

# Efecto protector de las micorrizas arbusculares en plantas de durillo regadas con aguas depuradas en condiciones de campo

MJ. Gómez-Bellot<sup>1</sup>, MF. Ortuño<sup>1</sup>, PA. Nortes<sup>1</sup>, J. Vicente- Sánchez<sup>2</sup>, S. Bañón<sup>3</sup>, MJ. Sánchez-Blanco<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Riego. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CSIC). P.O. Box 164, E-30100 Murcia. [mjgb@cebas.csic.es](mailto:mjgb@cebas.csic.es)

<sup>2</sup> SYMBORG SL. Campus Universitario de Espinardo. Edificio CEEIM. E-30100 Murcia.

<sup>3</sup> Departamento de Producción Agraria. Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT). E-30203 Cartagena, Murcia.

## Resumen

En la actualidad, el riego con aguas de mala calidad se ha convertido en una alternativa para satisfacer las necesidades de los cultivos. La aplicación de micorrizas puede ser una buena opción para mitigar los efectos negativos producidos por el alto contenido de sales que acompañan a este tipo de aguas. Sin embargo, la respuesta de las plantas micorrizadas depende de la especie empleada, del tipo de hongo introducido y del grado, duración y tipo de estrés, así como de las condiciones de cultivo. En este trabajo, se evaluó el efecto combinado del hongo *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* y dos tipos de agua depurada con distintos niveles de conductividad eléctrica, en el comportamiento fisiológico, nutrición foliar y valor estético de plantas de durillo establecidas en suelo. Los hongos micorrízicos arbusculares colonizaron satisfactoriamente las raíces de durillo y presentaron un alto porcentaje de actividad enzimática como la deshidrogenasa y la alcalina fosfatasa. Asimismo, mejoraron la estructura del suelo aumentando el contenido en glomalina y carbono total, incrementaron los nutrientes beneficiosos en las hojas y disminuyeron los iones tóxicos, estimularon la floración y aumentaron el potencial hídrico de tallo de las plantas regadas con agua depurada. Además, las micorrizas no solo mitigaron los efectos negativos del agua depurada con alta salinidad sino que también tuvieron un efecto positivo en las plantas de durillo regadas con agua de buena calidad, como muestra el aumento del potencial hídrico de tallo y de los parámetros de intercambio gaseoso.

**Palabras clave:** salinidad; *Glomus iranicum*; relaciones hídricas; estructura del suelo; plantas ornamentales.

## INTRODUCCION

La zona mediterránea, tanto en el sector agrícola como urbano, tiene la necesidad de mejorar su eficiencia en el uso del agua debido a la escasez de recursos hídricos. El agua depurada producida a partir de aguas residuales tratadas podría ayudar a reducir la demanda global de agua dulce en esta área (Qadir et al., 2007). Este tipo de agua normalmente contiene una gran concentración de nutrientes que producen beneficios directos a los cultivos. Sin embargo, dependiendo de su fuente y del tipo de tratamiento, estas aguas pueden tener un alto contenido en sales, metales pesados u organismos patógenos.

Diversos autores han mostrado que los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) tienen una influencia positiva en los sistemas de cultivo (Hamel y Plenchette, 2007). No sólo mejoran el crecimiento de la planta a través del incremento de la toma de

nutrientes, sino que también participan en el establecimiento de los agregados del suelo previniendo la erosión y alivian los efectos negativos inducidos por la salinidad.

Aunque la salinidad puede reducir la capacidad de colonización de las raíces y el crecimiento del micelio del hongo algunos autores han demostrado que la inoculación micorrízica puede aliviar los efectos negativos producidos por el riego con aguas salinas en plantas silvestres y ornamentales (Navarro et al., 2012). El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto combinado de la inoculación micorrízica de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* y dos tipos de agua depurada con distinta conductividad eléctrica en la adquisición iónica, intercambio gaseoso y valor estético de plantas de *Viburnum tinus* L. (durillo), así como el efecto del agua depurada en la colonización de las raíces y en algunas propiedades del suelo.

## MATERIAL Y METODOS

El experimento fue llevado a cabo en la finca experimental del CEBAS-CSIC (Santomera, Murcia), con 80 plantas de durillo (*Viburnum tinus* L.) de un año de edad creciendo en condiciones de campo y usando un marco de plantación de 1 x 1 m.

En Abril de 2012, las plantas fueron recogidas del vivero y transplantadas en suelo. El 8 de Marzo de 2013, la mitad de las plantas fueron inoculadas con el hongo *Glomus iranicum* var. *Tenuihypharum*, adquirido mediante su aislamiento en condiciones extremas de salinidad. El 5 de Abril del 2013 comenzó el primer periodo salino con dos tratamientos de riego: un Control, C ( $CE < 0.9 \text{ dS m}^{-1}$ ) y un tratamiento de agua depurada, RW1 ( $CE: 4 \text{ dS m}^{-1}$ ), procedente de una estación depuradora situada en Campotejar (Murcia). Por consiguiente, se llevaron a cabo cuatro tratamientos.

El 20 de Junio de 2013, comenzó un segundo periodo salino con el mismo tratamiento Control del primer periodo salino y reemplazando el tratamiento RW1 ( $4 \text{ dS m}^{-1}$ ) por otro tratamiento de agua depurada, RW2 ( $CE: 6 \text{ dS m}^{-1}$ ) procedente de una estación depuradora localizada en Mazarrón (Murcia). Este segundo periodo salino finalizó el 18 de Diciembre de 2013. Las plantas fueron regadas de manera que el valor del potencial hídrico de tallo de las plantas Control no disminuyera de  $-0.9 \text{ MPa}$ .

Al final del primer y segundo periodo salino, el porcentaje de colonización de raíces fue estimado en tres raíces por tratamiento siguiendo el método de intersección en placa (Giovannetti y Mosse, 1980) y bajo observación en microscopio. Al final del segundo periodo, la actividad enzimática del hongo micorrízico también fue estimada en tres muestras de raíces mediante la tinción de la actividad deshidrogenasa (SDH) (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1990) y alcalino fosfatasa (ALP) (Tisserant et al., 1993), incubando las muestras durante la noche en una solución de Nitro-Blue-Tetrazolium y de ácido naftil fosfato, respectivamente. Al final del segundo periodo salino se determinó el contenido mineral de tres muestras de suelo y cuatro muestras de hojas por tratamiento por espectrofotometría de emisión con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES IRIS INTREPID II XDL). La determinación de cloruro se obtuvo con un analizador automático (Chloride Analyser Model 926, Sherwood Scientific Ltd.). La concentración de nitrógeno total ( $N_T$ ), carbono total ( $C_T$ ) y carbono orgánico ( $C_{org}$ ) en suelo fue medida con un analizador elemental Flash EA 1112 Series- Leco Truspec. El contenido de materia orgánica (MO) fue determinado multiplicando  $C_{org}$  por 1.72. El fósforo asimilable en suelo fue analizado colométricamente mediante la reducción del complejo fosfomolibdato de amonio con ácido ascórbico (Watanabe y Olsen, 1965). La glomalina en suelo (EEG) se determinó mediante el método de Bradford usando albúmina bovina como estándar (Wright et al., 1996).

Al final del experimento se contaron las inflorescencias y se realizó una evaluación visual de todas las plantas: (1) PCI, porcentaje de plantas en condiciones ideales; (2) PCA, en condiciones aceptables; (3) PRS, con ramas secas; (4) PS, porcentaje de plantas secas. Durante el experimento, se midió en siete hojas por tratamiento el potencial hídrico de tallo ( $\Psi_{\text{tallo}}$ ) con una cámara de presión Scholander, y la conductancia estomática ( $g_s$ ) y la fotosíntesis neta ( $P_n$ ) con un medidor de intercambio gaseoso (LI-6400; LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA).

Veinte plantas fueron aleatoriamente atribuidas a cada tratamiento. Las dos variables (calidad del agua e inoculación micorrízica) fueron sometidas para cada parámetro a un análisis múltiple ANOVA usando Statgraphics Plus. Las diferencias significativas entre las medias de los tratamientos se determinaron usando el test de rango múltiple de Duncan ( $P \leq 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al final del primer y segundo periodo salino, las plantas inoculadas de los tratamientos Control y RW presentaron un mayor porcentaje de colonización de raíces que las no inoculadas. Sin embargo, para las no inoculadas, estos porcentajes presentaron niveles altos, posiblemente a causa de una proliferación nativa de hongos micorrízicos (Tabla 1). Solo el porcentaje de colonización en plantas inoculadas regadas con RW disminuyó al final del segundo periodo respecto al primero, probablemente debido a que el contenido de Na y Cl en suelo afectaron negativamente la colonización micorrízica (Sheng et al., 2008). Sin embargo, este porcentaje se mantuvo relativamente alto debido a que el hongo fue aislado bajo condiciones salinas extremas. Además, casi la totalidad del inóculo presente resultó estar vivo (SDH) y activo (ALP), permaneciendo estos porcentajes muy cercanos a los de la colonización de raíces. Prueba de esta actividad enzimática es el incremento del contenido de fósforo foliar en las plantas inoculadas regadas con ambos tipos de agua (Tabla 3). En los suelos inoculados se observó un incremento de glomalina que pudo estar relacionado con un mayor contenido de  $C_{\text{org}}$  y MO y con la tendencia de  $N_T$  a aumentar en suelos inoculados respecto a los no inoculados (Tabla 2) (Treseder y Turner, 2007), creando agregados estables.

Como resultado de la aplicación de los dos tipos de agua depurada, al final del ensayo se observó una acumulación de Na, Cl, Ca, K y B en hojas y una disminución de Mg y P. Sin embargo, la actividad fúngica aumentó la concentración de fósforo así como de magnesio de las plantas, y aliviaron el efecto adverso de la salinidad suprimiendo la acumulación de iones tóxicos como el sodio y el cloro (tabla 3) (Talaat y Shawky, 2014).

En las plantas tratadas con RW, la disminución del  $\Psi_{\text{tallo}}$  junto con el alto contenido volumétrico de agua en suelo sugirió que las sales disueltas en el agua depurada causaron a las raíces una dificultad para absorber el agua desde el suelo (Fig. 1). Sin embargo, la inoculación micorrízica incrementó el  $\Psi_{\text{tallo}}$  y mejoró ligeramente los valores de  $g_s$  de las plantas inoculadas regadas con RW respecto a las no inoculadas, siendo estos efectos beneficiosos más visibles en el segundo periodo salino, cuando el nivel de estrés incrementó (Fig. 1) (Mardukhi et al., 2011).

Aunque no hubo diferencias significativas de  $P_n$  entre tratamientos, las plantas Control inoculadas mostraron un 100% de plantas en óptimo estado (Fig. 2a). Los menores valores de PCI fueron encontrados por las plantas RW no inoculadas (35%) probablemente debido a que las sales redujeron el contenido de clorofila en hojas. Sin

embargo, las plantas RW inoculadas presentaron un 65% de PCI y un 30% de PCA. Además, el número de flores fue incrementado por el efecto de los HMA (Fig. 2b). Similares resultados fueron obtenidos por Navarro et al. (2012) en madroño.

## CONCLUSIONES

Los resultados sugirieron que *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* se estableció satisfactoriamente y su inoculación mejoró el valor estético de las plantas mejorando la estructura del suelo, incrementando los nutrientes beneficiosos en hoja y disminuyendo los iones tóxicos, estimulando la floración e incrementando la conductancia estomática en las plantas regadas con agua depurada. Además, también tuvo un efecto positivo en plantas bien regadas, como consecuencia de una estimulación de los parámetros fisiológicos. Por tanto, el uso del agua depurada junto con la aplicación de HMA resistentes a la salinidad podría ofrecer diversos beneficios económicos y ambientales, especialmente cuando las plantas crecen en suelo.

## Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL 2011-30022-C02-01-02) y por la Fundación Séneca (15356/PI/10).

## Referencias

- Giovannetti, M., Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular–arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, 84, 489–499.
- Hamel, C., Plenchette, C. (2007). *Mycorrhizae in Crop Production*. Haworth Press, Binghamton, NY.
- Mardukhi, B., Rejali, F., Daei, G., Ardakani, M.R., Malakouti, M.J., Miransari, M. (2011). Arbuscular mycorrhizas enhance nutrient uptake in different wheat genotypes at high salinity levels under field and greenhouse conditions. *Comptes Rendus Biologies*, 334, 564–571.
- Navarro, A., Elia, A., Conversa, G., Campi, P., Mastroilli, M. (2012). Potted mycorrhizal carnation plants and the saline stress: Growth, quality and nutritional plant responses. *Science Horticulturae*, 140, 131-139.
- Qadir, M., Wichelns, D., Raschid-Sally, L., Minhas, P.S., Drechsel, P., Bahri, A., McCornick, P. (2007). Agricultural use of marginal quality water-opportunities and challenges. In: Molden D (Ed) *Water for food, water for life: A Comprehensive Assessment of Water Management in Agriculture*. Earthscan, London, UK.
- Sheng, M., Tang, M., Chen, H., Yang, B., Zhang, F., Huang, Y. (2008). Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mycorrhiza*, 18, 287-296.
- Smith, S.E., Gianinazzi-Pearson, V. (1990). Phosphate uptake and arbuscular activity in mycorrhizal *Allium cepa* L.: Effects of photon irradiance and phosphate nutrition. *Australian Journal of Plant Physiology*, 17, 177-188.
- Talaat, N.B., Shawky, B.T., (2014). Protective effects of arbuscular mycorrhizal fungi on wheat (*Triticum aestivum* L.) plants exposed to salinity. *Environmental and Experimental Botany*, 98, 20-31.
- Tisserant, B., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S., Gollotte, A. (1993). *In planta* histochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular mycorrhizal infections. *Mycological Research*, 2, 245-250.
- Treseder, K.K., Turner, K.M. (2007). Glomalin in ecosystems. *Soil Science Society of America Journal*, 71, 1257–1266.

Watanabe, F.S., Olsen, S.R. (1965). Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and NaHCO<sub>3</sub> extracts from soils. Soil Science Society of America Proceedings, 29, 677-678.

Wright, S.F., Franke-Snyder, M., Morton, J.B., Upadhyaya, A. (1996). Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. Plant and Soil, 181, 193-203.

Tabla 1. Porcentaje de colonización de raíces y actividad SDH y ALP del hongo micorrízico al final del primer (I) y segundo periodo salino (II).

Establecimiento (%)	C	C M	RW	RW M	P
Colonización I	24.0 ± 1.0 b	83.5 ± 4.5 a	27.1 ± 2.0 b	81.0 ± 1.5 a	***
Colonización II	49.5 ± 0.5 c	90.4 ± 2.7 a	33.9 ± 1.2 d	75.9 ± 0.9 b	***
Actividad SDH II	44.4 ± 4.1 b	82.5 ± 2.6 a	31.0 ± 3.2 b	75.3 ± 3.1 a	*
Actividad ALP II	45.3 ± 2.6 b	73.7 ± 0.6 a	29.9 ± 1.6 c	67.8 ± 4.2 a	*

\*, \*\*, \*\*\* y ns indican el nivel de significancia a  $P \leq 0.05$ , 0.01, 0.001 y la ausencia de significancia, respectivamente.

Tabla 2. Efectos del agua de riego e inoculación micorrízica en las propiedades químicas y en la glomalina del suelo (EEG) al final del experimento.

Parámetros del suelo	Agua de riego (W)		Inoculación (M)		Significancia		
	Control	RW	+	-	W	M	W x M
P disponible (mg Kg <sup>-1</sup> soil)	15.89	11.31	13.34	13.61	**	ns	ns
N <sub>T</sub> (g/100g)	0.15	0.13	0.15	0.13	ns	ns	ns
C <sub>T</sub> (g/100g)	7.15	7.71	7.62	7.24	ns	ns	ns
C <sub>org</sub> (g/100g)	1.36	1.36	1.42	1.31	ns	*	ns
MO (%)	2.34	2.34	2.43	2.25	ns	**	ns
EEG (mg g <sup>-1</sup> soil)	38.26	22.43	38.14	22.55	***	***	***

\*, \*\*, \*\*\* y ns indican el nivel de significancia a  $P \leq 0.05$ , 0.01, 0.001 y la ausencia de significancia, respectivamente.

Tabla 3. Efectos del agua de riego e inoculación micorrízica en el contenido mineral foliar al final del experimento.

Análisis foliar (mg Kg <sup>-1</sup> peso seco)	Agua de riego (W)		Inoculación (M)		Significancia		
	Control	RW	+	-	W	M	W x M
Cl	4475.0	12200.0	7850.0	8825.0	***	*	ns
Na	201.8	1770.6	742.6	1229.8	***	***	***
Ca	12584.4	14995.0	13600.0	13979.4	***	ns	**
Mg	4651.1	4152.0	4570.5	4232.6	***	***	***
P	1745.5	1458.8	1702.1	1502.1	***	***	ns
K	12020.0	15202.5	13027.5	14195	***	***	ns
B	196.5	201.5	201.63	205.4	*	ns	***

\*, \*\*, \*\*\* y ns indican el nivel de significancia a  $P \leq 0.05$ , 0.01, 0.001 y la ausencia de significancia, respectivamente.

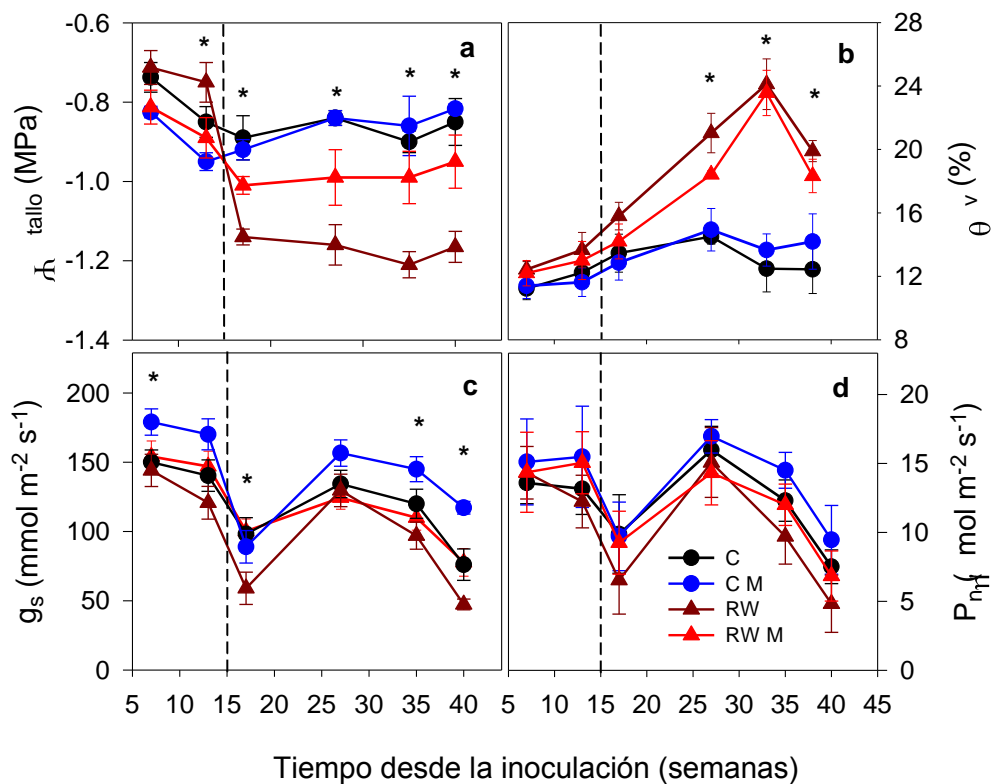


Fig 1. Evolución del potencial de tallo,  $\Psi_{\text{tallo}}$  (a), contenido volumétrico de agua en el suelo,  $\Theta_v$  (b), conductancia estomática,  $g_s$  (c) y fotosíntesis neta,  $P_n$  (d), en plantas de durillo. La línea punteada indica la separación entre periodos salinos. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos de acuerdo con el test de Duncan<sub>0,05</sub>.

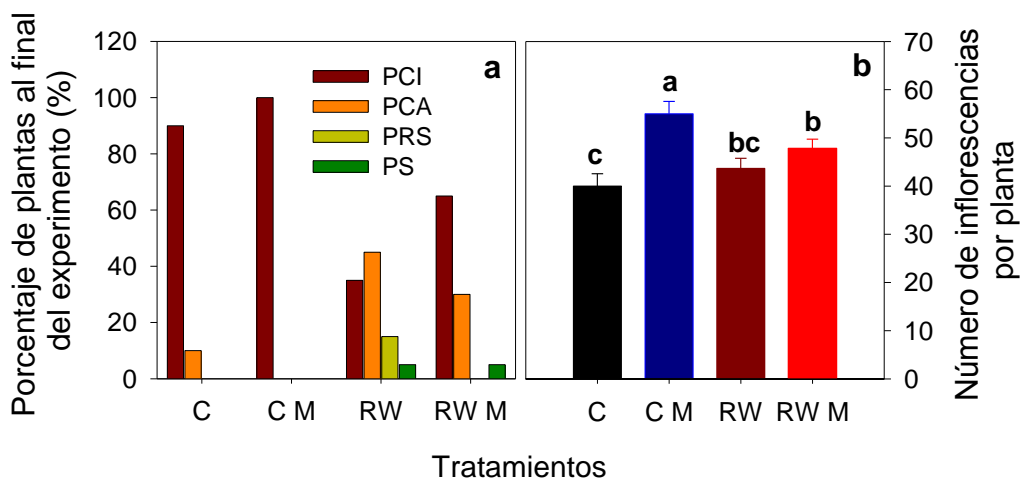


Fig 2. Porcentaje de plantas según características visuales (a) y número de inflorescencias por planta (b) al final del experimento. Las letras en minúscula diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con el test de Duncan<sub>0,05</sub>.