fuente de N se aplica en forma de NH_4NO_3, al cabo de aproximadamente 2 semanas, todo el NH_4^+ se había transformado en NO_3^-, luego los efectos que se observen en este trabajo a nivel de actividades NR se podrían atribuir al NO_3^- como tal. Además, Sarjala (1990) encuentra que el NH_4^+ no tiene efecto sobre la actividad NR ni "in vitro" ni "in vivo".

La reducción del nitrato tiene lugar tanto en tejidos verdes como en raíces, aunque es superior en hojas (Campbell, 1988), efecto que se observa en este estudio. El incremento en la actividad NR en plantas micorrizadas ha sido descrito tanto en parte aérea (Azcón *et al.*, 1992; Cliquet & Stewart, 1993; Azcón *et al.*, 1996; Ruíz-lozano & Azcón, 1996; Azcón & Tobar, 1998) como en raíces (Sarjala, 1991; Cliquet & Stewart, 1993; Azcón & Tobar, 1998). Este efecto parece atribuirse a la captación de nitratos por la MA y su subsecuente translocación a la planta, lo que incrementa la actividad NR (Azcón & Tobar, 1998). Azcón *et al.* (1996) y Ruíz-Lozano & Azcón (1996) descartan la posibilidad de que este efecto esté mediado por una mejora en los niveles de P en las plantas micorrizadas, ya que en plantas fertilizadas con P no se observó tal efecto.

El aumento de la concentración de NO_3^- en el medio, determina, como ya describió anteriormente Sarjala (1990; 1991), un aumento en la actividad NR. Llega un momento que esta actividad en raíces se satura al aumentar la concentración de NO_3^-, con lo cual el ión se transloca a hojas donde incrementa la actividad NR (Sarjala, 1991). Este efecto se puede comprobar observando las proporciones relativas de actividad NR en raíz y hoja, de modo, que mientras que en plantas control esta proporción no resultó afectada por el incremento en los niveles de N en el medio, en plantas micorrizadas, conforme aumenta el contenido de N, aumenta la proporción relativa de actividad NR en hoja, y disminuye en raíz. La capacidad de saturación de la raíz anteriormente mencionada, parece depender del endofito en cuestión, ya que mientras en plantas micorrizadas con *G. mosseae* la adición de N no incrementó la actividad NR en raíces, cuando éstas fueron micorrizadas con *G. fasciculatum* se observó la existencia de una correlación positiva entre N adicionado y actividad NR. A partir de 8 mM de N adicionado parece saturarse la actividad NR en raíces micorrizadas con este endofito. Este aumento de la actividad NR en raíz también podría ser debida al hongo *per se* (Ruíz-Lozano & Azcón, 1996; Azcón & Tobar,

1998) ya que se ha descrito expresión NR en el propio hongo de la MA (Kaldorf *et al.*, 1994; 1998). Estos resultados indicarían por tanto, bien una diferencia en la capacidad de saturación de NO_3^- en las raíces en función del endofito que las colonizara, o bien que diferentes hongos MA presentan diferente expresión de la actividad NR.

Del mismo modo que se observan alteraciones en la actividad NR, es lógico pensar que otras proteínas también resulten afectadas. Así, la micorrización incrementó el contenido proteíco, tanto en parte aérea como en raíz, aunque este aumento fué mas significativo en raíz. Mientras que en plantas control no se detectó modificación en la concentración de proteínas totales como consecuencia de la adición de N al medio, en plantas micorrizadas el aumento de N causó una disminución en el contenido de las mismas. Son muchos los autores que señalan un aumento en el contenido de proteínas en plantas micorrizadas (Berta *et al.*, 1995; Azcón *et al.*, 1996), efecto que se ha atribuido a las modificaciones fisiológicas inducidas en las plantas micorrizadas que determinan cambios en la expresión génica, pudiendo determinar bien la síntesis de nuevas proteínas solubles, o bien un aumento en la producción de proteínas, presentes también en las plantas sin micorrizar (Abdel-Fattah, 1990; Wyss *et al.*, 1990; Schellenbaum *et al.*, 1992).

El porcentaje de micorrización varió en función de diversos factores entre los que cabe destacar en primer lugar el tipo de endofito en cuestión. Otros factores que afectan el establecimiento de la simbiosis MA serán el cultivar (Ibijbijen *et al.*, 1996) y el régimen hídrico, no existiendo patrón definido. Se sabe que un determinado endofito puuede modificar sus patrones de colonización en función de toda una serie de variables. Un efecto especialmente significativo ocasionado como por el estrés hídrico es la existencia de una especie de fase de latencia en la actividad del hongo (tinción ALP) en los primeros estadíos de colonización, de modo que sólo una pequeña proporción del micelio intraradical mostró actividad ALP durante las primeras fases de micorrización.

En cualquier caso, la inoculación de *Rhizobium*, especialmente la cepa MG, no ejerció efecto adverso sobre el establecimiento de la simbiosis MA, pero tampoco mostró el efecto positivo descrito en los estudios realizados por Barea *et al.* (1996) y Tobar *et al.* (1996). La utilización de técnicas de tinción basadas en el uso de azul-tripan como colorante (Phillips & Hayman, 1970), que proporciona información sobre la cantidad de hongo MA total que coloniza la raíz, ofrece un modelo similar de colonización en el tiempo al descrito en múltiples ocasiones (Smith & Read, 1997). El uso de técnicas histoquímicas (tinciones vitales), permite observaciones que muestran nuevos aspectos relacionados con el comportamiento de cada cepa de *Rhizobium*. Así, un resultado destacable que se encontró en este estudio fué el hecho de que la cepa GM de *Rhizobium*, mantuviera viva (tinción SDH) una mayor proporción del micelio intraradical del hongo MA a lo largo de todo el experimento, y que este efecto fuera significativamente superior al inducido por la cepa S.

La nodulación fué superior en plantas micorrizadas, no existiendo efecto neto que determine que un endofito sea más efectivo que otro en este particular. No está claro si este efecto, ampliamente descrito en la literatura, es un efecto directo como consecuencia de la interacción *Rhizobium*-MA, o bien indirecto a través de cambios fisiológicos inducidos en el hospedador. En muchas ocasiones se ha atribuído a la mejor nutrición de P en plantas micorrizadas. Así el hecho de que la nodulación disminuya como consecuencia del estrés hídrico y el hecho de que microorganismos solubilizadores de P aumenten la nodulación en plantas sin micorrizar, podría ser un efecto indirecto de la disponibilidad de P, hecho que se relaciona con el nivel de P en plantas noduladas. Azcón & El-Atrash (1997) encuentran mayor nodulación en plantas micorrizadas que en aquellas fertilizadas con P, lo que sugirie la existencia de otra serie de mecanismos fisiológicos. Aunque el número de nódulos formados sobre las raíces va a variar en función del tipo de planta, se observó un patrón similar de nodulación, de modo que la cepa MG resultó ser más infectiva en la mayoría de los

ensayos realizados, resultado contradictorio con los encontrados por Tobar *et al.* (1996) y Toro *et al.* (1998) que describen una menor nodulación en raíces de plantas inoculadas con la cepa MG. La adición de N al medio de cultivo ocasionó descensos considerables en los niveles de nodulación, siendo esta inhibición más acusada cuanto mayor es la concentración de N en el medio (Hervás, 1988). El umbral de inhibición se situó en niveles más bajo para plantas micorrizadas (4 mM) que para controles (8 mM), efecto que se atribuye a la capacidad de captación de N a través del micelio externo de la MA, lo que da lugar a un contenido mayor de N en sus tejidos que en las plantas control, para un mismo nivel de N, lo que determina en definitiva una disminución de la nodulación.

La aplicación de las técnicas isotópicas basadas en el uso del ^{15}N, permite comprobar si un tratamiento determinado, por ejemplo la MA, influye en la nutrición nitrogenada a través de un aumento de la fijación de N o un aumento de la captación del mismo (Barea *et al.*, 1992). En este trabajo, los resultados correspondientes a ^{15}N no permiten vislumbrar el efecto de los distintos tratamientos aplicados sobre la fijación biológica de N_2, ya que como es sabido, para tal propósito en el caso de alfalfa se requieren tiempos de crecimiento largos que permitan apreciar de una dilución del isótopo, y por tanto los efectos del tratamiento sobre la fijación. Un exceso atómico de ^{15}N en plantas micorrizadas indica que la micorriza es capaz de captar N a través de sus hifas, como se ha descrito en numerosas ocasiones (Johansen *et al.*, 1993; 1994; Tobar *et al.*, 1994 a; 1994 b; Bago *et al.*, 1996; Villegas *et al.*, 1996).

Interacciones MA-Pseudomonas

Interacciones MA-*Pseudomonas*

Introducción

Las bacterias pertenecientes al género de *Pseudomonas* son las más frecuentes descritas entre las que actúan como PGPR. Normalmente mejoran el crecimiento vegetal de forma indirecta, antagonizando los efectos negativos de determinados organismos potencialmente fitopatogénicos en el entorno rizosférico. Por ello, y de acuerdo con Bashan & Holguin (1998) se les debe considerar "Biocontrol-PGPB" , es decir, bacterias capaces de promover el crecimiento vegetal gracias a su capacidad de control biológico frente a fitopatógenos.

Entre los mecanismos que operan en control biológico destacan, fundamentalmente, la producción de sideróforos que secuestran Fe^{3+} del medio, quedando éste no disponible para otros microorganismos, y la producción de sustancias antimicrobianas (mecanismo más común de control biológico), entre las cuales se han descrito la pirrolnitrina, la pioluteorina, el 2,4 diacetofluoroglucinol, la fenacina. Se ha demostrado que numerosas cepas de *Pseudomonas* son capaces de producir determinadas cantidades de antimicrobianos que resultan eficaces en cuanto a proteger a las plantas frente a enfermedades causadas por patógenos (Thomashow & Weller, 1988; Homma, 1994; Carruthers *et al.*, 1995). Bacterias mutantes en esta capacidad de síntesis no resultan eficaces como agentes de control biológico (Keel *et al.*, 1992). De otro lado, los mutantes, organismos genéticamente modificados, capaces de sobreexpresar o sobreproducir los antimicrobianos resultan especialmente interesantes desde el punto de vista de su uso como agentes de control biológico, al ser más efectivos que la cepa silvestre frente a la enfermedad o ataque del patógeno (Maurhofer *et al.*, 1992; Schnider *et al.*, 1994).

El hecho de que este tipo de microorganismos presenten actividad antagonista frente a un amplio rango de patógenos en suelo, fundamentalmente hongos, hace pensar en el posible efecto que pueden ejercer sobre otros hongos beneficiosos presentes en la mayoría de los suelos, como es el caso de los hongos de la micorriza arbuscular. Ello causaría un efecto negativo sobre el desarrollo y función de la simbiosis en determinados estadíos de la misma (Germida & Walley, 1996). Aún así no existen resultados consistentes que muestren tal efecto negativo, incluso se ha llegado a describir estimulación de alguno de los parámetros infectivos del hongo MA (Gryndler & Vosátka, 1996). Por otro lado, la micorriza podría producir una alteración en los niveles poblacionales de tales agentes de control biológico (Marschner & Crowley, 1996), probablemente como resultado de una modificación en la cantidad de exudados radicales y en la composición de los mismos, en las raíces micorrizadas (Linderman, 1992; Marschner *et al.*, 1997).

En este apartado se resumen experimentos orientados a estudiar varias cepas de *Pseudomonas* (cuyas características se recogen en la Tabla 4 del capítulo general de *Material y Métodos*) capaces de producir determinades cantidades de antimicrobianos, bien 2,4-diacetofluoroglucinol, o bien fenacina, en cuanto a su capacidad de persistencia en el entorno radical, en los efectos sobre el desarrollo y función de la MA, así como sobre la expresión de actividades enzimáticas en la rizosfera medida, concretamente esterasa, fosfatasa, quitinasa y trealasa.

Ensayos de interacciones

1. Microcosmos bajo condiciones controladas

1.1. Estudio del efecto de *P. fluorescens* F113Rif100 (S) y pAF3Tc50 (MG) sobre el desarrollo de la planta y la formación de micorriza por *G. mosseae*,

utilizando como modelo tomate, a dos estadíos del ciclo de cultivo (4 y 8 semanas).

Material y Métodos

Sistema y diseño experimentales

El experimento se diseñó con dos factores de variación. El primero, el factor MA, constaba de 3 tratamientos: Control sin micorrizar, inoculación con *G. mosseae* o con los endofitos naturales. El segundo factor fué la presencia o no de *Pseudomonas* con otros 3 tratamientos: inoculación con *P. fluorescens* F113Rif100 (cepa silvestre o S), *P. fluorescens* pAF3Tc50 (cepa modificada genéticamente o MG), y un control no inoculado. De los 9 tratamientos resultantes se prepararon 14 repeticiones, dando un total de 126 contenedores. Como contenedores se usaron bolsas negras de polietileno de 20.5 x 13.5 cm, con capacidad para 1 l de suelo.

Características del suelo

Se utilizó sustrato A pasteurizado.

Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos

Tomate fué la planta elegida para la realización de este experimento. Las semillas pregerminadas se transfirieron a los contenedores previamente preparados donde el suelo había recibido los tratamientos micorrícicos correspondientes. Se cultivó 1 plántula por contenedor.

Como inóculo de micorriza se adicionaron al sustrato 50 g por contenedor de un inóculo de *G. mosseae.*

Los inoculantes bacterianos (DO_{600} = 1, equivalente a $1x10^9$ ufc/ml) se aplicaron directamente en suelo y antes de plantar las semillas pregerminadas,

mezclado la suspensión bacteriana previamente obtenida con la proporción adecuada de suelo, resultando finalmente una concentración de 1 x 10^6 ufc/g suelo.

Determinaciones

Se realizaron dos cosechas, a las 4 y 8 semanas respectivamente, utilizándose la mitad de las repeticiones de cada tratamiento para cada cosecha (7 repeticiones/tratamiento/cosecha). Una vez cosechadas se determinaron el peso seco de parte aérea y raíces tras secar en un horno a 65ºC durante 48h, la longitud de raíz micorrizada (% micorrización) y el establecimiento de los inoculantes bacterianos empleados en la rizoplana, mediante la técnica de dilución y recuento en placas.

Resultados

En las Tablas 1 y 2 se muestran los resultados del análisis estadístico realizado con los datos obtenidos en los muestreos correspondientes a las 4 y 8 semanas de cultivo respectivamente. Las diferencias de cosecha observadas se deben exclusivamente al factor MA. La formación de micorriza dependió exclusivamente del endofito del que se tratara, y la inoculación con *Pseudomonas* no influyó en la infectividad del hongo MA. En cambio, la capacidad colonizadora y persistencia de los distintos inoculantes de *Pseudomonas*, va a depender tanto del factor MA, como del tipo de cepa empleado, así como de la interacción entre ambos factores. Los valores medios de los resultados obtenidos, tras 4 y 8 semanas de cultivo, para las variables de la planta y la micorriza, en cada tratamiento, se muestran en las Figuras 2 y 3, y para las variables del inoculante bacteriano en la Figura 4, donde además se aprecia la evolución de cada uno de los inoculantes a lo largo del tiempo.

Respuesta	Fuente de variación		
	MA	***Pseudomonas***	**MA x *Pseudomonas***
Variables de la planta			
Peso seco parte aérea	0,0001	0,3549	0,3543
Peso seco raíz	0,3529	0,5195	0,5979
Variables de la MA			
% micorrización	0,0001	0,4136	0,9038
Variables del inoculante			
log ufc/g raíz	0,0001	0,0001	0,0001
log ufc/raíz	0,0001	0,0001	0,0001

Tabla 1. Resultados de un ANOVA (valor P) de dos vías realizado para las distintas variables analizadas tras 4 semanas de crecimiento de plantas de tomate. El factor MA consiste en 3 tratamientos: sin micorriza, con *G. mosseae*, y con los endofitos naturales; el factor *Pseudomonas* consiste en tres tratamientos: sin *Pseudomonas*, con F113Rif100 y con F113Tc50.

Respuesta	Fuente de variación		
	MA	***Pseudomonas***	**MA x *Pseudomonas***
Variables de la planta			
Peso seco parte aérea	0,0078	0,8198	0,6843
Peso seco raíz	0,0001	0,1092	0,1325
Variables de la MA			
% mic	0,0001	0,5481	0,6734
Variables del inoculante			
log ufc/g raíz	0,0001	0,0001	0,0001
log ufc/raíz	0,0001	0,0001	0,0001

Tabla 2. Resultados de un ANOVA (valor P) de dos vías realizado para las distintas variables analizadas tras 8 semanas de crecimiento de plantas de tomate. El factor MA consiste en 3 tratamientos: sin micorriza, con *G. mosseae*, y con los endofitos naturales; el factor *Pseudomonas* consiste en tres tratamientos: sin *Pseudomonas*, con F113Rif100 y con F113Tc50.

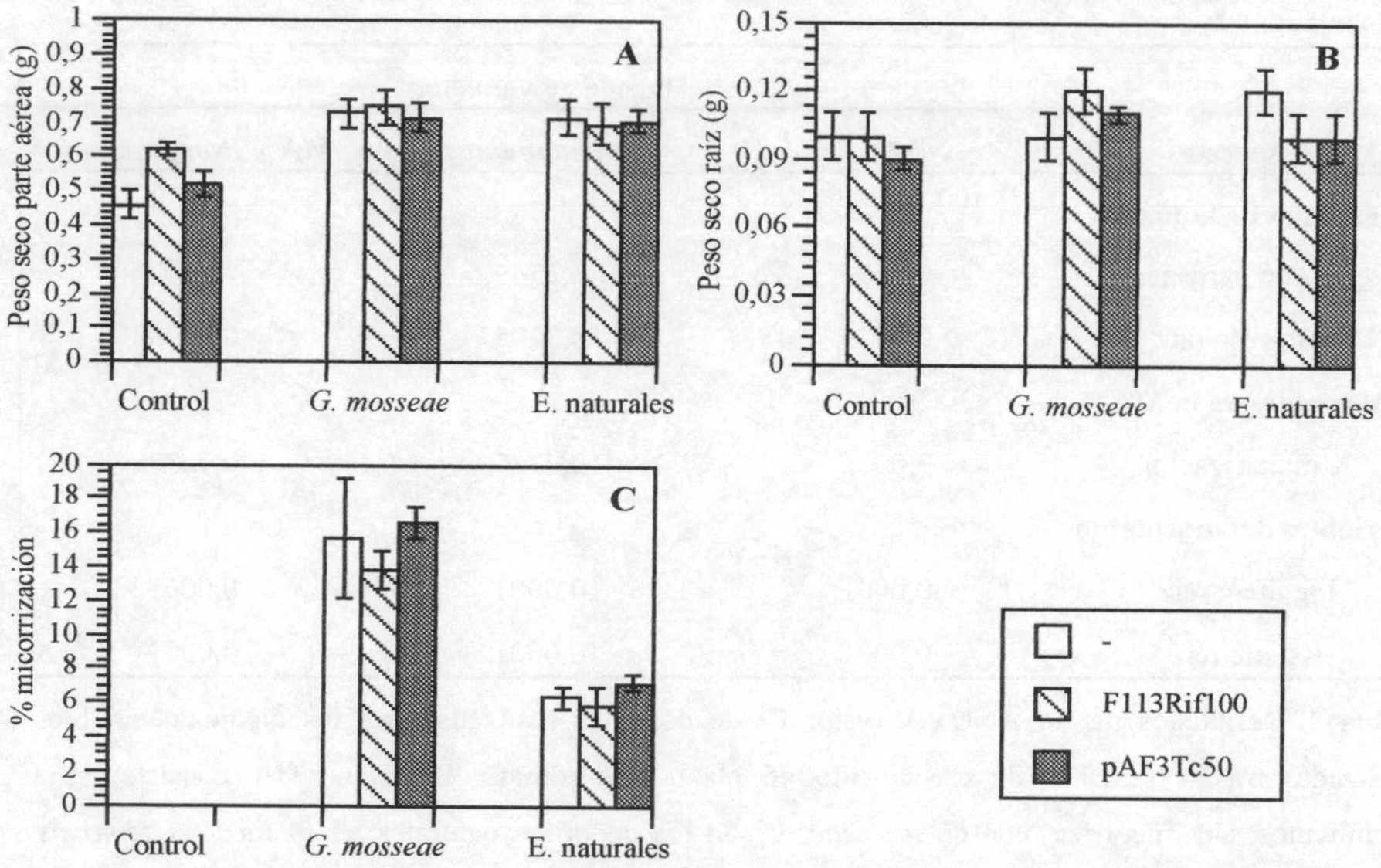

Fig. 2. Efecto de los distintos tratamientos investigados sobre la micorrización y el crecimiento de plantas de tomate tras 4 semanas de crecimiento. (A) Peso seco de la parte aérea, (B) Peso seco de la raíz, (C) % micorrización. Valores medios y "error estandard".

Se aprecia que la micorrización produjo mayor biomasa (parte aérea) vegetal, tanto a las 4 semanas como a las 8 semanas de crecimiento, independientemente del origen de los endofitos empleados (Fig. 2A y 3A). En cambio la micorrización no afecta el desarrollo de la raíz a las 4 semanas, o lo afecta negativamente a las 8 semanas de desarrollo (Fig. 3B).

La capacidad colonizadora del hongo de la micorriza tampoco se afecta, en ninguno de los casos, por la inoculación de *Pseudomonas* productoras de sustancias antifúngicas. Los valores de colonización fueron siempre mayores en raíces inoculadas con *G. mosseae* (Fig. 2C y 3C).

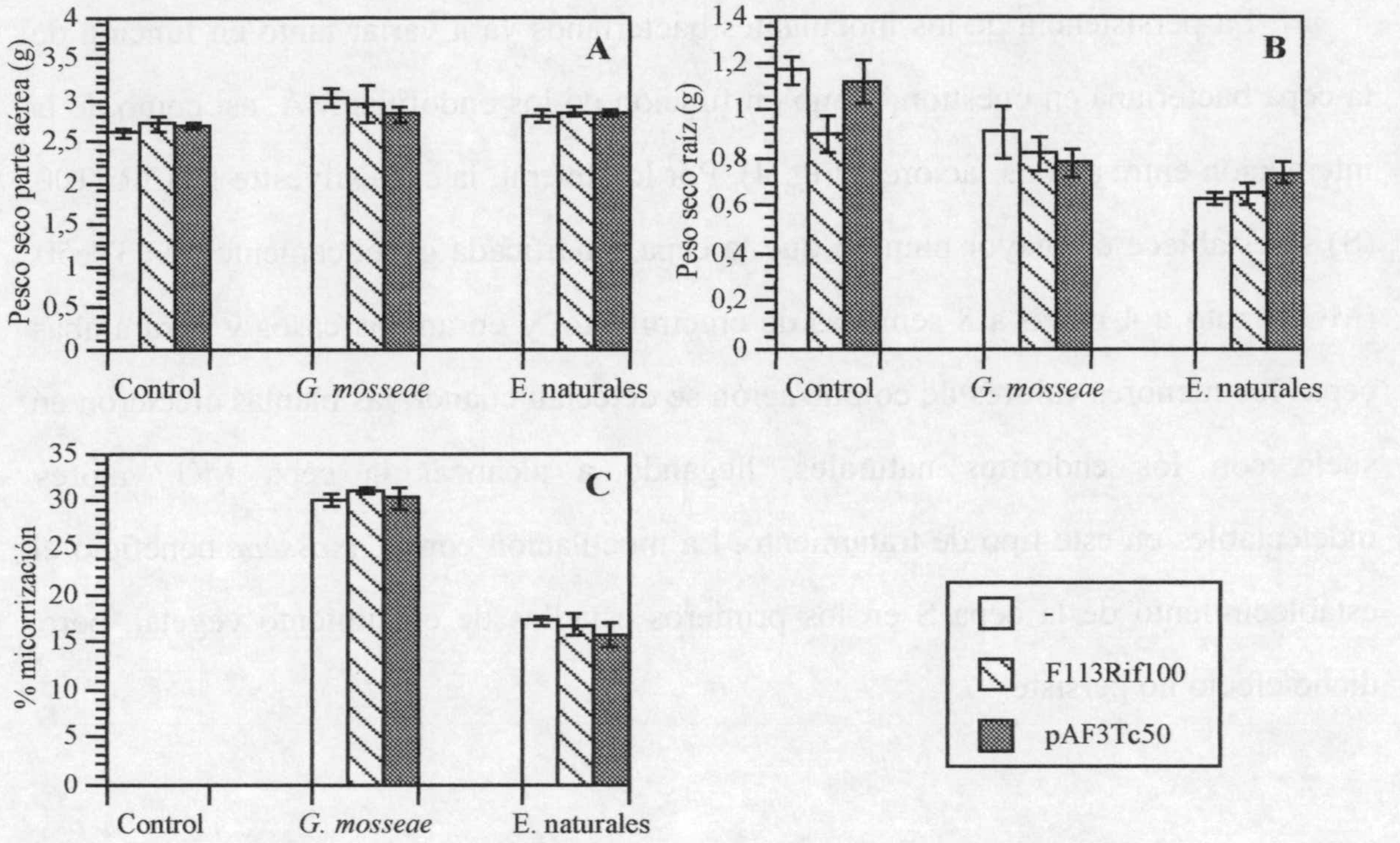

Fig. 3. Efecto de los distintos tratamientos investigados sobre la micorrización y el crecimiento de plantas de tomate tras 8 semanas de crecimiento. (A) Peso seco de la parte aérea, (B) Peso seco de la raíz, (C) % micorrización. Valores medios y "error estandard".

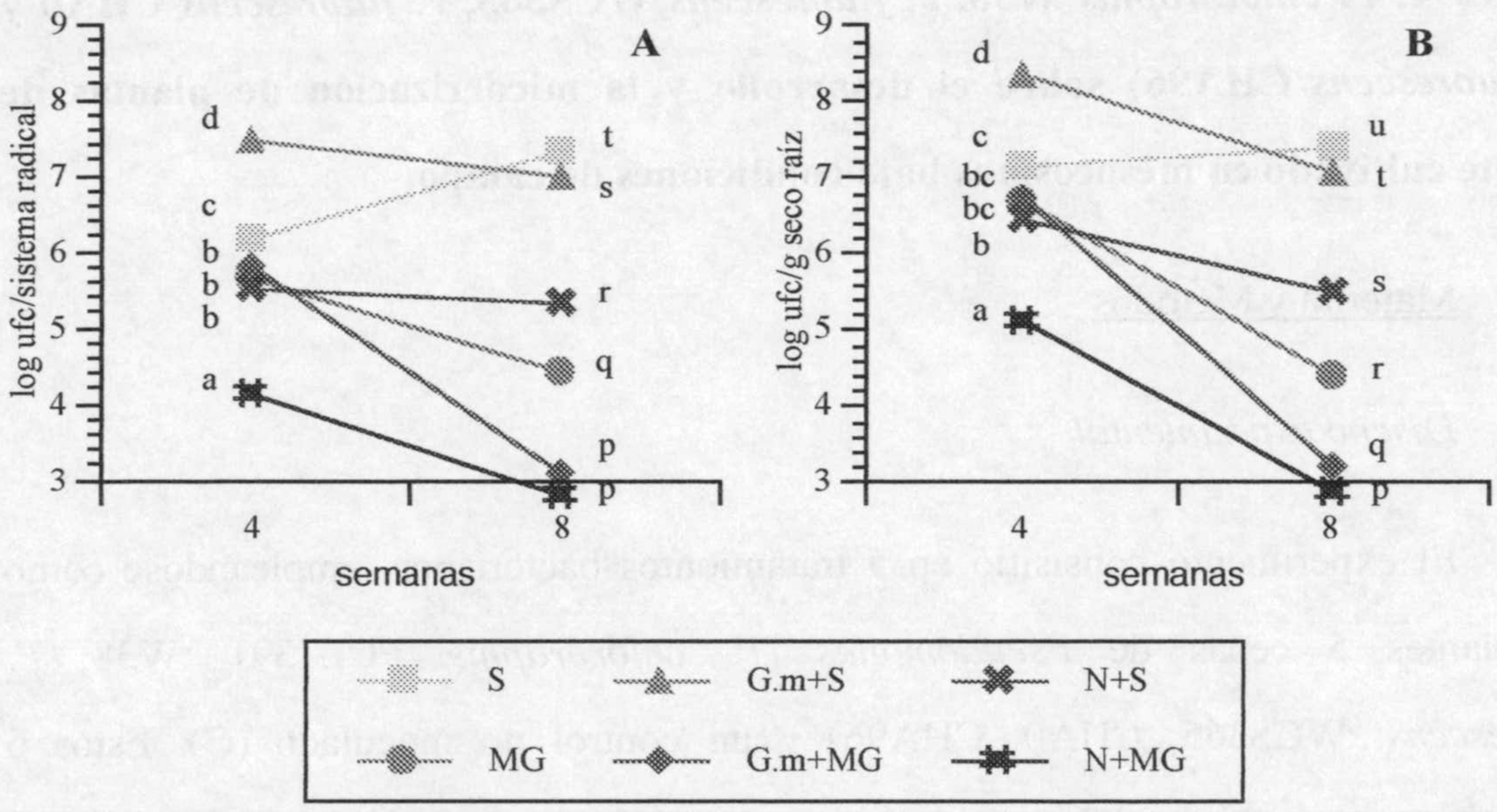

Fig. 4. Persistencia de los inoculantes de *Pseudomonas* empleados en los distintos tratamientos, donde S=F113Rif100; MG=pAF3Tc50; Gm=*G. mosseae*; N=endofitos naturales. (A) log ufc/sistema radical; (B) log ufc/g seco raíz. Valores que comparten la misma letra no son significativamente diferentes según "test" de las mínimas diferencias significativas (LSD)-Fisher para $P \leq 0.05$.

La persistencia de los inoculantes bacterianos va a variar tanto en función de la cepa bacteriana en cuestión, como en función de los endofitos MA, así como de la interacción entre ambos factores (Fig. 4). Por lo general, la cepa silvestre F113Rif100 (S) se establece en mayor número que la cepa modificada genéticamente pAF3Tc50 (MG), tanto a 4 como a 8 semanas de crecimiento, y en ambos casos y para ambas cepas los menores valores de colonización se detectan cuando las plantas crecieron en suelo con los endofitos naturales, llegando a alcanzar la cepa MG valores indetectables en este tipo de tratamiento. La inoculación con *G. mosseae* benefició el establecimiento de la cepa S en los primeros estadíos de crecimiento vegetal, pero dicho efecto no persiste.

2. Ensayos en mesosocosmos bajo condiciones de campo

2.1. Efecto de distintos inoculantes de *Pseudomonas* (*P. chlororaphis* PCL1391, *P. chlororaphis* W38, *P. fluorescens* WCS365, *P. fluorescens* CHA0 y *P. fluorescens* CHA96) sobre el desarrollo y la micorrización de plantas de tomate cultivado en mesocosmos bajo condiciones de campo.

Material y Métodos

Diseño experimental

El experimento consisitió en 5 tratamientos bacterianos, empleándose como inoculantes 5 cepas de *Pseudomonas* (*P. chlororaphis*: PCL1391, W38; *P. fluorescens*: WCS365, CHA0, CHA96) y un control no inoculado (C). Estos 6 tratamientos se replicaron 7 veces cada uno. Los 42 contenedores fueron distribuidos al azar en una parcela de 2.75 x 10.75 m^2.

Planta hospedadora y aplicación de tratamientos biológicos

La planta elegida para la realización de este experimento fué tomate. Las semillas pregerminadas fueron inoculadas con los tratamientos bacterianos correspondientes.

Los inoculantes bacterianos (DO_{600} = 1.0, equivalente a $1x10^9$ ufc/ml) se aplicaron directamente sobre las semillas resultando como media los valores que se indican en la siguiente Tabla:

	PCL1391	**W38**	**WCS365**	**CHA0**	**CHA96**
log ufc/semilla	6.50	6.13	5.61	5.96	5.72

Las semillas se inocularon inmediatamente antes de su siembra en los contenedores correspondientes.

Determinaciones

Se determinaron el peso y número de frutos, el peso seco de la parte aérea y raíces tras secar en un horno a 65ºC durante 96h, la extensión de la colonización radical del hongo MA, la población total de *Pseudomonas* en raíces, (el seguimiento de la población de los inoculantes empleados no se pudo realizar ya que sólo algunas de las cepas empleadas poseían un marcador característico que permitiera su reconocimiento), la población total de bacterias y hongos en suelo y las actividades enzimáticas esterasa, fosfatasa, quitinasa y trealasa, en suelo.

Resultados

Mientras que el desarrollo del sistema radical de la planta no se afecta por la acción de ninguno de los inoculantes bacterianos (Fig. 5B), el desarrollo de la parte aérea si que es afectado por dichos inoculantes, que en general ejercen un efecto positivo con respecto al control, aunque sólo las cepas W38 (*P. chlororaphis*) y

WCS365 (*P. fluorescens*) ejercieron beneficios estadísticamente significativos (Fig. 5A).

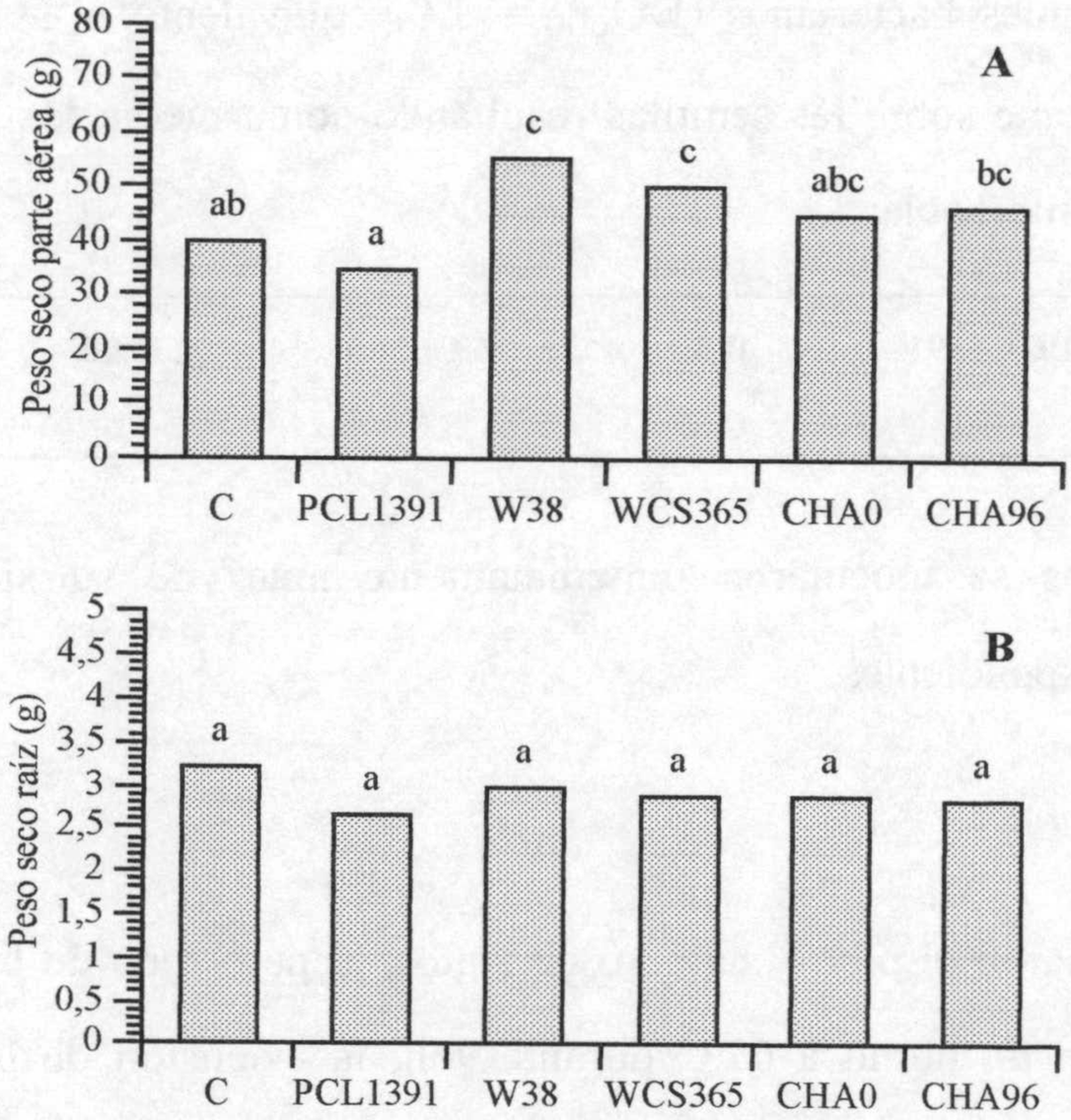

Fig 5. Efecto de distintos inoculantes de *Pseudomonas* en plantas de tomate tras 2 meses de crecimiento sobre (A) Peso seco de la parte aérea y (B) Peso seco de la raíz. Valores que comparten la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Fisher-LSD ($P \leq 0.05$).

La cosecha de frutos varió, en cuanto a número de frutos y porcentaje de plantas con fruto, en función de los distintos tratamientos aplicados. En la Figura 6 se expone el porcentaje de plantas que produjo un determinado número de frutos. Todos los tratamientos inoculados, a excepción de PCL1391, incrementaron la cosecha de frutos con respecto al control, efecto que está positivamente correlacionado con los incrementos observados en peso de parte aérea, aunque en este caso WCS365 y CHA0 fueron los más efectivos, siendo CHA0 el que presentó mejor relación

nºfrutos/planta y W38 el que dio una relación más baja. No se detectaron diferencias en cuanto a peso medio del fruto fresco en los distintos tratamientos, que fué de unos 8g por fruto.

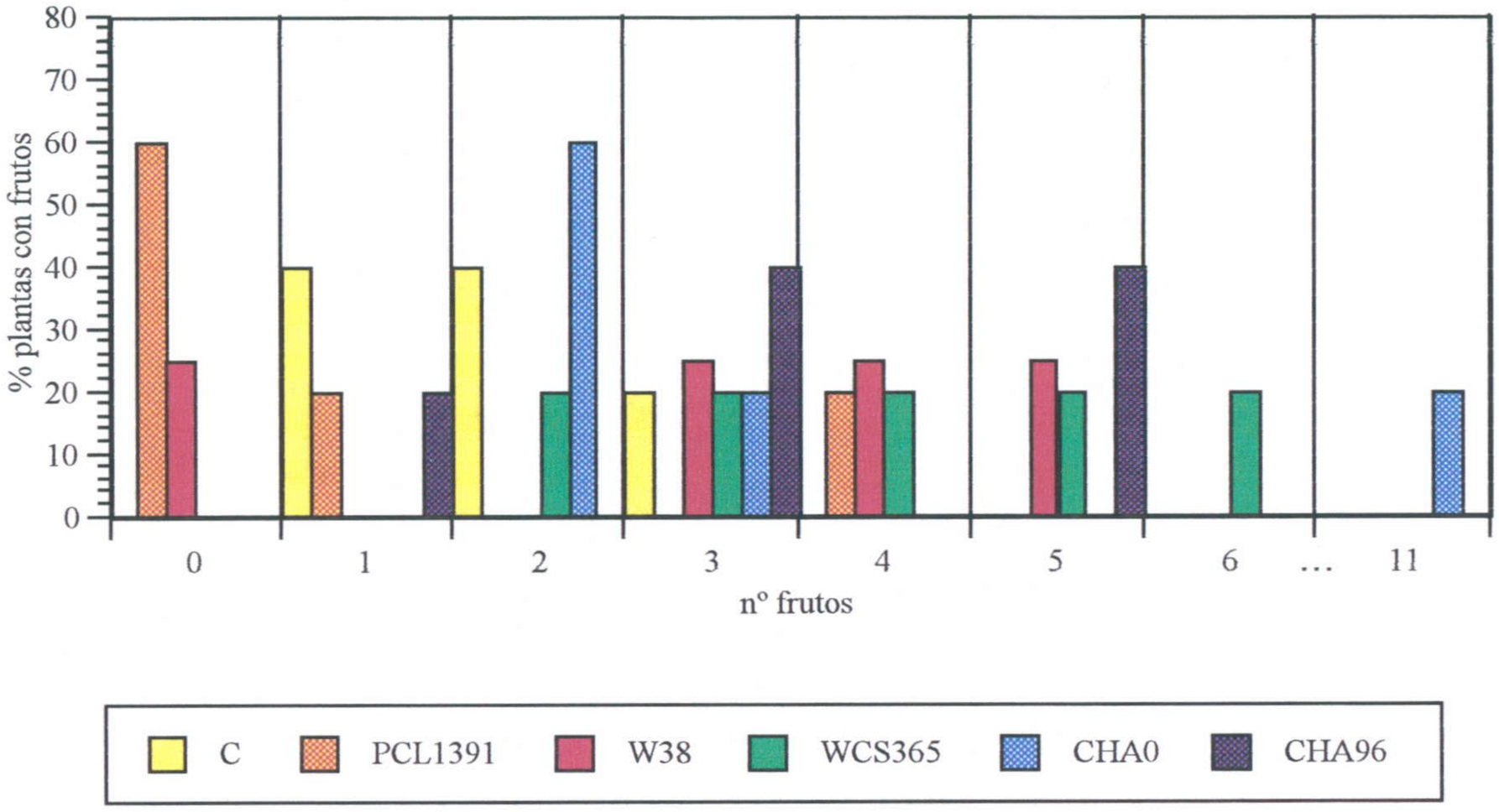

Fig.6. Efecto de los distintos tratamientos sobre el porcentaje de plantas con fruto y número de frutos en plantas de tomate tras 2 meses de cultivo.

La Figura 7A muestra los niveles de colonización de la rizoplana por *Pseudomonas* "totales", es decir, las inoculadas más las naturalmente presentes en el suelo. Se observa que la inoculación con *Pseudomonas* (antifúngicos) afectó negativamente a la colonización por *Pseudomonas* "naturales". Aunque no se pudo discriminar la cifra de los *Pseudomonas* "inoculados" que se estableció, es de suponer que en algunos casos (WCS365 y CHA0), fué suficiente para provocar un efecto positivo sobre la cosecha (producción de frutos), tal como muestra la Figura 6.

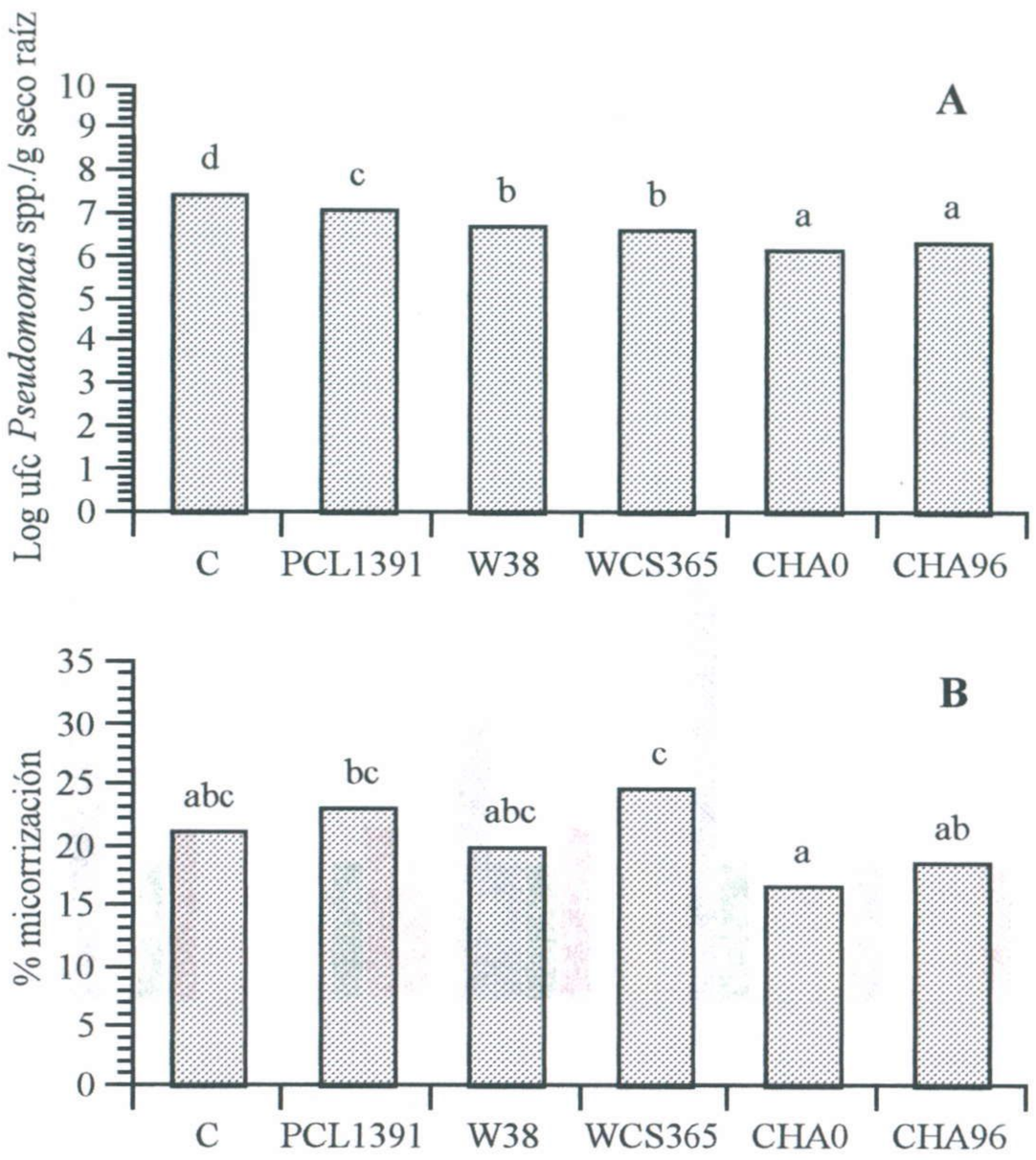

Fig 7. Efecto de distintos inoculantes de *Pseudomonas* tras 2 meses de crecimiento de plantas de tomate sobre (A) Log ufc *Pseudomonas* spp./g suelo seco y (B) % micorrización.

Los *Pseudomonas* inoculados no afectaron negativamente la micorrización de forma significativa, aún así las cepas CHA0 y CHA96 produjeron los valores más bajos de micorrización (Fig. 7B).

La población total de hongos y bacterias en suelo rizosférico no se modifica ni cuantitativa ni cualitativamente por la aplicación de los distintos inóculos de *Pseudomonas*. Los datos cuantitativos expresados como log ufc por gramo de suelo seco muestran valores en torno a 5 para hongos y 7 para bacterias.

A pesar de que no se detectaron diferencias cuantitativas ni cualitativas a nivel de poblaciones de microorganimos en suelo rizosférico, si se detectaron diferencias a nivel de enzimas claves de determinados procesos metabólicos en la rizosfera (Tabla

3). Así, las actividades quitinasa y trealasa, no se afectaron por ninguno de los inoculantes. La actividad quitinasa fué de 15-20 µg p-nitrofenol/g suelo seco, y la trealasa de 40-50 µg glucosa/g suelo seco. La actividad esterasa fué significativamente superior en suelo donde se había inoculado con WCS365. En cambio, la actividad fosfatasa fue superior en todos los tratamientos inoculados con *Pseudomonas*, siendo éste efecto significativo para los *Pseudomonas* PCL1391, WCS365 y CHA0 (Tabla 3).

	Esterasa (µg fluoresceína/g seco suelo)	**Fosfatasa** (µg p-nitrophenol/g seco suelo)
C	134,60 ab	214,33 a
PCL1391	121,46 a	236,71 b
W38	136,22 abc	232,55 ab
WCS365	170,92 c	248,44 b
CHA0	161,76 bc	235,43 b
CHA96	151,53 abc	233,50 ab

Tabla 3. Efecto de distintos inoculantes de *Pseudomonas* tras 2 meses de crecimiento de plantas de tomate sobre actividades enzimáticas esterasa y fosfatasa en suelo rizosférico.

Discusión

Algunos estudios muestran efectos negativos de la inoculación de *Pseudomonas* sobre la MA (Dhillion, 1992; Nehl *et al*., 1996; Waschkies *et al.*, 1994), otros en los que no se aprecian efectos (Andrade *et al*., 1998c; Burla *et al*., 1996; García-Garrido & Ocampo, 1989; Paulitz & Linderman, 1989) y otros que encuentran estimulación de la simbiosis MA (Gryndler & Vosatka, 1996; Vosatka & Gryndler, 1999). En este trabajo, todas las cepas de *Pseudomonas* empleadas habían

mostrado, en estudios anteriores, capacidad de actuación como agentes de control biológico, con lo cual podía ocurrir que antagonizaran no sólo al hongo patógeno, sino también a los micorrícicos, como consecuencia de la producción de compuestos antifúngicos. Pero en ninguno de los casos estudiados se detectó efecto antagonista significativo sobre la formación de MA. Sólo se detectó una pequeña disminución, aunque no significativa, en el porcentaje de micorrización de raíces cuando se inoculó con *P. fluorescens* CHA0, que en principio podría atribuirse a la gran variedad de metabolitos con capacidad antifúngica que es capaz de producir la cepa en cuestión (2-4, diacetofluoroglucinol, pioluteorina, CNH), los cuales podrían actuar conjuntamente ocasionando ligeras disminuciones en el porcentaje de raíz colonizada por el hongo.

Los ensayos realizados ponen de manifiesto que la inoculación con *Pseudomonas* tanto silvestres como modificados genéticamente, sólo supuso incrementos de la parte aérea en el caso de determinados inoculantes, y en ninguno de los casos se observó efecto negativo de la inoculación. Sorprendentemente, y a diferencia de lo que señalan otros autores (Gryndler & Vosatka, 1996), los incrementos en la producción de parte aérea se detectaron cuando se emplearon cepas no productoras de antibióticos, como es el caso de las cepas W38 y WCS365, pudiendo hablarse de un efecto estimulador directo de la bacteria independientemente de la producción de antibiótico, como ya describieron anteriormente Carruthers *et al.* (1995) en ausencia de fitopatógeno. En cambio, si la variable a considerar es la producción de frutos, fueron las cepas capaces de inducir resistencia sistémica (WCS365 y CHA0) las más efectivas, probablemente como consecuencia de una mejora en el estado fisiológico de la planta.

Numerosos autores (Gryndler & Vosatka, 1996; Siddiqui & Mahmood, 1998; Vosatka *et al.*, 1992; Vosatka & Gryndler, 1999) señalan la existencia de efectos sinérgicos de la doble inoculación MA-*Pseudomonas*, que suponen un aumento en el

desarrollo de las plantas. En el presente estudio, nunca se detectaron tales efectos sinérgicos, aunque tampoco se observaron efectos antagónicos.

La micorrización produjo aumentos en la relación parte aérea/raíz (PA/R) en plantas crecidas en microcosmos, lo que indica una mayor retención de fotosintatos en la parte aérea. Es el efecto bien conocido del aumento en la captación de P, y su utilización en la parte aérea, lo que implica utilizar allí productos de la fotosíntesis (Barea *et al.*, 1997).

Del mismo modo que la inoculación de *Pseudomonas* podría afectar al desarrollo de la MA, ésta, bien directamente a través de sus propios exudados, o bien indirectamente a través de la modificación en los exudados radicales, o por competición por C, podría estimular o inhibir la colonización y establecimiento de los inoculantes (Paulitz & Linderman, 1989). La mayoría de los estudios realizados describen una disminución tanto de la población de *Pseudomonas* inoculadas (García-Garrido & Ocampo, 1989; Marschner & Crowley, 1996; Paulitz & Linderman, 1989) como de la población de *Pseudomonas* fluorecentes naturales (Posta *et al.*, 1994; Waschkies *et al.*, 1994), como concecuencia de la micorrización. En el presente trabajo se detectó una estimulación inicial en el establecimiento del inoculante en plantas micorrizadas. Sin embargo, a lo largo del tiempo, la micorrización, especialmente los hongos naturales (autóctonos), induce un descenso de la colonización radical por los *Pseudomonas* inoculados. Ello indica un cambio cuanti o cualitativo en la producción de exudados radicales como consecuencia de una mayor colonización radical del hongo MA, lo que afectaría al establecimiento de determinadas rizobacterias. Otra posible explicación podría ser que el inóculo MA, aporta otras bacterias capaces de competir por sitios de colonización con el inoculante, que determinaría que aquellas raíces no micorrizadas presentaran, por tanto, mayor densidad del inoculante, sin embargo estas hipótesis no fueron probadas. Weller & Thomashow (1994) citan descensos graduales en la población del

inoculante, que pueden llegar a alcanzar hasta 5 órdenes de magnitud. En este estudio se llegaron a disminuir casi 4 órdenes de magnitud, siendo la cepa MG la que más acusó éste descenso poblacional, con lo cual no se puede considerar, que la producción de antibiótico o acumulación de metabolitos secundarios por parte de la bacteria contribuya a su competencia ecológica, y por tanto a su colonización radical en este estudio, como ya describieron anteriormente Carroll *et al.* (1995) y Fenton *et al*. (1992).

La población total de *Pseudomonas* fluorescentes en rizoplana disminuyó como consecuencia de la inoculación de *Pseudomonas*. Este efecto se podría explicar en términos de competitividad como consecuencia de la eficiente capacidad colonizadora y por tanto mayor capacidad competitiva de las cepas en cuestión, descrita para el caso de la cepa WCS365 (Simons *et al*., 1996), que disminuiría la colonización por otras cepas autóctonas. No se encontró en este estudio relación entre disminución en la capacidad de producción del antibiótico y disminución de la población indígena de *Pseudomonas* fluorescentes como describieron Andrade *et al.* (1998c), que relacionaron la producción de antibiótico con una alteración del metabolismo de la planta, que aumentaría la permeabilidad celular de la raíz, con lo cual aumentaría la exudación radical, y por tanto la cantidad de C disponible en la rizosfera, pudiendo aumentar el establecimiento de determinados grupos como las *Pseudomonas* fluorescentes.

El número total de bacterias y hongos cultivables en rizosfera no se afectó como consecuencia de la inoculación con *Pseudomonas*, ya que estos inoculantes se encontraron fundamentalmente en rizoplana, y en rizosfera probablemente representaran un porcentaje muy bajo con respecto al total del bacterias cultivables, como encuentran Moenne-Loccoz *et al.* (1998) en un estudio donde el inoculante de *Pseudomonas* tras 3 meses de cultivo llegó a representar el 0.1% del total de bacterias aeróbicas cultivables, lo que no impidió su función como agente en control biológico.

Aunque no se detectaron cambios cuantitativos, ni aparentemente cualitativos, en el número de microorganismos totales, éstos cambios debieron de producirse como consecuencia de la inoculación, quedando reflejados en las diferencias observadas en determinadas actividades enzimáticas en la rizosfera. La actividad fosfatasa fué superior en rizosfera de plantas inoculadas, especialmente con *Pseudomonas* sobreproductoras de metabolitos secundarios. WCS365, a pesar de que no produce metabolitos secundarios (Bloemberg, comunicación personal), mostró las mayores actividades esterasa y fosfatasa. Este aumento en las actividades catabólicas debería suponer una mayor disponibilidad de nutrientes para las plantas, y por tanto manifestarse los efectos observados en suelo a nivel de producción vegetal, aunque esto sólo se manifestó para WCS365, luego deberán existir otro tipo de interacciones, ya que se observaron mejoras en el desarrollo vegetal, aunque no se detectaron actividades significativas en suelo (W38), o bien no había efecto sobre el crecimiento mientras que ocurría mayor actividad catabólica en suelo (CHA0).

Ensayo de campo

Experimento de campo

Introducción

Como se indicó anteriormente, la aplicación como inoculantes de microorganismos beneficiosos, con funciones tales como biofertilizantes, fitoestimuladores o agentes de control biológico, es un aspecto de gran interés en el contexto de agricultura sostenible. La manipulación genética de esos microorganismos (OMG) con el fin de mejorar, incrementar o incluso introducir un carácter deseable, conduce a la obtención de inoculantes más eficaces. Sin embargo la aplicación de tales inoculantes, modificados genéticamente, podría tener consecuencias no sólo de tipo ético, sino también tener efectos a medio o largo plazo sobre el hombre y el medio ambiente. Se hace necesario, por tanto, evaluar el riesgo de introducir esos microorganismos en agrosistemas.

Debido a ello, existe una regulación específica para la liberación de OGMs al medio ambiente, siendo necesaria la realización de pruebas rigurosas, previas a la liberación del organismo al medio, que aseguren la inocuidad del mismo. Una vez realizadas pruebas previas en laboratorio, invernadero, etc, habrá que contrastar la aplicación del inoculante en condiciones de campo.

Dada la importancia de las micorrizas arbusculares tanto en sistemas manipulados por el hombre (agrosistemas) como ecosistemas, donde juegan un papel clave en ciclos de nutrientes, conservación de la estructura del suelo, mejora de las condiciones nutricionales y de salud de las plantas, etc, estos hongos van a ser un "blanco" obvio para estudiar las consecuencias que la aplicación de inoculantes, especialmente aquellos obtenidos con microorganimsos modificados genéticamente, pueden tener en un sistema en cuestión (Barea *et al.*, 1996; 1997). Es decir, se ha

considerado a los hongos MA como "controles" para el estudio de la seguridad de la aplicación de los microorganismos al medio.

El objetivo del experimento de campo que aquí se describe será evaluar como determinadas prácticas agronómicas normales (rotación de cultivos y aplicación de fungicidas) y la inoculación de *Pseudomonas*, productoras de compuestos antifúngicos, y *Rhizobium* tanto silvestres (S) como modificadas genéticamente (MG), pueden afectar a la estructura de las poblaciones de estos hongos, así como al establecimiento, desarrollo y función de las simbiosis micorrícica. Es decir, estructura y función de las poblaciones naturales de los hongos de la MA. Para ello se propuso la realización de un experimento en condiciones de campo utilizando un sistema de cultivo basado en la rotación veza-maíz-veza. En la primera fase de rotación (veza) se analizó la homogeneidad del terreno, tanto desde el punto de vista físico-químico, como en sentido biológico a través del estudio de las poblaciones de hongos de la MA. Es decir, se determinó el estadío basal de dichas poblaciones, previa a la rotación del cultivo y a la aplicación de los inoculantes. La fase de cultivo de maíz implicará la utilización de inoculantes basados en *Pseudomonas*, y la última rotación de veza, cuyos resultados no se mostrarán en este trabajo dada la extensión de la experiencia, implicará la utilización de inoculantes de *Rhizobium*, bien de forma individual, o bien de forma conjunta con los *Pseudomonas* anteriormente utilizados.

Ensayos de campo

1. Descripción de la parcela experimental

La parcela experimental está situada en la finca experimental de la EEZ (CSIC, Granada) y tenía unas dimensiones de 19 x 47 m^2. El suelo presentó las características correspondientes al suelo A (Apartado 1, Capítulo *Material y*

Métodos). En la parcela se había cultivado alfalfa varios años. Una vez cosechada la alfalfa se practicaron diversas labores de homogeneización con rotavator, quedando preparado el suelo para el experimento que aquí se describe. En la Figura 1 se muestra el esquema experimental a lo largo del tiempo de desarrollo de este ensayo en campo.

2. Muestreos previos a la utilización de inoculantes: Estudios de homogeneidad de la parcela.

Material y Métodos

En primer lugar se estudió la posible homogeneidad o no de la parcela experimental en cuanto a su población de hongos MA. También se analizaron las características físico-químicas del suelo, con objeto de poder dilucidar si posibles variaciones posteriores se debían o no a algún factor de variación inicial.

Así, la parcela se dividió en 18 microparcelas de 6.3 x 7.8 m^2, tal como se puede ver en la Figura 2. En cada muestreo se tomaron 9 muestras de 9 puntos distintos de cada microparcela, las cuales se mezclaron para dar una única muestra por microparcela. Los muestreos se realizaron a 3 tiempos distintos: (a) con el suelo desnudo, una vez cosechada la alfalfa y homogeniezado (rotavator) el terreno (Noviembre '97, muestreo nº 1 Fig. 1), tras lo cual se sembró veza; (b) y (c) a intervalos de tres meses tras la siembra de veza (Febrero '98, muestreo nº 2 Fig. 1; Mayo '98, muestreo nº 3 Fig. 1). En cada muestreo se analizaron número y tipos de esporas, análisis físico-químico del suelo (sólo en muestreo nº 1) y porcentaje de micorrización en las raíces de plantas de veza. Las muestran se tomaron de la zona más superficial (eliminando los 3 primeros cm) hasta unos 20 cm de profundidad, al ser en esta zona los propágulos de MA más abundantes y frecuentes (Germida & Walley, 1996).

UNIVERSIDAD DE GRANADA
2 8 JUN. 1999
COMISION DE DOCTORADO

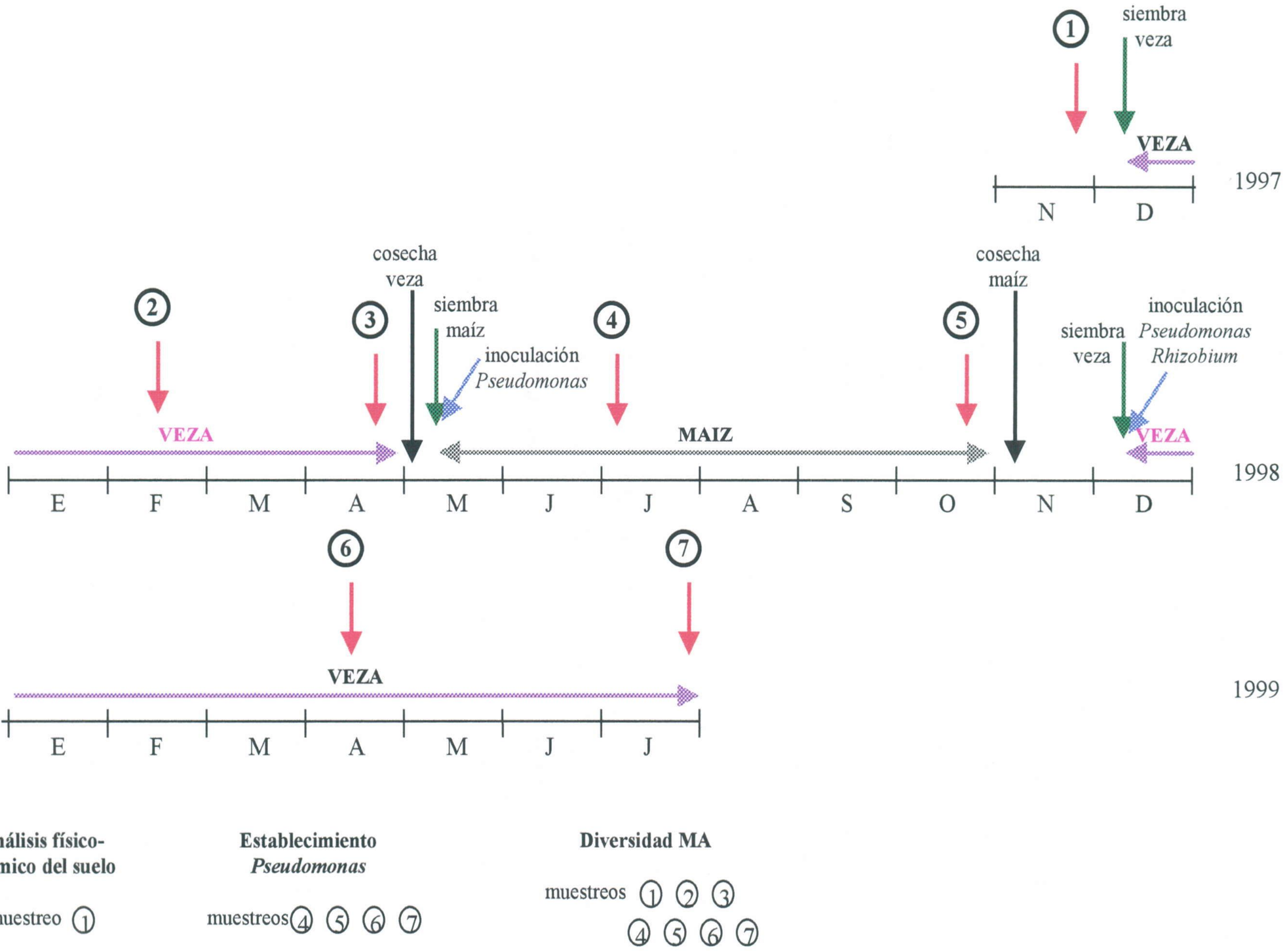

Fig. 1. Esquema de siembra, inoculación y muestreo

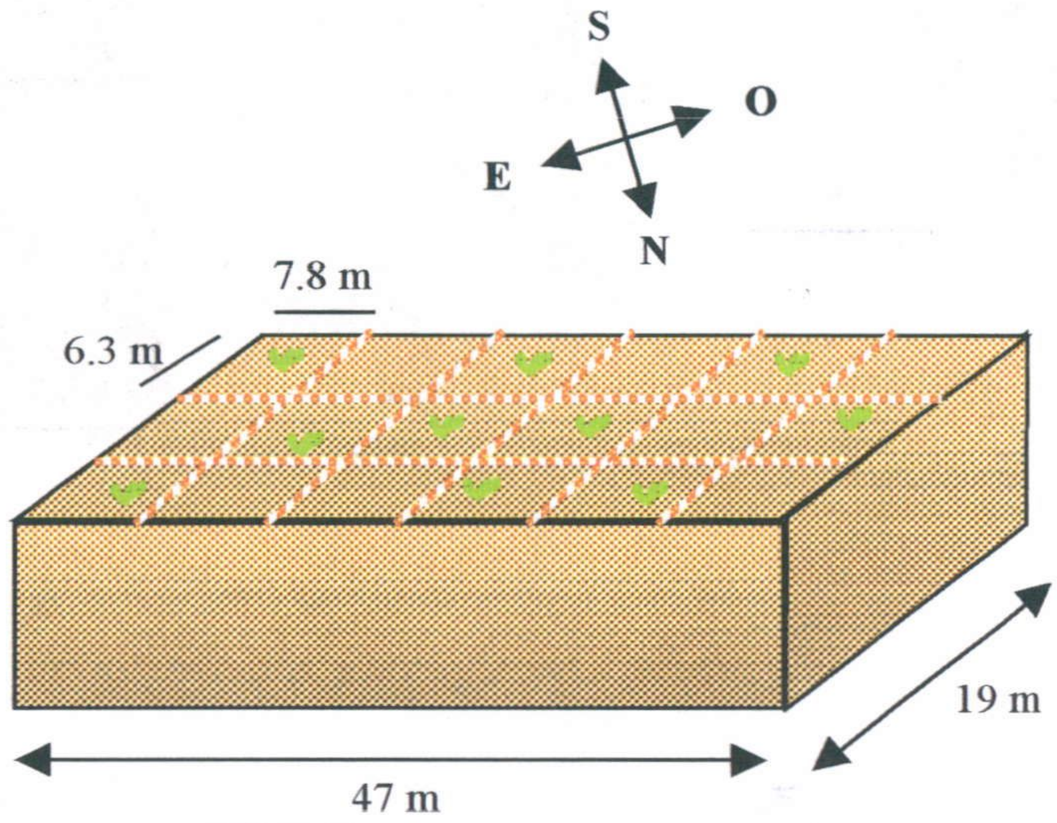

Fig. 2. Diagrama de la parcela experimental y diseño demuestreo para el estudio de las poblaciones de hongos de MA, así como de las propiedades físico-químicas del suelo.

El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA de 2 vías) teniendo en cuenta bloques de seis elementos tanto en el sentido longitudinal, como transversal, lo que permite ver si existen diferencias en función de la orientación en cada microparcela.

Resultados

El análisis de las propiedades físico-químicas del suelo, reveló que no existían diferencias entre las distintas microparcelas. Los valores medios de las distintas variables analizadas a este respecto se recogen en el Apartado 1 del Capítulo *Material y Métodos*.

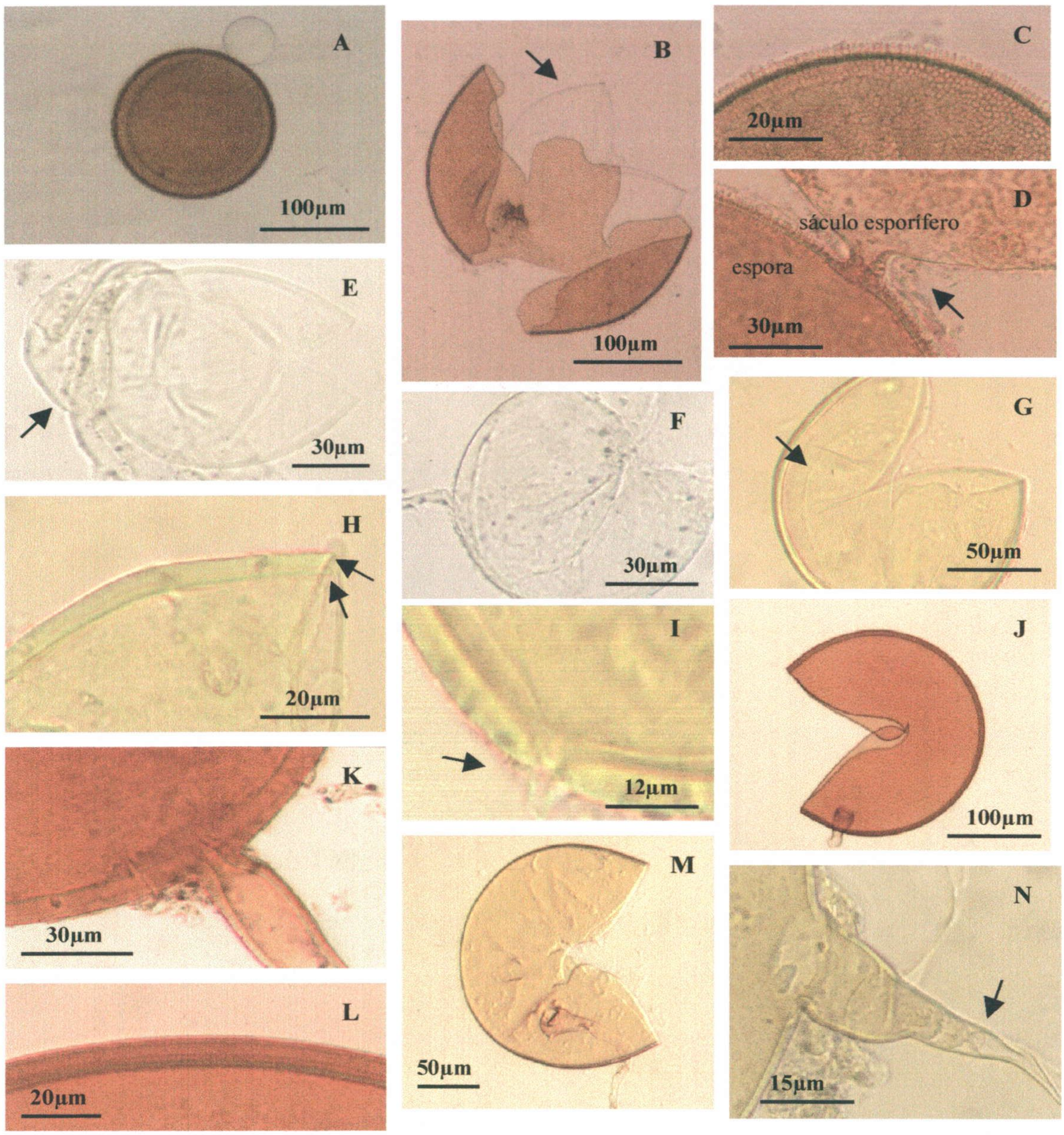

Figura 3. Fotografías de los distintos tipos de esporas encontrados en la parcela experimental: ***E. infrequens:*** (A) espora intacta, (B) pared interna flexible, (C) ornamentación de la pared a base de espinas vacuoladas, (D) detalle de la unión de la espora al sáculo esporífero; ***Glomus*** **sp1:** (E) detalle de la capa externa, que tiende a formar pliegues y arrugas, separándose fácilmente de la capa interna (hialina), suele presentar adherido restos orgánicos, (F) tamaño relativo de la hifa respecto a la espora; ***Glomus*** **sp2**: (G) capa interna flexible, (H) capas externas, (I) hifa de sustentación; ***Glomus*** **sp3**: (J) espora, (K) estructura de la hifa de sustentación, (L) estructura de la pared de la espora; ***G. mosseae***: (M) espora, (N) detalle de la hifa de sustentación, donde se puede apreciar el septo curvado.

Los resultados correspondientes a número de esporas, morfotipos correspondientes, riqueza media en especies, índice de diversidad y porcentaje de raíces micorrizadas se representan en las Figuras 4-8, donde se esquematiza la parcela experimental divida en microparcelas, a cada una de las cuales se le asigna una trama de color de distinta intesidad en función del valor del dato obtenido. A la derecha de cada fila se representa el valor medio de los datos obtenidos por fila, y debajo de cada 2 columnas el valor medio por bloque formado por cada 6 elementos. A la derecha de cada valor aparece su estadístico correspondiente en función del análisis realizado, por filas, o por bloques. En ninguno de los casos se detectaron efectos de la interacción filas x bloques en un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías. En la Figura 3 se muestran fotografías de los distintos tipos de esporas encontrados en un tamaño de muestra considerado como representativo (200 g de suelo en este caso).

De los diferentes tipos de esporas encontradas, dos de ellas se han clasificado como *E. infrequens* y *G. mosseae*, poco frecuente la primera, como su nombre indica, y prácticamente presente en la mayoría de los suelos la segunda. A diferencia de lo que ocurre con otros ecotipos de *G. mosseae*, en este caso nunca se detectó la presencia de esporocarpos. El resto de esporas encontradas no se han podido clasificar a nivel de especies, ya que aún no se han obtenido cultivos trampa donde halla resultado exitosa la producción de esporas y colonización de la raíz por el hongo, aunque las características morfológicas, especialmente de la hifa de sustentación, hacen catalogarlas como *Glomus* sp, seguido de un número del 1-3 para diferenciarlas.

El estudio de las poblaciones de hongos de la MA (esporas presentes en suelo) tras el primer muestreo, realizado en suelo de barbecho, puso de manifiesto la existencia de diferencias tanto a nivel cuantitativo como cualitativo en función de la orientación de la parcela. Así la zona situada más al sur poseía menos número de esporas que en el resto de las zonas (Fig. 4A). Se observó la misma tendencia en la

densidades relativas de *E. infrequens* y *Glomus* sp1, en cambio *Glomus* sp2 presentó una distribución totalmente opuesta, siendo su densidad relativa mayor en la zona orientada al sur (Fig. 5). A pesar de estos resultados no se detectaron diferencias en riqueza media de especies (Fig. 6A), ni en índice de diversidad (Fig. 7A).

La siembra de veza en el suelo de cultivo atenuó las diferencias detectadas en un primer muestreo. Aunque ya no existen variaciones en cuanto al número total de esporas en función de la zona de la parcela (Fig. 4B y 4C), aún continúan observándose las mismas tendencias referentes a distribución de los distintos tipos, con respecto al muestreo nº1, diferencias que terminan por desaparecer totalmente tras el muestreo nº3 (Fig. 5), donde ya se puede considerar la parcela totalmente homógenea en lo referente a hongos MA. Tampoco se detectaron diferencias a nivel de capacidad colonizadora de los hongos MA en ninguno de los tiempos muestreados (Fig. 8).

Estos resultados indican que tras el cultivo de veza se disponía de una parcela muy homogénea desde el punto de vista de la distribución, riqueza y diversidad de hongos MA.

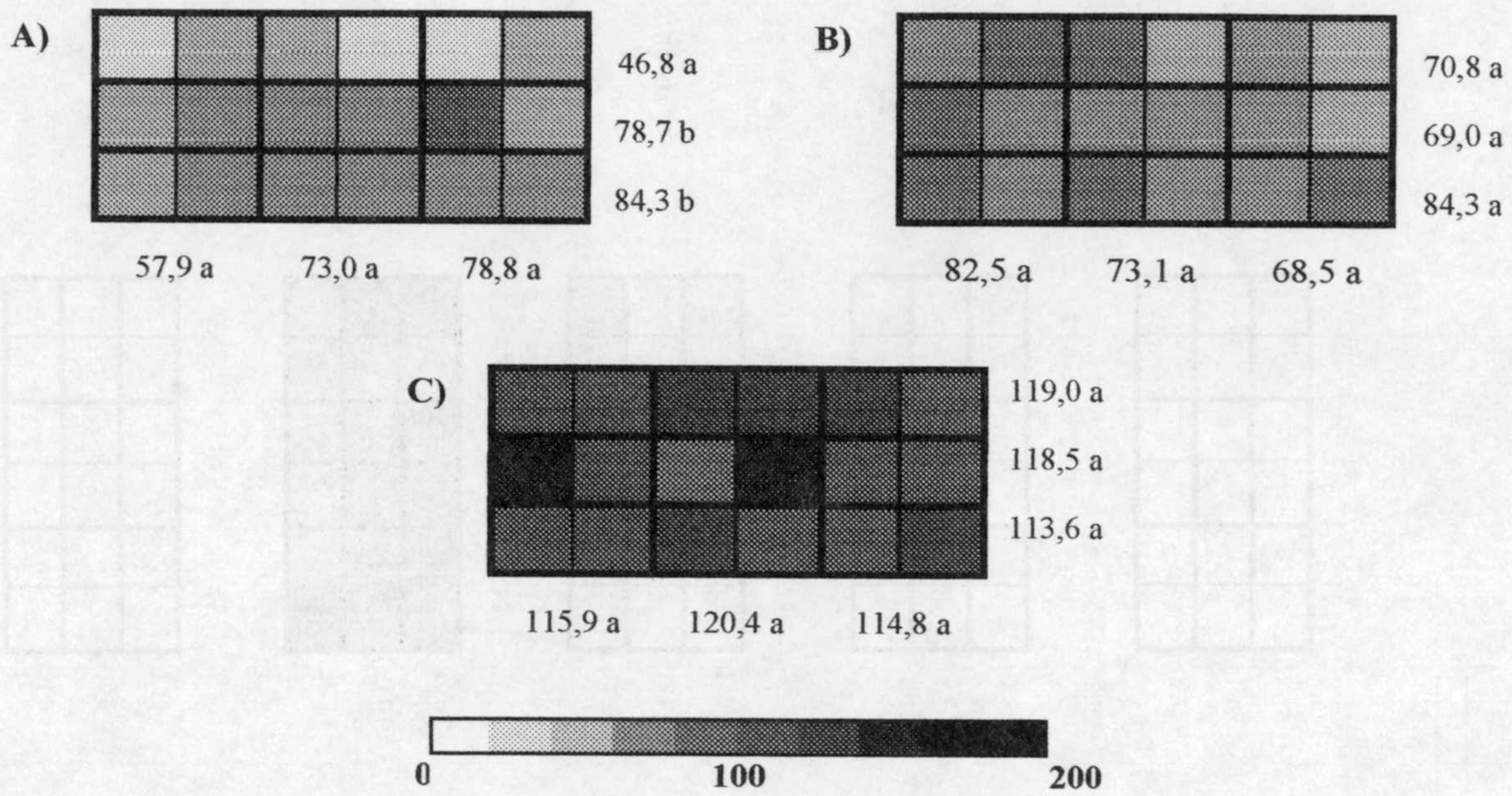

Fig. 4. Número total de esporas en la parcela experimental en diferentes tiempos de muestreo. (A) Diciembre '97, (B) Febrero '98, (C) Mayo '98. Valores de una misma fila o columna que comparten la misma letra no son significativamente diferentes según test LSD-Fisher para $P \leq 0.05$.

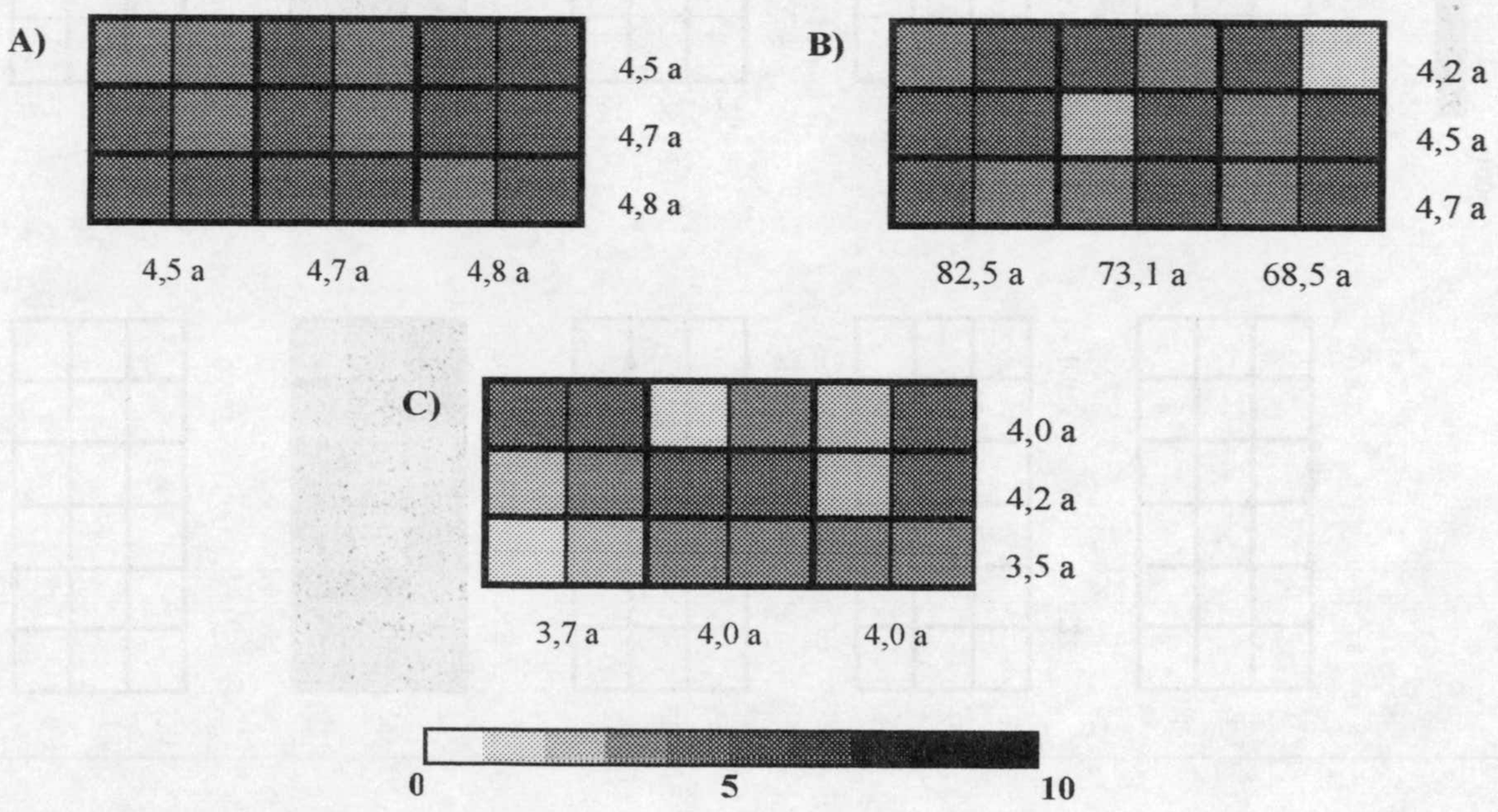

Fig. 6. Riqueza media de especies de hongos MA en la parcela experimental en diferentes tiempos de muestreo. (A) Diciembre '97, (B) Febrero '98, (C) Mayo '98. Valores de una misma fila o columna que comparten la misma letra no son significativamente diferentes según test LSD-Fisher para $P \leq 0.05$.

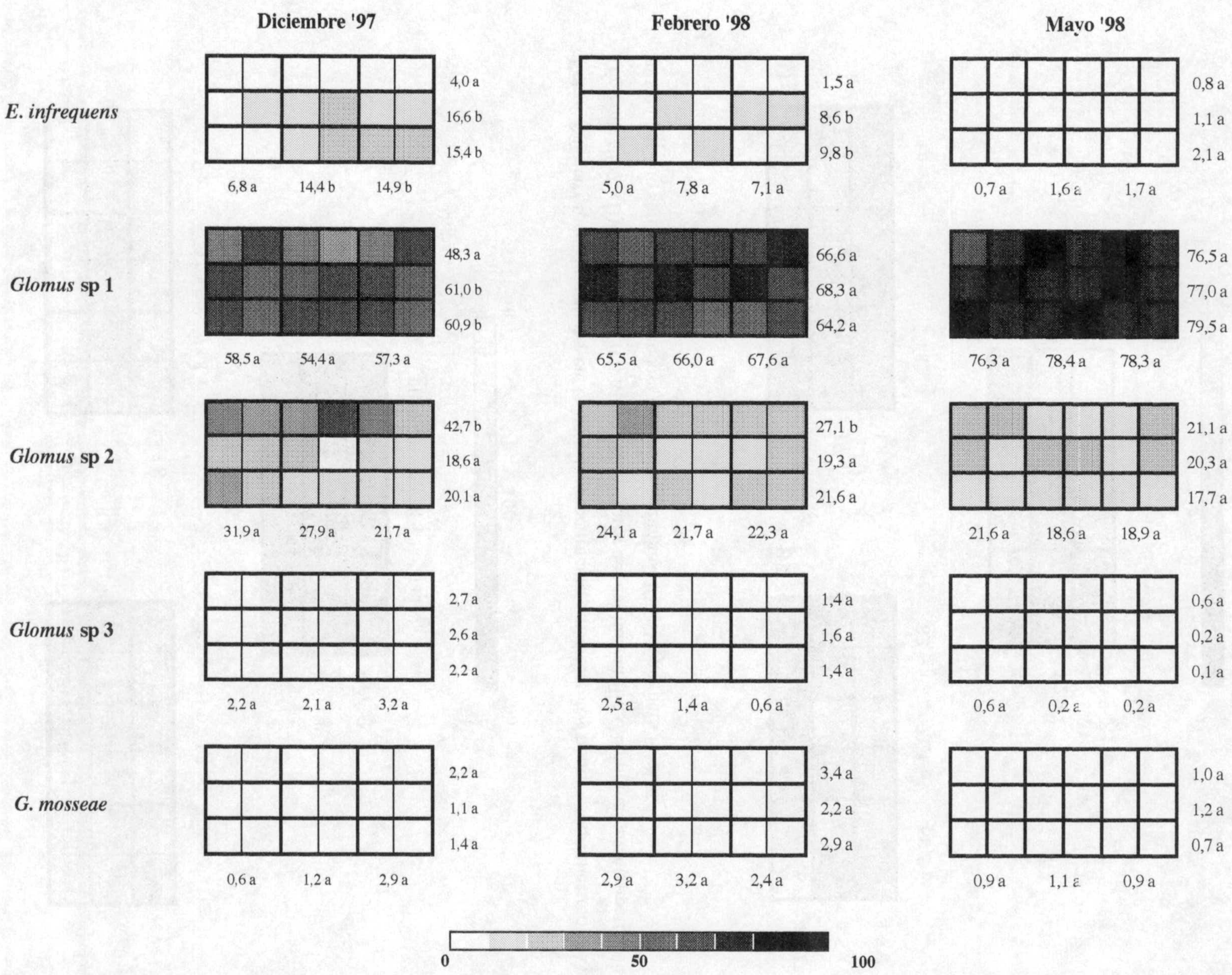

Fig. 5. Densidades relativas de los distintos tipos de esporas presentes en la parcela experimental en los distintos tiempos de muestreo. Valores en una misma línea o fila que comparten la msima letra no son significativamente diferentes según test LSD-Fisher $P \leq 0.05$.

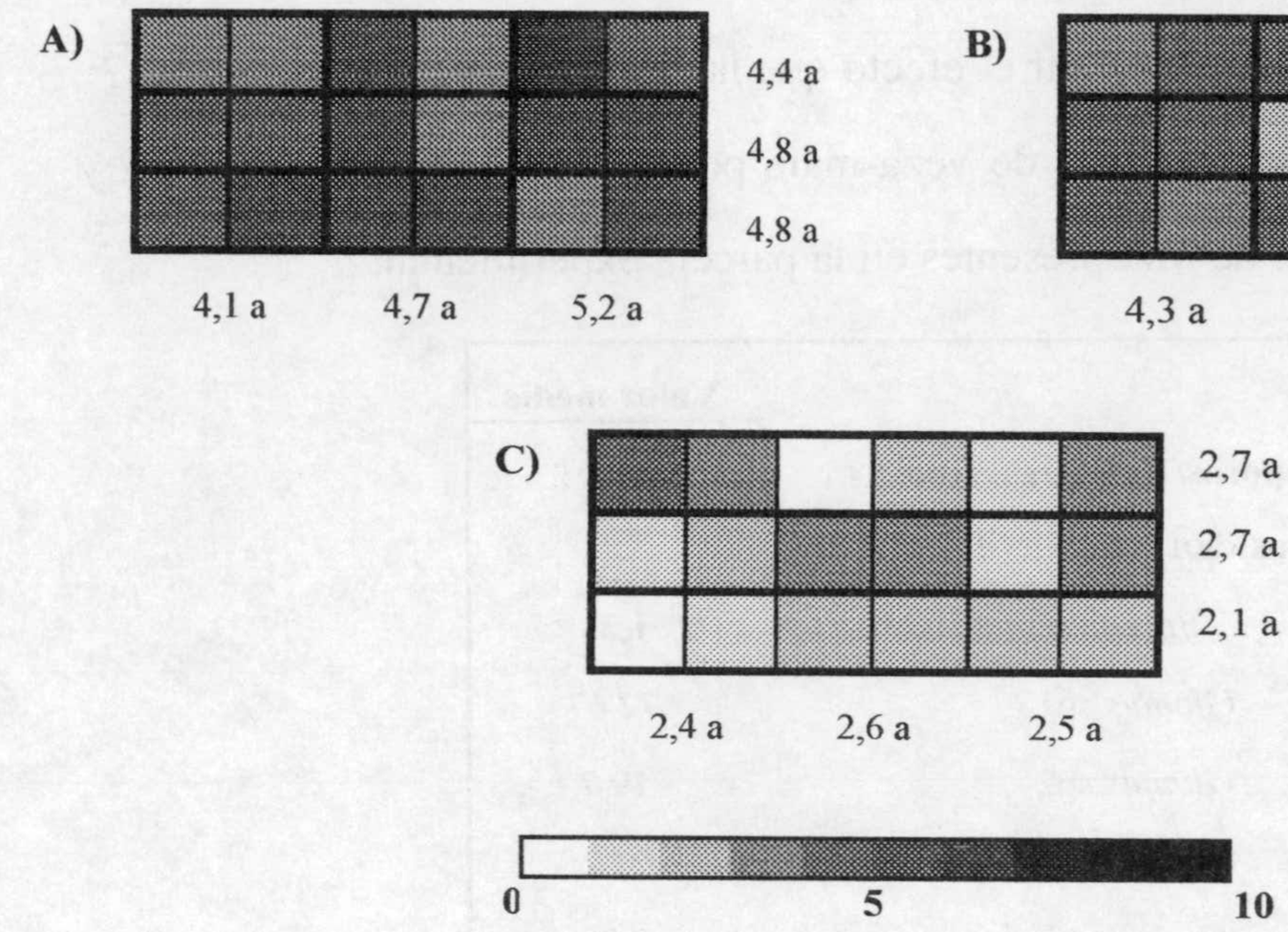

Fig. 7. Indice de diversidad de Shanon-Wiener en la parcela experimental en diferentes tiempos de muestreo. (A) Diciembre '97, (B) Febrero '98, (C) Mayo '98. Valores de una misma fila o columna que comparten la misma letra no son significativamente diferentes según test LSD-Fisher para $P \leq 0.05$.

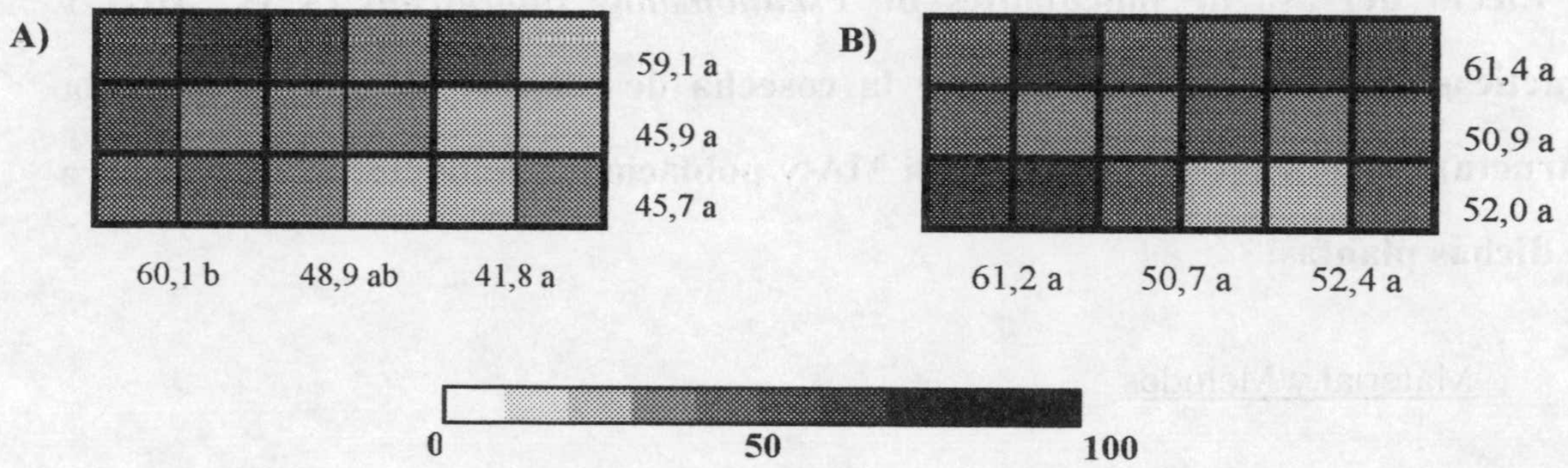

Fig. 8. Porcentaje de micorrización en raíces de veza en la parcela experimental en diferentes tiempos de muestreo. (A) Febrero '98, (B) Mayo '98. Valores de una misma fila o columna que comparten la misma letra no son significativamente diferentes según test LSD-Fisher para $P \leq 0.05$.

Una vez asumida la homogeneidad de la parcela para los distintos parámetros analizados en relación con hongos MA, y cuyos valores medios se muestran en la siguiente Tabla, se procedió a estudiar el efecto que la aplicación de inoculantes de *P. fluorescens* y la rotación del cultivo de veza-maíz podía tener sobre la estructura y función de las poblaciones de MA presentes en la parcela experimental.

	Valor medio
nº esporas/100g suelo seco	117,03
densidad relativa (dr)	
E. infrequens	1,33
Glomus sp1	77,67
Glomus sp2	19,7
Glomus sp3	0,32
G. mosseae	0,98
Riqueza media	3,9
Indice de diversidad de Shanon-Wiener	2,5
% micorrización	54,77

3. Efecto del uso de inoculantes de *Pseudomonas fluorescens* (S vs. MG) y prácticas agrícolas normales sobre la cosecha de plantas de maíz y sobre la estructura y función de hongos de la MA y poblaciones de bacterias en rizosfera de dichas plantas.

Material y Métodos

Tras la prospección de las propiedades físico-químicas del terreno, así como de la estructura y composición de las comunidades de hongos de la MA en la parcela experimental, se comprobó que la homogeneidad era adecuada y se procedió al estudio del impacto que prácticas agronómicas normales (rotación de cultivo y aplicación de fungicidas), así como la aplicación de inoculantes de *Pseudomonas*

silvestres (S) como modificados genéticamente (MG), con capacidad en ambos casos de producir el compuesto antifúngico 2,4-Diacetofluoroglucinol, podían tener sobre las poblaciones naturales de hongos de la MA. Se pretendía igualmente analizar los efectos de dichos tratamientos sobre las poblaciones naturales de microorganismos en el entorno rizosférico, tanto a nivel cuantitativo como cualitativo, así como los efectos de estos inoculantes sobre la planta (nutrición y cosecha).

Para abordar este estudio experimental se dividió la parcela en 48 microparcelas cada una de las cuales tenía unas dimensiones de 2.5 x 2.5 m^2 y una distancia entre una microparcela y otra de 1.5 m de pasillo (Fig. 9). Los distintos tratamientos fueron distribuidos en bloques "al azar" por toda la parcela, quedando 12 repeticiones por tratamiento.

Fig. 9. Diagrama de la parcela experimental y diseño de muestreo para el estudio del efecto de prácticas agrícolas y la aplicación de inoculantes de P. fluorescens capaces de producir compuestos antifúngicos, sobre poblaciones de hongos de MAy otros microorganismos, así como sobre la cosecha

Para la liberación de las bacterias MG se solicitó permiso a la Secretaría General de Medio Ambiente, siendo éste aprobado tanto para el caso de *Pseudomonas* (notificación B/ES/97/39), como para la cepa de *Rhizobium* (notificación B/ES/97/49) que se liberó en un estadío superior de la secuencia del experimento (Apartado 4).

Los tratamientos consistieron en (a) un control sin tratamiento alguno, (b) aplicación de un fungicida y (c) y (d) inoculación con dos cepas de *P. fluorescens*, una silvestre (S) y otra modificada genéticamente (MG) de la anterior. Como fungicida se empleó Previcur® diluído en solución Ringers en proporción 1:50, y como inoculantes bacterianos se emplearon las cepas de *P. fluorescens* F113Rif100 (cepa S) y F113Rif:pMEGP (cepa MG), cuyas características se detallan en la Tabla 4 del Capítulo de *Material y Métodos*.

La planta elegida para la segunda fase de rotación fué maíz. Las semillas pregerminadas recibieron los diferentes tratamientos antes de ser sembradas en campo. Para la aplicación del fungicida (10 ml/4 g de semillas) las semillas se sumergieron en la solución del mismo en agitación, durante 5 min. Los inoculantes bacterianos se aplicaron siguiendo el procedimiento descrito en el Apartado 7.2. del Capítulo de *Material y Métodos*. El número de bacterias que se habían adherido por semilla se calculó mediante el método de dilución y siembra en placa, resultando $5.3x10^7$ ufc/semilla, para F113Rif100 y $1.1x10^7$ ufc/semilla para F113Rif:pMEGP.

Una vez tratadas las semillas germinadas, se plantaron en sus respectivas microparcelas a razón de 36 golpes por microparcela, 3 semillas por golpe. Cuando las plántulas alcanzaron porte suficiente se dejó 1 planta por golpe. Las plantas se regaron por aspersión de acuerdo con las prácticas agronómicas habituales. Periódicamente se eliminaron las malas hierbas para controlar el experimento.

Las plantas de maíz crecieron durante aproximadamente 6 meses, y su rizosfera fué muestreada 2 veces. La primera al mes y medio después de la siembra (Julio '98, muestreo nº 4, Fig. 1) y la segunda poco antes de cosechar, a los cinco meses y medio después de la siembra (Noviembre '98, muestreo nº 5, Fig. 1). Los muestreos se realizaron tomando 3 plantas de cada microparcela (con sus raíces y el suelo más próximo a las mismas). Esto se consideró como una unidad de muestreo. Para el estudio de las poblaciones de hongos de la MA, así como para el estudio de otras poblaciones microbianas en la rizosfera, las muestras de suelo y raíces se mezclaron al azar de 2 en 2, resultando por tanto 6 repeticiones por tratamiento. Para el seguimiento de los inoculantes (*Pseudomonas*), se mezclaron de 4 en 4, resultando 3 repeticiones por tratamiento.

En el primer muestreo, las partes aéreas de las plantas, una vez secas en un horno a 65ºC durante 96 h, se procesaron para posterior análisis de nutrientes (N y P) en sus tejidos (Lachica *et al.*, 1973).

En el segundo muestreo la cosecha se expresó como peso de granos por parcela.

Parte del material de raíz obtenido se envió a York (Prof. Peter Young) para el estudio mediante técnicas moleculares del tipo de endofitos colonizadores de esas raíces.

Resultados

En un primer muestreo en rizosfera de maíz (muestreo nº 4, Julio '98) se observa que todos los tratamientos aplicados incrementaron el peso de la planta con respecto al control, especialmente la inoculación de *Pseudomonas* (Fig. 10A), aunque la cepa S de *Pseudomonas* fué más efectiva para incrementar el contenido nutricional en N y P por planta (Fig. 10B y 10C). La inoculación con la cepa MG de

Pseudomonas, fué el tratamiento más efectivo en cuanto a incrementar la cosecha final de grano (muestreo nº 5, Noviembre '98), expresada tanto como nº de mazorcas, peso de las mazorcas y peso del grano (Fig. 11).

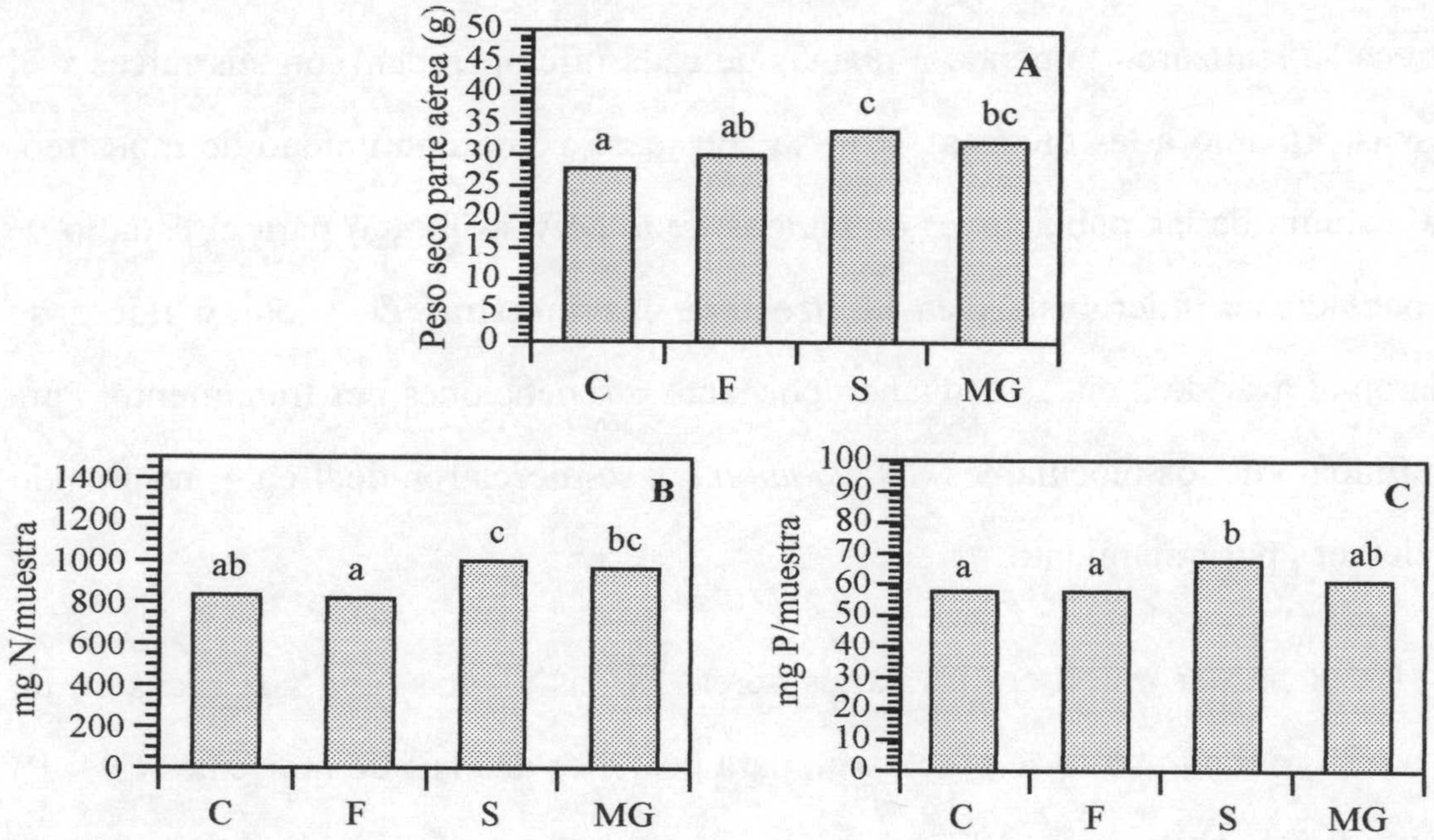

Fig. 10. Valores medios de los diferentes parámetros de cosecha analizados para los distintos tratamientos ensayados (C=control, F=fungicida, S=cepa S, MG=cepa MG) en el primer muestreo (Julio '98): (A) peso seco de la parte aérea/ muestra, (B) mg N/muestra, (C) mg P/muestra. En todos los casos una muestra se corresponde con la suma de 3 plantas. Valores que comparten la misma letra no son significativamente diferentes según test LSD-Fisher $P \leq 0.05$.

Los niveles poblacionales de *Pseudomonas* inoculadas se presentan calculadas por gramo de peso seco de raíz (log ufc/g psr). Se observa que el número de bacterias inoculadas tiende a descender con el tiempo, y aunque en principio no existen diferencias en cuanto al establecimiento en las dos cepas estudiadas, en la época de cosecha se observa que la cepa S tiene mayor capacidad de persistencia (Fig. 12A). Por otro lado, para ambos tiempos de muestreo se detectó que en aquellas placas con medio selectivo para el aislamiento de la cepa MG (medio SA, Rif100, X-GlcA50), crecían colonias azules características de la cepa en cuestión (presencia de plásmido

con marcador X-Glc), y además otras colonias de tamaño, color y morfología similares a la de la cepa S, y también rifampicina-resistentes, lo que nos hace pensar en pérdida del plásmido en la cepa MG, en una proporción alrededor del 50% en ambos tiempos de muestreo.

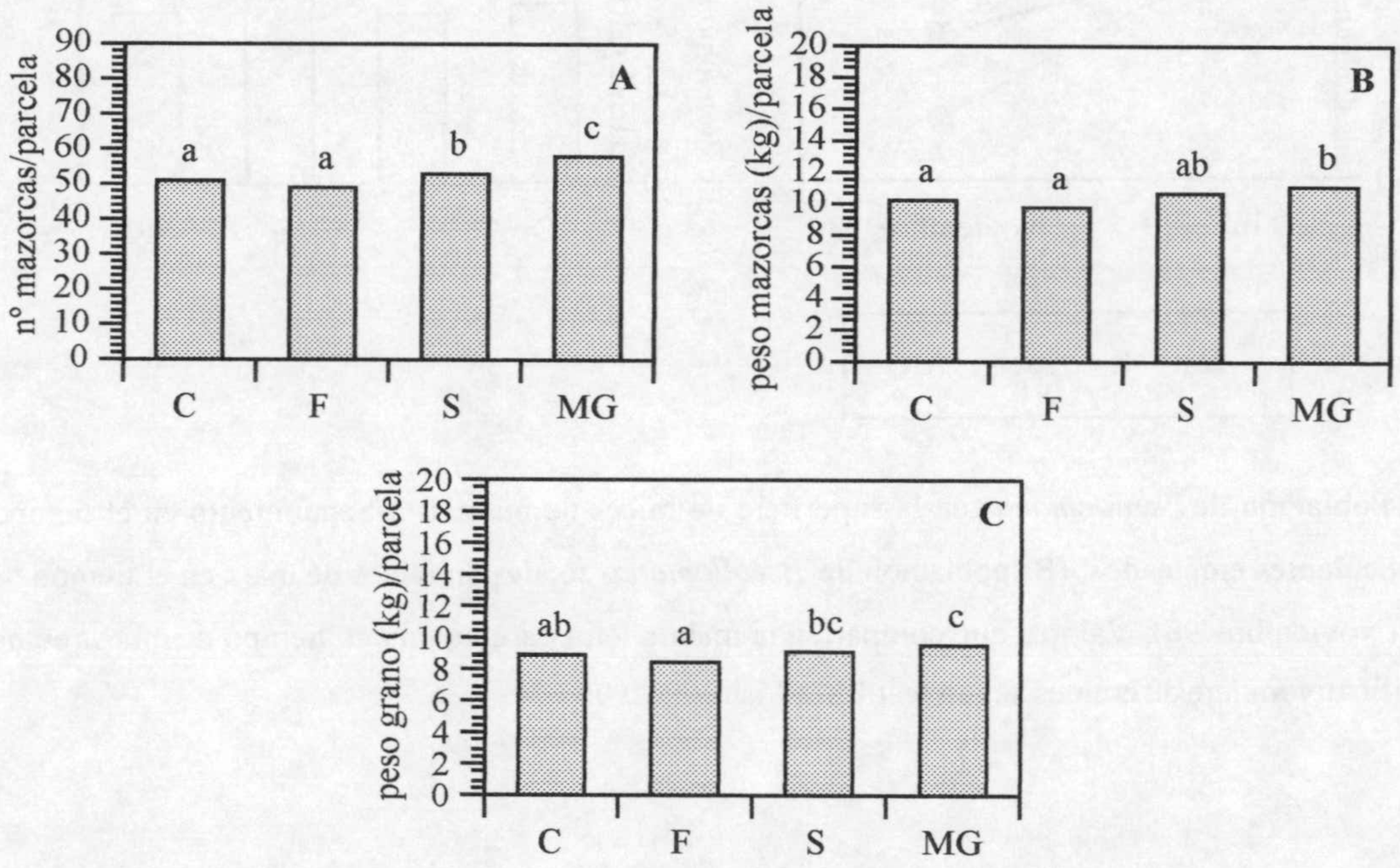

Fig. 11. Valores medios de cosecha en grano por parcela para los distintos tratamientos ensayados (C=control, F=fungicida, S=cepa S, MG=cepa MG) en la época de cosecha (Noviembre '98). (A) nº de mazorcas/parcela, (B) peso mazorcas (kg)/parcela, (C) peso grano (kg)/parcela. Valores que comparten la misma letra no son significativamente diferentes según test LSD-Fisher $P \leq 0.05$.

La cuantificación de la población de *Pseudomonas fluorescens* naturales se realizó en primer lugar utilizando el medio de King B selectivo para el aislamiento de *Pseudomonas*, pero resultó no ser del todo específico, ya que se encontró que también crecen muchas bacterias diferentes y no es seguro que todas ellas sean *P. fluorescens*. Los datos que se muestran (Fig. 12B) a este respecto corresponden al segundo muestreo, donde ya se utilizó un medio más selectivo para la detección de *Pseudomonas* fluorescentes (medio S1), y aunque se detectan diferencias entre

tratamientos, no existe ninguna tendencia marcada en función de la utilización de inoculantes, del tipo de inoculante, ni de la aplicación del fungicida.

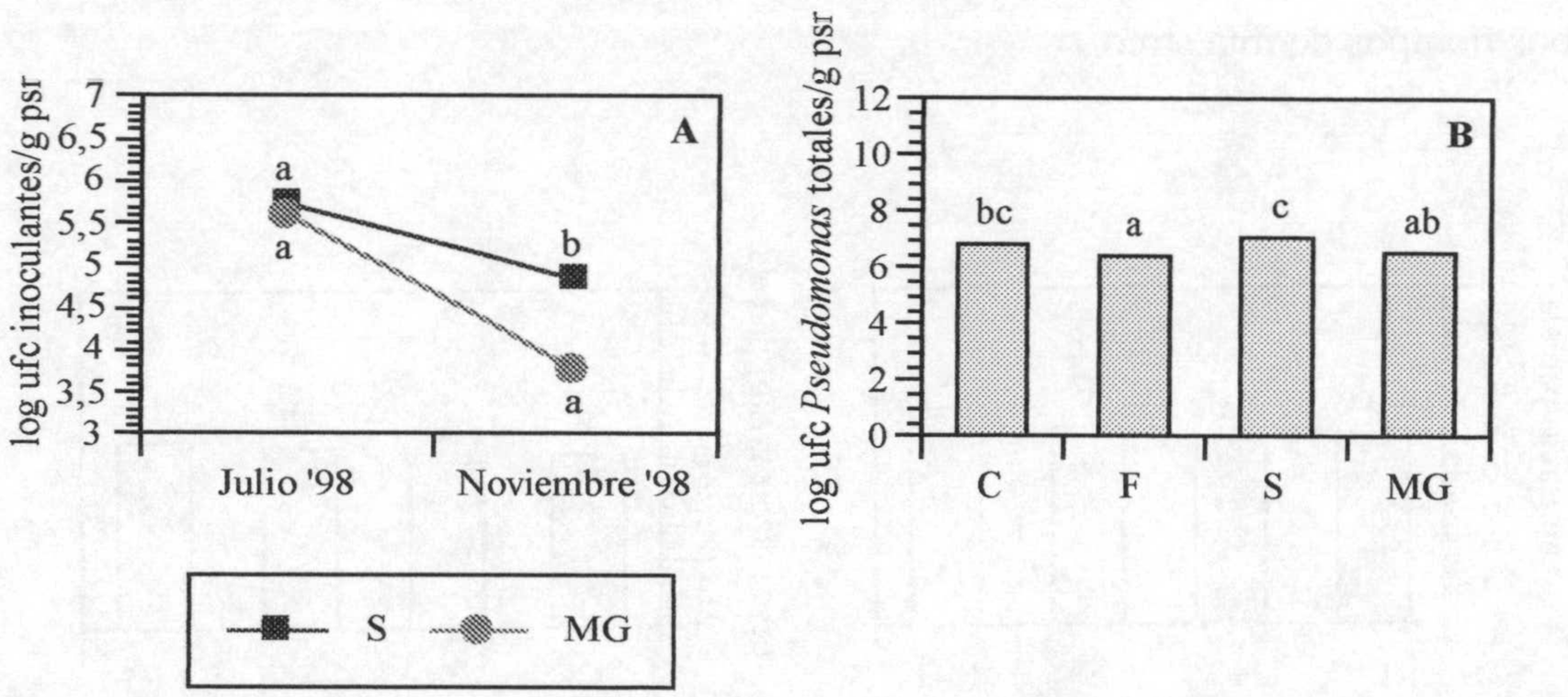

Fig. 12. Población de *Pseudomonas* en la superficie de raíces de maíz. (A) Seguimiento en el tiempo de los inoculantes empleados, (B) población de *Pseudomonas* totales en raíces de maíz en el tiempo de cosecha (Noviembre '98). Valores que comparten la msima letra para un mismo tiempo de muestreo no son significativamnete diferentes según test LSD-Fisher $P \leq 0.05$.

Los niveles poblacionales de hongos de la MA sólo presentaron pequeñas diferencias en el muestreo nº 4 (Julio '98), diferencias que no se detectan en un muestreo posterior (muestreo nº 5, Noviembre '98) para ninguno de las variables analizadas (Fig. 13). Así, el número total de esporas de hongos MA en la rizosfera de maíz, no se alteró de manera significativa por la aplicación de los distintos tratamientos, aunque el tratamiento con fungicida aumenta ligeramente este valor y la cepa MG lo disminuye (Fig. 13A). Las densidades relativas de los tipos minoritarios de esporas (*E. infrequens*, *Glomus* sp3 y *G. mosseae*), no se alteraron por la aplicación de los tratamientos (Fig. 13B, 13E y 13F), en cambio las densidades relativas de los tipos mayoritarios de esporas varió.

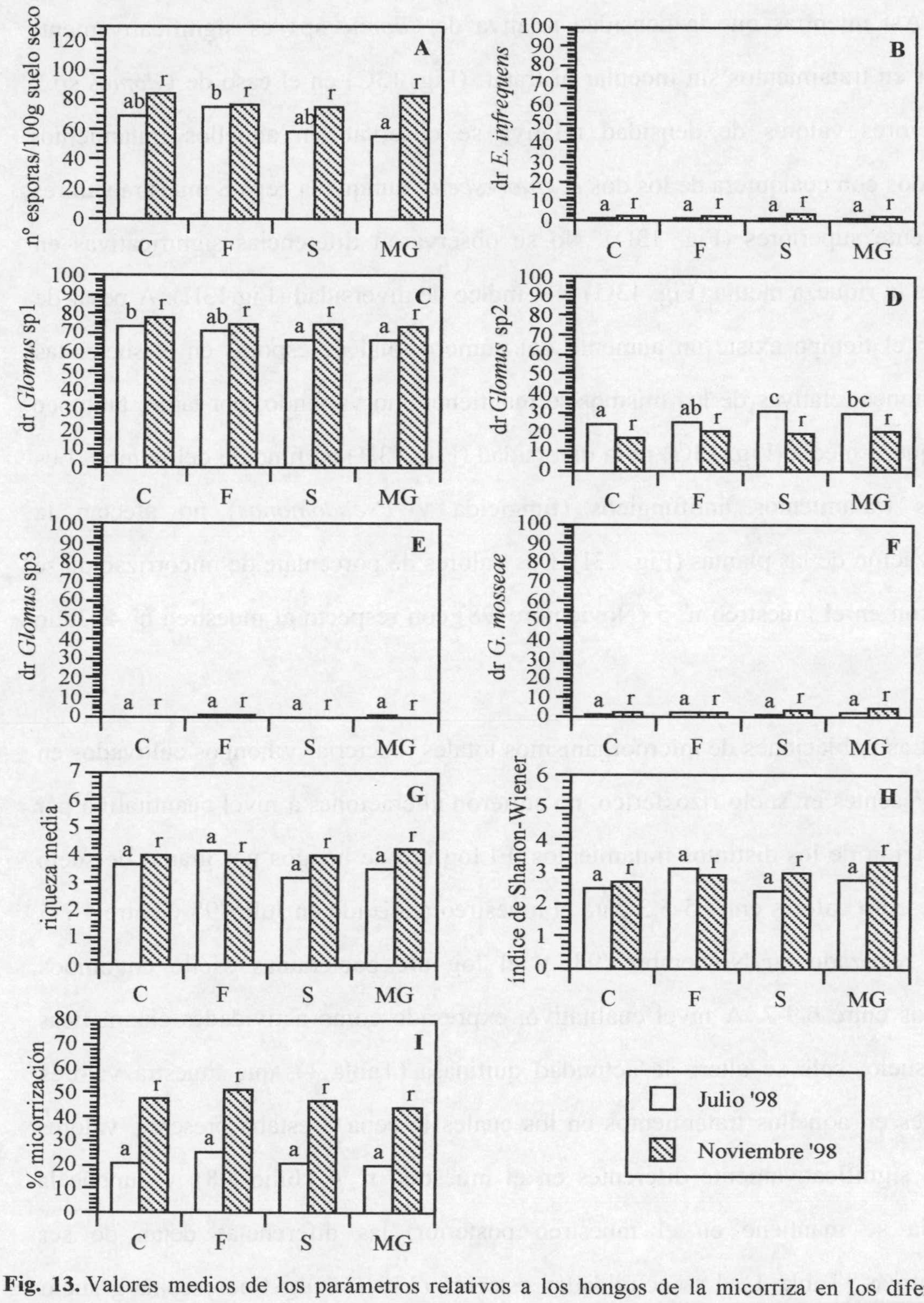

Fig. 13. Valores medios de los parámetros relativos a los hongos de la micorriza en los diferentes tratamientos (C=control, F=fungicida, S=cepa S, MG=cepa MG). (A) nº total de esporas en 100g de suelo seco, (B) densidad relativa (dr) de *E. infrequens*, (C) dr *Glomus* sp1, (D) dr *Glomus* sp2, (E) dr *Glomus* sp3, (F) dr *G. mosseae*, (G) riqueza media en especies, (H) índice de diversidad de Shanon-Wiener, (I) porcentaje de micorrización. Valores que comparten la misma letra para un mismo tiempo de muestreo no son significativamnete diferentes según test LSD-Fisher $P \leq 0.05$.

Así mientras que la densidad relativa de *Glomus* sp1 es significativamente superior en tratamientos sin inocular ni tratar, (Fig. 13C) en el caso de *Glomus* sp 2 los mayores valores de densidad relativa se observan en aquellos tratamientos inoculados con cualquiera de los dos *P. fluorescens*, aunque la cepa S muestra valores ligeramente superiores (Fig. 13D). No se observaron diferencias significativas en cuanto a la riqueza media (Fig. 13G) y el índice de diversidad (Fig 13H). A pesar de que con el tiempo existe un aumento del número total de esporas en el suelo, las proporciones relativas de los mismos se mantienen, no variando, por tanto, tampoco ni la riqueza media (Fig. 13G) ni la diversidad (Fig. 13H) en función del tiempo. Los distintos tratamientos antifúngicos (fungicida y *Pseudomonas*) no afectan la micorrización de las plantas (Fig. 13I). Los valores de porcentaje de micorrización se duplicaron en el muestreo nº 5 (Noviembre '98) con respecto al muestreo nº 4 (Julio '98).

Las poblaciones de microorganismos totales (bacterias y hongos cultivados en PDA) presentes en suelo rizosférico, no sufieron alteraciones a nivel cuantitativo por la aplicación de los distintos tratamientos. El log ufc de hongos por gramo de suelo seco presentó valores entre 5-5.3 para el muestreo realizado en Julio '98 y entre 4.7-5 para el realizado en Noviembre '98; y el log ufc bacterianas osciló en ambos muestreos entre 6.9-7. A nivel cualitativo, expresado como actividades enzimáticas en ese suelo, sólo se alteró la actividad quitinasa (Tabla 1), que muestra valores superiores en aquellos tratamientos en los cuales la cepa S estaba presente, valores que son significativamente diferentes en el muestreo nº 4 (Julio '98), y aunque la tendencia se mantiene en el muestreo posterior, las diferencias dejan de ser significativas (Tabla 1). Las actividades esterasa (130-160 µg fluoresceína/g suelo seco) y trealasa (17-24 µg glucosa/g suelo seco) no se alteraron por los tratamientos, ni en el tiempo. En cambió la actividad fosfatasa sólo se alteró estacionalmente,

detectándose valores entre 310-330 µg p-nitrofenol/g suelo seco, en Julio '98, y valores entre 520-550 en Noviembre '98.

	Quitinasa (µg p-nitrofenol/g suelo seco)	
	Jul '98	**Nov '98**
C	36,66 a	46,26 a
F	36,28 a	44,92 a
S	42,15 b	50,75 a
MG	36,81 a	46,65 a

Tabla 1. Actividades quitinasa en suelo rizosférico a distintos tiempos de muestreos. Valores para un mismo tiempo de muestreo que comparten la misma letra no son significativamente diferentes según test LSD-Fisher $P \leq 0.05$.

4. Efecto del uso de inoculantes de *Pseudomonas fluorescens* (S vs. GM) y *Rhizobium leguminosarum* (S vs. MG) y prácticas agrícolas normales sobre las poblaciones naturales de hongos de la micorriza en rizosfera de veza en condiciones de campo.

Material y Métodos

Se empleó en mismo esquema experimental que el descrito en el apartado anterior (Apartado 3). Se reinocularon los 4 tratamientos anteriores, a cada uno de los cuales, se inoculó conjuntamente con *Rhizobium leguminosarum* RLV113 (cepa S) ó RLV113H (cepa GM), o bien no se coinoculó, resultando por tanto 12 tratamientos distintos que fueron replicados 4 veces.

La planta elegida para la última fase de rotación fué veza. Las semillas pregerminadas recibieron los diferentes tratamientos antes de ser sembradas en campo, de modo similar a como se explicó en el apartado anterior. En este caso la

relación volumen del formulado:peso de las semillas, se modificó a una proporción 10:12, en lugar de 10:4 como se realizó anteriormente, y los tiempos de imbibición se prolongaron hasta que las semillas hubieran absorbido en la práctica totalidad los formulados preparados (aproximadamente unas 2 h). En aquellos caso donde se hizo necesaria la aplicación de dobles inoculantes (*Pseudomonas*+*Rhizobium*, Fungicida+*Rhizobium*), cada uno de ellos por separado se concentró 2 veces, tras lo cual se mezclaron, resultando por tanto el mismo número de bacterias por unidad de volumen, que en los inoculantes individuales.

El número de bacterias que se habían adherido por semilla se calculó mediante el método de dilución y siembra en placa, resultando la inoculación con *Pseudomonas* de la siguiente manera:

Tratamiento	**log ufc *Pseudomonas*/semilla**
Pseud. S	6.04
Pseud. S + Rhi S	6.00
Pseud. S + Rhi MG	5.93
Pseud. MG	5.20
Pseud. MG + Rhi S	5.37
Pseud. MG + Rhi MG	5.51

La aplicación de los inoculantes a base de *Rhizobium* supuso la adherencia de unas 10^6 células/semilla, independientemente del tipo de cepa empleada, y en todos los tratamientos donde estos inoculantes fueron aplicados.

Una vez tratadas las semillas germinadas se plantaron en sus respectivas microparcelas a razón de 360 g de semillas por microparcela. Las plantas se regaron por aspersión de acuerdo con las prácticas agronómicas habituales. Periódicamente se eliminaron las malas hierbas para controlar el experimento.

Los muestreos objetos de este estudio se corresponden con los números 6 y 7, y los resultados de las diferentes determinaciones a realizar a este respecto, no se expondrán en este trabajo debido a la extensión del experimento en el tiempo.

Discusión

Desde el punto de vista físico-químico se apreció que desde el inicio del estudio el suelo de la parcela era suficientemente homogéneo, aunque la homogeneidad biológica (considerada a través del estudio de las poblaciones de esporas de hongos MA) tanto cuantitativa como cualitativamente, sólo se alcanzó con el cultivo de veza durante varios meses.

La inoculación con *Pseudomonas* aportó considerables beneficios tanto de crecimiento como en contenido nutricional en las plantas. Si bien en principio la cepa productora de DAPG pareció ser algo más beneficiosa que la cepa sopreproductora, aunque no había diferencias significativas, la producción de maíz (cosecha) fué superior, y significativamente diferentes, en plantas inoculadas con la cepa sobreproductora. En la mayoría de estudios hasta ahora realizados en campo, los resultados de la aplicación de inoculantes con capacidad de actuación tipo PGPR ó biocontrol-PGPR, son inconsistentes, sin que se hayan descrito efectos positivos de la inoculación en cuanto al desarrollo de las plantas (Germida & Walley, 1996; Horwath *et al.*, 1998; Möenne-Loccoz *et al.*, 1998; Simons *et al.*, 1996). Esto puede ser resultado de las prácticas de cultivo o del tipo de suelo. A pesar de que algunos autores han demostrado efecto negativo de la inoculación de la cepa F113 y derivados sobre el desarrollo vegetal (Andrade *et al.*, 1998c), o una estimulación independientemente de la capacidad de producción de DAPG de las cepas empleadas (Barea *et al.* 1998), en este trabajo no se detectó efecto alguno en estudios en microcosmos. Es probable que estas diferencias de respuesta se deban a que en cada

experimento los inoculantes ejercían un efecto diferente sobre la colonización de la raíz por MA. Tanto en el estudio de Andrade *et al.* (1998) como en este trabajo (Capítulo *Interacciones MA*-Pseudomonas) no se aprecia estimulación de la micorrización, mientras que Barea *et al.* (1998) encuentran un incremento de la micorrización en raíces inoculadas por cualquiera de las cepas de *Pseudomonas* que emplea. En el presente estudio de campo, como se discute más adelante, no se afectaron ni la capacidad de micorrización, ni las poblaciones de hongos MA en suelo, luego los efectos observados no se podrían explicar desde este contexto. Al estar el efecto de crecimiento observado, positivamente correlacionado con la producción de DAPG, se podría asumir que este compuesto afecta fundamentalmente al metabolismo de la planta, pudiendo producir modificaciones en la exudación radical, que beneficiaría el establecimiento de otros microorganismos en la rizosfera, los cuales a su vez podrían ejercer efecto PGPR. También se ha descrito (Handelsman & Stabb, 1996) que algunas *P. fluorescens* pueden desplazar poblaciones autóctonas de bacterias y hongos, así como aumentar determinados grupos microbianos que pueden contribuir al control biológico. La posibilidad de existencia de algún patógeno que explicara el efecto beneficioso de la inoculación con productores de DAPG quedaría en principio descartada al no detectarse efecto positivo del fungicida comercial.

El hecho que la población de inoculantes disminuya con el tiempo, haciéndolo en mayor proporción el sobreproductor de DAPG, podría afianzar nuestra hipótesis de que el efecto de la bacteria se trató de un efecto a medio-largo plazo como consecuencia de la producción inicial de DAPG, que actuó sobre poblaciones autóctonas desplazando determinados grupos que en definitiva resultarían menos beneficiosos; de hecho son varios los autores que han descrito toxicidad del DAPG para determinadas bacterias (Keel *et al.*, 1992; Levy *et al.*, 1992; Shanahan *et al.*, 1992) y hongos (Maurhofer *et al.*, 1995; Mazzola *et al.*, 1995). Estos resultados

corroboran los obtenidos por Fenton *et al.* (1992) y Carroll *et al.* (1995), que indican que el DAPG es el responsable de la actividad de la bacteria, pero no contribuye a su competencia ecológica.

La población del inóculante desciende gradualmente a lo largo de la época de cultivo, fenómeno descrito anteriormente por Moenne-Loccoz *et al.* (1998), y muy importante si consideramos que un inoculante debe persistir el tiempo suficiente para realizar su función y luego descender sus niveles poblacionales hasta límites prácticamente indetectables, evitándose de esta manera su persistencia y competitividad en el medio, que impidiera el posterior uso de cepas más efectivas.

Uno de los principales problemas de la inoculación con agentes de control biológico en campo es la posible toxicidad o patogenicidad de los mismos sobre otros organismos beneficiosos "no-diana" a los cuales podrían desplazar. Así, un componente particular de la rizosfera como es la MA, debería considerarse como modelo de microorganismo beneficioso residente en suelo, y bioindicador para el estudio del posible efecto de la inoculación con potenciales agentes de control biológico productores de sustancias antimicrobianas. Debido a que el DAPG es un antibiótico no específico implicado en la inhibición de un amplio rango de bacterias y hongos, era de esperar que la inoculación de las semillas con cepas productoras de este compuesto inhibieran el desarrollo de la MA. Como ya se mencionó anteriormente, ninguno de los inoculantes aplicados causó efectos perjudiciales sobre la colonización de la raíz por hongos MA. Las únicas diferencias observadas se detectaron en los niveles poblacionales de determinados tipos de esporas en la rizosfera, produciéndose disminuciones en un morfotipo y aumentos en otro, efecto que desaparece con el tiempo de cultivo. Aunque en un principio estas diferencias pudieran ser las responsable de un resultado acumulativo sobre la cosecha (si aumenta un morfotipo de hongo MA que pueda resultar muy efectivo, y aumentan los niveles de colonización por el mismo, mejor desarrollo de la planta), no tiene porqué estar

correlacionado el aumento en la proporción de un determinado morfotipo con un aumento de su capacidad colonizadora, y su disminución con un descenso en la proporción del mismo. De modo que como ya se mencionó anteriormente los efectos diferenciales observados sobre la cosecha no parecen estar relacionados con los hongos MA propiamente dichos.

Aunque la población total de bacterias y hongos no se modificó cuantitativamente por ninguno de los tratamientos aplicados, a nivel cualitativo se detectó una mayor actividad quitinasa en rizosfera de plantas inoculadas con la cepa S (productora de DAPG). Este dato apoyaría nuevamente nuestra hipótesis inicial de alteración de determinados grupos microbianos como consecuencia de la inoculación de *Pseudomonas*, y aunque con la cepa sobreproductora de DAPG éste efecto no se manifieste, se podría deber a que son otros las poblaciones afectadas, que no se estudiaron en este trabajo.

En resumen, la inoculación de bacterias productoras de antifúngico (S y MG) no produjo efecto negativo alguno sobre los hongos de la MA considerados como biosensores del posible efecto de los inoculantes. En cambio otras poblaciones microbianas si pudieron resultar afectadas, pero en el contexto de productividad del sistema el balance neto de la inoculación fué positivo manifestándose éste en una mayor producción del cultivo.

Conclusiones

Conclusiones

1. Ninguno de los inoculantes aplicados (*Azospirillum*, *Trichoderma*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*), especialmente aquellos modificados genéticamente, produjeron efecto adverso sobre la formación, desarrollo o función de la micorriza arbuscular, a pesar de que algunos de ellos son productores de sustancias antifúngicas.

2. La aplicación de agentes de control biológico productores de sustancias antifúngicas (*Trichoderma*, *Pseudomonas*) no afectó la diversidad de hongos de la micorriza.

3. La efectividad de la micorriza arbuscular, es decir, su efecto sobre el desarrollo y producción vegetal, puede beneficiarse por la aplicación de inoculantes bacterianos, de forma tal que a veces la inoculación combinada con otros microorganismos produjo mayor beneficio que la aplicación de los microorganismos por separado. Con lo cual teniendo en cuenta que la micorrización no se afectó y la cosecha se mejoró, podríamos concluir que la aplicación práctica de estos inolantes sería posible dentro del contexto de bioseguridad medioambiental.

4. El resultado beneficioso de la inoculación puede deberse a: (a) la interacción directa entre micorrizas y microorganismos inoculados, (b) la producción de metabolitos secundarios por parte del inoculante que afectan el desarrollo de la planta, bien de forma directa, o bien indirectamente a través de cambios en las poblaciones microbianas, (c) modificaciones cuantitativas y cualitativas de la población de la microbiota del suelo, como consecuencia de la micorrización y/o inoculación con otros microorganismos.

5. La inoculación de microorganismos fitoestimuladores (*Azospirillum*), provocó cambios a nivel metabólico (activación de determinados enzimas).

6. La sequía y la adición de N al medio de cultivo tuvieron efecto negativo sobre el desarrollo de las plantas y el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, pero no afectaron ni al establecimiento ni a la función de la simbiosis MA, que confirió protección frente a la sequía, gracias un mayor ajuste osmótico en las plantas micorrizadas.

7. El uso de técnicas isotópicas (^{15}N y ^{32}P) permitió evaluar el papel de la micorriza y de microorganismos solubilizadores de P en el ciclo de nutrientes, demostrándose que la micorriza es capaz de captar P que no está disponible para las raíces de las plantas, y que los microorganismos solubilizadores de P aumentan el "pool" disponible de este elemento en suelo.

Bibliografía

Bibliografía

Adelman MJ, Morton JB (1986)Infectivity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi: influence of host-soil diluent combinations on MPN estimates and percentage colonization. Soil Biol. Biochem. 18: 77-83.

Ahnad MH (1995) Compatibility and coselection of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia for tropical legumes. Crit. Rev Microbiol 15:229-239.

Alexander M (1984) Ecology of *Rhizobium*. En Biological Nitrogen Fixation. M Alexander (ed.) Plenum Press, New York. pp. 39-50.

Altieri MA (1994) Sustainable Agriculture. Encyclopedia of Agricult Sci 4: 239-247.

Alvarez-Solís JD, Ferrera-Cerrato R, Santizo-Rincón JA, Zebrowsky C (1996) Establecimiento y actividad de *Rhizobium* y de *Azospirillum* introducidos en tepetate durante el primer año de roturación.

Ames RN (1989) Mycorrhiza development in onion in response to inoculation with chitin-decomposing actinomycetes. New Phytol. 112: 423-427.

Ames RN, Mihara KL y Bethlenfalvay GJ (1987) The establishment of microorganisms in vesicular-arbuscular mycorrhizal and control treatments. Biol. Fert. Soils 3: 217-223.

Ames RN, Reid CPP y Ingham ER (1984) Rhizosphere bacterial populations responses to root colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. New Phytol. 96: 555-563.

Ames RN, Thiagarajan TR, Ahmad MH, McLaughlin WA (1991) Co-sellection of compatible rhizobia and vesicualr-arbuscular mycorrhizal fungi for cowpea in sterilzed and non-sterilized soils. Biol. Fertil. Soils 12: 112-116.

Amora-Lazcano E, Vázquez MM, Azcón R (1998) Response of nitrogen-transforming microorganisms to arbuscular mycorrhizal fungi. Biol. Fert. Soils 27: 65-70.

Andrade G, Mikara KL, Linderman RG, Bethlenfalvay GJ (1997) Bacteria from rhizosphere and hyphosphere soils of different arbuscular-mycorrhizal fungi. Plant Soil 192: 71-79.

Andrade G, Linderman RG, Bethlenfalvay GJ (1998a) Bacterial associations with the mycorrhizosphere and hyphosphere of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. Plant Soil 202: 79-87.

Andrade G, Mikara KL, Linderman RG, Bethlenfalvay GJ (1998b) Soil aggregation status and rhizobacteria in the mycorrhizosphere. Plant Soil 202: 89-96.

Andrade G, De Leij FAAM, Lynch JM (1998c) Plant mediated interactions between *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium leguminosarum* and arbuscular mycorrhizae on pea. Letters in Appl. Microbiol. 26: 311-316.

Andreeva IN, Red'kina TV, Ismailov SF (1993) The involvement of indoleacetic acid in the stimulation of *Rhizobium*-legume symbiosis by *Azospirillum brasilense*. Russian J. Plant Physiol. 40: 901-906.

Artigas J (1986) La Alimentación Biológica. Plaza & Janes (eds.). ISBN 84-01-80332-2.

Asimi S, Gianinazzi-Perason V, Gianinazzi S (1980) Influence of increasing soil phosphorus levels on interaction between VA mycorrhizae and *Rhizobium* in soybeans. Can J Bot 58: 2200-2205.

Atkinson D, Berta G, Hooker JE (1994) Impact of mycorrhizal colonisation on root architecture, root longevity and the formation of growth regulators. En Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems. S Gianinazzi, H Schüepp (eds.). Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland. pp. 89-99.

Azcon R, El-Atrash (1997) Influence of arbuscular mycorrhizae and phosphorus fertilization on growth, nodulation and N_2 fixation (^{15}N) in *Medicago sativa* at four salinity levels. Biol Fertil Soils 24:81-86.

Azcón R, Tobar RM (1998) Activity of nitrate reductase and glutamine systhetase in shoot and root of mycorrhizal *Allium cepa*. Effect of drought stress. Plant Science 133: 1-8.

Azcón R, Azcón-Aguilar C, Barea JM (1978) Effects of plant hormones present in bacterial cultures on the formation and responses to VA mycorrhiza. New Phytol. 80: 359-369.

Azcón R, El-Atrach F y Barea JM (1988) Influence of mycorrhiza vs. soluble phosphate on growth, nodulation, and N2-fixation (15N) in alfalfa under different levels of water potential. Biol. Fert. Soils 7: 28-31.

Azcón R, Rubio R, Morales C, Tobar RM (1990) Interactions between rhizosphere free-living microorganisms and VAM fungi. Agric. Ecosyst. Environ. 29: 11-15.

Azcón R, Rubio R, Barea JM (1991) Selective interactions between different species of mycorrhizal fungi and Rhizobium meliloti strains, and their effects on growth, N2 fixation (15N) and nutrition of Medicago sativa L. New phytol. 117: 399-404.

Azcón R, Gómez M, Tobar RM (1992) Effects on nitrogen source on growth, nutrition, photosynthetic rate and nitrogen metabolism of micorrhizal and phosphorus-fertilized plants of Lactuca sativa L. New phytol. 121: 227-234.

Azcón-Aguilar C, Barea JM, Olivares J (1980) Effects of *Rhizobium* polysaccharides on VA mycorrhiza formation. 2nd Inter. Symp. on Microbial Ecology, University of Warwick, Coventry, U.K., Abstract No. 187.

Azcón-Aguilar C, García-García F, Barea JM (1991) Germinación y crecimiento axénico de los hongos formadores de micorriza vesiculo-arbusculares. En Fijación y movilización biológica de nutrientes, nuevas tendencias. J López-Jorgé, JM Barea y J Olivares (eds.). CSIC, Madrid, pp 129-147.

Azcón-Aguilar C, Bago B (1994) Physiological characteristic of the host plant promoting and undistubed functioning of the mycorrhizal symbiosis. En Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems. S Gianinazzi, H Schüepp (eds.). Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland. pp. 47-60.

Azcón-Aguilar C, Barea JM (1992) Interactions between mycorrhizal fungi and other rhizosphere microorganisms. En Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process. MF Allen (ed). Chapman & Hall, New York. pp.163-198.

Azcón-Aguilar C y Barea JM (1996) Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plants pathogens. An overview of the mechanisms involved. Mycorrhiza 6: 457-464.

Azcón-Aguilar C y Barea JM (1997) Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. Scientia Horticulturae 68: 1-24.

Azcón-Aguilar C, Bago B, Barea JM (1999) Saprophytic growth of arbuscular mycorrhizal fungi. En Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology. A Varma, B Hock (eds.) 2nd. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. pp. 391-408.

Baca BE, Soto-Urzua L, Xochihua-Corona YG, Cuervo-García A (1994) Characterization of two aromatic amino acid aminotransferase and production of indoleacetic acid in *Azospirillum* strains. Soil Biol. Biochem. 26: 57-63.

Bago B, Zipfel W, Williams RC, Chamberland H, Lafontaine JG, Webb WW, Piché Y (1998) In vivo studies on the nuclear behavior of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora* rosea grown under axenic conditions. Protoplasma 203 (in press).

Bagyaraj DJ, Menge JA (1978) Interactions between a VA mycorrhiza and Acetobacter, and their effects on rhizosphere microflora and plant growth. New Phytol. 80: 567-573.

Baker R (1989) Improved *Trichoderma* spp. for promoting crop productivity. Tibtech. 7: 34-38.

Baldani VDL, Baldani JI, Döbereiner J (1983) Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. Can. J. Microbiol. 29: 924-929.

Balota EL, Lopes ES, Hungria M Döbereiner J (1995) Interactions and physiological effects of diazotrophic bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi in cassava plants. Pesq. agropec. bras. vol. 30 n. 11: 1335-1345.

Balota EL, Lopes ES, Hungria M, Döbereiner J (1997) Inoculation of diazotrophic bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on the cassava crop. Pesq. agropec. bras. vol. 32 n.6: 627-639.

Bar T, Okon Y (1992) Induction of indole-3-acetic acid synthesis and possible toxicity of tryptophan in *Azospirillum brasilense* Sp7. Symbiosis 13: 191-198.

Barbieri P, Galli E (1993) Effect on wheat root development of inoculation with an *Azospirillum brasilense* mutant with altered indole-3-acetic acid production. Res. Microbiol. 144: 69-75.

Barbieri P, Baggio C, Bazzicalupo M, Galli E, Zanetti G, Nuti MP (1991) *Azospirillum*-gramineae interaction: effect of indole-3-acetic acid. Dev. Plant Soil Sci. 48: 161-168.

Barea JM (1986) Importance of hormones and root exudates in mycorrhizal phenomena. En Physiological and Genetical aspects of Mycorrhizae. V Gianinazzi-Pearson y S Gianinazzi (eds.). INRA, París, pp. 177-187.

Barea JM (1991a) En Advances in Soil Science. BA Steward (ed.) Springer-Verlag, New York, pp 1-40.

Barea JM (1991b) Cuantificación de la fijación biológica de N mediante el uso de 15N. En Fijación y Movilización Biológica de Nutrientes. Vol. II. J Olivares, JM Barea (eds.). CSIC, Madrid. pp. 105-124.

Barea JM (1997) Mycorrhiza/bacteria interactions on plant growth promotion. En Plant Growth-Promoting rhizobacteria, Present Status and Future Prospects. A Ogoshi, L Kobayashi, Y Homma, F Kodama, N Kondon, S Akino (eds). OECD, Paris. pp. 150-158.

Barea JM, Azcón-Aguilar C (1983) Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants. En advances in Agronomy. Vol. 36. NC Brady (ed.). Academic Press, New York, USA. pp. 1-54.

Barea JM, Azcón-Aguilar C, Azcón R (1991) The role of vesicular-arbuscular mycorrhizae in improving plant N adquisition from soil as assessed with 15N. Int. Symp. on the use of stable isotopes in plant nutrition, soil fertility and environmental studies. IAEA, Viena. pp. 209-216.

Barea JM, Azcón R, Azcón-Aguilar C (1993) Mycorrhiza and Crops. En Advances in Plant Pathology Vol. 9. Mycorrhiza: A Synthesis. I Tommerup (ed.). pp. 167-189. Academic Press, London.

Barea JM Tobar RM, Azcon-Aguilar C (1996) Effext of a genetically modified *Rhizobium meliloti* inoculant on the development of arbuscular mycorrhizas, root morphology, nutrient uptake and biomass accumulation in *Medicago sativa.* New Phitol 134:361-369.

Barea JM, Azcón-Aguilar C, Azcón R (1997) Interactions bewteen mycorrhizal fungi and rhizosphere micro-organisms within the context of sustainable soil-plant systems. En Multitrophic interactions in terrestrial systems. AC Gange, VK Brown (eds.). Blackwell Science, Cambridge, pp 65-77.

Barea **JM, Andrade G, Bianciotto V, Dowling D, Lohrke S, Bonfante P, O'Gara F, Azcón-Aguilar C** (1998) Impact on arbuscular mycorrhizal formation of *Pseudomonas* strains used as inoculants for the biocontrol of soil-borne plant fungal pathogens. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2304-2307.

Barea JM, Azcón R (1989) En Frontiers in Applied Microbiology vol. III. KG Mukerji, VP Singh y KL Garg (eds.). Rastogy and Company, Subhash Bazar, Meerut-250 002 India pp. 135-166.

Barea JM, Azcón-Aguilar C, Azcón R (1987) Vesicular-arbuscular mycorrhiza improve both symbiotic N2-fixation and N uptake from soil as assessed with a N technique under filed conditions. New Phytol. 106: 717-725.

Barea JM, Bonis AF, Olivares J (1983) Interactions between *Azospirillum* and VA mycorrhiza and their effects on growth and nutrition of maize and riegrass. Soil Biol. Biochem. 15: 705-709.

Barea JM, Olivares J (1998) Manejo de las propiedades biológicas del suelo. En: Agricultura Sostenible. RM Jiménez-Díaz, J Lamo de Espinosa (Eds.). Mundi Prensa, Madrid, España. ISBN: 84-7114-718-1.

Bashan Y (1998) Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. Biotechnol. Advances16: 729-770.

Bashan Y, Levanony H (1990) Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Can. J. Microbiol. 36: 591-608.

Bashan Y, Holguin G (1997) *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). Can. J. Microbiol. 43: 103-121.

Bashan Y, Holguin G (1998) Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) and PGPB. Soil Biol. Biochem. 30: 1225-1228.

Bashan Y, Alcaraz-Melendez L, Toledo G (1992) Responses of soybean and cowpea root membranes to inoculation with *Azospirillum brasilense*. Symbiosis 13: 217-228.

Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil 39: 205-207.

Baylis GTS (1972) Fungi, phosphorus, and the evolution of root systems. Search 3: 257-259.

Beam HW (1971) Effect of fluometuron and prometryne on ß-galactosidase and phosphatase produced by Rhizoctonia solani Khun in soil culture. M.S. Thesis. Auburn University, 86pp.

Bedmar EJ, Olivares J (1982) Limitaciones de la fijación biológica de nitrógeno. Investigación y Ciencia. Febrero: 26-34.

Becana M, Bedmar EJ (1991) Metabolismo del nitrógeno y oxígeno en nódulos de leguminosas. En Fijación y Movilización Biológica de Nutrientes. Vol. II. J Olivares, JM Barea (eds). CSIC, Madrid. pp. 33-50.

Becana M, Aparicio-Tejo PM, Sánchez-Díaz M (1985) Nitrate and nitrite reduction in the plant fraction of alfalfa root nodules. Physiol. Plant. 65: 185-188.

Bellapart C (1988) Agricultura biológica en equilibrio con la agricultura química. AEDOS (ed). Barcelona, España. 280pp.

Bellone CH, de Bellone SC (1995) Morphogenesis of strawberry roots infected by *Azospirillum brasilense* and V.A. Mycorrhiza. NATO ASI Ser. Ser. G. 37: 251-255.

Benbrook CM (1991) Introduction. In Sustainable Agriculture Research and Education in the Field, A proceedings. National research council, National Academy Press, Washington, D.C., pp 1-10.

Berta G, Fusconi A, Trotta A, Scannerini S (1990) Morphogenetic modifications induced by the mycorrhizal fungus *Glomus* strain E_3 in the root system of *Allium porrum* L. New Phytol. 114: 207-215.

Berta **G, Fusconi A, Trotta A** (1993) VA mycorrhizal infection and the morphology and function of root systems. Env. Exp. Botany 33: 159-173.

Berta G, Trotta A, Fusconi A, Hooker JE, Munro M, Atkinson D, Giovannetti M, Morini S, Fortuna P, Tisserant B, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (1995) Arbuscular mycorrhizal induced changes to plant growth and root system morphology in *Prunus cerasifera*. Tree Physiol. 15: 281-293.

Bethlenfalvay GJ, Bayne HG y Pacovsky RS (1983) Parasitic and mutualistic associations between a mycorrhizal fungus and soybean: The effect of phosphorus on host plant-endophyte interactions. Physiol. Plant. 57: 543-548.

Bethlenfalvay GJ, Brown MS y Stafford AE (1985) *Glycine-Glomus-Rhizobium* symbiosis II. Antagonistic effects between mycorrhizal colonization and nodulation. Plant Physiol. 79: 1054-1058.

Bethlenfalvay GJ, Brown MS y Newton WE (1987) Photosynthetic water- and nutrient-use efficiency in a mycorrhizal legume. En Mycorrhizae in the next decade. Practical applications and research priorities. Proc. 7th NACOM, Gainesville, Florida, pp. 231-233.

Bieleski RL (1973) Annu. Rev. Plant Physiol. 24: 225-252.

Bohlool BB, Ladha JK, Garrity DP y George T (1992) Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: A perspective. Plant soil 141: 1-11.

Bolton HJ, Fredrickson JK, Elliott LF (1993) Microbial ecology of the rhizosphere. En: Soil Microbial Ecology. FBJ Metting (ed.). Marcel Dekker, New York. pp. 27-63.

UNIVERSIDAD DE GRANADA
28 JUN. 1999
COMISION DE DOCTORADO

Bowen GD (1980) Misconception, concepts and approaches in rhizosphere biology. En Contemporary Microbial Ecology. DC Ellwood, MJ Lantham, JN Lynch y JM Slater (eds.) Academic Press, London, pp 283-304.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms of protein, utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

Briat JF (1992) Iron assimilation and storage in prokaryotes. J. Gen. Microbiol. 138: 2475-2483.

Brown ME, Burlingham SK y Jackson RM (1964) Studies on *Azotobacter* species in soil. III. Effects of artificial inoculation of crop yields. Plant Soil 20: 194-214.

Brundrett M (1991) Mycorrhizas in Natural Ecosystems. En: Advances in Ecological Research. A Macfayden, M Begon, AH Fitter (eds.). Academic Press, London. vol 21. pp. 171-313.

Bull CT, Weller DM y Thomashow LS (1991) Relationship between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79. Phytopathol. 81: 954-959.

Burla M, Goverde M, Schwinn FJ y Wiemken A (1996) Influence of biocontrol organisms on root pathogenic fungi and on the plant-symbiotic microorganisms *Rhizobium phaseoli* and *Glomus mosseae*. J. Plant disease and Protection 103: 156-163.

Calvet C, Pera J y Barea JM (1990) Interactions of *Trichoderma* spp. with *Glomus mosseae* and two wilt pathogenic fungi. Agric. Ecosyst. Environ. 29: 59-65.

Calvet C, Barea JM y Pera J (1992) *In vitro* interactions between the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and some saprophytic fungi isolated from organic substrates. Soil. Biol. Biochem. 24: 775-780.

Calvet C, Pera J y Barea JM (1993) Growth response of marigold (*Tagetes erecta* L.) to inoculation with *Glomus mosseae*, *Trichoderma aureoviride* and *Phytium ultimum* in a peat perlite mixture. Plant Soil 148: 1-6.

Cambardella CA y Elliott ET (1993) Carbon and nitrogen distribution in aggregates from cultivated and native grassland soils. Soil Sci. Soc. Am. J. 57: 1071-1076.

Cambardella CA y Elliott ET (1994) Carbon and nitrogen dynamics of soil organic matter fractions from cultivated and native grassland soils. Soil Sci. Soc. Am. J. 58: 123-130.

Camprubí A, Calvet C y Estaún V (1995) Growth enhancement of *Citrus reshni* after inoculation with *Glomus intraradices* and *Trichoderma aureoviride* and associated effects on micorbial populations and enzyme activity in potting mixes. Plant and soil 173: 233-238.

Carr GR, Hinkley MA (1985) Germination and hyphal growth of Glomus caledonium on water-agar containing Benomyl. Soil Biol. Biochem. 17:313-316.

Carroll H, Moenne-Loccoz Y, Dowling DN, O'Gara F (1995) Mutational disruption of the biosinthesis genes coding for the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol does not influence the ecological fitness of *Pseudomonas fluorescens* F113 in the rizosphere of sugarbeets. Appl. Env. Micro. 61 (8): 3002-3007.

Carruthers FL, Shum-Thomas T, Conner AJ, Mahanty HK (1995) The significance of antibiotic production by *Pseudomonas aureofaciens* PA147-2 for biological control of *Phytophthora megasperma* root rot of of asparagus. Plant Soil 170: 339-344.

Caba JM, Lluch C, Hervás A, Ligero F (1990) Nitrate metabolism in roots and nodules of *Vicia faba* in response to exogenous nitrate. Physiol. Plant. 79: 531-539.

Carrillo A, Bashan Y (1997) Microencapsulation as a potential carrier for plant-growth promoting bacteria. En Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-present status and future prospects. A Ogoshi, K Kobayashi, Y Homma, F Kodama, N Kondo, S Akino (eds.). Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan. pp. 460-463.

Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg GV, van der Bij AJ, van der drift KMGM, Schripsema J, Kroon B, Scheffer RJ, Keel C, Bakker PAHM, Tichy HV, de Bruijn FJ, Thomas-Oates, Luttenberg B (1998). Biocontrol of phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by Fusarium oxysporum f. sp. radicis lycopersici. Mol. Plant-Microbe Inter. 11: 1069-1077.

Cook RJ, Thomashow LS, Weller DM, Fujimoto D, Mazzola M, Bangera G y Kim DS (1995) Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4197-4201.

Costacurta A, Vanderleyden J (1995) Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. Crit. Rev. Microbiol. 21: 1-18.

Costacurta A, Keijers V, Vanderleyden J (1994) Mol. Gen. Genet. 243: 463-472.

Daft MJ y El-Giahmi AA (1976) Ann. Appl. Biol. 83: 273-276.

Danso SKA (1988) En Nitrogen Fixation by Legumes in Mediterranean Agriculture. DP Beck y LA Materon (eds.) ICARDA Martinus Nijjoff, Dordrecht. pp 245-358.

Datnoff LE, Nemec S y Pernezny K (1995) Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*. Biol. Control 5: 427-431.

Dehne HW y Backhaus GF (1986) J. Plant Dis. Prot. 83: 415-424.

de la Cruz J, hidalgo-Gallego A, Lora JM, Benítez T, Pintor-Toro JA y Llobell A (1992) Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. Eur. J. Biochem. 206: 859-867.

de Lorenzo C, Iannetta PPM, Fernández-Pascual M, James EK, Lucas MM, Sprent JI, Witty JF, Minchin FR y de Felipe MR (1993) Oxigen diffusion in lupin nodules. II Mechanisms of diffusion barrier operation. Jour. of Exp. Botany 44, 266: 1469-1474.

de **Weger LA, van Boxtel R, van der Burg B, Gruters RA, Geels FP, Schippers B, Lutenberg BJJ** (1986) Siderophores and outer membrane proteins of antagonistic, plant growth stimulating, root colonizing Pseudomonas spp. J. Bacteriol. 165: 585-594.

Dhillon SS (1992) Dual inoculation of pretransplant stage *Oryza sativa* L. plants with indigenous vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and fluorescent *Pseudomonas* spp. Biol. Fert. Soils 13: 147-151.

Díaz G, Azcón-Aguilar C, Honrrubia M (1996) Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Zn and Pb) uptake and growth of *Lygeum spartium* and *Anthyllis cytisoides*. Plant Soil 180: 241-249.

Dodd JC (1994) Approaches to the study of the extramatical mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi. En Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems. S Gianinazzi, H Schüepp (eds.). Basel, Switzerland: Birkhaüser Verlag, 147-166.

Dosselaere F, Vande Broek A, Lambrecht M, de Troch P, Prinsen E, Okon Y, Keijers V, Vanderleyden J (1997) Indole-3-acetic acid biosynthesis in *Azospirillum brasilense*. En Plant Growth Promoting Rhizobacteria-Present Status and Future Prospects-.Proceedings of the Fourth International Workshops on PGPR. A Ogoshi, K Kotayashi, Y Homma, F Kodama, N Kondo, S Akino (eds.). Japan-OECD Joint Workshop. ISBN 4-9900627-0-1.

Dowling DN, Broughton WJ (1986) Competition for nodulation of legumes. Annu. Rev. Microbiol. 40: 131-157.

Dowling DN, O'Gara F (1994) Metabolites of Pseudomonas involved in the biocontrol of plant disease. Trends Biotechnol. 12: 133-141.

Dowling DN, Boesten B, O'Sullivan DJ, Stevens P, Morris J, O'Gara F (1992) Genetically modified plant-microbe interacting strains for potential release into the rhizosphere. En Pseudomonas Molecular Biology and Biotechnology. E Galli, S Silver, B Witholt (eds). American Society for Microbiology, Washington DC. pp 408-414.

Dowling DN, Boesten B, Gill Jr PR, O'Gara F (1994) Developing Concepts in Biological Control: A Molecular Ecology Approach. En Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms. Biotechnology and the Release of GMOs. F O'Gara, DN Dowling, B Boesten (eds). Wienheim, Germany. pp. 57-65.

Dubeikovsky AN, Mordukhova EA, Kochetkov VV, Polikarpova FY, Boronin AM (1993) Growth promotion of blackcurrant softwood cuttings by recombinant strain Pseudomonas fluorescens BSP53a synthesizing an increased amount of indole-3-acetic acid. Soil Biol. Biochem. 25: 1277-1281.

Dubrovsky JG, Puente ME, Bashan Y (1994) *Arabidopsis thaliana* as a model system for the study of the effect of inoculation by *Azospirillum brasilense* Sp245 on root hairs growth. Soil Biol. Biochem. 26: 1657-1664.

Dunne P (1998) Analysis of determinants mediating biological control of *Phytium ultimun* by *Stenotrophomonas maltophilia* strain W81. Tesis Doctoral, Universidad de Cork, Irlanda.

Elliott LF, Lynch JM (1995) The international workshop on establishment of microbial inocula in soils: cooperative research project on biological resource management of the organization for economic cooperation and development (OECD). Am. J. Alter. Agric. 10: 50-73.

Emerson WW, Foster RC, Oades JM (1986) Organo-mineral complexes in relation to soil aggregation. En Interactions of Soil Minerals with Natural Organics and Microbes. PM Huang y M Schnitzer (eds). Soil Sci. Soc. Am. Special Publication 17, Soil Science Society of America, Madison, pp. 521-548.

Fages J (1992) An industrial view of *Azospirillum* inoculants: formulation and application technology. Symbiosis 13: 15-26.

Fenton AM, Stephens PM, Crowley J, O'Callaghan M, O'Gara F (1992) Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. Appl. Environ. microbiol. 58: 3873-3878.

Fontanet X, Estaun V, Camprubí A, Calvet C (1998) Fungicides added to potting substrate affect mycorrhizal symbiosis between a peach-almond rootstock and *Glomus* sp. Hortscience 33: 7: 1217-1219.

Foster RE (1994) Microorganisms and soil aggregates. En Soil Biota Management in Sustainable Farming Systems. CE Pankhurst, BM Double, VVSR Gupta y PR Grace (eds). CSIRO Information Services, Melbourne, pp. 144-155.

Francis R Read DJ (1994) The contribution of mycorrhizas fungi to the determination of plant community structure. Plant Soil 159: 11-25.

Fravel D (1988) Role of antibiotics in the biocontrol of plant diseases. Ann. Rev. Phytopathol. 26: 75-91.

Frey B, Schüepp H (1993) A role of vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal fungi in facilitating interplant nitrogen transfer. Soil. Biol. Biochem. 25: 651-658.

Fridlender M, Inbar J, Chet I (1993) Biological control of soilborne plant pathogens by a ß-1,3 glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. Soil Biol. Biochem. 25: 1211-1221.

Garbaye J (1994) Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. New Phytol. 128: 197-210.

García-Garrido JM, Ocampo JA (1989) Effect of VA mycorrhizal infection of tomato on damage caused by *Pseudomonas syringae*. Soil Biol. Biochem. 21: 165-167.

Gavito ME, Miller MH (1998) Changes in mycorrhizal development in maize induced by crop management practices. Plant Soil 198: 185-192.

Geels FP, Schippers B (1983) Reducton of yield depressions in high frequency potato cropping soil after seed tuber treatments with antagonistic fluorescens *Pseudomonas* spp. Phytophatol. Z. 108: 207-214.

Gerdemann JW (1975) En The Development and Function of Roots. JG Torrey y DT Clarkson (eds.). Academic Press, New York. pp575-591.

Gerdeman JW, Nicholson JH (1963) Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet-sieving and decanting. Trans. Br. Mycol. Soc. 46: 235-244.

Germida JJ, Walley FL (1996) Plant growth-promoting rhizobacteria alter rooting patterns and arbuscular mycorrhizal fungi colonization of field-grown spring wheat. Biol. Fert. Soils 23: 113-120.

Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (1981) En The Fungal Community; Its Organization and Role in the Ecosystem. DT Wicklow y GC Carrol (eds.). Dekker, New York. pp 637-652.

Gianinazzi S, Trouvelot A, Gianinazzi-Pearson V (1990) Role and use of mycorrhizal in horticultural crop production. XXIII International Horticulture Congress. Florence. pp. 25-30.

Gianinazzi-Pearson V (1984) En Genes Involved in Plant-Microbe Interactions. PDS Verma, TH Hohn (eds.). Springer-Verlag, Wien. pp. 225-253.

Gianinazzi-Pearson V (1996) Plant Cell Response to Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Getting to the Roots of the symbiosis. The Plant Cell 8: 1871-1883.

Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (1983) The physiology of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots. Plant and Soil 71: 197-209.

Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (1986) The physiology of improved phosphate nutrition on mycorrhizal plants. En Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae. V Gianinazzi-Pearson, S Gianinazzi (eds.). Paris, INRA. pp. 101-109.

Gianinazzi-Pearson V, Azcón-Aguilar C (1991) Fisiología de las micorrizas vesículo-arbusculares. En Fijación y Movilización Biológica de Nutrientes. Vol. II. J Olivares, JM Barea (eds.). CSIC, Madrid. pp. 175-202.

Giovannetti M, Sbrana C, Citernesi AS, Avio L (1996) Analysis of factors involved in fungal recognition responses to host-derived signal by arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol. 133: 65-71.

Glick BR (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Can. J. Microbiol. 41: 109-117.

Glick BR, Jacobson CB, Schwarze MMK, Pasternak JJ (1994) 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation. Can. J. Microbiol. 40: 911-915.

Goldman GH, Hayes C, Harman GE (1994) Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. Trends Biotechnol. 12: 478-482.

González SB (1988) Ecología y biotecnología de micorrizas en leguminosas (soja y alfalfa). Tesis Doctoral, Universidad de Granada.

Gori A, Favilli F (1995) First results on individual and dual inoculation with *Azospirillum-Glomus* on wheat. NATO ASI Ser. Ser. G. 37: 245-249.

Gryndler M, Vosátka M (1996) The response of *Glomus fistolosum-maize* mycorrhiza to treatments with culture fractions from *Pseudomonas putida*.Mycorrhiza 6: 207-211.

Gryndler M, Hrselová H, Chvátalová I, Jansa J (1998) The effect of selected plant hormones on i*n vitro* proliferation of hyphae of *Glomus fistolosum*. Biologia Plantarum 41: 255-263.

Gupta S, Arora DK, Srivastava AK (1995) Growth promotion of tomato plants by rhizobacteria and imposition of energy stress of *Rhizoctonia solani*. Soil Biol. Biochem. 27 (8): 1051-1058.

Haahtela K, Laakso T, Nurmiaho-Lassila EL, Korhonen TK (1988) Effects of inoculation of *Poa pratensis* and *Triticum aestivum* with root-associated, N2-fixing *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Azospirillum*. Plant Soil 106: 239-248.

Hadas R, Okon Y (1987) Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on root morphology and respiration in tomato seedlings. Biol Fertil Soils 5:241-247.

Hale MG, Orcutt DM (1987) The Physiology of Plants under Stress. John Willey and Sons, New York.

Handelsman J, Stabb EV (1996) Biocontrol of soilborne plant-pathogens. The Plant Cell 8: 1855-1869.

Hardarson G (1990) Use of nuclear techniques in studies of soil-plant relationships. Training course series nº 2. IAEA, Vienna, 223p.

Hardarson G, Danso SKA (1990) Use of ^{15}N methodology to assess biological nitrogen fixation. En: Use of Nuclear Techniques in Studies of Soil-Plant Relationships. G. Hardarson (ed.). Vienna: International Atomic Energy Agency, 129-160.

Hardie K (1985) the effect of removal of extraradical hyphae on water uptake by vesicular arbuscular mycorrhizal plants. New Phytol. 101 (4): 607-684

Hardy RWF, Havelka VD (1975) Nitrogen fixation research: A key to world food. Science 188: 633-643.

Harley JL Smith SE (1983) Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London. 483 pp.

Harris RF, Chester G, Allen ON (1966) Dynamics of soil aggregation. Adv. Agron. 18: 107-169.

Hayman DS (1983) The physiology of vesicular-arbuscular endomycorrhizal symbiosis. Can. J. Bot. 61: 944-963.

Henkel TW, Smith WK, Christensen M (1989) Infectivity and effectivity of indigenous vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi from contiguous soil in southwestern Wyoming, USA. New Phytol. 112: 205-214.

Hepper CM, Sen R, Azcón-Aguilar C, Grace C (1988a) Variation in certain isoenzyme analysis amongst different geographical isolates of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus clarum*, *Glomus monosporum* and *Glomus mosseae*. Soil Biol. Biochem. 20: 51-59.

Hepper CM, Azcón-Aguilar C, Rosendahl S, Sen R (1988b) Competition between three species of *Glomus* used as spatially separated introduced and indigenous mycorrhizal inocula for leek (*Allium porrum* L.) New Phytol. 110: 207-215.

Hervás A (1988) Selección de razas de *Rhizobium leguminosarum* y su tolerancia al nitrógeno combinado en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Tesis Doctoral, Universidad de Granada.

Herrera MA, Salamanca CP, Barea JM (1993) Inoculation of woody Legumes with selected arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia to recover desertified mediterranean ecosystems. Appl Environ Microbiol 59:129-133.

Hewitt EJ (1952) Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Tech. Commun. nº 22, Farnham Royal. Commonwealth Agriculture Bureau, Bucks. Gran Bretaña, 547 pp.

Hiltner R (1904) Uber neuere Erfahrungen und Probleme auf them Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung und Brache. Arb. Deut. Landw. Ges. 98: 59-78.

Homma Y (1994) Mechanisms in biological control - focused on the antibiotic pyrrolnitrin. En Proc. Thrid Int. Workshop, PGPR, Adelaide. pp 100-103.

Hong Y, Pasternak JJ, Glick BR (1991) Biological consequences of plasmid transformation of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. Can. J. Microbiol. 37: 796-799.

Horwarth WR, Elliot LF, Lynch JM (1998) Influence of soil quality on the function of inhibitory rhizobacteria. Letters in Appl. Microbiol. 26: 87-92.

Howell CR, Stipanovic RD, Lumsden RD (1993) Antibiotic production by strains of Gliocladium virens and its relation to the biocontrol of cotton seedlings disease. Biocontrol Sci. Technol. 3: 435-441.

Huenneke LF, Hamburg SP, Koide RT, Mooney HA, Vitousek PM (1990) Effects of soil resources on plant invasion and community structure in Californian serpentine grassalnd. Ecology 71: 478-491.

Ibijbijen J, Urquiaga S, Ismaili M, Alves BJR, Boddey RM (1996) Effect of arbuscular mycorrhizas on uptake of nitrogen by *Brachiaria arrecta* and *Sorghum vulgare* from soils labelled for several years with N15. New Phytol. 133: 487-494.

Ibijbijen J, Urquiaga S, Ismaili M, Alves BJR, Boddey RM (1996) Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition and nitrogen fixation of three varieties of common beans (*Phaseola vulgaris*), New Phitol 134:353-360.

Inbar Y, Boehm MJ, Hoitink HAJ (1991) Hydrolysis of fluorescein diacetate in Sphagnum peat container media fro predicting suppressiveness to damping-off caused by Phytium ultimum. Soil Biol. Biochem. 23: 479-483.

Jacobson CB, Pasternak JJ, Glick BR (1994) Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. Can. J. Microbiol. 40: 1019-1025.

Jarstfer AG, Sylvia DM (1992) Inoculum production and inoculation strategies for vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. En Soil Microbial Ecology: Applications in Agriculture and Environmental Management. B Metting (ed). Marcel Dekker, New York, pp. 349-377.

Jeffries P, Barea JM (1999) Arbuscular Mycorrhiza- a key component of sustainable plant-soil ecosystem. (en prensa).

Jeffries P, Dodd JC (1991) the use of mycorrhizal inoculants in forestry and agriculture. En Handbook of Applied Microbiology vol I. Soil and Plants. DK Arora, B Rai, KG Mukerji, GR Knudsen (eds). Marcel Dekker, New York. pp. 155-186.

Johansen A, Jakobsen I, Jensen ES (1992) Hyphal transport of 15N-labelled nitrogen by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and its effects on depletion of inorganic soil N. New Phytol. 122: 281-288.

Johnson NC, Pfleger FL (1992) Vesicular-arbuscular mycorrhizae and cultural stress. En Mycorrhiza in Sustainable Agriculture. GJ Bethlenfalvay, RG Linderman (eds). ASA Spec Publ Madison. WI. pp. 71-99.

Johnson NC, Pfleger FL, Crookston RK, Simmons SR, Copeland PJ (1991) Vesicular-arbuscular mycorrhizas respond to corn and soybean cropping history. New Phytol. 117: 657-663.

Kaiser JJ, Lewis OAM (1984) Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in leaves and roots of nitrate fed *Helianthus annuus* L. Plant Soil 70: 127-130.

Kaldorf M, Zimmer W, Bothe H (1994) Genetic evidence for the ocurrence of assimilatory nitrate reductase in arbuscular mycorrhizal and other fungi. Mycorrhiza 5: 23-28.

Keel C, Schnider U, Maurhofer M, Voisard C, Laville J, Burger U, Wirthner P, Haas D, Défago G (1992) Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHAO: importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. Mol. Plant-Microbe Interact. 5: 4-13.

Kennedy AC, Smith KL (1995) Soil microbial diversity and the sustainability of agriculture soils. Plant Soil 170: 75-86.

Kim KY, Jordan D, McDonald (1998) Effect of phosphate solubilizing bacteria and vesicular arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. Biol. Fert. Soils 26: 79-87.

Kloepper JW (1992) Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. En Applications in Agriculture Forestry and Environment Management. F Blaine y J Jr. Metting (eds.) Marcel Dekker, New York, pp 255-274.

Kloepper JW (1993) Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. En Soil Microbial Ecology. FBJ Metting (ed.). Marcel Decker, New York, pp. 255-274.

Kloepper JW, Lifshitz R, Zablotowicz RM (1989) Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. Trends Biotechnol. 7: 39-43.

Kloepper JW, Zablotowicz RM, Tipping EM, Lifshitz R (1991) Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. En The rhizosphere and plant growth. DL

Keister y PB Cregan (eds.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, and London. pp. 315-326.

Köhl J, Schlösser E (1989) Effect of two *Trichoderma* spp. on the infection of maize roots by vesicular-arbuscular mycorrhiza. J. Plant Disease Prot. 96: 439-443.

Kombrink E, Somssich IE (1995) Defense responses of plant to pathogens. En Advances in Botanical Research. Vol. 21. JH Andrews y IC Tommerup (eds.). Academic Press Limited. pp 1-34.

Koske RE (1988) Vesicular-arbuscular mycorrhizal of some Hawaiian dune plants. Pacific. Sci. 92: 217-229.

Koske RW, Gemma JN (1992) Fungal reactions to plants prior to mycorrhizal formation. En Mycorrhizal functioning, an integrative plant fungal process. MJ Allen (ed.). Chapman & Hall, New York, pp 3-36.

Kwok OCH, Fahy PC, Hoitink HAJ, Kuter GA (1987) Interactions between bacteria and *Trichoderma hamatum* in suppression of *Rhizoctonia* damping-off in bark compost media. Phytopathol. 77: 1206-1212.

Lachica M, Aguilar A, Yañez J (1973) Análisis foliar. Métodos utilizados en la Estación Experiemental del Zaidín. Anales de Edafología y Agrobiología. Tomo XXXII. Nums. 11-12. Págs. 971-1184.

Laville J, Voisard C, Keel C, Maurhofer M, Defago G, Haas D (1992) Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1562-1566.

Law R, Lewis DH (1983) Biotic environments and the maintenance of sex-some evidence from mutualistic symbioses. Biol. J. of the Linnean Society 20: 249-276.

Levy E, Gough FJ, Berlin KD, Guiana PW, Smith JT (1992) Inhibition of *Septoria tritici* and other phytopathogenic fungi and bacteria by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotics. Plant Pathol. 41: 335-341.

Lim HS, Kim YS, Kim SD (1991) *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic tansformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. Appl. Environ. Microbiol. 57: 510-516.

Linderman RG (1988) Mycorrhizal interations with the rhizosphere microflora: The mycorrhizosphere effect. Phytopathology 78: 488-505.

Linderman RG (1992) Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbiota interactions. En Mycorrhizae in Sustainable Agriculture. GJ Bethlenfalvay y RG Linderman (eds.). ASA Spec. Plub., Madison, pp 45-70.

Linderman RG (1994) Role of VAM fungi in biocontrol. En Mycorrhizae and Plant Health. FL Pfleger y RG Linderman (eds.). APS Press, St. Paul, pp 1-26.

Lluch C, Delgado MJ, Cordovilla MP, Ocaña A, Ligero F (1994) Aspects physiologiques de la fixation d'azote de la symbiose Rhizobium-légumineuse sous stress salin: effet du nitrate. Les Colloques INRA 77: 57-71.

Lluch C, Ocaña A (1997) Fijación y movilización biológica de nutrientes. En Nutrición Mineral de las Plantas en la Agricultura Sostenible. Junta de Andalucía. Congresos y Jornadas 40/97. pp. 7-10.

López-Bermúdez F, Albaladejo J (1990) Factores ambientales de la degradación del suelo en el área mediterránea. En Soil degradation and rehabilitation in mediterranean environmental conditions. J Albaladejo, MA Stocking y E Díaz (eds.) C.S.I.C., Murcia pp 15-45.

Lovato PE, Schüepp H, Trouvelot A, Gianinazzi S (1995) Application of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in orchard and ornamental plants. En Mycorrhiza Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology. A Varma, B Hock (eds).Springer, Heidelberg. pp. 521-559.

Lynch JM (1976) Products of soil micro-organisms in relation to plant growth. CRC Critical reviews in Microbiology 5: 67-107.

Lynch JM (1990) The Rhizosphere. John Wiley, New York, pp 258.

Manjunath A, Bagyaraj J (1984) Effect of fungicides on mycorrhizal colonization and growth of onion. Plant and Soil 80: 147-150.

Marschner P, Crowley D (1996) Root colonization of mycorrhizal and non-mycorrhizal pepper (*Capsicum annuum*) by *Pseudomonas fluorescens* 2-79RL. New Phytol. 134: 115-122.

Marsh BAB (1971) Measurement of lenght in random arrangements of lines. J. Appl. Ecol. 8: 265.

Maurhofer M, Keel C, Schinder U, Voisard C, Haas D, Défago G (1992) Influence of enhanced antibiotic production in Pseudomonas fluorescens strain CHAO on its disease suppressive capacity. Phytopathol. 82: 190-195.

Maurhofer M, Keel C, Haas D, Défago G (1995) Influence of plant species on dissease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 with enhanced antibiotic production. Plant Pathol. 44: 40-50.

Mazzola M, Fujimoto DK, Thomashow LS, Cook RJ (1995) Variation in sensitivity of *Gaeumannomyces graminis* to antibiotics produced by fluorecent *Pseudomonas* spp. and effect on biological control of take-all of wheat. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2554-2559.

McAllister CB, García-Romera I, Godeas A, Ocampo JA (1994a) Interactions between *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani* and *Glomus mosseae*: Effects on plant growth, arbuscular mycorrhizas and the saprophyte inoculants. Soil. Biol. Biochem. 26: 1363-1367.

McAllister CB, García-Romera I, Godeas A, Ocampo JA (1994b) *In vitro* interactions between *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani* and *Glomus mosseae*. Soil. Biol. Biochem. 26: 1369-1374.

McGovern RJ, Datnoff LE y Tripp L (1992) Effect of mixed infection and irrigation method on colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*. Proc. Fla. State Hortic. Soc. 105: 361-363.

McGrath SP (1994) Effects of heavy metals from sewage sludge on soil microbes in agricultural ecosystems. In Toxics Metals in Soil-Plant Systems. SM Ross, de., John Wiley & SonsLtd., Chichester, UK, pp 247-274.

Mei R, Chen B, Lu S, Chen Y (1990) Field application of yield increasing bacteria (YIB). Chin. J. Microecol. 2: 45-49.

Mellor RB (1992) Is trealose a symbiotic determinant in symbioses between higher plants and microorganisms?. Symbiosis, 12:113-129.

Menze H (1985) Interactions between *Azospirillum* and VA-mycorrhiza in Gramineae at Different Soil pH Levels. J. Agronomy & Crop Science 155: 232-237.

Meyer JR, Linderman RG (1986) Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting bacterium, Pseudomonas putida. Soil Biol. Biochem. 18: 185-190.

Meyer JR, Linderman RG (1986) Selective influence on populations of rhizosphere bacteria and actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum*. Soil Biol. Biochem. 18: 191-196.

Michiels K, Vanderleyden J, Van Gool A (1989) Azospirillum-plant root associations: A review. Biol. Fert. Soils 8: 356-368.

Mishustin EN (1963) Bacterial fertilizers and their effectiveness. Microbiologia 32: 774-778.

Mishustin EN, Naumova AN (1962) Bacterial fertilizers, their effectiveness and mode of action. Microbiology 31: 442-452.

Möenne-Loccoz Y, Powell J, Higgins P, McCarthy J, O'Gara F (1998) An investigation of the impact of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* F113 on the growth of sugarbeet and the performance of subsequent clover-*Rhizobium* symbiosis. Appl. Soil Ecol. 7: 225-237.

Mosse B (1962) The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizae under aseptic conditions. J. Gen. Microbiol. 27: 509-520.

Mosse B (1977) En Exploiting the Legume-Rhizobium Symbiosis in Tropical Agriculture. JM Vincent, AS Witney y J Bose (eds.). College of Tropical Agriculture, University of Hawaii, Miscellaneous Publication 145. pp 275-292.

Morton JB, Bentivenga SP (1994) Levels of diversity in endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes) and their role in defining taxonomic and non-taxonomic groups. Plant Soil 159: 47-59.

Mulongoy K, Gianinazzi S, Roger PA, Dommergues Y (1992) Biofertilizers: agronomic and environmental impacts and economics. En Microbial Technology: Economic and Social Aspects. E Da Silva *et al*. (eds). Cambridge University Press, Cambridge. pp. 59-69.

Naseby DC, Pascual JA, Linch JM (1999) Effect of biocontrol strains of Trichoderma on plant growth, Phytium ultimum populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. J. Appl. Microbiol. (en prensa).

Natsch A, Keel C, Pfirter HA, Haas D, Defago G (1994) Contribution of the global regulator gene *gac*A to persistence and dissemination of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0 introduced into soil microcosms. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2553-2560.

Nehl DB, Allen SJ, Brown JF (1996) Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. Applied Soil Ecol. 5: 1-20.

Neilands JB (1984) Siderophores of bacteria and fungi. Microbiol. Sci. 1: 9-14.

Nelson N (1944) A photometric adaptation of the somogyi method for determination of glucose. J. Biol. Chem. 153: 375-380.

Nemec S (1986) En Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants. GR Safir (ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida. pp 193-211.

O'Gara F, Dowling DN, Boesten B (1994) Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms. VCH Weinheim.

Okon Y, Kapulnik Y (1986) Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. Plant and Soil 90: 3-16.

Okon Y, Labandera-González CA (1994) Agronomic applications of *Azospirillum*. En Improving plant productivity with rhizosphere bacteria. MH Ryder, PM Stephens y GD Bowen (eds.). Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Adelaide, Australia. pp. 274-278.

Olivares J, Barea JM (1995) Fijación y mobilización biológica de nutrientes. Fronteras de la Ciencia y Tecnología 8: 42-44.

O'Sullivan DJ, O'Gara F (1992) Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. Microbiol. Rew. 56: 662-676.

Packovsky RS (1988) Influence of inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Glomus fasciculatum* on sorghum nutrition. Plant and Soil 110: 283-287.

Pacovsky RS, Da Silva P,Carvalho MT, Tsai SM (1991) Growth and nutrient allocation in *Phaseolus vulgaris* L. colonized with andomycorrhizae or Rhizobium. Plant Soil 132: 127-137.

Panwar JDS (1993) Response of VAM and *Azospirillum* inoculaton to water status and grain yield in wheat under water stress conditions. Indian J. Plant Physiol. 36: 41-43.

Parke JL (1990) Population dynamics of *Pseudomonas cepacia* in the pea spermosphere in relation to biocontrol of *Phytium*. Phytopathol. 80: 1307-1311.

Patten CL, Glick BR (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3acetic acid. Can. J. Microbiol. 42: 207-220.

Paul E, Fages J, Blanc p, Goma G, Pareilleux A (1993) Survival of alginate-entrapped cells of *Azospirillum lipoferum* during dehydratation and storage in relation to water properties. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40: 34-39.

Paula MA, Urquiaga S, Siqueira JO, Dobereiner J (1992) Synergistics effects of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria on nutrition and growth of sweet potato (Ipomoea batatas). Biol. Fert. Soils 14: 61-66.

Pauli FW (1967) Soil Fertility. A Biodinamical Approach. A Hilger (ed.). London.

Paulitz TC, Baker R (1987) Biological control of Phytium damping-off of cucumbers with *Phitium nunn*: Population dynamics and disease suppression. Phytopathol. 77: 335-340.

Paulitz TC, Linderman RG (1989) Interactions between pseudomonads and VA mycorrhizal fungi. New Phytol. 103: 37-45.

Pauu AS (1989) Improvement of *Rhizobium* inoculants. Appl. Environ. Microbiol. 55: 862-865.

Phillips DA, Hayman DS (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assesment of infection. Trans. Br. Mycol. Soc. 55: 158-161.

Piao CG, Tang WH, Chen YX (1992) Study on the biological activity of yield-increasing bacteria. Chin. J. Microecol. 4: 55-62.

Piccini D, Azcón R (1987) Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the utilization of Bayobvar rock phosphate by alfalfa plants using a sand-vermiculite medium. Plant Soil 101: 45-50.

Posta K, Marschner H, Römheld V (1994) Manganese reduction in the rhizosphere of mycorrhizal and non-mycorrhizal maize. Mycorrhiza 5: 119-124.

Pozo MJ, Azcón-Aguilar C, Dumas-Gaudot E, Barea JM (1998) Chitosanase and chitinase activities in tomato roots during interactions with arbuscular mycorrhizal fungi or *Phytophthora parasitica*. J. Exp. Bot. 49 (327): 1729-1739.

Pozo MJ, Azcón-Aguilar C, Dumas-Gaudot E, Barea JM (1999) ß-1,3-glucanase activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *Phytophthora parasitica*: time course analysis and possible involvement in bioprotection. (en prensa)

Primo E, Carrasco JM (1973) Análisis de suelos. En Química Agrícola I. Suelos y Fertilizantes. Ed. Alhambra S.A. ISBN 84-205-0448-3. pp 279-282.

Puppi G, Azcón R, Höflich (1994) Management of positive interactions of arbuscular mycorrhizal fungi with essential groups of soil microorganisms. En Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems. S Gianinazzi, H Schüepp (eds.). Basel, Switzerland: Birkhaüser Verlag, 201-215.

Ramos A, Callao V (1967) El empleo de la solubilización de fosfatos en placa como técnica diferencial bacteriana. Microbiol. España 20: 1-2.

Ramos C, Varela M (1990) Nitrate leaching in two irrigated fields in the region of Valencia (Spain). En Nitrates-Agriculture-Eau. Proc. International Symposium. E Calvet (eds.). pp 335-345. Paris.

Ratti N, Janardhanan KK (1996) Response of dual inoculation with VAM and *Azospirillum* on the yield and oil content of Palmarosa (*Cymbopogon martinii* var. *motia*). Microbiol. Res. 151: 325-328.

Raverkar KP, Konde BK (1988) Effect of Rhizobium and *Azospirillum lipoferum* inoculation on the nodulation, yield and nitrogen uptake of peanut cultivars. Plant and Soil 106:248-252.

Requena N (1996) Exploración de la diversidad microbiana (hongos de la micorriza arbuscular- *Rhizobium*- rizobacterias) en un ecosistema mediterráneo desertificado, dirigida a una estrategia de revegetación. Tesis doctoral Universidad de Granada 316 pp.

Requena N, Jimenez I, Toro M, Barea JM (1997) Interactions between plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR), arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* spp. in the rhizosphere of *Anthyllis cytisoides*, a model legume for revegetation in mediterranean semi-arid ecosystem. New Phytol 136: 667-677.

Robert M, Berthelin J (1986) Role of biological and biochemical factors in soil mineral weathering. En Interactions of Soil Minerals with Natural Organics and Microbes. PM Huang y M Schnitzer (eds). Soil Sci. Soc. Am. Special Publication 17, Soil Science Society of America, Madison, pp. 453-496.

Rodríguez-Cáceres EA (1982) Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp.. Appl. Environ. Microbiol. 44 (4): 990-991.

Rogers HJ, Parker MC (1995) Transgenic plants and the environment. J. Exp. Bot. 46, 467-488.

Rosendahl S, Dodd JC, Walker C (1994) Taxonomy and phylogeny of the Glomales. En Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems. S Gianinazzi, H Schüepp (eds.). Basel, Switzerland: Birkhaüser Verlag, 1-12.

Rousseau A, Benhamou N, Chat I, Piché Y (1996) Mycoparasitism of the extramatical phase of *Glomus intraradices* by *Trichoderma harzianum*. Phytopathol. 86: 434-443.

Rovira AD (1963) Microbial inoculation of plants. I. Establishment of free-living nitrogen-fixing bacteria in the rizosphere and their effects on maize, tomato and wheat. Plant soil 19: 304-314.

Ruíz-Lozano JM, Azcón R (1995) Hyphal contribution to water uptake in mycorrhizal plants as affected by the fungal species and water status. Physiol. Plantarum 95 (3): 472-478.

Ruíz-Lozano JM, Azcón R (1996) Mycorrhizal colonization and drought stress as factors affecting nitrate reductase activity in lettuce plants. Agriculture, Ecosystems & Enviroment 60: 175-181.

Safir GR (1980) En The Biology of Crop Productivity. PS Carlson (ed.). Academic Press, New York. pp 231-252.

Sánchez-Díaz M, Pardo M, Antolín M, Peña J, Aguirreolea J (1990) Effect of water stress on photosynthetic activity in the *Medicago-Rhizobium-Glomus* symbiosis. Plant Science 71: 215-221.

Sanders IR, Clapp JP, Wiemken A (1996) The genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in natural ecosystems - a key to understanding the ecology and functioning of the mycorrhizal symbiosis. New Phytol. 113: 123-134.

Sanders IR, Koide RT, Shumway DL (1999) Diversity and structure in natural communities: the role of mycorrhizal symbiosis. En Mycorrhiza: structure, fuction, molecular biology and biotechnology. A Varma, B Hock (eds.) 2nd ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. pp. 571-593.

Sanjuan J, Olivares J (1989) Implication if *nifA* in the regulation of genes affecting *Rhizobium meliloti* nodulation efficiency located on a criptic plasmid. J. Bacteriol. 171: 4154-4161.

Sanjuan J, Olivares J (1991) Multicopy plasmids carrying the *Klebsiella pneumoniae nifA* gene enhanced *Rhizobium meliloti* nodulation competitiveness in alfalfa. Mol. Plant-Microbe Interact. 4: 365-369.

Sarig S, Blum A, Okon Y (1988) Improvement of the water status and yield of field-grown sorghum (*Sorghum bicolor*) by inoculation with *Azospirillum brasilense*. J. Agric. Sci. Camb. 110: 271-277.

Schaller N (1991) Background and status of the low-input sustainable agriculture program. In Sustainable Agriculture Research and Education in the Field, A proceedings. National research council, National Academy Press, Washington, D.C., pp 22-31.

Schellenbaum L, Berta G, Ravolanirina F, Tisserant B, Gianinazzi S, Fitter AH (1991) Influence of endomycorrhizal infection on root morphology in a micropropagated woody plant species (*Vinis vinifera* L.). Ann. Bot. 68: 135-141.

Schinder U, Blumer C, Troxler J, Défago G, Haas D (1994) Overproduction of the antibiotics 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin in *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO. En Improving plant productivity with rhizosphere bacteria. MH Ryder, PM Stephens, GD Bowen (eds.). Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation. pp. 120-121.

Schippers B, Bakker AW, Bakker PAHM (1987) Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. Ann. Rev. Phytophatol. 25: 339-358.

Schnurer J, Rosswall T (1982) Fluorescein diacetate hidrolysis as a mesure of total microbial activity in soil and litter. Appl. Environ. Microbiol. 43: 1256-1261.

Schreider RP, Bethlenfalvay GJ (1997) Plant and soil response to single and mixed species of arbuscular mycorrhizal fungi under fungicide stress. Appl. Soil Ecol. 7: 93-102.

Schroth MN Hancock JG (1982) Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. Science 216: 1376-1381.

Secilia J, Bagyaraj DJ (1987) Bacteria and actinomycetes associated with pot cultures of vesicular-arbuscular mycorrhizas. Can. J. Microbiol. 33: 1069-1073.

Shanahan P (1992) Analytical biotechnology of antimycotic metabolites from fluorescens pseudomonads. Ph. D. dissertation, University College Cork, Cork, Ireland.

Shanahan P, O'Sullivan DJ, Simpson P, Glennon JD, O'Gara F (1992) Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescen pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. Appl. Environ. Microbiol. 58: 353-358.

Siddiqui ZA, Mahmood I (1998) Effect of a plant growth promoting bacterium, an AM fungus and soil types on the morphometrics and reproduction of Meloidogyne javanica on tomato. Appl. Soil Ecol. 8: 77-84.

Sieverding E (1991) Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Deutsche GTZ. GmbH Eschborn, 371 pp.

Sieverding E, Barea JM (1991) Perspectivas de la inoculación de sistemas de producción vegetal con hongos fromadores de micorrizas VA. En Fijación y Movilización Biológica de Nutrientes. J Olivares, JM Barea (eds). Colección Nuevas Tendencias. Vol II, CSIC, Madrid. pp. 221-245.

Simons M, van der Bij AJ, Brand I, de Weger LA, Wijffelman CA, Lugtenberg BJJ (1996) Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. Mol. Plant Microbe Interac.9 (7): 600-607.

Singh CS (1992) Mass inoculum production of vesicular-arbuscular (VA) mycorrhiza: I. Selection of host in the presence of *Azospirillum brasilense*. Zent. Mikrobiol. 147: 447-453.

Smith RE, Rodríguez-Kabana R (1982) The extraction and assay of soil trehalose. Plant Soil 65: 335-344.

Smith SE, Gianinazzi-Pearson V (1988) Physiological interactions between simbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. Ann. Rev. Plant Physiology 39: 221-244.

Snell FD, Snell CT (1949) Colorimetrics methods of analysis. D. Van Nostrand Company, New York. pp. 802-807.

Soler Rovira J, Soler Soler J, Soler Rovira P, Polo Sánchez A (1996) Code of good agriculture practice and water pollution. In C Rodriguez-Barrueco, ed. Fertilizers and Environment, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 561-566.

Soto MJ, Zorzano A, Mercado J, Olivares J, Toro N (1993) Nucleotide sequence and characterization of *Rhizobium meliloti* nodulation competitiveness genes *nfe*. J. Mol. Biol. 229: 570-576.

Spanu P, Boller T, Ludwing A, Wiemken A, Faccio A, Bonfante-Fasolo (1989) Chitinase in roots of mycorrhizal *Allium porrum* : regulation and localization. Planta, 177:447-455.

Staley TE, Lawrence EG y Nance EL (1992) Influence of a plant growth-promoting pseudomonad and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus on alfalfa and birdsfoot trefoil growth and nodulation. Biol. Fert. Soils 14: 175-180.

Stoztky G (1972) Activity, ecology and population dinamic of microorganisms in soil. Crit. Rew. Microbiol. 2: 59-137.

Streeter J (1988) Inhibition of legume nodule formation and N2 fixation by nitrate. CRC Crit. Rev. Plant Sci. 7: 1-23.

Strullu DG (1982) Trans. Int. Col. Mycorrhizes Biol. Perspectives Utilisation, Dijon.

Subba Rao NS, Tilak KVBR, Singh CS (1985) Effect of combined inoculation of *Azospirillum brasilense* and vesicular-arbuscular mycorrhiza on pearl millet (*Pennisetum americanum*). Plant and Soil 84: 283-286.

Sukarno N, Smith SE, Scott ES (1993) The effect of fungicides on vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. I. The effect on vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth. New Phytol. 125: 139-147.

Sukarno N, Smith FA, Smith SE, Scott ES (1996) The effect of fungicides on vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. II. The effects on area of interface and efficiency of P uptake and transfer to plant. New Phytol. 132: 583-592.

Sukarno N, Smith FA, Scott ES, Jones GP, Smith SE (1998) The effect of fungicides on vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. III. The influence of VA mycorrhiza on phytotoxic effects following application of fosetyl-Al and phosphonate. New Phytol. 139: 321-330.

Sylvia DM, Jarstfer GJ (1994) Production of inoculum and inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. En Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry. AD Robson, LK Abbott, N Malajczuk (eds). Kluwer, Dordrecht. pp. 231-238.

Tang WH (1994) Yield-increasing bacteria (YIB) and biocontrol of sheath blight of rice. En Improving plant productivity with rhizosphere bacteria. MH Ryder, PM Stephens y GD Bowen (eds.). Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Adelaide, Australia. pp. 267-274.

Tarrand JJ, Krieg NR, Döbereiner J (1978) A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two species *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) sp. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Can. J. Microbiol. 24: 967-980.

Thiagarajan TR, Ames RN, Ahmad MH (1992) Response of cowpea (Virgna unguiculata) to inoculation with co-selected vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and Rhizobium strains in fields trials. Can J Microbiol 38: 573-576.

Thies JE, Bohlool BB, Singleton PW (1992) Environmental effects on competition for nodule occupancy between introduced and indigenous *rhizobia* among introduced strains. Can. J. Microbiol. 38: 493-500.

Thomashow LS, Weller DM (1988) Role of a phenacine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var *tritici*. J. Bacteriol. 170: 3499-3508.

Thompson JP (1990) Soil Biol. Biochem. 22: 229-240.

Thompson JP (1994) What is the potential for management of mycorrhizas in horticulture?. En Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry. AD Robson, LK Abbott, N Malajczuk (eds). Kluwer, Dordrecht. pp. 191-200.

Tilak KVBR, Dwivedi A (1990) Enhancement of spore germination of *Glomus fasciculatum* by bacterial cell free extracts. Indian J. Exp. Biol. 28: 373-375.

Tilak KVBR, Singh CS (1988) Response of pearl millet (*Pennisetum americanum*) to inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizae and *Azospirillum brasilense* with different sources of phosphorus. Current Science 57: 43-44.

Tobar RM, Azcón R, Barea JM (1994a) The improvement of plant N acquisition from an ammonium-treated, drought-stressed soil by the fungal symbiont in arbuscular mycorrhizae. Mycorrhiza 4: 105-108.

Tobar RM, Azcón R, Barea JM (1994b) Improved nitrogen uptake and transport from 15N-labelled nitrate by external hyphae of arbuscular mycorrhiza under water-stressed conditions. New Phytol. 126: 119-122.

Tobar RM, Azcon-Aguilar C, Sanjuan J, Barea JM (1996) Impact of a genetically modified Rhizobium strain with improved nodulation competitiveness on the early stages of arbuscular mycorrhiza formation. Applied Soil Ecology 4:15-21.

Tommerup IC (1987) Physiology and ecology of VAM spores germination and dormancy in soil. En Mycorrhiza in the next decade, Practical Applications and Research Priorities. DM Sylva, LL Hung, JH Graham (eds.) pp. 175.177. Institute of Food and Agriculture Science, University of Florida, Gainsville.

Toro M (1996) Interacción de bacterias solubilizadoras de fosfatos y micorrizas arbusculares en la optimización del uso de rocas fosfóricas y su evaluación mediante aplicación de técnicas isotópicas. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, España.

Toro M, Azcón R, Barea JM (1997) Improvement of arbuscular mycorrhizal development by inoculation with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (32P) and nutrient cycling. Appl. Environ. Microbiol. 63: 4408-4412.

Toro M, Azcón R, Barea JM (1998) The use of isotopic dilution techniques to evaluate the interactive effects of *Rhizobium* genotype, mycorrhizal fungi, phosphate-solubilizing rhizobacteria and rock phosphate on nitrogen and phosphorus acquisition by *Medicago sativa*. New Phytol. 138: 265-273.

Toyoda H, Utsumi R (1991) Method for the prevention of Fusarium diseases and microorganisms used for the same. U.S. patent No. 4 988 586.

Trillas-Gay MI, Hoitink HAJ, Madden LV (1986) Nature of suppression of *Fusarium* wilt of radish in a container medium amended with composted hardwood bark. Plant dis. 70: 1023-1027.

Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V (1986) Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système radiculaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. En Les mycorrhizes: phisiologie et génetique. 1er ESM, Dijon, Paris. pp. 217-222.

Tuzun S, Kloepper J (1994) Induced systemic resistence by plant growth-promoting rhizobacteria. En Improving plant productivity with rhizosphere bacteria. MH Ryder, PM Stephens y GD Bowen (eds.). Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Adelaide, Australia. pp. 104-109.

van der Heijden MGA, Boller T, Wiemken A, Sanders IR (1998a) Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. Ecology 79: 2082-2091.

van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders IR (1998b) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. Nature 396: 69-72.

Vande Broek A, Vanderleyden J (1995) The role of bacterial motility, chemotaxis, and attachment in bacteria-plant interactions. Mol. Plant-Microbe Interact. 8: 800-810.

Vande Broek A, Lambrecht M, Eggermont K, Vanderleyden J (1999) J. Bacteriol. 181: 1338-1342.

Vassileva M, Vassilev N, Azcón R (1998) Rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* on olive cake-based medium and its further aplication in soil-plant system. World J. Microbiol. Biotechnol. 14:

Veeraswamy J, Padmavathi T, Venkateswarlu, K (1992) Interaction effects of *Glomus intraradices* and *Azospirillum lipoferum* on sorghum. Indian J. Microbiol. 32: 305-308.

Vejsadová H, Catská V, Hrselová H, Gryndler M (1993) Influence of bacteria on growth and phosphorus nutrition of mycorrhizal corn. J. Plant Nutr. 16: 1857-1866.

Voisard C, Keel C, Haas D, Defago G (1989) Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. EMBO J. 8: 351-358.

Vosátka M, Gryndler M (1999) Treatments with culture fractions from *Pseudomonas putida* modifies the development of *Glomus fistulosum* mycorrhiza and the response of potato and maize plants to inoculation. Appl. Soil Ecol. 11: 245-251.

Vosátka M, Gryndler M, Prikryl Z (1992) Effect of the rhizosphere bacterium *Pseudomonas putida*, VAM fungi and substratum composition on the growth of strawberry. Agronomie 12: 859-863.

Wang Y, Brown HN, Crowley DE, Szaniszlo PJ (1993) Evidence for direct utilization of a siderophore, ferrioxamine B, in axenically grown cucumber. Plant Cell Environ. 16: 579-585.

Waschkies C, Schropp A, Marschner H (1994) Relations between grapewine replant disease and root colonization of grapewine (*Vitis* sp.) by fluorescens pseudomonads and endomycorrhizal fungi. Plant and Soil 162: 219-227.

Way JL, Leung P, Cannon E, Morgan R, Tamulinas C, Way JL, Baxter L, Nagi A, Chui C (1988) The mechanism of cyanide intoxication and its antagonism. En Cyanide compounds in biology. D Evered y S Harnett (eds.). J. Wiley, Chichester. pp 232-243.

Weinbaum BS, Allen MF, Allen EB (1996) Survival of arbuscular mycorrhizal fungi following reciprocal transplanting across the Great Basin, USA. Ecol. Applications 6: 1365-1372.

Weissenhorn I, Leyval C, Belgy G, Berthelin J (1995) Arbuscular mycorrhizal contribution to heavy metal uptake by maize (*Zea mays* L.) in pot culture with contaminated soil. Mycorrhiza 5: 245-251.

Weller DM (1988) Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Ann. Rev. Phytopathol. 26: 376-407.

Weller DM, Thomashow LS (1994) Current Challenges in Introducing Beneficial Microorganisms into the Rhizosphere. En Molecular ecology of rhizosphere microorganisms. Biotechnology and the Release of GMOs. F O'Gara, DN Dowling, B Boesten (eds.). Weinheim, Germany, pp 7-16.

Wood T (1991) VA Mycorrhizal Fungi: Challenges for commercialization. En Handbook of Applied Mycology, vol 4. DL Arora, RP Elander, KG Mukerji (eds). Marcel Dekker, New York. pp. 82-87.

Wring SF, Upadhyaya A (1998) A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glicoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. Plant and Soil 198: 97-107.

Wyss P, Boller TH, Wiemken A (1992) Testing the effect of biological control agents on the formation of vesicular-arbuscular mycorrhiza. Plant and Soil 147: 159-162.

Yahalom E, Okon Y, Dovrat A (1990) Possible mode of action of *Azospirillum brasilense* strain Cd on the root morphology and nodule formation in burr medic (*Medicago polymorpha*). Can. J. Microbiol. 36: 10-14.

York ET jr (1994) Global perspectives on international agriculture research. In Physiology and Determination of Crop Yield. KJ Boote, JM Bennett, TR Sinclair and GM Paulsen, eds. ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wisconsin, USA, pp 1-17.

Zapata F (1990) Isotope techniques in soil fertility and plant nutrition studies. En Use of Nuclear Techniques in Studies of soil-Plant Relationships. G Hardarson. Vienna: International Atomic Energy Agency. pp 61-128.

Zapata F, Axmann H (1995) ^{32}P Isotopic techniques for evaluating the agronomic effectiveness of rock phosphate materials. Fertilizer Research 41: 189-195.

Zimmer W, Roeben K, Bothe H (1988) The interaction between the N2-fixing bacterium *Azospirillum* and wheat. En Nitrogen fixation: Hundred years after. H Bothe, FJ de Bruijn y WE Newton (eds.). Proc. of the 7th Int. Congr. on nitrogen fixation. Fischer, Stuttgart, New York. pp. 776.