



**Universidad Agraria de la Habana
“Fructuoso Rodríguez Pérez”
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas
Unidad Científico Tecnológica de Base
“Los Palacios”**



***COMPORTAMIENTO DEL ARROZ (*Oryza sativa* L.)
INOCULADO CON HONGOS MICORRÍZICO
ARBUSCULARES Y EXPUESTO A DIFERENTES
CONDICIONES HÍDRICAS EN EL SUELO***

*Tesis presentada en opción al Grado Científico de
Doctor en Ciencias Agrícolas*

Michel Ruiz Sánchez

Mayabeque, Cuba

-2015-



Universidad Agraria de la Habana
“Fructuoso Rodríguez Pérez”
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas
Unidad Científico Tecnológica de Base
“Los Palacios”



***COMPORTAMIENTO DEL ARROZ (*Oryza sativa* L.)
INOCULADO CON HONGOS MICORRÍZICO
ARBUSCULARES Y EXPUESTO A DIFERENTES
CONDICIONES HÍDRICAS EN EL SUELO***

Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas

Autor: Ing. Michel Ruiz Sánchez, MSc.

Tutores: Dr. C. José Miguel Dell'Amico Rodríguez

Dr. C. Juan Adriano Cabrera Rodríguez

Dr. C. Juan Manuel Ruiz Lozano

Mayabeque, Cuba

-2015-

Pensamiento



Hay que trabajar para enriquecer los conocimientos adquiridos durante los estudios para saber aplicar en la práctica de manera creadora y recordar que la realidad es siempre mucho más rica que la teoría, pero la teoría es imprescindible para desarrollar el trabajo profesional de un mundo científico.

Fidel Castro Ruz

(7-7-1981)

Dedicatoria

- ✎ *A la memoria de mi difunta madre de crianza Fidencia Vilaú Páez, quien dejó sus últimas palabras encomendadas a estudiar siempre, al igual que mi abuela ya fallecida Julia Vilaú Páez.*
- ✎ *A mi pequeña hija Rosa Miyara Ruiz Muñoz, a ella me debo para siempre por todo el tiempo que no estuve a su lado y a mi otra pequeña Rosa Nayara Ruiz Muñoz, que igual le he faltado.*
- ✎ *A mi madre Basilia Sánchez Vilaú, quien desde su perspectiva no dejó de impulsar amor, cariño y sobre todas las cosas, optimismo, cada vez que decía, que no vería este momento.*
- ✎ *A mis hermanos y familia, sin distinción alguna, ellos también han permanecido en mi mente cada minuto de trabajo y escritura de tesis.*
- ✎ *A mi esposa MSc. Yaumara Muñoz Hernández, quien ha seguido paso a paso las barreras que se interpusieron en la culminación de esta tesis, quien hizo además la función de padre para mis hijas cuando yo les falté. Hoy siente el calor del logro que defiende.*
- ✎ *A mis padres de crianza: Tomás Sánchez Vilaú, quien desde pequeño me dio todo lo que pudo con amor y a Jorge Lorenzo Sánchez, quien, desde su posición, fue más que un padre.*

Agradecimientos

A ojos cerrados y a corazón abierto le dedico esta tesis doctoral a la Revolución Cubana, paradigma del mundo, que me dio la oportunidad, para llegar hasta aquí.

Me siento agradecido de todas las personas que me rodean; pero también soy del criterio que siempre existen compañeros y compañeras, así como instituciones que uno no puede olvidar, porque mi gratitud para con ellos es eterna.

✎ *Debo comenzar agradeciendo a mis profesores que me tuvieron como alumno, desde la Primaria hasta la Maestría y en el posgrado, algunos de estos profesores que no están, pero igual quiero agradecerles.*

✎ *Al Dr. C. Rodolfo I. Castro Mendiña, gracias por aceptarme en la Estación, por las disimiles oportunidades, por darme un hogar y confiar en mí como persona y profesional, hoy con este logro creo que aún no pago tanta ayuda. Muchísimas Gracias.*

✎ *A los doctores: Félix Fernández Martín, José Dell'Amico Rodríguez y Ricardo Polón Pérez, quienes una tarde de invierno a finales del año 2005, despertaron en mi persona la realización de esta investigación. Gracias.*

✎ *Al Dr. C. Ricardo Polón, quien fue y será un ejemplo de persona, investigador y amigo para siempre, también por compartir conmigo conocimientos y momentos de trabajos en el montaje y seguimiento de los experimentos y también por sus consejos. Muchísimas Gracias.*

✎ *A mis tutores: el Dr. C. Dell'Amico Rodríguez y el Dr. C. Juan A. Cabrera Rodríguez, por su paciencia, orientación y horas de trabajo en lograr la culminación de esta tesis, por la ayuda incondicional, por explicar una y otra vez más, por lo valioso de todos los conocimientos transmitidos, siempre estaré muy agradecido. Muchísimas Gracias.*

✎ *A mi otro tutor: el Dr. C. Juan Manuel Ruiz Lozano, quien apoyó en todo momento mi proyecto de investigación, quien confió a ciegas y no dudó nunca, quien ocupó parte de su*

- tiempo y dedicación para lograr mi formación profesional, quien guió y estuvo pendiente de mí cuando estuve por las tierras de Andalucía, además de ser un amigo. Muchísimas Gracias.
- ✎ A la Dra. C. Déborah Geada, por brindarme su ayuda, sin apenas conocerme dejó sus cosas para de forma amena revisarme, orientarme y esclarecer muchas dudas que en aquel entonces tenía, ella fue la primera que me ayudó a darle forma a mi tesis. Muchísimas Gracias.
- ✎ A la Dra. C. Kalyanne Fernández Suárez, quien se sumó en el momento más oportuno de escritura de mi tesis, además de su contribución desde su posición como oponente, también valieron sus sugerencias, criterios y señalamientos. Gracias.
- ✎ Al Dr. C. Eduardo Jerez, por su ayuda, comprensión, sugerencias y criterios, desde su posición como oponente que contribuyeron en la llegada de este final. Gracias.
- ✎ Al Dr. C. Rubén Alfonso, por su ayuda y comprensión, análisis críticos, consejos y sugerencias realizadas, que desde su posición como oponente dedico horas extras para contribuir con mi formación y la feliz culminación de esta tesis. Muchísimas Gracias.
- ✎ A la Dra. C. Yakelin Rodríguez, que siempre me ayudó, desde el momento en el que tuvo la tesis y dejó cosas personales para dedicarse a hacer la oponencia, además por todas las sugerencias y enseñanzas transmitidas. Muchísimas Gracias.
- ✎ A todos los trabajadores de la Estación del Zaidín, Granada, España, en especial a los doctores: Ricardo Aroca, José Miguel Barrea, Rosario Azcón, Concepción Azcón, Juan A. López, María J. Pozo, a todos los becarios, Gloria, Miguel, Ana, a las dos Beatriz y a los técnicos Sonia y José, al grupo por completo, a todos muchísimas gracias. También a otros que en ese país me ayudaron muchísimo: Sol Franco, Sebastián Meller, Lupe, Azahara, Laly, María, Nelson, Jadi, Mercedes y Yoel Caises. Gracias.
- ✎ A todos los trabajadores de la Estación Experimental del Arroz “Los Palacios” que hoy se llama UCTB “Los Palacios”, ustedes también contribuyeron en el logro de esta tesis, al resto de los investigadores (Fofito, Rogelio, Elizabeth, Sandra, Migue, Tanía, Samuel,

- Pionero, Alexander), a los técnicos (Ernesto, Mary, Marta, Guille, Mayara, Yesika, Dayana, Osmany, Raidel), personal de campo, de servicio y de seguridad, a todos y todas muchísimas gracias.*
- ✂ *A todos los trabajadores del INCA, que incluye transporte, cocina, servicio, seguridad, técnicos e investigadores de los departamentos, ustedes también formaron parte de este final, los doctores Mirian Núñez, Donaldo Morales, Angel Leyva, Ramón, Alejandro Falcón, Nicolás, María Margarita, Cary, Walfredo, además de Ariel, Damay, Dianevis, Guianeya, Yaisy, Lorenzo, Yanelis, Lisbel, el grupo de micorrizas del INCA, las chicas de la biblioteca y de ediciones, a todos y todas muchísimas gracias.*
- ✂ *A mis verdaderos amigos de la infancia, Lazarito y Dopaso con su familia y aquellos que me brindaron su amistad incondicionalmente y me aceptaron tal como soy. También a la maravillosa familia que tengo en Los Palacios a través de mi esposa. De ustedes siempre recibí palabras de aliento, fortalezas y optimismo. Gracias a todos.*
- ✂ *A mis colegas de la universidad: Javier, Yosbel, Yoel, Amaury, Alexei, Dunieski, Juan Miguel, Mayanis, Aniel, El chino, Carlito y Yuhan. Gracias a todos.*
- ✂ *Por último, no menos importante a todos los colegas que transitaron por las casitas del INCA, porque cada conversación, cada reencuentro y momentos como becarios de maestría y doctorado impulsaron la llegada al final, ellos son: Guillermo, Tuto, Ernestico de Granma, Gicli, Nory, Lazarito, Jaimito, Ventura, Ernesto, Yonger, Yaniuska, Gertrudis, Almeida, Max, Panchito, Ceka, Deyanira, Ariel, Anayza, a todas y todos muchísimas gracias.*

Citación correcta Norma ISO 690

Según Sistema de Referencia Numérico

1. Ruiz-Sánchez, Michel. Comportamiento del arroz (*Oryza sativa* L.) inoculado con hongos micorrízico arbusculares y expuesto a diferentes condiciones hídricas en el suelo. [Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas] Mayabeque : Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, 2015.

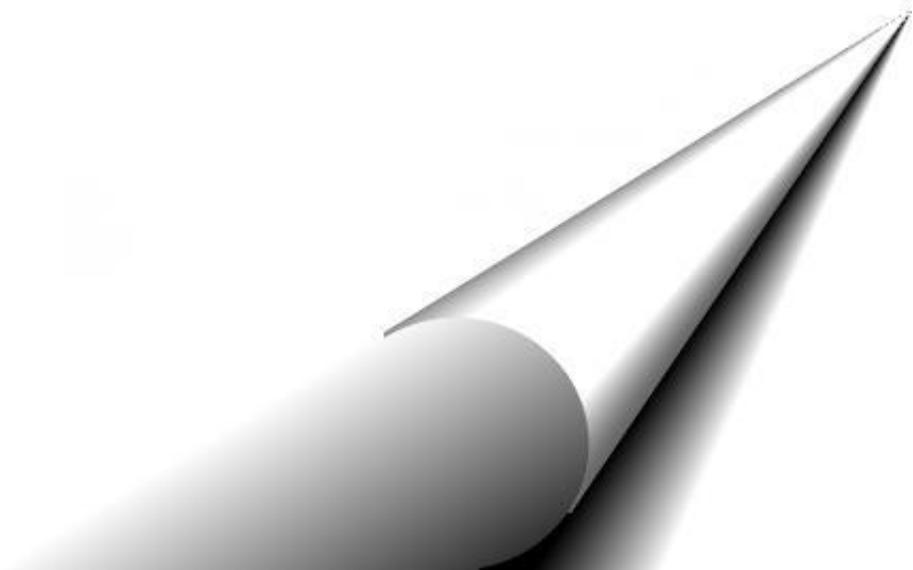
Según Sistema de Referencia Apellido, año

Ruiz-Sánchez, Michel. 2015. Comportamiento del arroz (*Oryza sativa* L.) inoculado con hongos micorrízico arbusculares y expuesto a diferentes condiciones hídricas en el suelo. [Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas] Mayabeque : Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.

Abreviaturas más utilizadas

| Abreviatura | Significado | Abreviatura | Significado |
|--------------------|---|-----------------------------------|--|
| ABA | -Ácido abscísico | H₂O₂ | -Peróxido de hidrógeno |
| ALT | -Altura de la planta | HMA | -Hongos micorrízico arbusculares |
| ASC | -Ascorbato reducido | MA | -Inoculadas con HMA |
| Cc | - <i>Claroideoglopus claroideum</i> | MDA | -Malondialdehído |
| CE | -Conductancia estomática | MFA | -Masa fresca aérea |
| Con E | -Plantas que se expusieron a reducción del suministro hídrico | MFR | -Masa fresca de la raíz |
| cv | -Cultivar | MS | -Masa Seca |
| CRA | -Contenido relativo de agua | MSA | -Masa seca aérea |
| DDE | -Días después de la emergencia | MSR | -Masa seca de la raíz |
| DDT | -Días después del trasplante | NH | -Número de hijos |
| DOL | -Daño oxidativo a lípidos | noMA | -no inoculadas con HMA |
| DV | -Densidad visual | PRO | -Prolina |
| ESx | -Error estándar | Ri | - <i>Rhizoglopus intraradices</i> |
| Fm | - <i>Funneliformis mosseae</i> | ROS | -Especies reactivas de oxígeno |
| Gc | - <i>Glomus cubense</i> | RR% | -Rendimiento relativo |
| GSH | -Glutación reducido | Sin E | -Plantas que no se expusieron a reducción del suministro hídrico |

SÍNOPSIS



SÍNTESIS

En la Unidad Científico Tecnológica de Base “Los Palacios”, Cuba y en la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada, España, se realizaron experimentos con el objetivo de evaluar el efecto de la inoculación con hongos micorrízico arbusculares en el desarrollo de plantas de arroz, expuestas a diferentes condiciones hídricas del suelo. Los niveles de colonización micorrízica fueron menores al cultivarse en condiciones de anaerobiosis, pero fueron efectivos. Las cepas *Rhizoglyphus intraradices* y *Glomus cubense* mostraron el mayor efecto sobre las plantas y cuando estas se expusieron a estrés hídrico por un periodo de 15 días a partir de los 30 días después del trasplante, se incrementó la biomasa aérea y de la raíz, el potencial hídrico y el contenido de glutatión reducido; mientras que, disminuyó el daño oxidativo a lípidos, comportamiento que se tradujo en un rendimiento agrícola superior. Se proponen cuatro categorías de estrés hídrico, a partir del potencial hídrico foliar y el rendimiento relativo. El incremento del rendimiento agrícola en plantas inoculadas con HMA eficientes, interactuando con el estrés por déficit de hídrico, superó al incremento que se obtuvo solo por efecto de la condición de estrés. Con la presencia de HMA residentes en el medio edáfico, la inoculación con una cepa eficiente de HMA no incrementó los niveles de colonización micorrízica, pero si los de densidad visual.

ÍNDICE

CONTENIDO DE LA PARTE I

1. INTRODUCCIÓN

2. OBJETIVOS

3. METODOLOGÍA

4. RESULTADOS

5. CONCLUSIONES

6. BIBLIOGRAFÍA

7. ANEXOS

8. GLOSARIO

9. ÍNDICE ALFABÉTICO

10. ÍNDICE DE TABLAS

11. ÍNDICE DE FIGURAS

12. ÍNDICE DE REFERENCIAS

13. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

14. ÍNDICE DE SIGLAS

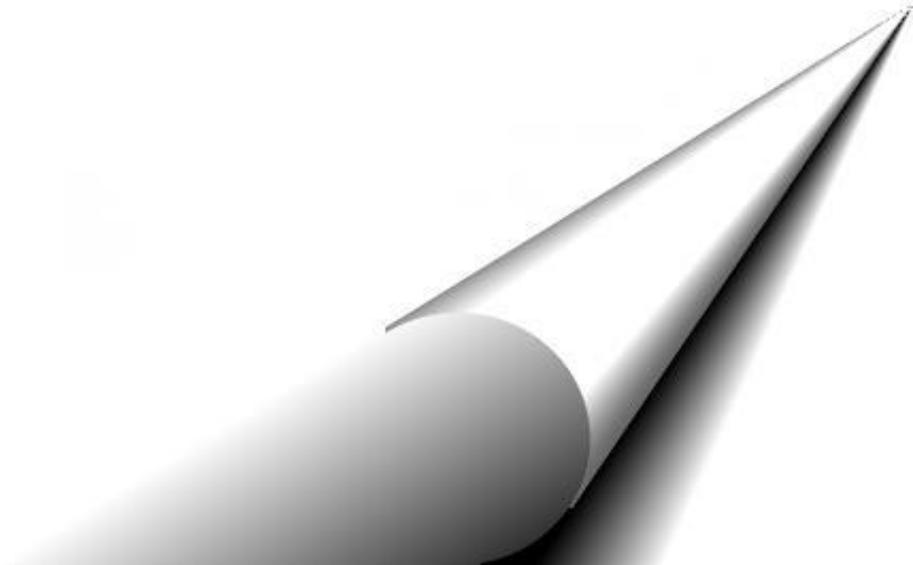
ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... | 5 |
| 2.1. El cultivo del arroz..... | 5 |
| 2.1.1. Origen y taxonomía | 5 |
| 2.1.2. Importancia y situación de su producción..... | 5 |
| 2.2. Los hongos micorrízico arbusculares..... | 7 |
| 2.2.1. Colonización intrarradical y crecimiento extrarradical..... | 10 |
| 2.2.2. Importancia en el sistema suelo-planta | 12 |
| 2.2.3. Inoculación de estos hongos en plantas de arroz | 13 |
| 2.2.4. Efectos en las relaciones hídricas de las plantas inoculadas..... | 14 |
| 2.3. Mecanismos de respuesta de las plantas al déficit hídrico o la sequía | 16 |
| 2.3.1. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)..... | 16 |
| 2.3.2. Sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos | 19 |
| 2.3.3. Cierre estomático..... | 22 |
| 2.3.4. Ajuste osmótico | 23 |
| 2.4. Manejo del agua de riego en el cultivo del arroz | 24 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 29 |
| 3.1. Evaluación de cepas de hongos micorrízico arbusculares en plantas de arroz..... | 30 |
| 3.2. Evaluación en condiciones de anaerobiosis del comportamiento de plantas de arroz, inoculadas con HMA y expuestas a diferentes suministros hídricos en tres momentos de su desarrollo | 33 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3. Evaluación en condiciones de aerobiosis del comportamiento de plantas de arroz, inoculadas con HMA y expuestas a diferentes suministros hídricos..... | 39 |
| 3.4. Evaluación en condiciones de campo del comportamiento de plantas de arroz, inoculadas con HMA y expuestas a suspensión de la lámina de agua en tres momentos de su desarrollo | 41 |
| <i>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</i> | 44 |
| 4.1. Evaluación de cepas de hongos micorrízico arbusculares en plantas de arroz..... | 44 |
| <i>Crecimiento y desarrollo</i> | 44 |
| <i>Colonización micorrízica y densidad visual en las raíces.....</i> | 45 |
| 4.2. Evaluación en condiciones de anaerobiosis del comportamiento de plantas de arroz, inoculadas con HMA y expuestas a diferentes suministros hídricos en tres momentos de su desarrollo | 51 |
| <i>Crecimiento y desarrollo</i> | 51 |
| <i>Rendimiento agrícola y sus componentes</i> | 53 |
| <i>Comportamiento de otros indicadores fisiológicos en las plantas</i> | 58 |
| <i>Comportamiento de indicadores bioquímicos en las plantas</i> | 65 |
| <i>Colonización micorrízica de las raíces</i> | 69 |
| 4.3. Evaluación en condiciones de aerobiosis del comportamiento de plantas de arroz, inoculadas con HMA y expuestas a diferentes suministros hídricos..... | 74 |
| <i>Crecimiento y desarrollo</i> | 74 |
| <i>Comportamiento de otros indicadores fisiológicos en las plantas</i> | 77 |
| <i>Comportamiento de indicadores bioquímicos en las plantas</i> | 81 |
| <i>Colonización micorrízica de las raíces</i> | 84 |

| | |
|--|-----------|
| 4.4. Evaluación en condiciones de campo del comportamiento de plantas de arroz inoculadas con HMA y expuestas a suspensión de la lámina de agua en tres momentos de su desarrollo | 89 |
| <i>Rendimiento agrícola.....</i> | 90 |
| <i>Colonización micorrízica y densidad visual en las raíces.....</i> | 92 |
| <i>V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</i> | 97 |
| 5.1. Conclusiones | 97 |
| 5.2. Recomendaciones | 98 |
| <i>VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i> | |
| <i>ANEXOS</i> | |

INTRODUCCIÓN



I. INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L.), es uno de los cereales de mayor producción a nivel mundial y conjuntamente con el trigo (*Triticum aestivum* L.), la carne y el pescado, constituyen la base de la alimentación humana; el 75 % de la población mundial lo incluye en su dieta alimenticia diaria y puede superar, en algunos casos, el consumo de otros cereales (Méndez, 2011).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), informó en el año 2014 que la producción mundial de este cereal fue de 496,2 millones de toneladas, 0,6 millones de toneladas menos que lo alcanzado en el 2013 (FAO, 2014).

Aproximadamente la mitad de la superficie cultivable de arroz en el mundo, no dispone de agua suficiente para mantener las condiciones de inundación y el estrés por sequía intermitente en las etapas críticas, puede provocar una reducción considerable del rendimiento del cultivo (Bernier *et al.*, 2008).

La planta de arroz tiene la particularidad de ser semiacuática y se cultiva tradicionalmente con inundación continua durante la mayor parte de su ciclo de desarrollo (Hattori *et al.*, 2011); pero tiene pocas adaptaciones a las condiciones de agua limitada y es sensible a la sequía (Kamoshita *et al.*, 2008). A pesar de lo mencionado, la exposición del cultivo a condiciones de estrés por déficit de agua ha favorecido el incremento del rendimiento, tal como se informó por diferentes investigadores (Austin, 1989; IRRI, 1993; Fukai y Cooper, 1996; Polón *et al.*, 1995; Polón *et al.*, 2001; Polón, 2007).

En Cuba, los cultivares de arroz actualmente presentan un potencial de rendimiento que supera las 7 t ha⁻¹. Sin embargo, a pesar de que en el país existen condiciones de clima y de suelo

favorables para el crecimiento y desarrollo de este cereal, en los últimos 20 años el rendimiento no supera las 3,4 t ha⁻¹ como promedio (ONEI, 2014). La disponibilidad limitada de agua de riego provocada por la sequía que se viene manifestando, es una de las causas que han incidido negativamente en los bajos rendimientos de este cultivo.

Ante esta problemática, una alternativa pudiera ser el uso de los hongos micorrízico arbusculares (HMA), que en asociación con la planta contribuyen a protegerla frente al daño oxidativo generado por la sequía (Porcel *et al.*, 2003; Aroca *et al.*, 2012), a través de la absorción directa y la transferencia de agua por las hifas del hongo hacia la planta hospedera (Ruiz-Lozano y Azcón, 1995; Augé *et al.*, 2008; Ruth *et al.*, 2011), mejorando así el intercambio gaseoso, la eficiencia en el uso del agua y el ajuste osmótico de la planta, tal como han expresado Ruiz-Lozano *et al.* (2012).

En Cuba, se han obtenido resultados del establecimiento de la asociación micorrízica en el cultivo del arroz inundado por diferentes autores (Ortiz y Fernández, 1998; Hernández y Cuevas, 1999). Sin embargo, esas investigaciones no incluyeron estudios para conocer la respuesta de las plantas inoculadas en condiciones de déficit hídrico, ni del efecto sobre las actividades fisiológicas y bioquímicas en plantas de arroz expuestas a esas condiciones.

En la literatura científica es escasa la información sobre, estudios que proporcionen un panorama claro de cómo la inoculación micorrízica pueda ser utilizada para incrementar el rendimiento del arroz, cuando el cultivo queda expuesto a condiciones de déficit hídrico.

Dada la escasez de agua existente en la actualidad y la que se vislumbra en el futuro, la importancia del cultivo del arroz y los resultados limitados que existen sobre el uso de la inoculación micorrízica en plantas de arroz, cultivadas en condiciones de anaerobiosis y aerobiosis, expuestas a reducción del suministro hídrico, se hace imprescindible investigar el efecto de ambos factores, situación que orienta hacia el establecimiento de la **Hipótesis** de

trabajo: La inoculación con hongos micorrízico arbusculares en plantas de arroz expuestas a diferentes suministros hídricos, favorece el desarrollo y el rendimiento agrícola.

Basado en la Hipótesis de trabajo, se propone como **Objetivo general**: Evaluar el efecto de la inoculación con hongos micorrízico arbusculares en el desarrollo de plantas de arroz, expuestas a diferentes condiciones hídricas del suelo.

Como **Objetivos específicos** se proponen:

1. Evaluar cepas de hongos micorrízico arbusculares en plantas de arroz cultivadas en condiciones de anaerobiosis, en un suelo Hidromórfico Gley Nodular Ferruginoso Petroférrico.
2. Determinar el efecto de la inoculación micorrízica en las plantas de arroz, cultivadas en condiciones de anaerobiosis y expuestas a diferentes suministros hídricos en tres momentos de la fase vegetativa, mediante la evaluación de indicadores fisiológicos y bioquímicos.
3. Determinar el efecto de la inoculación micorrízica en plantas de arroz, cultivadas en condiciones de aerobiosis y expuestas a diferentes suministros hídricos, mediante la evaluación de indicadores fisiológicos y bioquímicos.
4. Evaluar el efecto de la inoculación micorrízica y la suspensión de la lámina de agua en el rendimiento agrícola en condiciones de campo.

Novedad Científica

Se demuestra que los hongos micorrízico arbusculares (HMA) tienen la capacidad de colonizar las raíces de plantas de arroz, cultivadas en condiciones de anaerobiosis y atendiendo a las modificaciones de oxidación-reducción que se producen en el suelo, diferentes cepas de HMA manifiestan una efectividad similar.

Se establece una categorización del estrés hídrico en plantas de arroz a partir del potencial hídrico foliar y se define que en general a valores de potencial hídrico menores de $-1,20$ MPa disminuye el rendimiento de la planta.

Se demuestra que, en condiciones de anaerobiosis seguida de la imposición de un estrés por déficit de agua, la inoculación con HMA en plantas de arroz favorece el crecimiento y desarrollo, mejora el potencial hídrico, la conductancia estomática, disminuye el daño oxidativo a lípidos e incrementa el contenido de glutatión reducido.

Se evidencia que, la inoculación con HMA conjuntamente con el estrés hídrico por déficit de agua, incrementa los rendimientos del arroz en mayor cuantía que con la sola imposición del estrés.

Contribución a la teoría

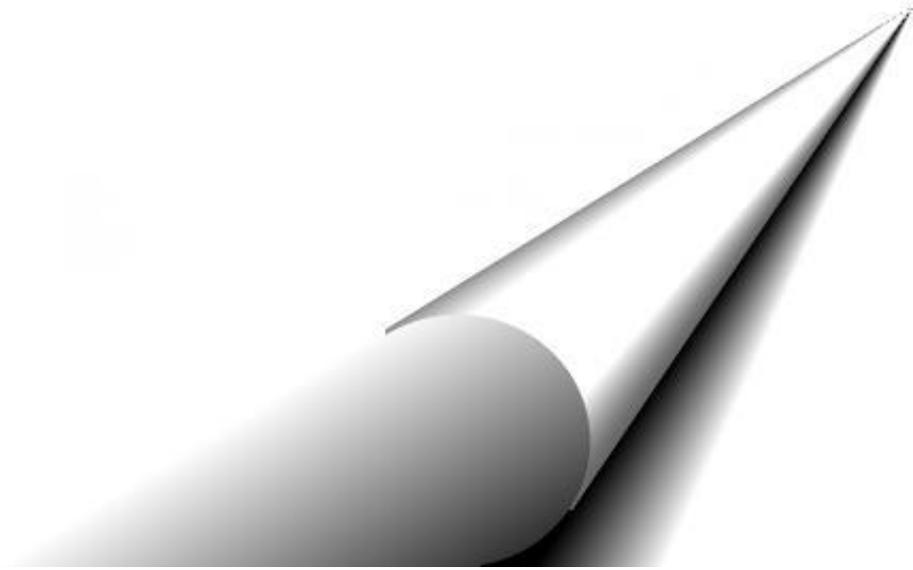
Se aportan conocimientos relacionados con la respuesta de indicadores fisiológicos y bioquímicos del cultivo del arroz inoculado con hongos micorrízico arbusculares, al cultivarse en condiciones de anaerobiosis y aerobiosis, cuando se expone a condiciones de déficit hídrico e intensidad del mismo, en diferentes momentos de su ciclo vegetativo.

Contribución a la práctica

La inoculación del arroz con hongos micorrízico arbusculares eficientes, incrementa el rendimiento agrícola entre un 9 % y 13 % y dicha inoculación, combinada con la suspensión de la lámina de agua por un periodo de 15 días a partir de los 30 días después del trasplante, lo incrementa hasta más del 60 %.

En plantas de arroz cuando el potencial hídrico foliar sea menor a $-1,20$ MPa se debe restablecer la lámina de agua para lograr la recuperación de las plantas y alcanzar un rendimiento mayor.

*REVISIÓN
BIBLIOGRÁFICA*



II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. El cultivo del arroz

2.1.1. Origen y taxonomía

Según Angladette (1969) es difícil establecer con exactitud la época en que se inició el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). La literatura china lo ubica 3 000 años antes de Cristo (a.C), cuando se consideraba su siembra como una ceremonia religiosa importante, reservada al emperador.

Estudios arqueológicos mostraron que *O. sativa*, se originó hace mucho tiempo. Las excavaciones en Hasthinapura revelaron que el arroz ya existía 1 000 años a.C. en el Norte de la India. Este cereal se descubrió en las ruinas de Yangshao, China, supuestamente 2 600 años a.C. y se estima que tiene entre 6 000 y 7 000 años de antigüedad, a partir de su descubrimiento en Hemudú, China Central (Matsuo *et al.*, 1995). En cualquier caso, lo cierto es que no existe un panorama claro al respecto.

El arroz es una planta monocotiledónea ubicada dentro del Grupo Fanerógama, Tipo Espermatofita, Subtipo Angiosperma, Clase Monocotiledónea, Orden Glumiflora, Familia *Poaceae*, Subfamilia *Panicoidea*, Tribu *Oryzae*, Subtribu *Oryzinea* y Género *Oryza* (Angladette, 1969; Alvarado, 2007).

2.1.2. Importancia y situación de su producción

La importancia del cultivo del arroz está estrechamente relacionada con la demanda de este cereal a escala mundial (Bernier *et al.*, 2008), prácticamente se produce y se consume en todas las regiones del mundo. Según Khush (2003), este cereal aporta el 23 % de todas las calorías

que se consumen en los alimentos y representa el 40 % de las proteínas en la población más pobre de América Latina (Acevedo *et al.*, 2006).

Según informes de la FAO (2010), el consumo de este cereal aumentó en un 4 %, respecto al trigo, situación que lo ubicó como el alimento más importante para el consumo humano; también porque un tercio de la humanidad depende del mismo para satisfacer más del 50 % de su alimentación. Además, esta organización afirmó que las perspectivas para el consumo humano del arroz en 2014 aumentarían en un 2,6 %, respecto al 2013 (FAO, 2013).

Cuba es uno de los principales consumidores de arroz en América Latina, con un consumo per cápita aproximado actual de 62 kg año⁻¹, lo que ha elevado la demanda nacional a 670 mil toneladas anuales (MINAG, 2008).

Su producción está organizada por el Grupo Agroindustrial de Granos (GAIG), el que agrupa 12 Empresas Agroindustriales de Granos, que conforman el sector especializado (Empresas Estatales), de las cuales cuatro poseen UEB estatales, y las restantes ocho son prestadoras de servicios básicamente pues están compuestas por UBPC y CCS solamente. Este grupo produce más de 320 000 t de arroz en 143 200 ha de suelo (ONEI, 2014). Adicionalmente, el GAIG orienta y controla por otros mecanismos el sector cooperativo campesino. En este último sector se ha venido aplicando la tecnología de trasplante en más del 59 % de sus áreas, lo que en el año 2008 representó 52 700 ha (Alemán *et al.*, 2008).

Los productores cubanos distan mucho de obtener los rendimientos que se logran en otras regiones del mundo, donde se aplican las mismas tecnologías de producción y se emplean cultivares con similares características. Esto está dado, según el MINAG (2011) por muchas causas, tales como: incumplimiento de lo establecido en los Instructivos Técnicos del Cultivo del Arroz (Indisciplinas tecnológicas); pérdida de la productividad de los suelos; mala

aplicación de la tecnología del trasplante; carencia de indicaciones técnicas específicas para las diferentes condiciones edafoclimáticas en el sector no especializado; insuficiente disponibilidad de agua para enfrentar las siembras, entre otras.

A partir de la problemática existente, además de hacer cumplir las normas técnicas en el cultivo del arroz, pudiera ser promisorio la introducción de alternativas agroecológicas para incrementar el rendimiento agrícola en el cultivo del arroz, donde una de estas alternativa puede ser la inoculación con hongos micorrízico arbusculares (HMA).

2.2. Los hongos micorrízico arbusculares

Los hongos micorrízico arbusculares (HMA) son microorganismos beneficiosos, que viven en el suelo, en simbiosis con alrededor del 80 % de las plantas terrestres (Smith y Read, 2008; Angelard, *et al.*, 2010). Según Schüßler *et al.* (2001) los hongos formadores de este tipo de micorrizas pertenecen al Phylum Glomeromycota y se distribuyen en cuatro órdenes.

En el año 2011, Schüßler y Walker realizaron un análisis filogenético, basado en secuencias del gen SSU del ADNr y propusieron una familia y tres géneros nuevos en el orden *Glomarales*, que constituyen los más estudiados y abundantes en la naturaleza. La familia es *Claroideoglomeraceae* que incluye al género *Claroideoglomus*, en tanto que, la familia *Glomeraceae* se reorganizó en los géneros *Glomus*, *Funneliformis*, *Sclerocystis* y *Rhizophagus*. Posteriormente, Redecker *et al.* (2013) basado en los tres genes ribosómicos nucleares (SSU, ITS y LSU) adicionó el género *Septoglomus* en la familia *Glomeraceae* y propusieron una reorganización de especies en general. Recientemente Sieverding *et al.* (2014) reclasificó el género *Rhizophagus* como *Rhizoglomus*.

Los HMA no poseen una reproducción sexual reconocida y a partir de tres fuentes de propágulos pueden llegar a colonizar nuevas plantas: esporas, fragmentos de raíces micorrizadas e hifas,

adquiriendo una importancia diferente como propágulo según el hábitat (Smith y Read, 2008). En el suelo aparecen diferentes poblaciones de esporas de distintas edades y estados de dormancia, de manera que funcionan como reservorio de inóculo que puede persistir durante años, el tamaño de las esporas, puede alcanzar entre 20 μm a 500 μm de diámetro (Smith *et al.*, 2010).

Las esporas contienen gran cantidad de lípidos, algunos carbohidratos y de 800 a 35 000 núcleos haploides (Sanders y Croll, 2010) con contenido en ADN variable, dependiendo del tamaño de la espora (Smith y Read, 2008). En condiciones ambientales apropiadas las esporas germinan utilizando las reservas lipídicas y comenzando la formación de un micelio de 20-30 mm sin apenas ramificación que crece de manera errática y que, en caso de que no detecte la presencia de moléculas señales exudadas por las raíces, se retrae de nuevo y forma septos.

En algunas especies, una vez que se retrae el micelio asociado a la espora, esta es capaz de conservar su viabilidad por largos periodos de tiempo a la espera de condiciones favorables. Este proceso (germinación de la espora) es independiente de la presencia de la planta hospedera, que no requiere más que de unas condiciones adecuadas de humedad y temperatura.

Se sabe que determinados factores físicos, como la vernalización previa de las esporas (Hepper, 1981), químicos, como concentraciones elevadas de CO_2 y biológicos como la presencia de exudados de las raíces (Akiyama *et al.*, 2005; Besserer *et al.*, 2008; Yoshida *et al.*, 2012), o los compuestos producidos y liberados por una amplia variedad de hongos y bacterias del suelo (Azcón-Aguilar *et al.*, 2002; Hildebrandt *et al.*, 2002), aceleran el proceso de germinación de las esporas.

La germinación se evidencia por la formación de uno o varios tubos germinativo y va acompañada de una activación del metabolismo de la espora, reflejado en cambios en la estructura nuclear y en la replicación del ADN (Parniske, 2008; Oldroyd *et al.*, 2009).

La micorrización arbuscular sigue una serie de etapas (Figura 1) hasta el establecimiento de la simbiosis (Harrison, 2005; Paszkowski, 2006; González-Guerrero *et al.*, 2009; Porcel *et al.*, 2012), a partir de un diálogo molecular presimbiótico que involucra las estrigolactonas exudadas por la raíz (Akiyama *et al.*, 2005; Besserer *et al.*, 2008).

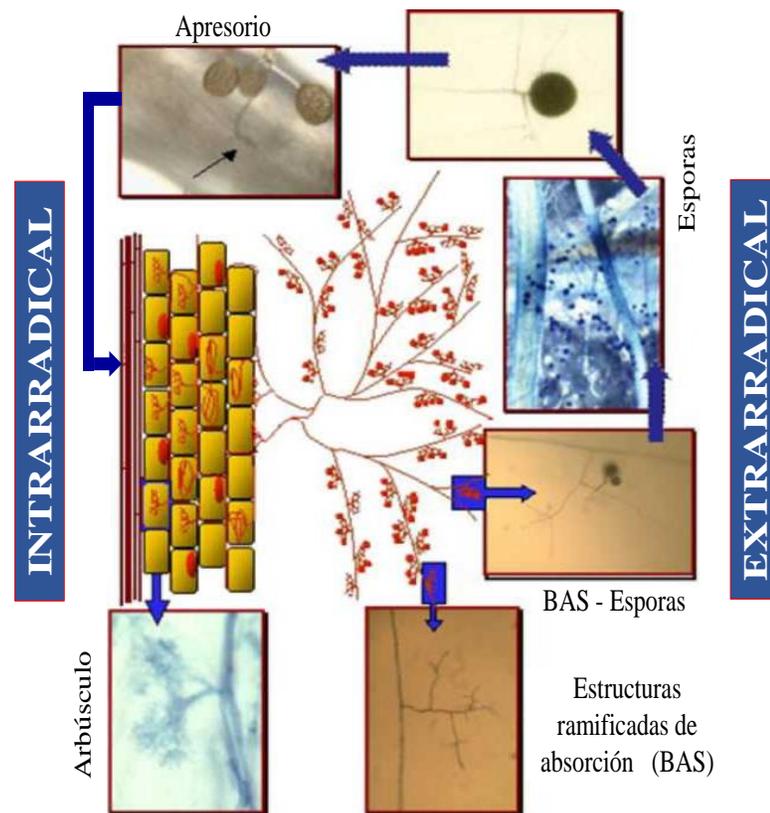


Figura 1. Ciclo de vida de un HMA. Esquema obtenido de Porcel *et al.* (2012).

Estas últimas se reconocen recientemente como una molécula señal clave y específica para el establecimiento de este tipo de simbiosis (Olah *et al.*, 2005); aunque se continúa estudiando a nivel molecular los mecanismos de interacción hongo-planta (Kosuta *et al.*, 2008; Yoshida *et al.*, 2012).

Una vez que la hifa alcanza la superficie de la raíz va creciendo paralela a ésta, hasta seleccionar el punto de entrada mediante mecanismos aún desconocidos (Bonfante y Genre, 2010), donde el reconocimiento de las zonas de máxima actividad metabólica de las células epidérmicas de la planta puede ser el desencadenante de la unión, ya que la exudación radical es más abundante en estas zonas.

El primer contacto en la superficie de la raíz está marcado por la diferenciación de las hifas fúngicas en una estructura hinchada y/o ramificada, denominada apresorio o hifopodio, de la cual, emerge una hifa de penetración que invade la capa de células epidérmicas de la raíz (Genre *et al.*, 2005).

El apresorio se adhiere fuertemente a la raíz, desarrollando protuberancias que penetran en la pared celular de la planta y genera una presión mecánica sobre la célula iniciando la fase de colonización, con la probable participación de otros factores de reconocimiento específico aún no identificados y al parecer con la intervención de enzimas pectinolíticas y celulolíticas del hongo, cuya producción y liberación es limitada, las que provocan la desorganización de los componentes de la pared celular facilitando la penetración del hongo en la raíz (Giovannetti *et al.*, 1993; García-Garrido *et al.*, 2002; Gonzáles-Guerrero *et al.*, 2009).

2.2.1. Colonización intrarradical y crecimiento extraradical

La colonización intrarradical, se caracteriza por una red de micelios y la formación de arbusculos y vesículas. La formación de arbusculos supone una alteración profunda de la célula vegetal, que conlleva la reestructuración completa de la célula que lo hospeda. En primer lugar se genera alrededor de las ramificaciones de la hifa una membrana periarbuscular, formada por invaginaciones de la membrana plasmática de la planta, que recubre y comprime las hifas, modelándolas y separando la estructura fúngica del citoplasma vegetal (Genre *et al.*, 2008).

La vida media de los arbusculos es breve, aproximadamente de 2 a 10 días (Genre *et al.*, 2005), transcurrido ese tiempo los arbusculos colapsan y la célula cortical recupera su morfología original e incluso puede ser colonizada de nuevo. Este patrón de desarrollo evidencia la existencia de una maquinaria genética compleja que controla la penetración y el desarrollo de las hifas en la planta.

Un descubrimiento reciente verdaderamente interesante es que el periodo de vida de un arbusculo parece estar controlado por ambos simbioses (Gutjahr y Parniske, 2013). Este mecanismo de percepción mutua y reajuste es imprescindible para la elección de simbioses eficientes por ambas partes, estableciéndose en los ecosistemas naturales el mejor equilibrio simbiótico posible según las circunstancias ambientales (Kiers *et al.*, 2011).

Las vesículas se forman generalmente en los extremos de las hifas del hongo y pueden producirse a lo largo de todo el parénquima cortical colonizado de forma intra y/o intercelulares; presentan formas variadas según la especie (redondas, ovoides, alargadas, entre otras formas), suelen aparecer más tarde que los arbusculos y son consideradas órganos de reserva, principalmente de lípidos (Barea *et al.*, 2008).

Estas estructuras no son efímeras como los arbusculos, sino que van madurando con el paso del tiempo, en algunos casos pueden convertirse en esporas en situaciones concretas. Fue la observación de estas estructuras claramente visibles en la raíz, lo que llevó a que durante mucho tiempo, las micorrizas arbusculares se denominaran de hecho micorrizas vesículo-arbusculares, aunque sabemos que no todas las especies de hongos micorrízico arbusculares las forman (Koide y Mosse, 2004).

Cuando la infección interna está bien establecida, las hifas del hongo crecen externamente formando el micelio extraradical, aumentando considerablemente el volumen de suelo que

puede ser explotado para la adquisición de recursos para la planta hospedadora (Varma, 2008). Este micelio comienza su crecimiento con hifas exploradoras que van sufriendo ramificaciones extendiéndose por el terreno, con la función de absorber agua y nutrientes, además de colonizar otras raíces.

2.2.2. Importancia en el sistema suelo-planta

Las bases fundamentales sobre las que se establece la simbiosis planta-HMA son nutritivas (Smith y Read, 2008). La planta cede al hongo compuestos carbonados procedentes de la fotosíntesis; mientras que, éste transfiere a la planta nutrientes minerales, especialmente aquellos con baja movilidad en el suelo, que son menos asequibles para la misma, en virtud de la mayor accesibilidad del micelio externo del hongo a recursos del suelo más distantes de la capacidad de acceso de la raíz (Barea *et al.*, 2008; Smith y Read, 2008; Ferrol y Pérez-Tienda, 2009; Yoshida *et al.*, 2012), este intercambio HMA-planta ocurre a través de los arbusculos.

Los hongos micorrízicos no sólo se limitan a mejorar la nutrición mineral de las plantas, también contribuyen a su protección frente a patógenos del suelo y mejoran la tolerancia frente a estreses abióticos como salinidad, exceso de metales pesados en el suelo o déficit hídrico (Azcón-Aguilar *et al.*, 2002; Ike-Izundu, 2007; Ruiz-Lozano, 2012).

La simbiosis micorrízica arbuscular tiene un efecto marcado en las relaciones hídricas de la planta y del suelo en condiciones de estrés, pues modifica la conductancia estomática, la tasa fotosintética, el potencial hídrico foliar, la concentración de osmolitos, la eficiencia en el uso del agua y la asimilación de nutrientes (Harris-Valle *et al.*, 2009); mientras que, los exudados fúngicos promueven la cohesión de las partículas del suelo e incrementan la retención de agua por éste (Rillig y Mummey, 2006).

En resumen, y de acuerdo con la información recientemente revisada, los HMA realizan acciones importantes en los sistemas suelo-planta y de hecho constituyen un componente esencial del sistema.

Según Ruiz-Lozano (2003); Aroca *et al.* (2008) y Porcel *et al.* (2012), estos hongos favorecen la diversidad de las comunidades de plantas y la sucesión vegetal, ya que cada planta muestra un nivel de compatibilidad mayor con determinados ecotipos de hongos micorrízicos, de ahí la importancia de conservar la diversidad de los mismos en los ecosistemas (Barea *et al.*, 2005 y 2008; González-Guerrero *et al.*, 2009; Sánchez-Castro, 2009).

No obstante, Rivera *et al.* (2007) y Herrera-Peraza *et al.* (2011) informaron la baja especificidad que tienen los HMA con relación a la planta hospedera, al poseer la capacidad un mismo individuo de colonizar plantas de igual o diferentes especies.

2.2.3. Inoculación de estos hongos en plantas de arroz

Los HMA colonizan las raíces de la mayoría de las monocotiledóneas y dicotiledóneas, a pesar de la variabilidad de la arquitectura de las raíces y los diferentes patrones de las células. Entre los cereales que se colonizan por HMA se encuentra el arroz, el cual posee un sistema radical peculiar, compuesto de tres tipos de raíces diferentes: raíces de corona, raíces laterales grandes y raíces laterales finas (Gutjahr *et al.*, 2009).

Maiti *et al.* (2011) en condiciones de secano evaluaron el porcentaje de colonización micorrízica a los 90 días después de la emergencia de las semillas de arroz (DDE) y observaron diferencias entre las plantas inoculadas con HMA residentes (autóctonas) y las inoculadas con cepas comerciales. Este comportamiento estuvo determinado por la riqueza fúngica existente en el suelo y la inoculación, pero en estas condiciones se favoreció la colonización con los HMA

residentes. Además, encontraron incrementos en la masa seca y el número de panículas por m², cuando el porcentaje de colonización en la raíz fue superior.

Según Secilia y Bagyaraj (1994) en la India se incrementó el rendimiento del grano en el cultivar de arroz "Prakash" con la inoculación de *R. intraradices* y *R. fasciculatum* en un 11 y 8 %, respectivamente, en comparación con un testigo sin inocular; además de reducir al 50 % la dosis de fertilizante fosfórico aplicado sin que se afectara el rendimiento agrícola en plantas colonizadas por *R. intraradices*.

En otros estudios realizados en condiciones aeróbicas se lograron porcentajes de colonización de hasta 60 % (Gutjahr *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011); además de incrementos en el desarrollo aéreo y de las raíces de las plantas micorrizadas, respecto a las plantas testigo no micorrizado (Gutjahr *et al.*, 2009; Vallino *et al.*, 2009).

2.2.4. Efectos en las relaciones hídricas de las plantas inoculadas

Varios estudios han descrito cómo la simbiosis micorrízica favorece al estado hídrico de diversas especies vegetales en presencia de una deficiencia hídrica en el suelo (Ruiz-Lozano, 2003; Augé *et al.*, 2008; Aroca *et al.*, 2008; 2013), argumentándose que estos microorganismos contribuyen a incrementar el contenido relativo de agua, la tasa de transpiración y el intercambio de CO₂; además de mejorar la eficiencia en el uso del agua (Dell'Amico *et al.*, 2002; Porcel y Ruiz-Lozano, 2004; Harris-Valle *et al.*, 2009).

En la Tabla 1 se resumen algunos estudios realizados en los últimos años, que se relacionan con el efecto de la inoculación con HMA en diferentes especies vegetales silvestres y de interés comercial, expuestas a estrés abiótico (sequía y salinidad), en cuanto a la respuesta fisiológica, bioquímica y la asimilación de nutrientes.

Tabla 1. Efecto de diferentes HMA en el desarrollo, asimilación de nutrientes y respuestas bioquímicas en diferentes plantas, expuestas a estrés abiótico.

| Especie vegetal | HMA | Efecto | Referencia |
|--|---|--|------------------------------------|
| <i>Triticum aestivum</i> L. | <i>F. mosseae</i> y <i>C. etunicatum</i> | ↑ Biomasa y producción de grano [†] ↑ [P] y [Fe] en tejido aéreo [†] | Al-Karaki <i>et al.</i> (2004) |
| <i>Glycine max</i> L. | <i>R. intraradices</i> | ↑ $\Delta\psi$ hoja [†] ↑ Biomasa y ↓ estrés oxidativo [†] | Porcel y Ruiz-Lozano (2004) |
| <i>Atriplex nammularia</i> Lindl. | <i>R. fasciculatum</i> | ↑ Crecimiento ^{††} ↑ Asimilación de P y Mg ^{2+††} | Asghari <i>et al.</i> (2005) |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> L. | <i>R. intraradices</i> | L y CRA iguales vs. plantas NE [¶] ↑ PIP (acuaporinas) [¶] | Aroca <i>et al.</i> (2006) |
| <i>Sorghum bicolor</i> L. | <i>R. intraradices</i> | ↑ gs, el cierre estomático y $\psi \pi$ [†] | Cho <i>et al.</i> (2006) |
| <i>Oryza sativa</i> L. | <i>F. mosseae</i> | ↑ actividad enzimática, condiciones aeróbicas | Rodríguez <i>et al.</i> (2006) |
| <i>Capsicum annuum</i> L. cv. 'San Luis' | <i>R. fasciculatum</i> y HMA residentes del desértico | ↑ Biomasa y [carotenoides] [†] Mantienen coloración y [clorofila] [†] | Mena-Violante <i>et al.</i> (2006) |
| <i>Retama sphaerocarpa</i> Boiss. | <i>R. intraradices</i> | ↓ Requerimientos de agua ^{††} | Marulanda <i>et al.</i> (2006) |
| <i>Poncirus trifoliata</i> L. Raf. | <i>G. versiforme</i> | ↑ K en hojas y Ca ²⁺ en raíces [†] ↑ Contenido de glucosa y sacarosa [†] | Qiang-Sheng <i>et al.</i> (2007) |
| <i>Cucurbita pepo</i> L. | <i>R. intraradices</i> | ↑ $\Delta\psi$ hoja ^{††} | Augé <i>et al.</i> (2008) |
| <i>Zea mays</i> L. | <i>F. mosseae</i> | ↑ Biomasa y contenido de clorofila ↑ Asimilación CO ₂ y CF [†] | Sheng <i>et al.</i> (2008) |
| <i>Lactuca sativa</i> L. | | ↓ ABA ^{††} | Jahromi <i>et al.</i> (2008) |
| <i>Zea mays</i> L. | <i>R. intraradices</i> | ↑ L, varía la expresión PIP [†] | El-Mesbahi <i>et al.</i> (2012) |
| <i>Lactuca sativa</i> L. | | ↑ Biomasa, L, gs, CF, estrigolactonas, ↓ ABA [†] | Aroca <i>et al.</i> (2013) |

Leyenda: † = Estrés por sequía; †† = Estrés por salinidad; ¶ = Estrés por sequía y salinidad; [] = Concentración; ↑ = Incremento; ↓ = Disminución; L = Conductancia hidráulica de raíz; CRA = Contenido relativo de agua; CF = Capacidad fotosintética; gs = Conductancia estomática; $\Delta\psi$ hoja = Gradiente de potencial hídrico de la hoja inducido por transpiración; NE = No estresadas; ψ hoja = Potencial hídrico de la hoja; $\psi\pi$ = Potencial osmótico; ABA = Ácido Abscísico; PIP = proteínas intrínsecas de la membrana plasmática.

Porcel *et al.* (2006) afirmaron que la inoculación con *R. intraradices* estimuló eficientemente la absorción de agua en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), en comparación con *F. mosseae*, que mostró una disminución de su capacidad para mejorar la absorción de agua por la planta. Esto sugiere que la estrategia de ambos hongos para proteger a la planta huésped contra el déficit de agua es diferente.

Por otra parte, Dell'Amico *et al.* (2002) demostraron que la infección micorrízica en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) por *Rhizoglyphus clarum* provocó un efecto beneficioso en su estado hídrico, además de que favoreció la conductancia estomática y la tasa fotosintética, lo que se reflejó en el incremento de la biomasa aérea de las plantas.

2.3. Mecanismos de respuesta de las plantas al déficit hídrico o la sequía

La sequía es uno de los estreses abióticos más comunes en las plantas, que limita su producción y determina de forma continua la distribución natural de las especies vegetales (Cruz de Carvalho, 2008; Scheibe y Beck, 2011).

De manera general, ante condiciones de estrés, las primeras barreras que poseen las plantas son adaptativas, desarrollando estructuras que se agrupan bajo términos de barreras físicas, y las segundas agrupan la presencia de algunos compuestos derivados del metabolismo secundario. Estos niveles de protección no garantizan una solución inicial de respuesta al problema; sino que se desencadenan otros mecanismos bioquímicos y fisiológicos de defensa (Gill y Tuteja, 2010; Scheibe y Beck, 2011; Noctor *et al.*, 2012).

Estos mecanismos permiten la adaptación y supervivencia a periodos más prolongados de déficit hídrico, y se dan a nivel de toda la planta o en tejidos específicos, con la finalidad de reducir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Entre estos mecanismos se encuentran: la defensa frente al daño oxidativo, mediante el sistema antioxidante enzimático y no enzimático, cierre estomático (con repercusión en el intercambio gaseoso y el estado hídrico de la planta) y ajuste osmótico, entre otros.

2.3.1. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Una de las consecuencias inevitables de la sequía es la producción de especies reactivas de oxígeno (sus siglas en inglés: ROS) en los diferentes compartimentos celulares: en los

cloroplastos, los peroxisomas y las mitocondrias (Noctor y Foyer, 1998). La respuesta a la sequía en la planta dependerá de la duración y severidad de la misma. Si la sequía se prolonga en cierta medida, la producción de ROS superará la acción protectora del sistema antioxidante de la planta, lo que resulta en daño y muerte celular (Cruz de Carvalho, 2008; Gill y Tuteja, 2010; Mahmood *et al.*, 2010 y Noctor *et al.*, 2012).

De forma general, las ROS abarcan no sólo los radicales libres como el superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo (OH^\cdot), sino también el H_2O_2 y el oxígeno singlete. Asimismo, se conoce que el oxígeno singlete y los radicales OH^\cdot son tan reactivos, que su producción debe reducirse al mínimo (Jakob y Heber, 1996); mientras que, el O_2^- y el H_2O_2 pueden producirse a niveles más elevados, incluso en condiciones óptimas de cultivo (Noctor y Foyer, 1998; Foyer y Noctor, 2000).

Si las ROS se mantienen en niveles relativamente bajos es probable que funcionen como componentes de una vía de señalización de estrés, facilitando la defensa ante éste y la aclimatación de la planta (Dat *et al.*, 2000; Vranova *et al.*, 2002). No obstante, cuando se alcanza un cierto nivel de fitotoxicidad, que ocurre por acumulación excesiva de ROS, estas pueden llegar a ser extremadamente nocivas, iniciando cascadas descontroladas de daño oxidativo a las membranas y a otros componentes celulares y finalmente, la muerte de la planta (Dat *et al.*, 2000; Mittler, 2002). Estos radicales se generan debido a un aumento en la tasa de fotorreducción del O_2 en los cloroplastos (Gill y Tuteja, 2010).

En cuanto al H_2O_2 , no sólo es la ROS más estable con capacidad de difundirse fácilmente de un compartimento celular a otro, también puede ser fácilmente asimilable por un sistema antioxidante celular eficiente, debido a que se produce a tasas elevadas en condiciones de sequía (Cruz de Carvalho, 2008; Noctor *et al.*, 2012).

La disminución de su concentración por acción del sistema antioxidante de las plantas permite el cambio rápido de la señal de "encendido" a "apagado", condición esencial para que un mensajero secundario pueda ser eficaz (Foyer y Noctor, 2000; 2003). También se demostró que el H_2O_2 , cuando se encuentra en el citosol es fácilmente eliminado por el ascorbato a través del ciclo ascorbato-glutación (Cruz de Carvalho, 2008).

Aunque la tasa de producción de H_2O_2 es más rápida en los peroxisomas y cloroplastos, según Foyer y Noctor (2003), las mitocondrias son los organelos más vulnerables al daño oxidativo (Gill y Tuteja, 2010). Esto puede ser explicado por una menor amortiguación antioxidante en las mitocondrias en comparación con los peroxisomas y cloroplastos. En este sentido, las mitocondrias tienen una importancia crucial en el establecimiento del estado redox celular y el inicio de las cascadas de transducción de señales en condiciones de sequía.

Los síntomas de daño oxidativo (peroxidación de lípidos) se han utilizado para evaluar el aumento en la producción de ROS en condiciones de sequía. La falta de síntomas no implica que el aumento de la formación de ROS no está ocurriendo, sino que resulta del aumento relacionado con las defensas antioxidantes a nivel celular (Cruz de Carvalho, 2008; Scheibe y Beck, 2011). La oxidación lipídica es un indicador fiable de la producción desequilibrada de radicales libres, que puede ser reflejado por el contenido de malondialdehído (MDA) en la planta (Wen *et al.*, 2010) y es indicativo de afectación a las membranas celulares.

Dada la toxicidad de las ROS, las plantas disponen de sistemas adecuados de desintoxicación que permiten su eliminación rápida, los que incluyen varias enzimas antioxidantes y compuestos no enzimáticos como ascorbato, glutación, flavonoides, carotenoides, tocoferoles, o prolina (Ma *et al.*, 2008). Algunos de ellos regulan otras funciones vitales de las células (Noctor y Foyer, 1998; Gill y Tuteja, 2010; Noctor *et al.*, 2012).

Algunos autores han detectado una correlación directa entre el nivel de inducción de sistemas antioxidantes y el grado de tolerancia a la sequía de las especies vegetales (Torres-Franklin *et al.*, 2008), por lo tanto, se podría sugerir que, el aumento de la tolerancia al estrés oxidativo puede tener un efecto positivo en la tolerancia a la sequía (Cruz de Carvalho, 2008).

2.3.2. Sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos

Ante una condición de estrés biótico o abiótico se activan mecanismos antioxidantes en la planta que involucran al ciclo ascorbato-glutatión (Asada, 1999). El ciclo (Figura 2) se basa en la reducción del peróxido de hidrógeno a agua mediante una cadena de reacciones de oxidación-reducción que incluye como elementos antioxidantes al ácido ascórbico y el glutatión, que regeneran su estado de reducción gracias a la actividad de enzimas como la glutatión reductasa (GR), la monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) y la dehidroascorbato reductasa (DHAR) utilizando NAD(P)H como fuente de poder reductor.

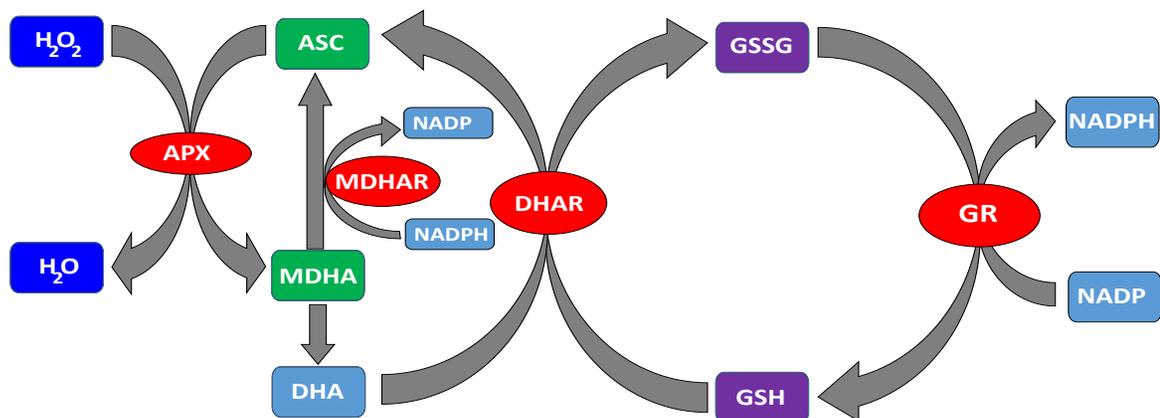


Figura 2. Ciclo ascorbato-glutatión, tomado de Bárzana (2014).

Leyenda: Peróxido de hidrógeno (H_2O_2); Agua (H_2O); Ascorbato peroxidasa (APX); Ascorbato reducido (ASC); Monodehidroascorbato reductasa (MDHAR); Monodehidroascorbato (MDHA); Deshidroascorbato (DHA); Deshidroascorbato reductasa (DHAR); Glutatión oxidado (GSSG); Glutatión reducido (GSH); Glutatión reductasa (GR); Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada (NADP) y Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida (NADPH).

En este ciclo participan cuatro enzimas, siendo la más abundante la ascorbato peroxidasa (APX), que cataliza el paso del H_2O_2 a H_2O , para lo cual requiere ascorbato. El monodehidroascorbato

(MDHA) formado en esta primera reacción puede ser reducido a ascorbato de nuevo por la monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), que requiere NADP, o bien puede convertirse en deshidroascorbato (DHA). A continuación, la deshidroascorbato reductasa (DHAR) regenera el ascorbato a partir de deshidroascorbato (DHA) utilizando el glutatión reducido (GSH) como reductor. El ciclo se completa con la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a GSH mediante la actividad de la glutatión reductasa (GR) que necesita NADPH (Mittler, 2002). Este mecanismo (ascorbato-glutatión) tiene funciones imprescindibles en condiciones de estrés oxidativo, evitando que se acumulen grandes cantidades de ROS (Mittler, 2002).

Dentro del ciclo ascorbato-glutatión, la GR es una enzima clave que tiene como función principal el mantenimiento del glutatión intracelular en estado reducido (GSH), según Noctor y Foyer (1998), el cual puede funcionar directamente como un antioxidante no enzimático, similar como el ascorbato, para eliminar las ROS como el oxígeno singlete, el superóxido y los radicales hidroxilos, o indirectamente como un agente reductor que recicla el ácido ascórbico desde su forma oxidada, hasta la forma reducida con participación de la enzima dehidroascorbato-reductasa (Noctor y Foyer, 1998).

El glutatión reducido es un tripéptido (α -glutamil cisteinilglicina), que se encuentra prácticamente en todos los compartimentos celulares, tales como el citosol, los cloroplastos, el retículo endoplasmático, las vacuolas y las mitocondrias (Foyer y Noctor, 2003). Es la principal fuente de grupos tiol en las células de la mayoría de las plantas. La reactividad química del grupo tiol lo hace especialmente adecuado para una amplia gama de funciones bioquímicas en todos los organismos.

El carácter nucleofílico del grupo tiol es también importante en la formación de enlaces mercáptido con los metales y en la relación con electrófilos seleccionados (Foyer y Noctor,

2005a). Esta reactividad, junto con la estabilidad relativa del GSH, y el hecho de ser altamente soluble en agua, lo convierten en un compuesto ideal para proteger las plantas frente el estrés oxidativo (Foyer y Noctor, 2005a; 2005b).

Según lo antes expuesto, el GSH participa en el control de los niveles celulares del H_2O_2 (Shao *et al.*, 2005; 2007) y por lo tanto, el cambio en la relación de su forma reducida a oxidada (GSH/GSSG) es importante en ciertas vías redox de señalización (Li y Jin, 2007). De hecho autores como Shao *et al.* (2005) o Li y Jin (2007) sugirieron que esta relación es indicativa del equilibrio redox celular y puede estar implicada en la percepción de las ROS.

Otro grupo de proteínas que se sobreexpresan durante el estrés hídrico son las enzimas antioxidantes que, conjuntamente con compuestos no proteicos, detoxifican los radicales libres acumulados por las plantas. Entre las principales enzimas están la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la ascorbato peroxidasa (APX), la peroxidasa (POD), la glutatión reductasa (GR) y la monodehidroascorbato reductasa (MDAR) según Scheibe y Beck (2011).

La APX tiene una alta afinidad por el H_2O_2 y aparece en casi todos los orgánulos celulares, por lo que se supone que tiene una marcada influencia controlando el contenido de H_2O_2 en las células y por lo tanto, en su función como señalizador.

En un estudio realizado en arroz transgénico que sobreexpresa un gen que codifica para la SOD, se encontró una capacidad fotosintética mayor en los tratamientos donde se indujo el estrés hídrico con polietilenglicol (PEG). Esto sugirió que la SOD en el cloroplasto tiene una función fundamental en la eliminación de las ROS durante el estrés por sequía, con la consiguiente disminución del daño oxidativo y la protección del aparato fotosintético (Wan *et al.*, 2005).

2.3.3. Cierre estomático

El órgano principal de la planta que detecta una limitación en el suministro de agua es la raíz, órgano que además de absorber agua y minerales, también envía señales a las hojas a través de la savia del xilema, como es el caso del ácido abscísico (Jiang y Hartung, 2007). Cuando la señal de estrés llega a las hojas, provoca el cierre estomático y mediante el ajuste de cierre y apertura se controla la pérdida de agua, debido a la reducción del flujo de transpiración. Esto, no obstante, limita simultáneamente la entrada de dióxido de carbono (CO₂), inhibiendo la fotosíntesis (Damour *et al.*, 2010).

La apertura o cierre de estomas no sólo es importante para la absorción de CO₂, sino también para la respuesta a la sequía (Song y Matsuoka, 2011) y tiene efectos directos e indirectos en la reducción de la fotosíntesis neta y la producción total de ROS por las plantas en condiciones de estrés por sequía (Dat *et al.*, 2000).

Los estudios relacionados con la conductancia estomática de las plantas revisten gran importancia, debido a que su productividad está íntimamente relacionada con el consumo y disponibilidad del agua, más que con cualquier otro factor ambiental. Por lo tanto, la capacidad de algunas plantas de mantenerse turgentes bajo condiciones de escasez de agua en el suelo, es una característica beneficiosa para evitar que disminuya su producción, puesto que en tales circunstancias el descenso del rendimiento puede estar relacionado con la reducción de la conductancia estomática (Da Matta, 2004), como indicador de apertura y cierre estomático.

En arroz se describieron dos vías de cierre estomático, la primera dependiente del ABA, la cual es la más representada en la naturaleza, y una segunda vía que involucra al peróxido de hidrógeno H₂O₂ como segundo mensajero y activador de la síntesis de factores transcripcionales

y activadores de la expresión de enzimas eliminadoras de ROS (Huang *et al.*, 2009), vía independiente de ABA, que funciona en las células oclusivas del estoma.

2.3.4. Ajuste osmótico

El agua se mueve desde las zonas donde el potencial hídrico es mayor (menos negativo) hacia las zonas donde este es menor (más negativo). El potencial hídrico se define según la ecuación: ($\Psi_h = \Psi_s + \Psi_p + \Psi_g + \Psi_m$), donde: “ Ψ_h ” es el *potencial hídrico*; “ Ψ_s ” es la *presión osmótica*, que es una medida de la concentración de los solutos; “ Ψ_p ” es la *presión de turgor* o la fuerza hidrostática ejercida en la célula vegetal contra la pared celular y “ Ψ_g ” *presión de gravedad* y el Ψ_m “*potencial matricial*”, que ejercen un efecto en la energía libre del agua (Taiz y Zeiger, 2006). La planta con la finalidad de mejorar su estado hídrico ante un déficit de agua, realiza ajuste osmótico, que le permite incrementar su Ψ_h , como mecanismo de respuesta a nivel celular de tolerancia al estrés hídrico. El mismo consiste en una disminución extra del potencial osmótico en los tejidos vegetales, lo que permite la entrada y/o retención de agua en las células y evita una disminución en el turgor o en la productividad fotosintética de la planta (Moreno, 2009). Existen varios compuestos orgánicos sin carga, que al acumularse ejercen función de osmoprotección o osmoreguladora, como aminoácidos, azúcares solubles, manitol, siendo la prolina uno de los que más se acumula en cantidad y en una mayor variedad de plantas (Ruiz-Lozano *et al.*, 2012).

El ajuste osmótico a través de la acumulación de solutos celulares, tales como la prolina, se considera uno de los posibles mecanismos para superar el estrés osmótico causado por la pérdida de agua (Caballero *et al.*, 2005).

La prolina, además de actuar como un osmoprotector, también funciona como un disipador de energía para regular el potencial redox en la célula, provocando la eliminación de ROS, como

radicales hidroxilo (Sharma y Dietz, 2006), por lo que actúa protegiendo contra la desnaturalización de las proteínas y como mecanismo para reducir la acidez en la célula (Kishor *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2012).

Este aminoácido se forma en la mayoría de los tejidos expuestos a estrés hídrico y junto con los azúcares solubles, se metaboliza fácilmente en etapas de recuperación de la sequía, a diferencia de la glicina y la betaína (Mostajeran y Rahimi-Eichi, 2009).

El rol de la prolina en la adaptación y la supervivencia de las plantas se informó por Watanabe *et al.* (2000) quienes encontraron un aumento de las concentraciones de carbohidratos solubles y prolina en las hojas de tres cultivares de arroz durante la sequía, los que permitieron a las plantas realizar ajuste osmótico y elevar su tolerancia a esta condición adversa.

La acumulación de prolina se relaciona con el grado de deterioro inducido por el estrés y el aumento de este aminoácido podría deberse a una necesidad de la planta de eliminar el exceso de amonio y de ROS (Amini y Ehsanpour, 2005; Mostajeran y Rahimi-Eichi, 2009). Sin embargo, Vendruscolo *et al.* (2007) declararon que la prolina podría conferir tolerancia al estrés por sequía en plantas de trigo mediante el incremento de los sistemas antioxidantes en lugar de un ajuste osmótico.

2.4. Manejo del agua de riego en el cultivo del arroz

Con la creciente escasez de agua en la agricultura, a nivel mundial se incrementó el número de productores de arroz que no disponen de suficiente cantidad de agua para inundar sus campos (Kato *et al.*, 2009; Kato y Okamai, 2010). Debido a tal problemática los principales productores de arroz en el mundo, como China y la India, se han visto limitados para cultivarlo en condiciones de inundación (Singh *et al.*, 2006), situación que los ubica en los primeros en comenzar la búsqueda de alternativas para mantener las producciones con menor consumo de

agua. En Cuba se han tenido que reducir las áreas de siembra por no contar con suficiente agua en los embalses (MINAG, 2011a).

En Cuba, el arroz se cultiva bajo tres condiciones diferentes en función del agua que se aplica (MINAG, 2005). La primera condición es con riego o aniego, que necesita suficiente disponibilidad de agua para garantizarle al cultivo, en todo o en gran parte de su ciclo, con una lámina de agua de 10 cm aproximadamente.

La segunda, se conoce como arroz de secano, dependiente de las precipitaciones durante todo su ciclo de vida, que exige como promedio aproximado 200 mm de lluvia por mes y es importante, tanto la cantidad, como la frecuencia de las lluvias. Bajo estas condiciones, este cereal sufre serias afectaciones por la falta de agua a lo largo de su ciclo, cuando no existen precipitaciones abundantes, ni fuentes estables de abastecimiento. Por último, el cultivo de arroz en condiciones de secano favorecido, también dependiente de las lluvias, pero en ocasiones recibe abastecimiento de agua por riego (MINAG, 2005; 2011).

El desarrollo de las plantas puede ser inhibido por la falta de agua en cualquier momento del ciclo de vida de los cultivos, pero la sensibilidad al estrés hídrico es especialmente grave durante el desarrollo reproductivo. Esta fase implica varios procesos fisiológicos y bioquímicos, que son extremadamente vulnerables a un cambio en el estado hídrico de la planta. La meiosis se considera el periodo más sensible al estrés en la reproducción de las plantas (Belder *et al.*, 2004). En sentido general, se conocen las principales fases o momentos en que el cultivo del arroz demanda una cantidad de agua mayor. Dentro de las fases más susceptibles se encuentra la etapa de germinación (hasta que la planta comienza el ahijamiento) y la fase reproductiva (de 20 a 25 días antes de la floración y de 5 a 15 días después de la misma (García *et al.*, 2009).

En las plantas de arroz se distinguen tres fases de desarrollo (Tabla 2), las cuales tienen periodos de crecimiento definidos en cuanto a la diferenciación de la planta y los días de duración. Las fases son: vegetativa, reproductiva y maduración (CIAT, 2005; Jarma *et al.*, 2010; FAO, 2012).

Tabla 2. Fases y fenofases que caracteriza el cultivo del arroz (FAO, 2012).

| Fases | Fenofases | Descripción |
|---------------------------------|--|---|
| Vegetativa (0 hasta 70 días) | Germinación | Desde la siembra hasta la emergencia del coleóptilo de la semilla. |
| | Plántula | Desde la emergencia del coleóptilo hasta la aparición de la quinta hoja (contando como primera hoja, la primera hoja sin lámina). |
| | Macollaje o ahijamiento | Desde la aparición del primer macollo hasta la iniciación de la panoja. |
| Reproducción (30-40 días) | Elongación y engrosamiento de la vaina | Desde la iniciación de la panoja hasta su completo desarrollo dentro de la vaina de la hoja bandera. |
| | Emisión de la espiga | Desde la aparición de la punta de la panícula fuera de la vaina de la hoja bandera hasta más del 90 % de su emergencia. |
| | Floración | Desde la primera floración hasta que se completa la floración de la panoja. |
| Maduración (30-40 días) | Estado lechoso | Grano desde estado acuoso a lechoso. |
| | Estado pastoso | Grano desde estado de masa blanda a dura. |
| | Maduración | Maduración de más del 80 % de las espiguillas en la espiga. El grano está completamente desarrollado en tamaño, es duro y sin tonalidades verdosas. |

La información de la Tabla 2 es una generalización, que varía en función del cultivar, la época de siembra, las condiciones ambientales, entre otras, de modo que se puede prolongar el tiempo de algunas de las fases, tal como ha encontrado Maqueira (2014) en las condiciones de Cuba y cuyos resultados se presentan en la Tabla 3, que evidenció que el cultivar ‘INCA LP-5’ es de ciclo corto y puede variar su ciclo en dependencia de los factores antes mencionados.

Tabla 3. Rangos de la duración (días) de las fases del arroz (*Oryza sativa* L. cv. ‘INCA LP-5’) en diferentes fechas de siembra. Época “poco lluviosa”. (Adaptada de Maqueira, 2014).

| Fecha de siembra | Fases (días) | | | Ciclo (días) |
|------------------|--------------|--------------|------------|--------------|
| | Vegetativa | Reproductiva | Maduración | |
| Enero 2004 | 84-90 | 33-37 | 20-22 | 151 -155 |
| Diciembre 2004 | 86-92 | 40-42 | 20-22 | 147-155 |
| Febrero 2005 | 80-86 | 30-32 | 24-26 | 137-141 |
| Enero 2006 | 69-79 | 37-39 | 27-29 | 134-142 |

La manifestación del estrés por déficit hídrico o por sequía, se produce en las plantas en respuesta a un ambiente escaso en agua, donde la tasa de transpiración excede a la toma de agua. El estrés no sólo ocurre cuando hay poca agua disponible en el suelo, sino también por bajas temperaturas y por una elevada salinidad (Moreno, 2009).

Cuando el déficit hídrico ocurre lentamente, las plantas pueden presentar respuestas de aclimatación que tienen efectos sobre el desarrollo, como la disminución de la expansión foliar y el aumento del crecimiento de las raíces (Potters *et al.*, 2007; Shao *et al.*, 2007); aunque el área foliar es importante, pues de ella depende la fotosíntesis, una expansión foliar rápida puede afectar negativamente la adaptación a la poca disponibilidad de agua.

Otro proceso que se modifica es el desarrollo de la raíz. La disponibilidad de agua afecta la relación entre la parte aérea y de la raíz. Esta última continúa su desarrollo; mientras que, la parte aérea deja de crecer por causa del estrés. Así las plantas son capaces de continuar el desarrollo de sus raíces siguiendo la humedad hasta zonas más profundas del suelo (Shao *et al.*, 2007; Lafitte *et al.*, 2007; Ali *et al.*, 2008 y Venuprasad *et al.*, 2008). Las plantas también responden al estrés por déficit hídrico a nivel celular y molecular (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

Una de las principales respuestas al estrés hídrico es la modificación de la expresión génica, relacionada con la producción y actividad de enzimas claves en las vías de síntesis de osmolitos, proteínas con función protectora, enzimas antioxidantes, factores de transcripción y otras proteínas involucradas en las respuestas al estrés hídrico (Zhu *et al.*, 2002).

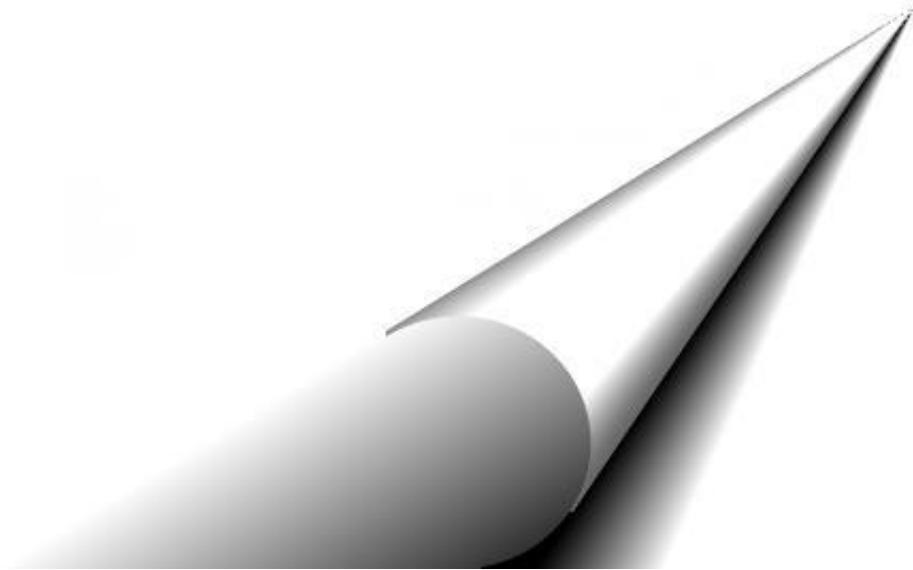
El estrés hídrico al finalizar la fase vegetativa o en la floración en el cultivo del arroz, puede interrumpir la floración (causa esterilidad de la espiguilla) y el llenado del grano (Kamoshita *et al.*, 2004; Botwright *et al.*, 2008) y durante la etapa de floración, provoca pérdidas considerables

en el rendimiento (Liu *et al.*, 2006; Raveendran *et al.*, 2011), que puede disminuir hasta el 50 % (Yang *et al.*, 2008).

En esta fase se induce una reducción en la elongación del pedúnculo y la longitud de la espiga (Raveendran *et al.*, 2011). Por otra parte, se informó que el llenado del grano está estrechamente relacionado con el proceso de senescencia de toda la planta (Mi *et al.*, 2002; Yang y Zhang, 2006) y por lo general, la falta de agua durante esta etapa induce la senescencia temprana y acorta el periodo de llenado del grano (Asseng y van Herwaarden, 2003; Plaut *et al.*, 2004).

En Cuba en la década del 1990 se realizaron investigaciones de la aplicación del estrés hídrico en la fase vegetativa en el cultivo del arroz por siembra directa, las cuales demostraron el incremento del rendimiento agrícola (Polón *et al.*, 1995; Polón y Castro, 1999); resultados que se incluyeron en las Normas Técnicas del Cultivo (MINAG, 2005). No obstante, estas investigaciones no profundizaron en la respuesta de la planta a nivel fisiológico y bioquímico. Por otra parte, García (2009) realizó estudios que corroboraron lo informado por Polón y Castro (1999), pero profundizó en el efecto del déficit hídrico inducido en fases tempranas del crecimiento en el arroz, para identificar variables fisiológicas que faciliten la selección de variedades tolerantes y conocer la contribución de los carbohidratos del tallo en el llenado de los granos de estas plantas.

MATERIALES
Y
MÉTODOS



III. MATERIALES Y MÉTODOS

Aspectos generales de la investigación

Se realizaron cuatro experimentos (Figura 3), con el cultivar comercial de arroz (*Oryza sativa* L.) de ciclo corto 'INCA LP-5' (Anexo 1), y para ello se emplearon dos tipos de suelos.

El suelo que se utilizó para elaborar los sustratos de los experimentos que se realizaron en la Estación Experimental del Zaidín, Granada, España, se clasificó como Fluvisol Háptico Calcáreo (WRB, 2014), el que presentó un pH de 8,1 (medido por potenciometría), 1,81 % de materia orgánica (método de Walkley y Black), fósforo asimilable 6,2 mg kg⁻¹ (P-Olsen) y potasio intercambiable 0,34 cmol kg⁻¹ (extracción con NH₄OAc 1 mol L⁻¹ a pH 7).

El otro suelo, utilizado para el desarrollo de los experimentos en la Unidad Científico Tecnológica de Base “Los Palacios” (UCTB), perteneciente al Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (Tabla 4), se clasificó como Hidromórfico Gley Nodular Ferruginoso Petroférrico (MINAG, 1999), y se caracterizó por un pH ligeramente ácido; contenido de materia orgánica (MO) bajo; bases intercambiables con contenidos típicos para este tipo de suelo y considerados bajos y fósforo asimilable (P) bajo (Mesa *et al.*, 1984).

Tabla 4. Algunas propiedades que caracterizan la fertilidad del horizonte cultivable (0-0,20 m) del suelo Hidromórfico Gley Nodular Ferruginoso Petroférrico, n= 4.

| Propiedad | Unidad | Media | Mediana | Error estándar | Varianza |
|------------------|-----------------------|-------|---------|----------------|----------|
| pH | | 6,46 | 6,50 | 0,15 | 0,09 |
| MO | % | 2,86 | 2,80 | 0,13 | 0,07 |
| Ca ²⁺ | cmol kg ⁻¹ | 6,97 | 7,01 | 0,13 | 0,08 |
| Mg ²⁺ | | 3,11 | 3,09 | 0,06 | 0,01 |
| Na ⁺ | | 0,21 | 0,19 | 0,02 | 0,01 |
| K ⁺ | | 0,18 | 0,18 | 0,02 | 0,01 |
| P asimilable | mg kg ⁻¹ | 46,80 | 46,00 | 3,80 | 5,70 |

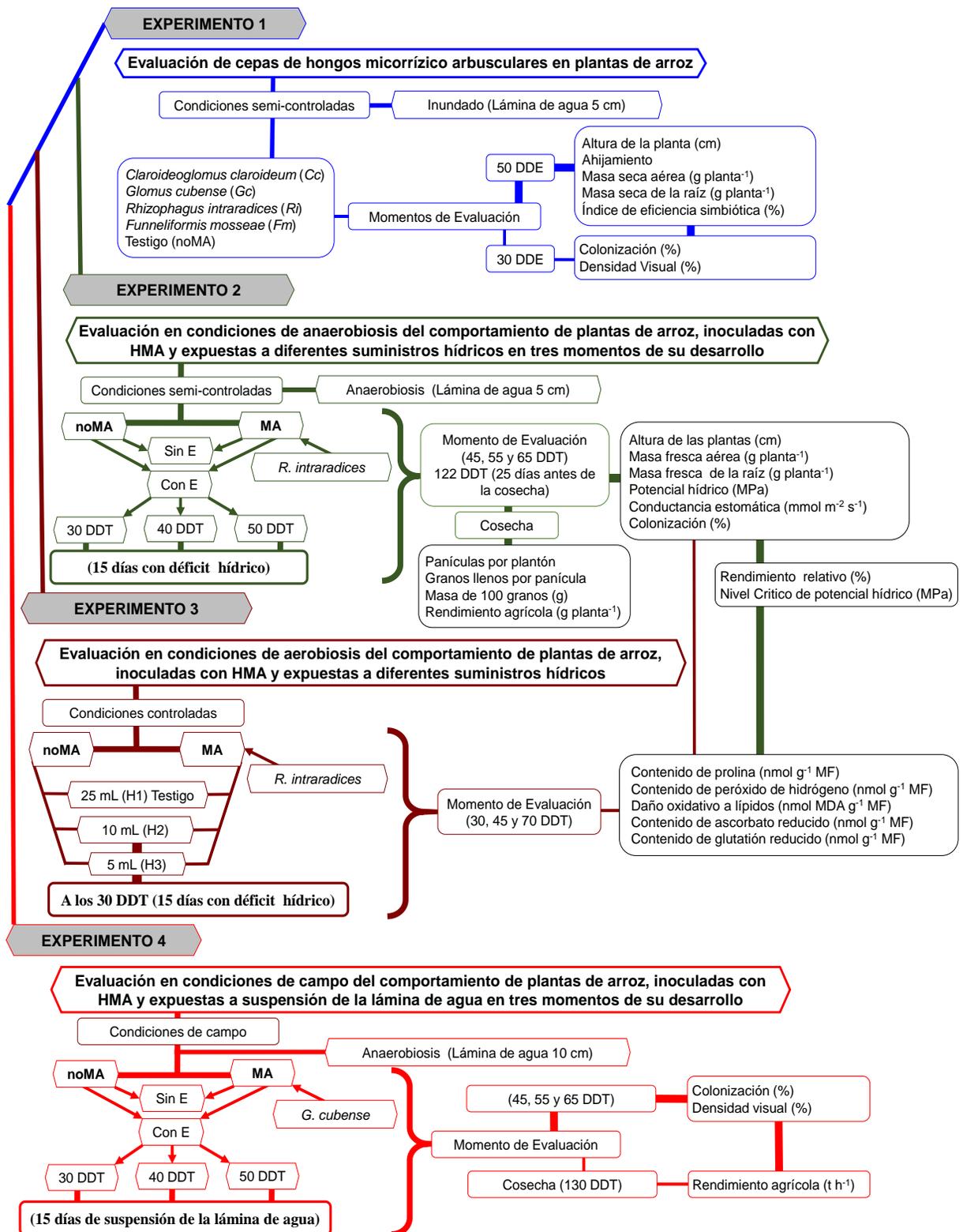


Figura 3. Esquema experimental desarrollado en la investigación.

Leyenda: Hongos micorrízico arbusculares (HMA); días después de la emergencia (DDE); días después del trasplante (DDT); plantas no inoculadas con HMA (noMA); plantas inoculadas con HMA (MA); sin estrés hídrico (Sin E); con estrés hídrico por un periodo de 15 días (Con E); masa seca (MS).

Las técnicas analíticas utilizadas para las determinaciones realizadas al suelo de la UCTB “Los Palacios” fueron: pH: Potenciometría, relación suelo:agua 1:2,5 (NC ISO 10390, 1999); materia orgánica (MO) por el método de Walkley y Black (NC 51, 1999); cationes intercambiables, a partir de una extracción con NH_4OAc 1 mol L^{-1} a pH 7 y determinación por complejometría (Ca^{2+} y Mg^{2+}) y fotometría de llama (Na^+ y K^+), según NC 65 (2000); fósforo asimilable (P) según el método de Oniani (solución extractiva H_2SO_4 0,1 N), según NC 52 (1999).

En todos los experimentos se comprobaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza (Test Bartlett's y Kolmogórov-Smirnov, respectivamente), en cada variable evaluada. A los resultados de los análisis de suelo se le determinaron la Media, Mediana, el Error Estándar y la Varianza. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el Programa STATGRAPHICS Plus sobre Windows, versión 5.1.

3.1. Evaluación de cepas de hongos micorrízico arbusculares en plantas de arroz

El experimento se realizó en la UCTB “Los Palacios” en el año 2008, con plantas de arroz cultivadas en macetas de 7 kg de capacidad (0,22 m de alto y 0,21 m de diámetro), las que se llenaron con suelo previamente esterilizado de la capa arable (Tabla 4). Para la esterilización, el suelo se esparció sobre una manta de polietileno y se le asperjó una solución de formol al 4 % con una asperjadora manual con capacidad de 16 L; inmediatamente después todo el suelo se cubrió con otra manta de polietileno durante 72 horas, posterior a este periodo el suelo se aireó a la sombra durante siete días y finalmente se procedió al llenado de las macetas.

Las semillas se inocularon en el momento de la siembra por el método de recubrimiento (Fernández *et al.*, 2001), con los cuatros inóculos micorrízicos certificados, que conformaron cada una los tratamientos, conjuntamente con el testigo sin inocular: cada inóculo contenía una cepa de HMA con diferentes cantidades de esporas, descritos a continuación: INCAM-8:

Claroideoglopus claroideum, Schenck y Smith (Schüßler y Walker, 2011), con 80 esporas g^{-1} de inóculo (*Cc*); INCAM-4: *Glomus cubense* Y. Rodr. y Dalpé (Rodríguez *et al.*, 2011), con 126 esporas g^{-1} de inóculo (*Gc*); INCAM-11: *Rhizoglopus intraradices*, N.C. Schenck & G.S. Sm. Sieverd., G.A. Silva & Oehl comb. nov. (Sieverding *et al.*, 2014), con 42 esporas g^{-1} de inóculo (*Ri*) e INCAM-2: *Funneliformis mosseae*, Nicol. y Gerd. Walker y Schüßler (Schüßler y Walker, 2011), con 38 esporas g^{-1} de inóculo (*Fm*), procedentes del cepario del INCA.

Para cada tratamiento se utilizaron 100 semillas de arroz que facilitó el procedimiento de recubrimiento y el cálculo de la cantidad de inóculo necesario a aplicar, a partir de la riqueza de propágulos de cada uno de ellos, de modo que se garantizara aproximadamente la aplicación de 600 esporas por maceta. En cada maceta se depositaron diez semillas y tres días después de la emergencia (DDE), se dejaron seis plantas por maceta.

Después de la siembra, todas las macetas se regaron hasta lograr una lámina de agua de 5 cm por encima de la superficie del suelo por un periodo de 24 horas, momento a partir del cual se drenaron, manteniendo el suelo a máxima capacidad de retención de agua hasta que brotaron dos hojas por planta. Con posterioridad, se restableció la lámina de agua y se mantuvo hasta que finalizó el experimento (50 DDE).

La cantidad total de nutrientes, equivalente a 0,738 g de N; 0,301 g de P_2O_5 y 0,354 g de K_2O por maceta, se aplicó a los 20 y 35 DDE, correspondiendo a cada momento el 50 % de la misma, utilizando como portadores Urea (46 % de N), Superfosfato Triple (46 % de P_2O_5) y Cloruro de Potasio (60 % de K_2O), respectivamente.

Los tratamientos estudiados consistieron en plantas que se inocularon con las cuatro cepas de HMA por separado (*Cc*, *Gc*, *Ri* y *Fm*) y un testigo sin inocular (noMA). El experimento se

desarrolló siguiendo un diseño experimental Completamente Aleatorizado, con cuatro repeticiones.

En el invernadero donde fueron colocadas las macetas, las temperaturas diurnas y nocturnas promedio fueron de 29 °C y 24 °C, respectivamente y la humedad relativa osciló entre 60-70 %, variables que se midieron con un equipo Testoterm (JAPAN, testo® 610).

Se tomaron ocho plantas por tratamiento (dos plantas por maceta) en cada momento de evaluación. La altura (ALT), el ahijamiento o número de hijos (NH), la masa seca aérea (MSA) y la masa seca de la raíz (MSR) se determinaron solamente a los 50 DDE. El porcentaje de colonización micorrízica y la densidad visual se determinaron a los 30 y 50 DDE.

La ALT se midió desde la superficie del suelo hasta el extremo superior de la hoja más larga proyectada en la misma dirección del tallo (IRRI, 2002) y se expresó en cm; el número de hijos se determinó por conteo de tallos en cada planta muestreada y a la cantidad determinada se le restó el valor 1 (tallo primario o planta madre). Posteriormente las plantas fueron separadas en parte aérea y raíz para determinar la biomasa en ambos órganos.

Las raíces se lavaron con abundante agua para eliminar el suelo adherido y se secaron con papel absorbente. Ambas secciones de la planta se mantuvieron en estufa con tiro forzado de aire a 70 °C hasta alcanzar masa constante, la que se midió en una balanza técnica (Denver Instrument PK-601), el resultado obtenido se expresó en g planta⁻¹.

Para la determinación del porcentaje de colonización micorrízica y la densidad visual, se tomaron todas las raíces de las plantas muestreadas a los 30 DDE y en el caso de las muestras a los 50 DDE se utilizaron las raíces más finas encontradas en la sección media longitudinal. En cada momento de evaluación se tomaron hasta 200 mg de raíces secas.

La colonización micorrízica se determinó por observación visual en un microscopio estéreo 70x (Stemi 2000-C), después de calentar en baño de agua a ebullición durante 30 min las raíces sumergidas en KOH al 10 %, estas se lavaron con abundante agua y se mantuvieron durante 5 min con HCl (37 % 1N), seguidamente se tiñeron con 0,05 % de Azul de Tripán en ácido láctico (v/v) de acuerdo con Phillips y Hayman (1970). Posteriormente, se utilizó el método de los interceptos, desarrollado por Giovanetti y Mosse (1980) para la determinación del porcentaje de colonización micorrízica.

La densidad visual se determinó según la metodología descrita por Trouvelot *et al.* (1986), por medio de la evaluación de la ocupación fúngica de cada fragmento de raíz, asignándosele un nivel a los porcentajes de ocupación, según establece dicha metodología.

Se calculó el índice de eficiencia simbiótica en función de cada una de las variables evaluadas (ALT, NH, MSA y MSR), mediante la ecuación propuesta por Siqueira y Franco (1988):

$$\text{Índice de eficiencia simbiótica} = \frac{(\text{MA}) - (\text{noMA})}{(\text{noMA})} * 100$$

donde: MA= Plantas inoculadas; noMA = Plantas no inoculadas.

Los datos se procesaron mediante Análisis de Varianza de Clasificación Simple, cuando existieron diferencias significativas, las medias se compararon según la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ($p \leq 0,05$).

3.2. Evaluación en condiciones de anaerobiosis del comportamiento de plantas de arroz, inoculadas con HMA y expuestas a diferentes suministros hídricos en tres momentos de su desarrollo

Se realizó un experimento en la Estación Experimental del Zaidín, Granada, España (EEZ) en el año 2009 en condiciones de invernadero, para estudiar el comportamiento del arroz inoculado

y sin inocular con HMA, al exponerlo ante reducción del suministro hídrico, en tres momentos diferentes de la fase vegetativa y posterior recuperación.

Se estableció un semillero de arroz en bandejas plásticas de 0,40 x 0,80 x 0,08 m con arena estéril. Para lograr la germinación se procedió como en el experimento anterior en cuanto al manejo del agua (Acápite 3.1); cuando las plantas emitieron dos hojas se estableció una lámina de agua de 3 cm hasta los 30 DDE.

A los 30 DDE se trasplantó una planta a cada maceta de 1 kg de capacidad (0,18 m de alto y 0,13 m de diámetro), que contenían un sustrato compuesto por arena (granulometría <1 mm) y suelo (granulometría <5 mm) en proporción 1:1 (v:v), que previamente se esterilizó; la arena a 120 °C durante 20 min, en una autoclave Selecta, modelo PRESOCLAVE-II 75 L, y el suelo a 95-100 °C, pero durante 60 min diarios en tres días consecutivos.

Previo al trasplante se inocularon las plantas con la cepa *R. intraradices* (riqueza fúngica: 56 esporas g⁻¹ de inóculo), a razón de 5 g de inóculo, por maceta, depositado debajo de la planta, el 50 % de las mismas no se inocularon.

Las macetas se colocaron en el invernadero donde se estableció el semillero, con temperaturas de 26 °C y 22 °C (día/noche, respectivamente); humedad relativa entre 50-70; fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad y radiación fotosintéticamente activa de 850 μmol m⁻² s⁻¹, medida con un LICOR portátil (Lincoln, NE, EE.UU., modelo LI-188B), siguiendo un diseño experimental Completamente Aleatorizado, con arreglo factorial y cinco repeticiones, para lo cual se emplearon 25 macetas por tratamiento.

El suministro de agua consistió en mantener una lámina de agua a 5 cm sobre la superficie del sustrato en todos los tratamientos, hasta el momento en que se suspendió la lámina de agua (30, 40 y 50 DDT) a un grupo de macetas con plantas MA y noMA, por un periodo de 15 días,

momento en el cual se repuso la lámina de agua que permaneció hasta los 15 días antes de efectuar la cosecha; el grupo de macetas a las que no se les suspendió la lámina de agua quedaron como tratamientos testigos.

La aplicación total de nutrientes, correspondiente a 0,123 g de N; 0,050 g de P_2O_5 y 0,059 g de K_2O por maceta, se realizó a los 20, 35 y 60 DDT, aplicando en cada momento el 30, 40 y 30 %, respectivamente, utilizando como portadores Urea (46 % de N), Superfosfato Triple (46 % de P_2O_5) y Cloruro de Potasio (60 % de K_2O), respectivamente.

Se tomaron cinco plantas por tratamiento a los 15 días después del estrés hídrico (45, 55 y 65 DDT) y a los 122 DDT (25 días antes de la cosecha del grano), para evaluar la altura de las plantas (ALT), la masa fresca aérea (MFA) y de las raíces (MFR), el rendimiento agrícola y sus componentes, el potencial hídrico foliar (Ψ_h), la conductancia estomática (CE), los contenidos foliares de prolina (PRO), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), de daño oxidativo a lípidos (DOL), el contenido de ascorbato reducido (ASC), el glutatión reducido (GSH), además de la colonización micorrízica en la raíz.

La ALT (cm) se evaluó siguiendo el procedimiento del experimento anterior (Acápite 3.1). La MFA y la MFR se determinaron por separado, a través de un corte que se realizó en la base del tallo, la masa de ambos se midió en una Balanza Técnica (Denver Instrument PK-601, con margen de error de 0,01 g) y se expresó en $g\ planta^{-1}$.

En el momento de la cosecha (147 DDT) cuando el 85 % de las espigas en la planta se tornaron de coloración amarilla (IRRI, 2002), se evaluó el rendimiento agrícola ($g\ planta^{-1}$) y sus componentes (número de panículas por planta, granos llenos por panícula y masa de 1000 granos). Para el conteo de los granos llenos se tomaron ocho panículas por tratamiento. Además, se determinó el rendimiento agrícola relativo (RR%), dividiendo los valores de rendimientos

alcanzados entre el valor máximo de rendimiento y después multiplicado por 100. Los valores de RR% se utilizaron para determinar los niveles críticos de Ψ_h .

El Ψ_h se determinó por el método Psicrométrico, dos horas después de iniciarse el fotoperiodo diurno (entre las 9:00 am y 10:00 am), para lo cual se utilizó un sistema integrado por el microvoltímetro HR-33T conectado a una cámara psicrométrica C52 (Wescor Inc, Logan, UT, USA), tal como describen Porcel y Ruiz-Lozano (2004). Se tomaron 10 discos (0,005 m de diámetro) por tratamiento, de la parte central de las hojas de la planta y se colocaron en la cámara durante 15 min, para estabilizar la temperatura y el vapor de agua del disco, antes de realizar la lectura del Ψ_h , el cual se expresó en MPa. Se determinaron niveles críticos del Ψ_h basado en el método de Cate y Nelson (1971), primero considerando todos los tratamientos estudiados y posteriormente, subdividiendo poblaciones hasta lograr rangos de categorías de estrés.

La CE se midió utilizando un Porómetro AP4 (Delta-T Devices Ltd, Cambridge, Reino Unido), en las mismas horas en las que se determinaron el Ψ_h y se expresó en $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Ambas variables se midieron en las hojas bien desarrolladas del tercio superior de la planta.

Para los análisis bioquímicos de PRO, H_2O_2 , DOL y GSH, se tomaron tres muestras cada una de 0,5 g por planta y de 0,2 g por planta para el ASC, que se congelaron en el momento de los muestreos con nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C .

Después de macerar las muestras en nitrógeno líquido y añadido solución de extracción específica para cada variable (Tabla 5), se centrifugó o filtró según correspondió y se extrajo el sobrenadante (extracto). El precipitado de cada extracción, se colectó en Eppendorf estériles, previamente pesados para determinar la masa seca (MS). En todos los casos se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Hitachi, modelo U-1900, Japón.

Tabla 5. Condiciones y procedimientos de extracción vegetal para la determinación de las variables bioquímicas analizadas.

| VARIABLES | Soluciones de Extracción | Volumen de extracción | Centrifugado o filtrado |
|------------------------------|--|-----------------------|--------------------------------|
| Peróxido de Hidrógeno | Ácido tricloroacético (TCA) 5 % (m/v) + carbón activado 2 % (m/v) + polivinil polipirrolidona (PVPP) 2 % (m/v) | 5 mL | 18 000 g durante 10 min a 4 °C |
| Daño oxidativo a lípidos | Ácido tricloroacético (TCA) 15 % (m/v) | 4 mL | 1500 g durante 20 min a 4 °C |
| Ascorbato reducido | Ácido Metafosfórico 2 % (m/v) + NaCl 20 % (m/v) | 5 ml | Se filtró con papel de filtro |
| Glutati6n reducido y prolina | Ácido sulfosalicílico 5 % (m/v) | 5 mL | 1000 g durante 10 min a 4 °C |

La PRO se determinó según el método de Bates *et al.* (1973). Se adicionó en tubos de vidrio 0,5 mL de extracto, 0,5 mL de ácido acético glacial ($1,05 \text{ g mL}^{-1}$) y 0,5 mL de ninhidrina ácida ($1,04 \text{ mol L}^{-1}$). Se calentó la mezcla a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ en baño de agua durante una hora y se detuvo la reacción introduciendo los tubos en hielo. Se añadió 1 mL de tolueno (99,8 %) y se agitó en un vórtex durante 10 s. Se extrajo la fase resultante superior, conteniendo tolueno y prolina, y se realizó la lectura de absorbancia a 530 nm. Como blanco se utilizó tolueno en lugar de extracto (Tabla 5). Para la curva patrón se utilizó prolina (Sigma) y se expresó en $\text{nmol g}^{-1} \text{ MS}$.

Para la cuantificación del H_2O_2 se procedió según el método de Patterson *et al.* (1984), con modificaciones descritas por Aroca *et al.* (2003). Se añadió 100 μL de extracto a tubos de vidrio y se le adicionó una mezcla de reacción que contenía 1 mL de tampón fosfato potásico 100 mol L^{-1} , titanium oxalato $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ y 4-(2-pyridylazo)resorcinol $0,6 \text{ mol L}^{-1}$. Se calentó la mezcla a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ durante una hora, se detuvo la reacción introduciendo los tubos en hielo y se midió la absorbancia a 508 nm. Como blanco se utilizó TCA 5 % en lugar de extracto y la curva patrón se preparó con H_2O_2 disuelto en solución de extracción (Tabla 5). El contenido de H_2O_2 se expresó en $\text{nmol g}^{-1} \text{ MS}$.

El DOL se cuantificó por el método de Dhindsa *et al.* (1981), para lo cual se añadieron 500 μL de extracto a tubos eppendorf y 1,5 mL de una mezcla de reacción que contenía ácido tricloroacético (TCA) 15 % (m/v) y ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,37 % (m/v). Se calentó la mezcla a 100 °C en baño de agua durante 30 min y se detuvo la reacción introduciendo los tubos en hielo durante 15 min y se midió la absorbancia a 532 nm y 600 nm. La absorbancia a 600 nm se sustrajo a la lectura que se tomó a 532 nm para descontar la absorbancia no específica. El DOL se estimó a partir del contenido de sustancias reactivas al TBA según Halliwell y Gutteridge (1989). Como blanco se utilizó solución de extracción en lugar de extracto (Tabla 5) y para la curva patrón se preparó con malondialdehído (MDA) disuelto en solución de extracción. El DOL se expresó en nmol MDA g^{-1} MS.

El contenido de ASC se cuantificó por espectrofotometría UV-visible tras la reducción de 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP), según el método de Leipner *et al.* (1997), para lo cual se añadió en tubo de vidrio 300 μL de extracto con 200 μL de K_2HPO_4 al 45 % (m/v), tras 15 min de incubación a 25 °C, se añadió 1 mL de tampón ácido cítrico-fosfato potásico 2 M (pH 2,3) y 1 mL de DCPIP 0,003 % (m/v). La absorbancia se midió a 524 nm. Como blanco se utilizó solución de extracción en lugar de extracto (Tabla 5). El contenido de ascorbato reducido se expresó en nmol g^{-1} MS.

El contenido de GSH se determinó según el método de Smith (1985), para lo cual se añadieron en tubo de vidrio, una mezcla de 1,125 mL de tampón fosfato potásico 0,5 mol L^{-1} (pH 7,5) con 0,75 mL de extracto. Posteriormente, se añadieron 0,5 mL de tampón fosfato sódico 0,1 mol L^{-1} (pH 7,5) que contenía 5 mol L^{-1} EDTA, 0,2 mL de 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzoico) 6 mol L^{-1} , 0,1 mL de NADPH 2 mol L^{-1} y 0,1 mL de glutatión reductasa (Sigma, 200 unidades mg^{-1} de proteína). Las lecturas de la absorbancia se realizaron a 412 nm durante 5 min con un intervalo

de 1 min. Como blanco se utilizó solución de extracción en lugar de extracto (Tabla 5) y para la curva patrón se utilizó glutatión oxidado (GSSG) disuelto en solución de extracción. El contenido de glutatión reducido se expresó en $\text{nmol g}^{-1} \text{MS}$.

Por último, se determinó la colonización micorrízica siguiendo el procedimiento del experimento anterior (Acápite 3.1).

Las medias de los tratamientos se compararon a partir de los Intervalos de Confianza para $\alpha=0,05$. Se determinaron los incrementos del rendimiento agrícola por efecto de la inoculación, por la condición de reducción del suministro hídrico y por la interacción de ambos factores, incrementos a los que se le realizaron análisis de Varianza de Clasificación Simple y cuando existieron diferencias significativas, las medias se compararon según la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ($p \leq 0,05$).

3.3. Evaluación en condiciones de aerobiosis del comportamiento de plantas de arroz, inoculadas con HMA y expuestas a diferentes suministros hídricos

Se estudió la respuesta de las plantas de arroz inoculadas con la cepa *R. intraradices* y cultivadas en condiciones de aerobiosis, expuestas a diferentes regímenes del suministro hídrico, a partir de los 30 DDT por un periodo de 15 días, evaluándose en tres momentos, antes de imponer el la reducción del suministro hídrico (30 DDT), después del periodo de déficit hídrico (45 DDT) y tras la recuperación de las plantas (70 DDT).

Para lo anterior, se realizó un experimento en la Estación Experimental del Zaidín, Granada, España (EEZ), en el año 2010, en condiciones controladas de cámara de crecimiento (DYCOMETAL, modelo CM 08790).

Se estableció un semillero de arroz bajo las mismas condiciones y con igual manejo en que se desarrolló el experimento anterior (Acápite 3.2). El trasplante se efectuó a los 14 DDE a macetas

con capacidad de 0,4 kg (0,10 m de alto y 0,07 m de diámetro), el sustrato estaba compuesto por suelo (<5 mm), arena (<1 mm) y vermiculita, en proporción 1:2:6 (v:v:v), que previamente se esterilizó siguiendo el procedimiento del experimento anterior (Acápite 3.2), en el caso de la vermiculita se esterilizó por el mismo procedimiento que se siguió con la arena. Al momento del trasplante un grupo de plantas se inocularon con HMA siguiendo el mismo procedimiento del experimento anterior (Acápite 3.2) y otro grupo quedó sin inocular.

Se trasplantó una planta por maceta y se realizó el riego diariamente con 25 mL de agua, alternado con igual volumen de solución nutritiva de Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950) modificada mediante la disminución de 25 % del contenido de fósforo (Anexo 2) hasta los 30 DDT, momento a partir del cual se establecieron los tratamientos de reducción del suministro hídrico.

Un tratamiento considerado testigo, consistió en regar las plantas con 25 mL de agua (H1), el primer tratamiento de reducción del suministro hídrico se regó con 10 mL (H2) y el otro tratamiento recibió en cada riego 5 mL. En los tratamientos H2 y H3 se mantuvo la misma cantidad total de nutrientes que para el tratamiento testigo (H1). El periodo con reducción del suministro hídrico fue de 15 días, posterior a este se restablecieron las condiciones de humedad existentes antes de imponer la reducción del suministro hídrico (adicionando los mismos 25 mL agua y solución nutritiva), hasta los 70 DDT para todos los tratamientos.

Se conformaron seis tratamientos (dos niveles con y sin HMA y tres niveles de régimen de humedad en el sustrato), con cuatro repeticiones, utilizándose un total de 72 macetas, siguiendo un diseño experimental Completamente Aleatorizado.

Las macetas se mantuvieron en una cámara de crecimiento, con temperaturas de 23 °C y 19 °C (día/noche); humedad relativa entre 60-70 %; fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad y

radiación fotosintéticamente activa de $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, medida con un LICOR portátil (Lincoln, NE, EE.UU., modelo LI-188B).

Las evaluaciones que se realizaron se correspondieron con las del experimento anterior (Acápite 3.2), con la excepción del rendimiento agrícola y sus componentes. La ALT, la MFR y la MFR se evaluaron en tres momentos: antes de imponer el estrés hídrico (30 DDT), a los 15 días posteriores a la imposición de la reducción del suministro hídrico (45 DDT) y a los 70 DDT, momento denominado periodo de recuperación. El Ψ_h , la CE y las variables bioquímicas, solo se evaluaron en los dos últimos momentos. En el caso de la CE se midió dos horas después de iniciarse el fotoperiodo diurno (entre las 9:00 am y 10:00 am para las evaluaciones que se realizaron a los 45 DDT y, entre las 12:00 pm y 1:00 pm a los 70 DDT).

Los datos obtenidos se procesaron mediante Análisis de Varianza de Clasificación Doble, cuando existieron diferencias significativas, las medias se compararon según la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ($p \leq 0,05$).

3.4. Evaluación en condiciones de campo del comportamiento de plantas de arroz, inoculadas con HMA y expuestas a suspensión de la lámina de agua en tres momentos de su desarrollo

A partir de los resultados encontrados en el primer experimento (Acápite 4.1) se utilizó en este estudio la cepa *G. cubense*, con el objetivo de evaluar plantas de arroz inoculadas o no con HMA en condiciones de campo expuestas a suspensión de la lámina de agua en tres momentos diferentes del desarrollo del cultivo. El experimento se realizó en las áreas de campo de la UCTB “Los Palacios” desde enero hasta julio de 2011.

El área se preparó iniciando la roturación del suelo hasta una profundidad de 0,20 m en un estado de escasa humedad y considerado seco, después se realizó un pase de grada, luego se

irrigó hasta lograr una lámina de agua de altura inferior a 10 cm, finalmente se realizó el fangueo (MINAG, 2005).

El comportamiento de las variables meteorológicas durante el periodo experimental se evaluó *in situ* y se presentan en el Anexo 3. Las precipitaciones se midieron con un pluviómetro de cuña graduado, fijado a un soporte de madera a 1 m de altura de la superficie del suelo, ubicado en el centro del área experimental. La temperatura (°C) y la humedad relativa (%) se midieron con un equipo Testoterm (JAPAN, testo® 610).

Se estableció el semillero de arroz (26 de enero, 2011) en una parcela de 40 m², con una dosis de 700 g de semilla m⁻², sembrándose el 50 % del área, con semillas sin inocular (noMA) y el resto se inoculó (MA) con *Glomus cubense* (20 esporas g⁻¹ de inóculo), por el método de recubrimiento de Fernández *et al.* (2001), en este caso se utilizó la cepa *G cubense* por no contar con suficiente inóculo de la cepa *R. intraradices*. El riego en el semillero se realizó según el procedimiento establecido en condiciones de campo para promover la germinación y emergencia del arroz (MINAG, 2008) y se estableció una lámina de agua cuando brotaron dos hojas por planta. Transcurrido 20 DDE se aplicó fungicida (Amistar a 0,5 L ha⁻¹) e insecticida (Karate a 0,3 L ha⁻¹) de forma preventiva, además se aplicó urea a razón de 2 kg en cada semillero (MINAG, 2011b).

A los 30 DDE se realizó el trasplante (3 de marzo, 2011) y se reinocularon las plantas procedentes del semillero inoculado con HMA, mediante la inmersión de todas las raíces a la vez, en una suspensión de 1 kg de inóculo micorrízico (*G. cubense*) en 5 L de agua.

El trasplante se efectuó de forma manual a una distancia entre plantas de 0,20 m x 0,20 m y una planta por sitio, en cuatro terrazas experimentales de 40 m x 80 m, separadas entre ellas por vías de acceso de 4 m de ancho; cada terraza contó con riego independiente, lo que facilitó la

suspensión de la lámina de agua (Con E) a los 30, 40 y 50 DDT durante 15 días y una terraza permaneció en aniego permanente (Sin E) con una lámina de agua de 10 cm hasta los 15 días antes de la cosecha (MINAG, 2005). En cada terraza se conformaron diez parcelas de 20 m² cada una, con 1 m de separación entre sí, el 50 % de ellas con plantas reinoculadas con HMA (MA) y el resto con plantas sin inocular (noMA).

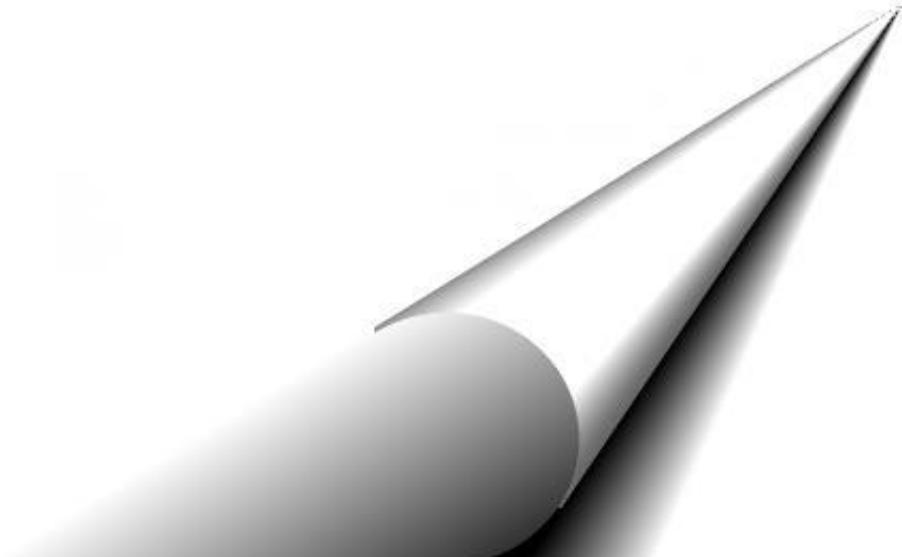
La aplicación total de nutrientes, correspondiente a 185 kg ha⁻¹ de N, 75 kg ha⁻¹ de P₂O₅ y 90 kg ha⁻¹ de K₂O, se realizó a los 20, 35 y 70 DDT, aplicando en cada momento el 30, 40 y 30 %, respectivamente y utilizando como portadores Urea (46 % de N), Superfosfato Triple (46 % de P₂O₅) y Cloruro de Potasio (60 % de K₂O), respectivamente.

En la cosecha se evaluó el rendimiento agrícola estimado (t ha⁻¹) en un área de 16 m² por parcela, según las metodologías descritas por IRRRI (2002).

Se evaluó los porcentajes de colonización y densidad visual, siguiendo los procedimientos descritos en el primer experimento (Acápite 3.1), tomándose diez plantas por parcela, 15 días después de suspender la lámina de agua en los tratamientos (45, 55 y 65 DDT) y en el momento de la cosecha (130 DDT).

Las medias de los tratamientos se compararon a partir de los Intervalos de Confianza, para $\alpha=0,05$. Se determinaron los incrementos del rendimiento agrícola por efecto de la inoculación, por la condición sin lámina de agua y por la interacción de ambos factores, además del incremento de la colonización micorrízica y la densidad visual; incrementos a los que se le realizaron análisis de Varianza de Clasificación Simple y cuando existieron diferencias significativas, las medias se compararon según la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ($p\leq 0,05$).

*RESULTADOS
Y
DISCUSIÓN*



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Evaluación de cepas de hongos micorrízico arbusculares en plantas de arroz

Crecimiento y desarrollo

Al analizar el comportamiento manifestado por las variables altura, ahijamiento, masa seca aérea y de la raíz en plantas de arroz a los 50 DDE (Figura 4), se observó que, con la excepción de la masa seca aérea de plantas inoculadas con *F. mosseae* (Figura 4 B), las plantas inoculadas con HMA reflejaron significativamente las magnitudes mayores.

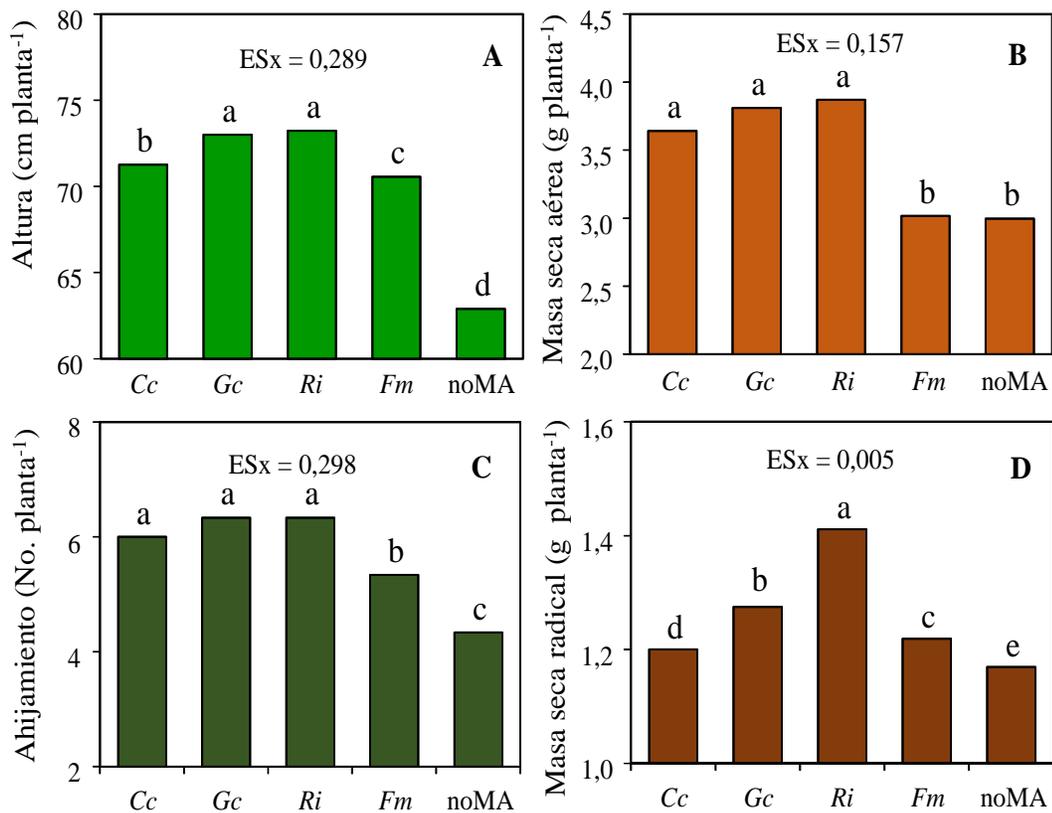


Figura 4. Altura (A), masa seca aérea (B), ahijamiento (C) y masa seca de la raíz (D) a los 50 DDE de plantas de arroz sin inocular e inoculadas con HMA, cultivadas en condiciones de anaerobiosis en un suelo Hidromórfico Gley Nodular Ferruginoso Petroférrico. Barras con letras desiguales difieren significativamente ($p \leq 0,05$) según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan.

Leyenda: Cepas de hongos micorrízico arbusculares (HMA): *Claroideoglomus claroideum* (Cc); *Glomus cubense* (Gc); *Rhizoglonus intraradices* (Ri) y *Funneliformis mosseae* (Fm). Plantas no inoculadas (noMA).

La excepción estuvo dada por la similitud encontrada en la masa seca aérea entre las plantas inoculadas con *F. mosseae* y las plantas sin inocular. Siempre *R. intraradices* y *G. cubense* estuvieron entre las cepas de HMA que provocaron un efecto mayor en las variables del crecimiento y desarrollo de las plantas.

Colonización micorrízica y densidad visual en las raíces

En los momentos en que se hicieron las evaluaciones de la colonización micorrízica en las raíces de las plantas que no fueron inoculadas con las cepas de HMA no se encontró colonización micorrízica. A los 30 DDE, no se observó en el interior de la raíz colonización en ninguno de los tratamientos donde se inoculó con HMA. Sin embargo, a los 50 DDE se apreció colonización micorrízica (Figura 5 A) sin que existieran diferencias significativas entre las cepas *R. intraradices*, *G. cubense* y *C. claroideum*.

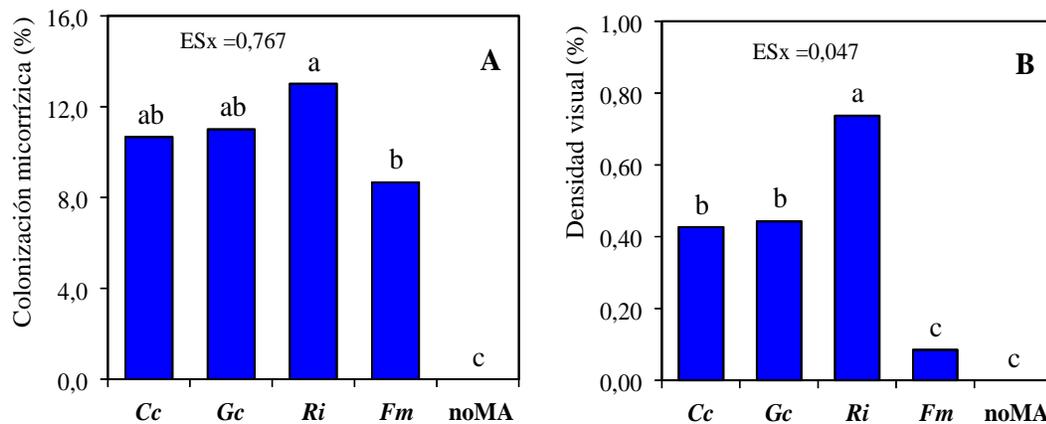


Figura 5. Colonización micorrízica (A) y densidad visual (B) a los 50 DDE en raíces de arroz sin inocular e inoculado con HMA, cultivado en condiciones de anaerobiosis en un suelo Hidromórfico Gley Nodular Ferruginoso Petroférrico. Barras con letras desiguales difieren significativamente ($p \leq 0,05$) según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan.

Leyenda: Cepas de hongos micorrízico arbusculares (HMA): *Claroideoglomus claroideum* (Cc); *Glomus cubense* (Gc); *Rhizogloium intraradices* (Ri) y *Funneliformis mosseae* (Fm). Plantas no inoculadas (noMA); Días después de la emergencia (DDE).

La densidad visual (DV) a los 50 DDE (Figura 5 B) indicó los valores mayores en las cepas *R. intraradices*, *G. cubense* y *C. claroideum*, destacándose el tratamiento inoculado con la

cepa *R. intraradices*, donde se encontró una mayor ocupación del hongo en el interior de las raíces. La asociación más débil HMA-planta de arroz se observó con la cepa *F. mosseae*.

En cuanto al índice de eficiencia simbiótica en función de las variables evaluadas (ALT, MSA, NH y MSR), se encontraron los porcentajes mayores de eficiencia en el número de hijos por planta (Figura 6).

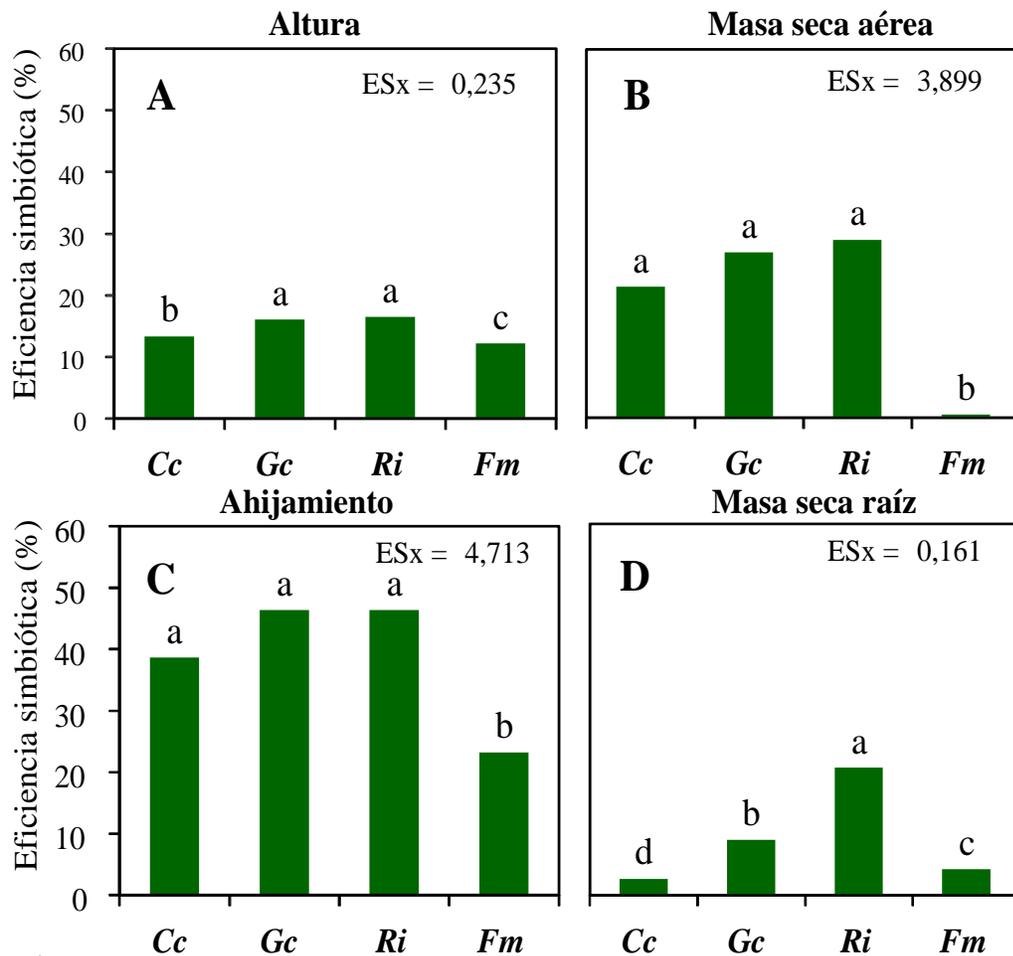


Figura 6. Índice de eficiencia simbiótica a los 50 DDE, en función de la altura (ALT); masa seca aérea (MSA); Ahijamiento (NH) y masa seca de la raíz (MSR) en plantas de arroz a los 50 DDE inoculadas con HMA cultivadas en condiciones de macetas en un suelo Hidromórfico Gley Nodular Ferruginoso Petroférrico. Barras con letras desiguales difieren significativamente ($p \leq 0,05$) según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan.
Leyenda: Cepas de hongos micorrízico arbusculares (HMA): *Claroideoglomus claroideum* (Cc); *Glomus cubense* (Gc); *Rhizogloium intraradices* (Ri) y *Funneliformis mosseae* (Fm).

El índice de eficiencia simbiótica demostró que siempre las cepas *R. intraradices* y *G. cubense* estuvieron entre las que exhibieron los mayores incrementos. Por otra parte, se observó que la

cepa *F. mosseae* resultó ser la de menor eficiencia simbiótica, con excepción de la evaluación en función de la masa radical, en la que esta cepa fue superior a *C. claroideum*.

En sentido general en las variables de crecimiento se encontraron incrementos en la altura, el número de hijos y en la masa seca aérea, provocado por la inoculación de las cepas *R. intraradices*, *G. cubense* y *C. claroideum*, respecto a *F. mosseae* y al testigo no inoculado. Otros autores (Hernández y Cueva, 1999; Porcel y Ruiz-Lozano, 2004; Rivera *et al.*, 2007; Ruiz Lozano *et al.*, 2012; Bárzana, 2014) han encontrado incrementos en el crecimiento y desarrollo de las plantas inoculadas, respecto a las no inoculadas.

Referido a la altura de las plantas (Figura 3 A), los resultados encontrados se correspondieron con los informados por Hernández y Cuevas (1999) quienes inocularon plantas de arroz con diferentes cepas de HMA (*R. fasciculatum*, *R. manihotis* y *R. intraradices*) en condiciones semejantes de suelo y cultivo y observaron valores mayores en las plantas inoculadas; pero sin diferencias entre ellas, con respecto a las plantas testigo no inoculadas.

Teniendo en cuenta que el ahijamiento es un componente esencial del rendimiento agrícola (Aguilar, 2001; Jarma *et al.*, 2010), resulta relevante el hecho de que los valores superiores de eficiencia simbiótica se obtuvieron al considerar el número de hijos por planta. Estos resultados demuestran las diferencias en la capacidad de distintos HMA para adaptarse y vivir en asociación con la planta hospedera, además de promover el crecimiento y desarrollo de las mismas. Este comportamiento está relacionado con la presencia de la asociación micorrízica.

En los tratamientos no inoculados no se observó colonización micorrízica, debido a la esterilización a la que fue sometido el suelo. En el caso de las plantas inoculadas donde no se observó colonización micorrízica a los 30 DDE, pudiera explicarse por un retardo en la germinación de las esporas, debido a la existencia de cantidades limitadas de oxígeno en el suelo

condicionada por la presencia de la lámina de agua y a un efecto de dilución de los exudados radicales que constituyen moléculas señales en la interacción planta-HMA, como pudieran ser las estrigolactonas.

Las estrigolactonas son consideradas hormonas y moléculas señales específicas de este tipo de simbiosis en los HMA (Akiyama *et al.*, 2010; Yoshida *et al.*, 2012), las mismas poseen un enlace éter muy lábil, que puede ser fácilmente hidrolizado en la rizosfera (Rochange, 2010). La dilución de esta hormona en las condiciones de anaerobiosis pudiera afectar dos etapas iniciales del establecimiento de la simbiosis, como la germinación de las esporas (López-Ráez *et al.*, 2010) y el crecimiento hifal e incluso la ramificación hifal en el proceso de colonización (Yoshida *et al.*, 2012).

La presencia de colonización a los 50 DDE (Figura 5 A), se puede atribuir en este estadio al mayor crecimiento y desarrollo de la planta de arroz, que provocó mayor oxigenación de la zona rizosférica, a partir del transporte de mayor cantidad de oxígeno desde la parte aérea hacia las raíces. Así mismo, se debió incrementar el intercambio gaseoso entre la planta y la atmósfera y por tanto, mayor transporte de carbohidratos a las raíces (Kiers *et al.*, 2011), todo lo cual, al parecer creó condiciones favorables que estimularon la germinación de las esporas de HMA y la colonización micorrízica.

No obstante a lo manifestado anteriormente, los porcentajes de colonización micorrízica y densidad visual alcanzados a los 50 DDE se pueden considerar bajos (Figura 5 A), en comparación con los encontrados en otros cultivos como trigo (Plana *et al.*, 2008; Bheemareddy y Lakshman, 2011) y pastos (González *et al.*, 2015), que se cultivan en condiciones de aerobiosis. Aun cuando los valores de colonización micorrízica y densidad visual se consideran bajos, resultaron efectivos.

También, puede deberse a las condiciones de anaerobiosis sobre el desarrollo de la micorrización en las plantas de arroz y como consecuencia de dichas condiciones se modifica la arquitectura de la raíz en la planta de arroz (Gutjahr *et al.*, 2009), que conduce al predominio de raíces con mayor tejido aerénquima, dejando menos espacio al tejido cortical (Gutjahr *et al.*, 2009; Vallino *et al.*, 2014), siendo precisamente este último tejido en el que se establece el hongo micorrízico arbuscular en la raíz (Smith y Read, 2008).

La DV, mide con mayor claridad la intensidad de la colonización micorrízica en la raíz, así como el funcionamiento micorrízico, a través del intercambio simbiótico de la especie de hongo micorrizógeno con la planta. Los resultados obtenidos de DV, demostraron la capacidad de *R. intraradices* en primer lugar, seguido por *G. cubense* y *C. claroideum*, para adaptarse a condiciones de inundación (anaerobiosis), a pesar de que estas cepas no fueron aisladas residentes de suelos dedicados al monocultivo de arroz bajo estas condiciones.

Recientemente, Vallino *et al.* (2014) informaron que la colonización micorrízica en plantas de arroz contribuye a su adaptación a condiciones de anaerobiosis y aerobiosis, así como a los cambios de una condición a la otra. Además, detectaron la expresión de transportadores de fosfato y amonio considerados marcadores de la funcionalidad de la simbiosis, aun cuando los porcentajes de colonización micorrízica eran bajos (entre 8 y 25 %) dadas las condiciones de anaerobiosis.

De acuerdo con Rivera *et al.* (2007), el suelo es determinante en la colonización micorrízica, puesto que los HMA son microorganismos edáficos y las propiedades físico-químicas del suelo determinan, tanto la capacidad de adaptabilidad y establecimiento de los HMA, como la eficiencia simbiótica. Sin embargo, en este estudio debido a las condiciones de oxidación-reducción que se generan en un suelo con lámina de agua (anaerobiosis), donde se modifican el

potencial redox, el pH, las condiciones de solubilización de nutrientes para las plantas, entre otras propiedades, se torna complejo asociar el comportamiento de las cepas de HMA con las condiciones edáficas. Estas modificaciones condicionaron que tres de las cepas de HMA evaluadas manifestaran un comportamiento semejante y que la cepa *F. mosseae*, descrita como eficiente para condiciones de suelo ácido (Rivera *et al.*, 2014), reflejara el peor comportamiento, por provocar la menor respuesta simbiótica y un desarrollo más limitado de las plantas, lo cual se evidenció en la eficiencia simbiótica y la densidad visual.

Un aspecto a considerar en todo el comportamiento analizado, aunque no fue evaluado, está referido al efecto que pudiera sobre el incremento en el crecimiento y desarrollo de las plantas inoculadas con respecto a las no inoculadas, la producción hormonal durante el reconocimiento entre los simbiontes y establecimiento de la asociación, tal como sugirieron Fernández *et al.* (2002) a partir del incremento en la formación de callos embriogénicos en café (*Coffea canephora*).

Recientemente algunos autores (Foo *et al.*, 2013; Fusconi, 2014), también han manifestado en plantas micorrizadas una mayor estimulación en la producción de fitohormonas, que pueden contribuir de alguna manera al incremento del crecimiento de las plantas. No obstante, otros autores consideran que los resultados en este sentido no están totalmente esclarecidos y en ocasiones son contradictorios (Gutjahr, 2014; Pozo *et al.*, 2015).

Los resultados indican que en el momento del reconocimiento de los simbiontes y después de establecida la colonización, debe existir un equilibrio en la liberación y producción de hormonas, tanto del HMA, como de la planta, que regulan el establecimiento de la colonización y determinan un mejor funcionamiento micorrízico, que se manifieste en el crecimiento y desarrollo de la planta.

4.2. Evaluación en condiciones de anaerobiosis del comportamiento de plantas de arroz, inoculadas con HMA y expuestas a diferentes suministros hídricos en tres momentos de su desarrollo

La reducción del suministro hídrico condicionó el agrietamiento del sustrato en la maceta, además del enrollamiento y erección de las hojas, evidenciando un déficit hídrico, en los tres momentos que se aplicó la reducción (Figura 7).



Figura 7. Efectos de la reducción del suministro hídrico por un periodo de 15 días a los 30 DDT, en condiciones de macetas.

Crecimiento y desarrollo

En la Figura 8 se presentan el efecto de la inoculación con *R. intraradices* en la

altura (ALT), la acumulación de masa fresca de la parte aérea (MFA) y de las raíces (MFR) de plantas de arroz que permanecieron con una lámina de agua desde el momento del trasplante (Sin E) y que fueron expuestas a reducción del suministro hídrico (Con E) por un periodo de 15 días a los 30, 40 y 50 DDT.

Las plantas expuestas a reducción del suministro hídrico mostraron menor ALT (Figura 8 A) y MFA (Figura 8 C) independientemente de estar inoculadas o no. En el caso de la MFR se presentaron los valores mayores en las plantas expuestas a reducción del suministro hídrico en los tres momentos que se impuso esta condición (Figura 8 E). La inoculación con *R. intraradices* favoreció dicho incremento, hasta en las plantas testigo (Sin E).

Después del periodo de recuperación (122 DDT), no se encontró diferencias en la ALT entre las plantas inoculadas y las no inoculadas dentro de cada tratamiento (Figura 8 B); mientras

que las plantas inoculadas siempre presentaron valores mayores de MFA (Figura 8 D) y de MFR (Figura 8 F), respecto a las plantas testigo noMA.

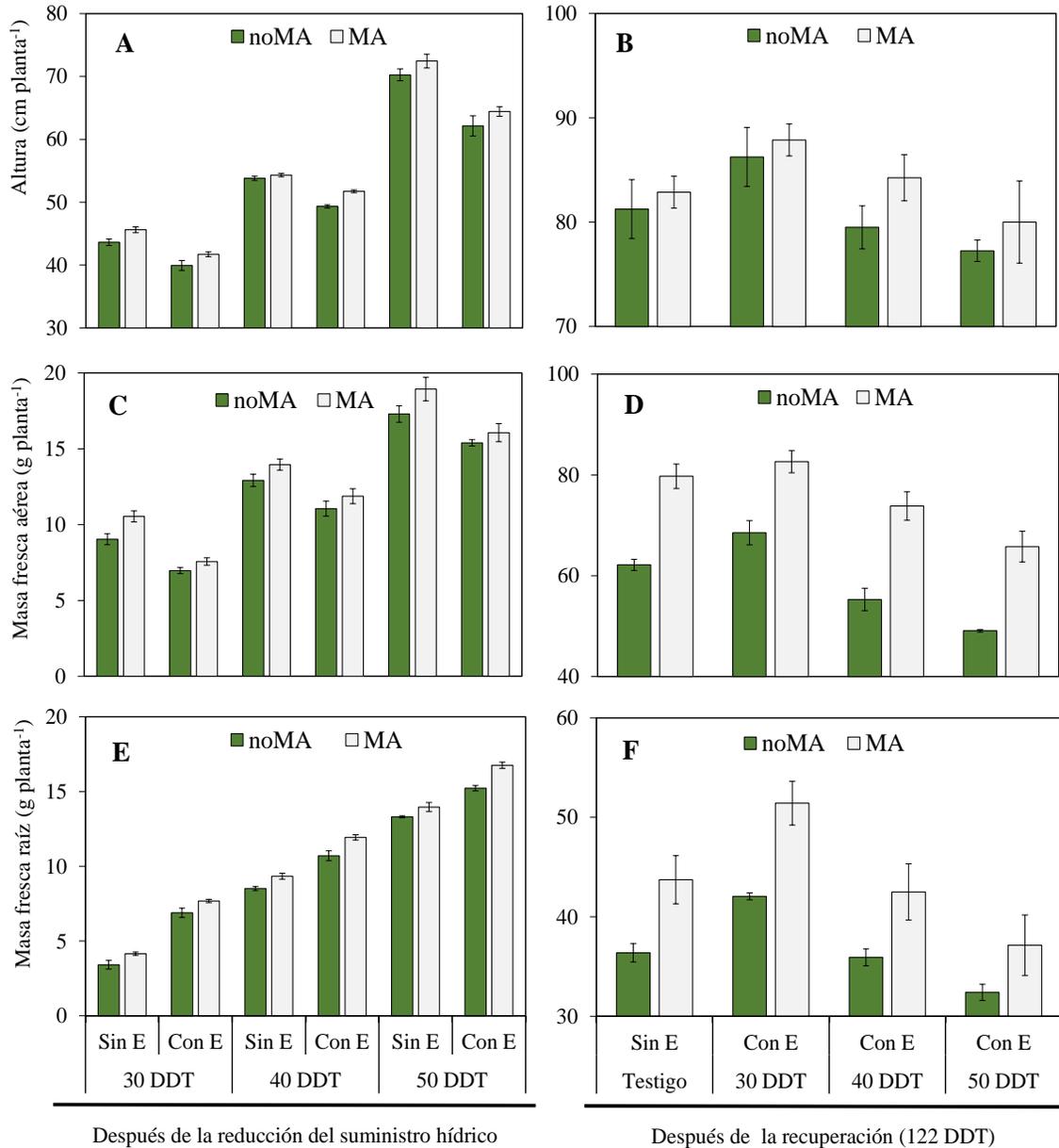


Figura 8. Altura (A y B), masa fresca aérea (C y D) y masa fresca de la raíz (E y F), 15 días después de iniciar la reducción del suministro hídrico y 25 días antes de la cosecha, en plantas de arroz inoculadas con *R. intraradices* (MA) y no inoculadas (noMA), cultivadas en sustrato suelo:arena 1:1 (v:v) en condiciones de macetas y con lámina de agua (Sin E), expuestas a reducción del suministro hídrico (Con E) a los 30, 40 y 50 DDT, respectivamente. Marcas sobre las barras indican Intervalos de confianza ($\alpha=0,05$).

La reducción del suministro hídrico a los 30 DDT provocó mayor ALT, MFA y MFR después del periodo de recuperación (122 DDT), tanto en plantas inoculadas, como no inoculadas. Por

el contrario dicha reducción a los 40 y 50 DDT limitó el crecimiento y desarrollo del arroz (Figura 8 B, D y F), respecto a su imposición a los 30 DDT.

Rendimiento agrícola y sus componentes

En la Figura 9 se muestran los resultados obtenidos al evaluar la cantidad de panículas por planta, los granos llenos por panícula, la masa de 1000 granos y el rendimiento agrícola en las plantas de arroz inoculadas con *R. intraradices* (MA) y no inoculadas (noMA), cultivadas en sustrato suelo:arena 1:1 (v:v), en condiciones de macetas y con lámina de agua (Sin E), expuestas a reducción del suministro hídrico por un periodo de 15 días durante la fase vegetativa (30, 40 y 50 DDT).

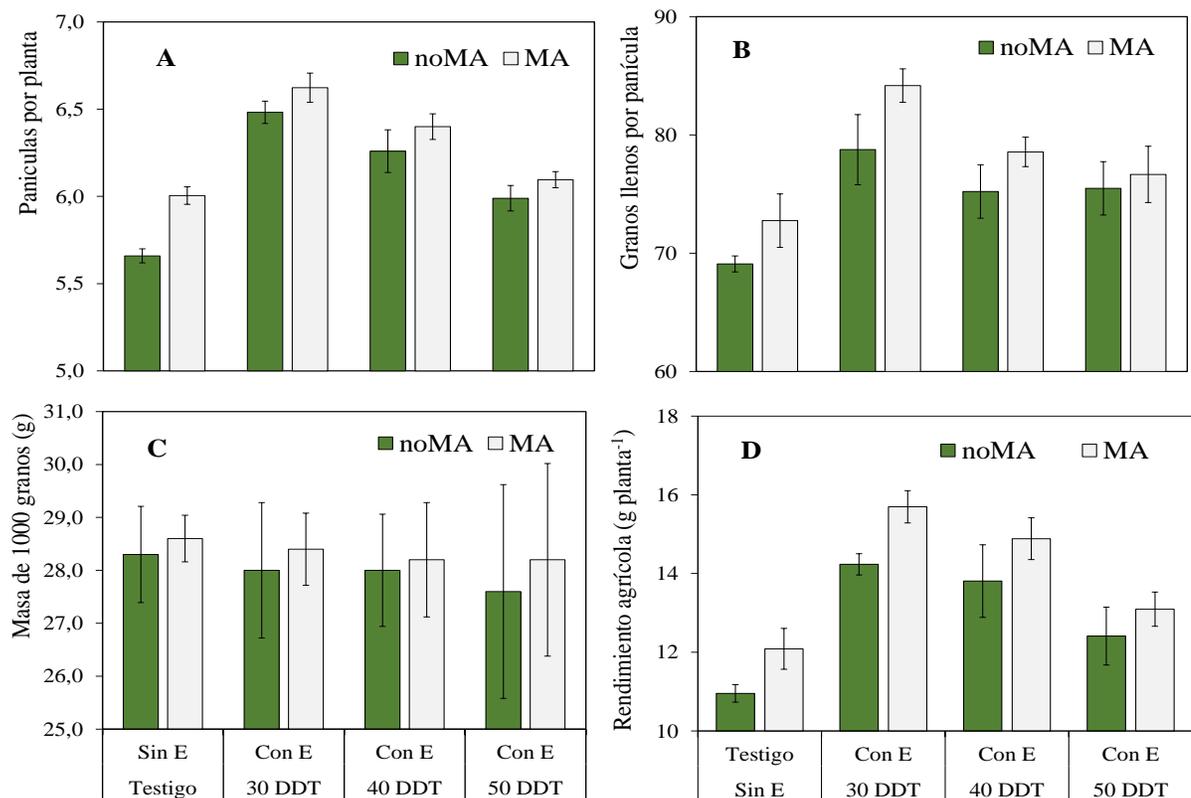


Figura 9. Panículas por planta (A), granos llenos por panícula (B), masa de 1000 granos (C) y rendimiento agrícola (D), en el momento de la cosecha (147 DDT) en plantas de arroz inoculadas con *R. intraradices* (MA) y no inoculadas (noMA), cultivadas en sustrato suelo:arena 1:1 (v:v), en condiciones de macetas y con lámina de agua (Sin E), expuestas a reducción del suministro hídrico (Con E) a los 30, 40 y 50 DDT, respectivamente. Marcas sobre las barras indican Intervalos de confianza ($\alpha=0,05$).

Las panículas por planta se incrementaron en los tratamientos expuestos a reducción del suministro hídrico a los 30 DDT, sin que se apreciara efecto de la inoculación, respecto al resto

de los tratamientos (Figura 9 A). En la medida que se aplicó más tardíamente (40 y 50 DDT) la reducción del suministro hídrico, la cantidad de panículas por planta disminuyó y no se observó efecto de la inoculación micorrízica. La cantidad menor de panículas correspondió a las plantas testigo (Sin E) y fue únicamente en esta condición donde se encontró efecto de la inoculación. Los resultados obtenidos de granos llenos por panícula a los 30 DDT fueron superiores en las plantas con reducción del suministro hídrico y que fueron inoculadas con HMA (Figura 9 B); mientras que, la cantidad menor de granos se observó en las plantas testigo (Sin E); aunque el tratamiento inoculado mostró un incremento. La inoculación no tuvo efecto cuando se redujo el suministro hídrico pasados los 30 DDT. No se encontró efecto de los tratamientos en la masa de 1000 granos (Figura 9 C), resultado que coincide con lo informado por Polón y Castro (1999), Polón (2007) y García *et al.* (2010).

En correspondencia con el comportamiento de los componentes del rendimiento evaluados, el rendimiento mayor por planta (Figura 9 D) se obtuvo en las expuestas a reducción del suministro hídrico a los 30 DDT y que fueron inoculadas; mientras que, el rendimiento menor se encontró en las plantas que no se expusieron a esta condición y no se inocularon. Este indicador disminuyó cuando se impuso la reducción del suministro hídrico a los 50 DDT; aunque fue mayor que el testigo.

El arroz se cultiva en Cuba manteniendo una lámina de agua durante casi todo el ciclo biológico del cultivo; sin embargo, los resultados aquí analizados permiten destacar que, bajo esa condición, el rendimiento agrícola se afecta, alejándolo del potencial de la especie. En las condiciones mencionadas, las plantas presentaron las cantidades menores de panículas por planta, granos llenos por panícula y el menor rendimiento y, en todos los casos, la inoculación provocó incrementos de estos indicadores.

Exponer a la planta de arroz a reducción del suministro hídrico en algún momento de la fase vegetativa por un periodo de tiempo de 15 días, no afectó al cultivo y garantizó el incremento del rendimiento agrícola. Al respecto, Polón y Castro (1999) y García *et al.* (2009), afirmaron que el estrés hídrico en la fase vegetativa en plantas de arroz incrementó el número de panículas por planta, variable que identificaron como determinante en el rendimiento agrícola.

La reducción del suministro hídrico por un periodo de 15 días a partir de los 30 DDT, provocó valores elevados de ALT, MFA, MFR, panículas por planta y de granos llenos por panícula, así como, mayor rendimiento agrícola. En particular la MFA, MFR, los granos llenos por panícula y el rendimiento, fueron superiores cuando la planta se inoculó con HMA.

El incremento en el desarrollo de las plantas inoculadas con HMA, también se informó por otros investigadores trabajando en cultivos como, trigo (Plana *et al.*, 2008), maíz (Li *et al.*, 2011) y en el arroz (Maiti *et al.*, 2012), este último en condiciones de secano y en rotación de cultivo con otros cultivos.

El incremento del número de panículas por planta puede estar relacionado con el desarrollo del sistema radical, expresado en este caso como MFR, tal como han señalado otros investigadores (Yoshida, 1981; Polón y Castro, 1999; García *et al.*, 2009).

El aumento del número de granos llenos por panícula pudiera estar asociado con el incremento de la ALT y de la MFA, que son indicativo de un desarrollo foliar mayor y posiblemente de una actividad fotosintética superior. Esto pudiera ocasionar un incremento de carbohidratos productos de la fotosíntesis que serían translocados al grano, contribuyendo así a su llenado (Xu y Zhou, 2007; García *et al.*, 2009; García *et al.*, 2010).

El incremento del rendimiento agrícola en cada momento, provocado por la inoculación con HMA, por la reducción del suministro hídrico impuesto a los 30, 40 y 50 DDT y por la interacción de ambos se presenta en la Tabla 6.

Tabla 6. Porcentaje de incrementos del rendimiento agrícola del arroz en cada momento, por efecto de la inoculación con HMA, de la reducción del suministro hídrico en los diferentes momentos de la fase vegetativa y de la interacción de ambos factores.

| Tratamientos | Incremento (%) por efecto de: | | |
|-----------------|-------------------------------|---------|-------------|
| | MA | Estrés | MA + Estrés |
| Testigo (Sin E) | 10,41 a | 0,00 | 0,00 |
| 30 DDT | 9,83 a | 29,95 a | 42,73 a |
| 40 DDT | 0,00 b | 22,73 b | 35,89 b |
| 50 DDT | 0,00 b | 13,33 c | 19,4 c |
| ESx | 1,59 * | 1,88 ** | 1,71 ** |

* Nivel de significación para el 95 %

** Nivel de significación para el 99 %

La reducción del suministro hídrico impuesto a los 30 DDT provocó incrementos del rendimiento, con menor dispersión de los resultados, tanto por efecto de la inoculación, por la condición de déficit hídrico, como por la interacción de ambos factores; mientras que, los menores incrementos estuvieron asociados a las plantas del tratamiento con reducción del suministro hídrico a los 50 DDT.

Con estos resultados se corroboró lo señalado por otros autores de forma independiente, en cuanto al incremento del rendimiento agrícola del arroz por efecto de la inoculación con HMA (Rivera *et al.*, 2007; Maiti *et al.*, 2011, 2012) y por el estrés hídrico intencionado (Polón y Castro 1999; García *et al.*, 2009). García *et al.* (2009) en condiciones semicontroladas, al someter el cultivar de arroz J-104 a estrés hídrico en la fase vegetativa (50 y 57 días después de la siembra, en las épocas seca y lluviosa, respectivamente), encontraron que las plantas con estrés hídrico presentaron un incremento del rendimiento agrícola, que osciló entre 30 % y 43 % en la época seca y lluviosa, respectivamente.

El comportamiento en el crecimiento y desarrollo de las plantas de arroz que se expusieron a reducción del suministro hídrico a los 30 DDT, pudo estar relacionado con un mecanismo de respuesta ante esa condición, denominado “*evasión*” (Laffite *et al.*, 2007), mediante el cual las plantas activan mecanismos que permiten el ajuste osmótico a nivel celular (Augé *et al.*, 2008; Ruiz-Lozano *et al.*, 2012), con la finalidad de mantener la turgencia de la célula y los procesos que dependen de ella, tales como la expansión y el crecimiento celular, la apertura de estomas y la fotosíntesis, así como el mantenimiento de un gradiente de potencial hídrico favorable a la entrada de agua en la planta (Ruiz-Lozano *et al.*, 2012). De acuerdo con los resultados de este experimento, la inoculación con HMA favorece estos mecanismos en la planta de arroz.

La condición de reducción del suministro hídrico a los 30 DDT, limitó el crecimiento y desarrollo de la planta; sin embargo, a los 122 DDT se incrementó el mismo, lo que pudiera estar relacionado, por una parte, con el tiempo que medió desde que las plantas concluyeron este periodo y el momento de la recuperación, el cual fue menor en aquellas que se expusieron más tardíamente a esta condición y por otra parte, con el estado fenológico de la planta en el momento de imponer la reducción del suministro hídrico.

Resulta importante señalar que a los 40 DDT y 50 DDT, la planta pudiera encontrarse inmersa en el inicio y desarrollo de la fase reproductiva, por lo que el metabolismo de la planta puede que se esté reservando para el cambio de primordio y la floración, procesos que se pudieron afectar en mayor magnitud al imponerse la reducción del suministro hídrico, con respecto a los 30 DDT.

Todo lo argumentado con anterioridad, permite explicar por qué la reducción del suministro hídrico a los 30 DDT estimuló el crecimiento y desarrollo de las plantas de arroz, donde adicionalmente, esa estimulación fue mayor cuando se realizó la inoculación con HMA.

Sea cual fuera el mecanismo desarrollado por las plantas, aquellas que se inocularon tuvieron mejor recuperación tras un periodo de reducción en el suministro de agua, ya que se incrementó el crecimiento de las plantas a un ritmo más rápido cuando el riego fue restaurado, comportamiento que se correspondió con lo señalado por Polón (2007) y Miransari (2010).

Comportamiento de otros indicadores fisiológicos en las plantas

Las variables potencial hídrico foliar (Ψ_h) y conductancia estomática (CE) se muestran en la Figura 10. El Ψ_h se incrementó en las plantas que no se sometieron a reducción del suministro hídrico y decreció cuando éste se impuso a los 50 DDT (Figura 10 A) y bajo esta condición, la inoculación con HMA mantuvieron los valores más altos de Ψ_h .

El periodo de reducción del suministro de agua provocó un estrés hídrico en la planta, que se incrementó en la medida en que el estrés se impuso más tardíamente, reflejado esto en una disminución del Ψ_h (Figura 9 A); además, bajo las condiciones, la inoculación provocó que se encontraran siempre valores de Ψ_h superiores a los encontrados en plantas no inoculadas.

Después de la recuperación a los 122 DDT (Figura 10 B), en las plantas que se expusieron a estrés hídrico el Ψ_h aumentó, con respecto a las evaluaciones realizadas previamente y fue mayor en plantas inoculadas sin estresar y estresadas a los 30 DDT; aunque sin diferencias con el testigo.

La CE (Figura 10 C), siempre fue mayor en las plantas testigos (Sin E), encontrándose los valores mayores en aquellas evaluadas a los 45 DDT, inoculadas o no con HMA. Bajo estas condiciones, la CE disminuyó a los 55 DDT y se mantuvo con igual magnitud hasta la evaluación realizada a los 122 DDT (después de la recuperación, Figura 9 D), donde se observó un aumento de esta variable por efecto de la inoculación.

Las plantas que se expusieron a reducción del suministro hídrico en los tres momentos, evidenciaron estrés hídrico en la planta, reflejado esto en una disminución de la CE (Figura 10 C).

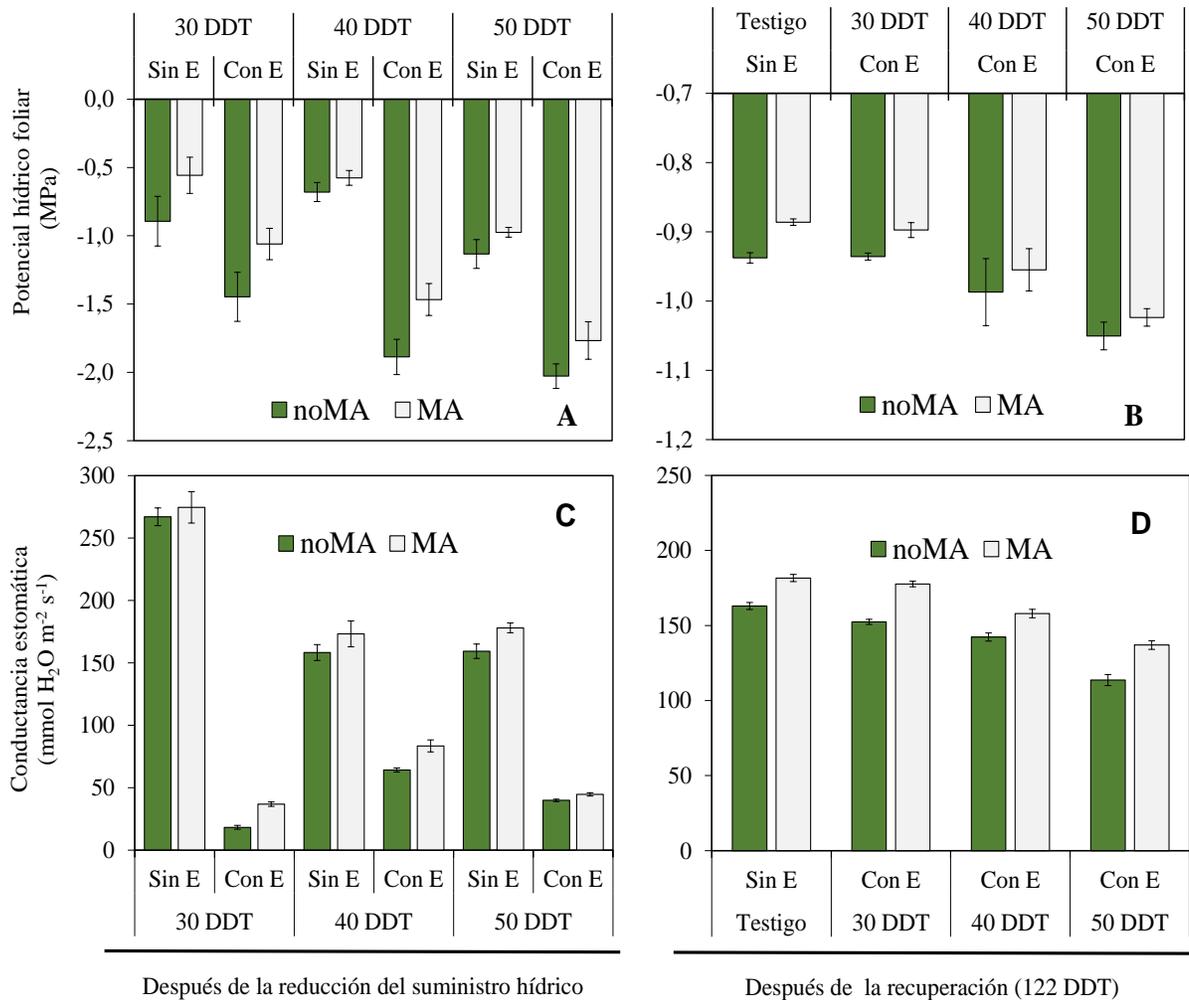


Figura 10. Potencial hídrico foliar (A y B) y conductancia estomática (C y D), 15 días después de iniciar la reducción del suministro hídrico y 25 días antes de la cosecha, en plantas de arroz inoculadas con *R. intraradices* (MA) y no inoculadas (noMA), cultivadas en sustrato suelo:arena 1:1 (v:v) en condiciones de macetas y con lámina de agua (Sin E), expuestas a reducción del suministro hídrico (Con E) a los 30, 40 y 50 DDT, respectivamente. Marcas sobre las barras indican Intervalos de confianza ($\alpha=0,05$).

La inoculación micorrízica siempre mejoró la CE, siendo superior en las estresadas a los 40 DDT. A los 122 DDT (Figura 10 D), esta variable aumentó en todos los tratamientos estresados, aunque el mayor incremento se encontró en las plantas estresadas a los 30 DDT, manteniéndose el efecto bajo condiciones de estrés hídrico en las plantas inoculadas.

Los resultados hasta aquí analizados indican que el Ψ_h reflejó el estado hídrico de las plantas expuestas o no a estrés hídrico, lo que evidenció la pertinencia de determinar los niveles o valores críticos de Ψ_h para el arroz, relacionados con el rendimiento relativo (RR%), al no existir hasta el presente una categorización del Ψ_h en las plantas de arroz expuestas a esta condición. En la Figura 11 se muestra la dispersión de los valores entre el Ψ_h y el RR% encontrados en las diferentes condiciones evaluadas; así como el Nivel Crítico al considerar el conjunto poblacional íntegro.

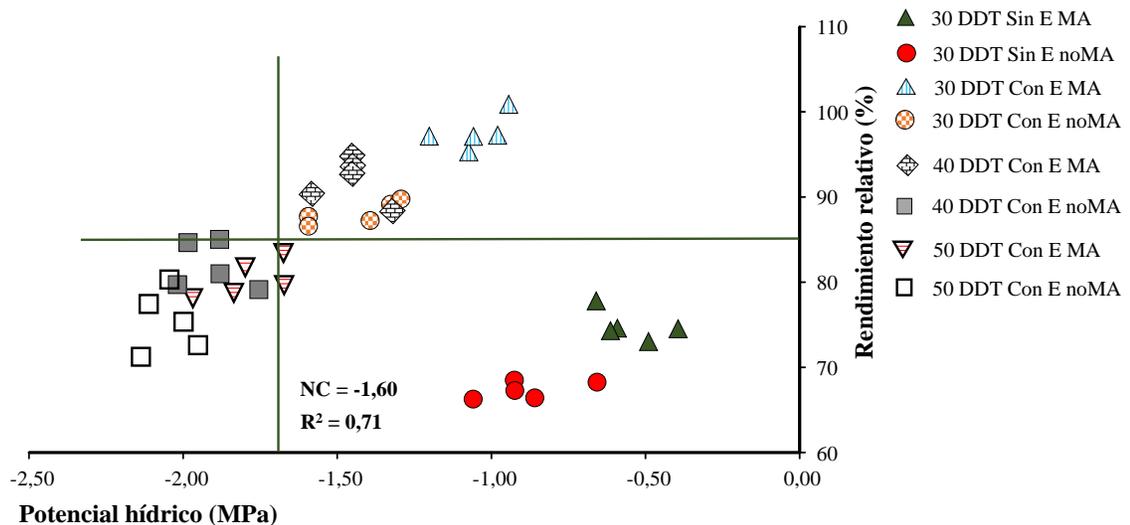


Figura 11. Nivel Crítico del Ψ_h determinado 15 días después de cada periodo de reducción del suministro hídrico, representado en un diagrama de dispersión de la relación entre el Ψ_h y el rendimiento relativo de plantas de arroz inoculadas con *R. intraradices* (MA) y no inoculadas (noMA), cultivadas en sustrato suelo:arena 1:1 (v:v) en condiciones de macetas y con lámina de agua (Sin E), expuestas a reducción del suministro hídrico (Con E) a los 30, 40 y 50 DDT, respectivamente. El rendimiento máximo con el que se calculó el rendimiento relativo fue 16,24 g planta⁻¹.

Se obtuvieron dos poblaciones definidas, una que abarcó desde el cuadrante superior derecho hasta el cuadrante inferior izquierdo, con RR% que oscilaron entre 72 % hasta el 100 % y una segunda, ubicada en el cuadrante inferior derecho, con RR% entre 65 % y 80 %.

La primera población estuvo conformada por todos los tratamientos que se expusieron a reducción del suministro hídrico en los diferentes momentos de la fase vegetativa, tanto en plantas no inoculadas, como inoculadas con HMA.

La segunda población, correspondió a tratamientos no inoculados e inoculados con HMA, denominados Testigos, que nunca se expusieron ante una situación de estrés. En la propia Figura 11, se observa también el Nivel Crítico del Ψ_h considerando las dos poblaciones descritas antes, con el valor de -1,60 MPa, para un RR% de 85 %, según método de Cate y Nelson (1971).

El valor de RR% que se corresponde con el Nivel Crítico determinado, apunta a que la subpoblación del cuadrante superior derecho, puede ser dividida una vez más, hasta lograr un RR% por encima del cual todos los valores que se encuentren no difieran entre sí. El Nivel Crítico determinado se muestra en la Figura 12.

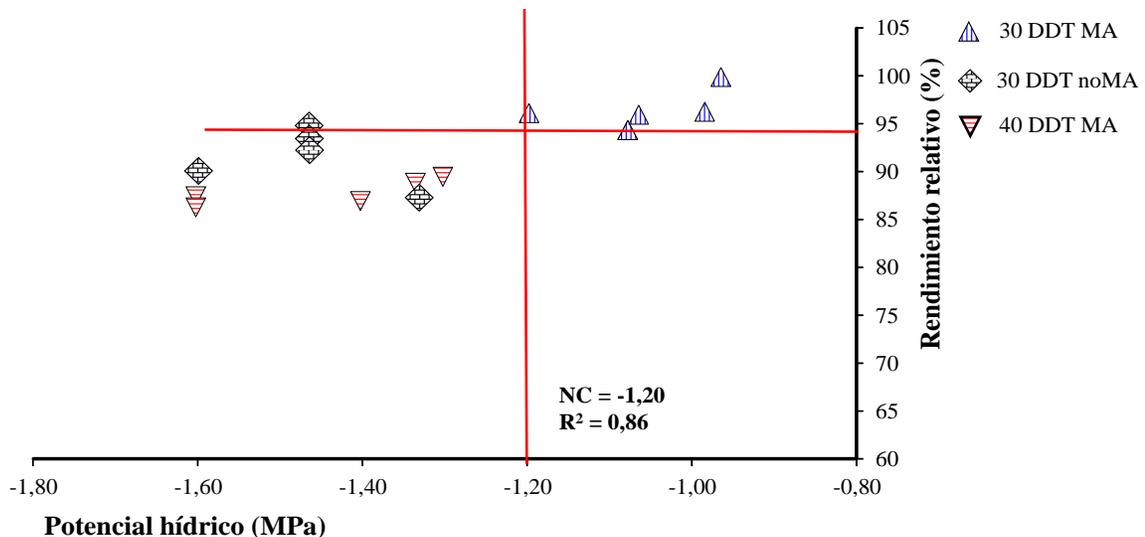


Figura 12. Nivel Crítico del Ψ_h determinado 15 días después de cada periodo de reducción del suministro hídrico, representado en un diagrama de dispersión de la relación entre el Ψ_h y el rendimiento relativo de plantas de arroz inoculadas con *R. intraradices* (MA) y no inoculadas (noMA), cultivadas en sustrato suelo:arena 1:1 (v:v) en condiciones de macetas y con lámina de agua (Sin E), expuestas a reducción del suministro hídrico (Con E) a los 30 y 40 DDT, respectivamente. El rendimiento máximo con el que se calculó el rendimiento relativo fue 16,24 g planta⁻¹.

En el cuadrante superior derecho se ubicaron las plantas del tratamiento que se estresó a los 30 DDT y que fueron inoculadas con HMA; mientras que, en el cuadrante inferior izquierdo, se ubicaron las plantas estresadas a los 30 DDT pero sin inocular con HMA y aquellas inoculadas con HMA que se estresaron a los 40 DDT. El RR% asociado al Nivel Crítico de Ψ_h (-1,20 MPa) establecido, se incrementó hasta el 94 %-95 %.

Finalmente, la población conformada por los tratamientos Testigos, que no se sometieron a condiciones de estrés hídrico, pudo ser dividida en dos subpoblaciones encontrándose un nuevo Nivel Crítico de Ψ_h de -0,67 MPa (Figura 13).

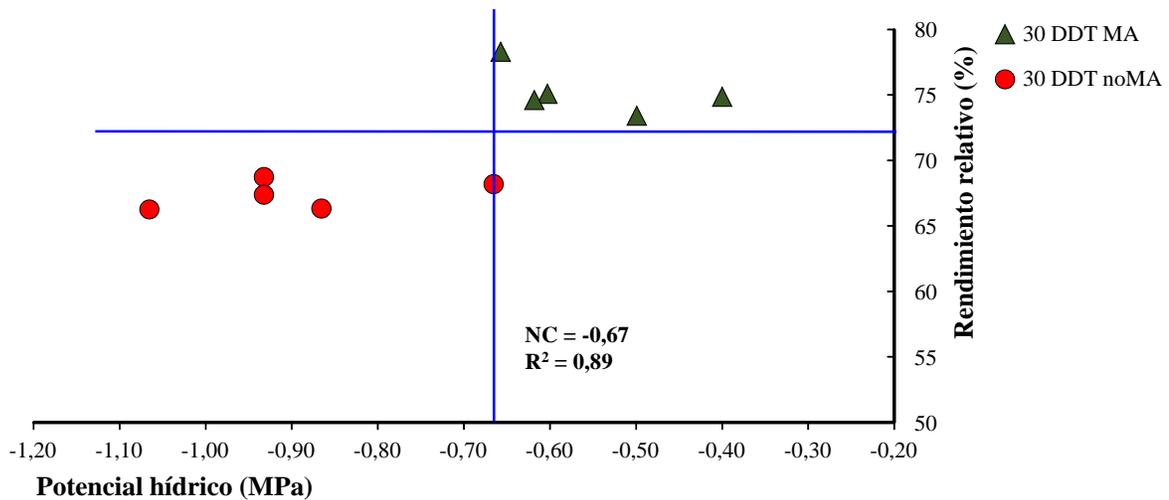


Figura 13. Nivel Crítico del Ψ_h determinado a los 45 DDT, representado en un diagrama de dispersión de la relación entre el Ψ_h y el rendimiento relativo de plantas de arroz inoculadas con *R. intraradices* (MA) y no inoculadas (noMA), cultivadas en sustrato suelo:arena 1:1 (v:v) en condiciones de macetas y con lámina de agua (Sin E). El rendimiento máximo con el que se calculó el rendimiento relativo fue 16,24 g planta⁻¹.

El análisis desarrollado con los resultados obtenidos, permitió establecer una categorización del grado de estrés en que se encontraron las plantas de arroz a partir del Ψ_h y el RR% (Tabla 7).

Tabla 7. Categorización del estrés por déficit hídrico en plantas de arroz en función del Ψ_h (medido entre las 9:00 am y 10:00 am) y el RR%.

| Categoría del estrés | Rangos del Ψ_h (MPa) |
|----------------------|---------------------------|
| Sin estrés | $\geq -0,67$ |
| Estrés ligero | $< -0,67$ a $-1,20$ |
| Estrés moderado | $< -1,20$ a $-1,60$ |
| Estrés severo | $< -1,60$ |

La disminución del Ψ_h y la CE indicaron un estrés hídrico en las plantas provocado por la reducción del suministro de agua, variables que se han utilizado como indicadores de estrés por déficit hídrico en otros cultivos, como en tomate (Dell'Amico *et al.*, 2002; Fundora *et al.*, 2008), *Sorghum bicolor* L. Moench (Mena *et al.*, 2011), en lechuga y maíz (Bárzana, 2014) y en el arroz (García *et al.*, 2010; Ruiz-Sánchez *et al.*, 2011).

Es importante destacar que después del periodo de recuperación se observó a través del Ψ_h la capacidad de recuperación que presentaron las plantas, expuestas a estrés hídrico tanto MA, como noMA. Al respecto Polón (2007) informaron que el arroz tiene la capacidad de recuperarse, aun cuando estrés hídrico impuesto se puede considerar severo, por su duración e intensidad. Por otra parte, la CE también denotó una recuperación de las plantas, que fue más evidente en las que se inocularon, respecto a las no inoculadas.

En la medida que el estrés hídrico se impuso más tardíamente, se correspondió con la limitación del crecimiento y desarrollo de la planta de arroz, lo que pudiera atribuirse a una disminución de la entrada de CO_2 en las células y una baja eficiencia en el uso de la luz, a la vez que pudo provocar la inactivación del sistema fotosintético y por lo tanto, las plantas no produjeron asimilados suficientes que contribuyeran con la división celular del tejido meristemático para el crecimiento de la planta (Zubarer *et al.*, 2007; Mostajeran y Rahimi-Eichi, 2009), siendo también insuficiente su acumulación para el llenado de los granos (García *et al.*, 2010).

Después de la recuperación (122 DDT), los valores mayores de Ψ_h en las plantas inoculadas sin estresar y estresadas a los 30 DDT (Figura 9 B) y de CE en todos los tratamientos inoculados con HMA (Figura 9 D), indicaron la participación directa de los HMA en los mecanismos de señalización y adaptación de las plantas ante una condición de estrés y de recuperación del mismo. Resulta importante mencionar que en este momento de evaluación (122 DDT, 25 días antes de la cosecha), las plantas se encontraban en un proceso caracterizado por una demanda mayor de agua para la translocación de metabolitos y llenado de los granos (García *et al.*, 2010), así como por la senescencia, aspecto este último que disminuye la fotosíntesis (Lim *et al.*, 2007) y provoca cambios bioquímicos en la planta con la finalidad de completar su ciclo biológico.

Los resultados encontrados demuestran el efecto positivo de la inoculación que hace que la planta pueda tolerar la condición de estrés hídrico, a partir de garantizar la recuperación de la misma después de restaurada la lámina de agua y de mejorar, tanto el Ψ_h de las plantas sin estresar y estresadas a los 30 DDT, como la CE en todos los casos, constituyendo esta última el mecanismo inicial de tolerancia ante una condición de estrés según lo expresado por Damour *et al.* (2010); Song y Matsuoka (2011).

Resultados similares se informaron por Kato y Okami (2010), al cultivar arroz en condiciones no inundadas e inundadas. Además estos autores destacaron que este cultivo es sensible a potenciales hídricos en el suelo inferiores a -30 KPa y que el estrés hídrico estimula el crecimiento radical. Aunque a este nivel de potencial no se reduce la transpiración en otros cultivos de secano, sí ocurre en el arroz (Wopereis *et al.*, 1996), por presentar una elevada sensibilidad en los estomas, lo que está relacionado con los mecanismos de señalización de la raíz a través del ABA para evitar las pérdidas de agua (Siopongco *et al.*, 2008; 2009).

Todo lo anterior indicó que el comportamiento encontrado en cuanto al Ψ_h y CE, estuvo influenciado por la inoculación MA, ya que de alguna manera se aumentó la capacidad de absorción de agua de las plantas y presumiblemente, la conductividad hidráulica de la raíz, lo que al parecer disminuyó la resistencia de ésta al paso del agua, tal como han planteado otros investigadores (Dell'Amico *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2010; Ruiz-Lozano *et al.*, 2011), aspecto que se corroboró en otros trabajos con diferentes genotipos de trigo (Silva-Robledo *et al.*, 2007) y en maíz (Bárzana *et al.*, 2012).

Los rangos de Ψ_h presentados, resultaron comparables con los propuestos para todas las plantas por Hsiao (1973), propuesta que se realizó a partir de un análisis de los resultados publicados sobre el efecto del estrés hídrico en las plantas. No obstante, este autor definió tres grados de

estrés para categorizar el estado hídrico de una planta, teniendo en cuenta los valores de Ψ_h y el contenido relativo de agua (CRA): Déficit hídrico ligero: Cuando el Ψ_h es mayor de -5 bar o cuando el CRA se reduce en un 8-10 %. Déficit hídrico moderado: Cuando el Ψ_h está entre -5 bar a -12 o -15 bar o cuando el CRA decrece entre 10 y 20 %. Déficit hídrico severo: Cuando el Ψ_h es menor de -1,5 bar o cuando el CRA disminuye en más de 20 %.

Es importante señalar que la categoría de Déficit hídrico moderado propuesta de Hsiao (1973) incluyó un rango muy amplio que va desde -5 bar hasta -12 o -15 bar (= a -0,5 MPa hasta -1,2 o -1,5 MPa) y en este trabajo se pudo precisar y establecer otro rango de estrés hídrico. A pesar de lo expuesto anteriormente, desde la década de 1970 hasta la actualidad diversos autores han utilizado la categorización propuesta por este autor, para comparar sus resultados, la cual fue utilizada recientemente en las investigaciones realizadas en arroz por García (2009).

Comportamiento de indicadores bioquímicos en las plantas

El contenido de prolina (PRO) en las plantas de arroz se muestra en la Figura 14. En cada momento de evaluación (Figura 14 A), se encontró que en los tratamientos sin estresar (Testigo) las plantas presentaron los menores contenidos de PRO, sin diferencias entre las MA y noMA, dicho contenido disminuyó cuando estas tuvieron mayor crecimiento y desarrollo.

La exposición a estrés hídrico a los 30, 40 y 50 DDT (Figura 14 A), aumentó el contenido de PRO, con respecto a los Testigos correspondientes y fue menor en las plantas MA. Después de la recuperación a los 122 DDT, en las plantas que se estresaron a los 30 DDT (Figura 14 B) no se observó variación en el contenido de PRO y fueron los más bajos; mientras que, en los otros tratamientos dicho contenido se incrementó al comparar ambos momentos de evaluación, siendo menor en las plantas que no sufrieron estrés; en todos los caso el contenido de PRO fue menor en las plantas inoculadas, respecto a las no inoculadas.

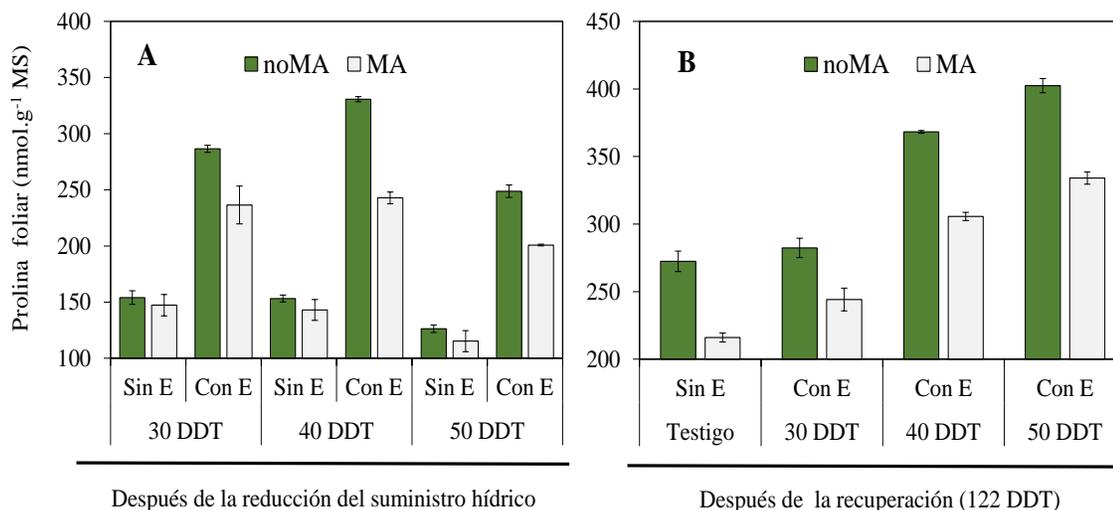


Figura 14. Contenido de Prolina foliar, 15 días después de iniciar la reducción del suministro hídrico (A) y 25 días antes de la cosecha (B), en plantas de arroz inoculadas con *R. intraradices* (MA) y no inoculadas (noMA), cultivadas en sustrato suelo:arena 1:1 (v:v) en condiciones de macetas y con lámina de agua (Sin E), expuestas a reducción del suministro hídrico (Con E) a los 30, 40 y 50 DDT, respectivamente. Marcas sobre las barras indican Intervalos de confianza ($\alpha=0,05$).

En la Figura 15 se muestra el comportamiento del contenido de H_2O_2 , el DOL, el contenido de ASC y de GSH en plantas de arroz inoculadas con HMA que fueron expuestas o no a estrés hídrico en diferentes momentos del desarrollo de la planta durante la fase vegetativa.

Los contenidos de H_2O_2 a los 30, 40 y 50 DDT fueron más bajo en las plantas sin estrés (Sin E) e inoculadas con HMA (Figura 15 A), respecto a las no inoculadas y a los tratamientos expuestos a estrés hídrico (Con E), en estos últimos tratamientos se incrementó el contenido de H_2O_2 en la medida que más tardíamente se aplicó el estrés (50 DDT), solamente se encontró efecto de la inoculación cuando se aplicó el estrés hídrico a los 30 y 40 DDT.

Cuando se restauró la lámina de agua y se evaluó el contenido de H_2O_2 a los 122 DDT (Figura 15 B), este fue menor en las plantas testigos (Sin E) y en todos los tratamientos dicho contenido resultó más bajo en las plantas MA. El H_2O_2 continuó siendo superiores en la medida que el estrés se impuso más tardíamente, tanto en las plantas MA como en las noMA.

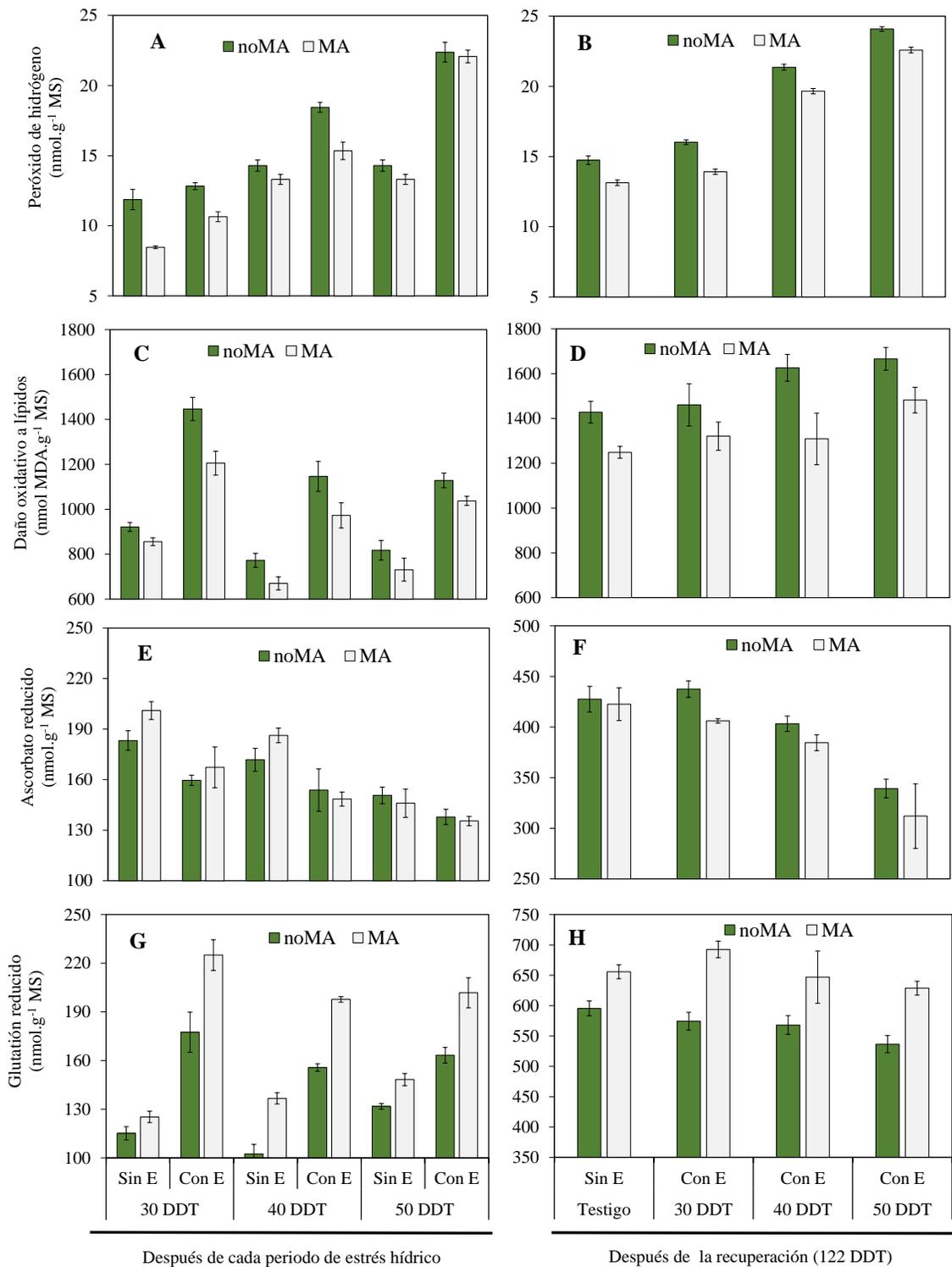


Figura 15. Contenido de H_2O_2 foliar (A y B), daño oxidativo por lípidos (C y D), contenido de ascorbato reducido foliar (E y F) y contenido de glutatión reducido foliar (G y H), 15 días después de iniciar la reducción del suministro hídrico y 25 días antes de la cosecha, en plantas de arroz inoculadas con *R. intraradices* (MA) y no inoculadas (noMA), cultivadas en sustrato suelo:arena 1:1 (v:v) en condiciones de macetas y con lámina de agua (Sin E), expuestas a reducción del suministro hídrico (Con E) a los 30, 40 y 50 DDT, respectivamente. Marcas sobre las barras indican Intervalos de confianza ($\alpha=0,05$).

El DOL (Figura 15 C) fue menor en las plantas que no se expusieron a estrés por déficit de agua (Sin E) y entre estas plantas, fue superior cuando se evaluó este indicador a los 45 DDT. La inoculación condujo a una disminución en el DOL en estas plantas a los 45 y 55 DDT.

Las plantas que se expusieron a estrés hídrico mostraron los valores mayores de DOL; sin embargo, las inoculadas con HMA reflejaron los valores menores de DOL en los tres momentos (45, 55 y 65 DDT) y dentro de estos tratamientos la imposición de esta condición a los 30 DDT mostró valores superiores (Figura 15 C).

Después de la recuperación a los 122 DDT (Figura 15 D), el DOL se incrementó en las plantas que no se expusieron ante el estrés y en aquellas estresadas a los 40 y 50 DDT, en estos tratamientos, la inoculación propició una disminución del indicador. Las plantas estresadas y evaluadas a los 45 DDT, mantuvieron el mismo valor del DOL hasta después de la recuperación. Al analizar los contenidos de la molécula antioxidante no enzimática ASC (Figura 15 E), se encontraron incrementos de la misma en los tratamientos Testigos en los tres momentos en que fueron evaluados (45, 55 y 65 DDT) y entre estos los contenidos más altos correspondieron a las plantas evaluadas a los 45 DDT. La inoculación provocó el aumento del contenido de ASC a los 45 y 55 DDT.

Por otra parte, en los tratamientos expuestos a estrés hídrico (Figura 15 E) los contenidos de ASC disminuyeron en la medida en que el estrés se impuso más tardíamente y la inoculación no tuvo efecto alguno.

Posterior a la recuperación a los 122 DDT (Figura 15 F), en todos los tratamientos se incrementó el contenido de ASC, con respecto a las evaluaciones realizadas cuando se impuso el estrés y en aquellas plantas estresadas a los 30 DDT y 40 DDT, la inoculación provocó disminución de dicho contenido. En la medida en que el estrés se impuso más tardíamente continuó

observándose que disminuyó los contenidos de ASC, respecto a las plantas testigo y la imposición del estrés hídrico a los 30 DDT.

En cuanto al contenido de GSH (Figura 15 G), los valores mayores se encontraron en las plantas que se expusieron ante la situación de estrés hídrico, correspondiendo los valores superiores a las plantas evaluadas a los 45 DDT (cuando el estrés se impuso a los 30 DDT). La inoculación con HMA provocó que se incrementara los contenidos de GSH en todos los tratamientos.

Después del periodo de recuperación a los 122 DDT (Figura 15 H), el contenido de GSH se incrementó más de tres veces en las plantas estresadas a los 30 DDT y más de cinco veces en las plantas sin estresar, encontrándose en las primeras los mayores contenidos de GSH en las plantas que se inocularon. En todos los tratamientos, la inoculación MA condujo al incremento de los contenidos de GSH.

Colonización micorrízica de las raíces

Al evaluar la colonización micorrízica en las plantas de arroz que permanecieron con inundación desde el momento del trasplante (Sin E) y en las que fueron expuestas a estrés hídrico (Con E), no se observó colonización en las plantas que no fueron inoculadas debido a la esterilización a que fue sometido el sustrato; mientras que, en las inoculadas se encontró un incremento de esta variable con el tiempo (Figura 16 A).

A los 45 DDT no se observaron diferencias significativas entre las plantas testigo (Sin E) y las expuestas a estrés hídrico (Con E); sin embargo, a los 55 y 65 DDT se apreciaron valores de colonización superiores en los tratamientos Con E.

En la recuperación a los 122 DDT (Figura 16 B), la colonización micorrízica en las plantas Testigo y las que fueron expuestas a estrés hídrico a los 30 y 40 DDT resultó similar y en los

dos primeros tratamientos (Testigo y estresadas a los 30 DDT) hubo más colonización que cuando las plantas se estresaron a los 50 DDT.

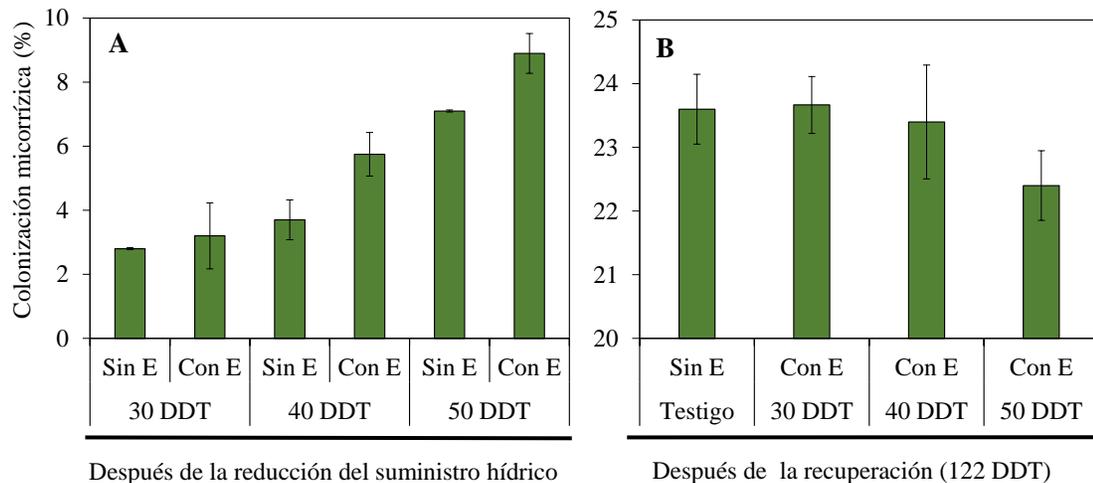


Figura 16. Colonización micorrízica, 15 días después de iniciar la reducción del suministro hídrico (**A**) y 25 días antes de la cosecha (**B**), en raíces de arroz inoculadas con *R. intraradices* (MA) y no inoculadas (noMA), cultivadas en sustrato suelo:arena 1:1 (v:v) en condiciones de macetas y con lámina de agua (Sin E), expuestas a reducción del suministro hídrico (Con E) a los 30, 40 y 50 DDT, respectivamente. Marcas sobre las barras indican Intervalos de confianza ($\alpha=0,05$).

Lo expuesto anteriormente, evidenció que en las plantas estresadas el mayor incremento de la colonización, entre la primera evaluación y después de la recuperación. En este sentido, en las plantas estresadas a los 30 DDT el incremento de la colonización fue de 20 %, cuando el estrés se impuso a los 40 DDT el incremento fue de 17,5 % y finalmente, las estresadas a los 50 DDT incrementaron la colonización en un 13 %, respecto a la evaluación de estrés indicador después de la recuperación (122 DDT).

Con anterioridad, en Cuba se obtuvieron resultados en el establecimiento de la asociación micorrízica en el cultivo del arroz inundado (Ortiz y Fernández, 1998; Hernández y Cuevas, 1999), tal como sucedió en las investigaciones realizadas para esta tesis y cuyos resultados se han expuesto.

Los valores de colonización micorrízica reafirmaron los resultados obtenidos por otros investigadores, que consideraron los niveles de colonización bajos trabajando con la misma

especie vegetal y bajo condiciones de inundación (Secilia y Bagyaraj, 1994; Solaiman e Hirata, 1996), además observaron una reducción de la colonización al trasplantar de condiciones de aerobiosis plantas micorrizadas a condiciones inundadas.

Diversas son las causas que pudieron motivar los niveles bajos de colonización micorrízica, entre las que se encontraron: la condición de anaerobiosis y a la producción de etileno en el medio. La condición de anaerobiosis por la existencia de la lámina de agua, además de mantener el medio con carencia de oxígeno necesario para la germinación de las esporas del hongo, incrementa la concentración del etileno en el medio (Malik *et al.*, 2003), compuesto que a elevadas concentraciones inhibe el crecimiento hifal (Ishii *et al.*, 1996).

Al exponer a las plantas ante un estrés por déficit de agua en diferentes momentos de su ciclo biológico, los niveles de colonización se incrementaron al finalizar el ciclo biológico de la planta y el mayor incremento correspondió a aquellas plantas que se estresaron a los 30 DDT (Figura 16 B), se pueden relacionar con el momento de la evaluación del indicador que coincidió con la etapa final del ahijamiento. A partir de aquí, comenzó la planta de arroz a experimentar transformaciones metabólicas asociadas con el inicio y preparación de la fase reproductiva (Jarma *et al.*, 2010). También pudieron estar relacionados con el periodo de recuperación del estrés hídrico, que fue menor al que tuvieron las plantas que fueron expuestas a estrés a los 30 DDT.

A pesar de lo expuesto, los bajos niveles de colonización tuvieron influencia sobre varios indicadores fisiológicos y bioquímicos en la planta. En tal sentido, cuando las plantas se evaluaron antes de la cosecha (a los 122 DDT), se encontró que la MFA y MFR fueron mayores cuando las plantas se inocularon, estando expuestas o no al estrés. Los valores de Ψ_h y de la CE en las plantas inoculadas superaron a los reflejados por las que no se inocularon. Los contenidos

de PRO, H₂O₂ y DOL fueron menores en las plantas inoculadas. El ASC disminuyó en las plantas inoculadas que se expusieron ante el estrés a los 30 DDT y 40 DDT; mientras que, el contenido de GSH fue mayor en las plantas inoculadas.

Todo lo anterior condujo al incremento del rendimiento agrícola, cuando las plantas se inocularon con HMA y se expusieron ante el estrés hídrico a los 30 DDT y que no se estresaron; pero en menor magnitud que las plantas expuestas a estrés hídrico.

Por otra parte, varios autores refieren una acumulación elevada e incrementos de la síntesis de PRO ante condiciones de estrés como mecanismo osmoregulador y de ajuste osmótico en las plantas cuando son expuestas a estrés abiótico (Mostajeran y Rahimi-Eichi, 2009; Gill y Tuteja, 2010).

Los resultados encontrados de PRO, al finalizar el periodo de estrés hídrico (45 DDT) indicaron que, la PRO puede que se esté expresado como señalizador de la condición a las que fueron expuestas las plantas, aun cuando se expresara como agente osmoprotector, de acuerdo con lo señalado por Mostajeran y Rahimi-Eichi (2009), o incluso haciendo las dos funciones. Estos dos mecanismos se informaron por Foyer y Noctor (2005b), con una eficiencia mayor en las plantas MA que en las noMA (Porcel y Ruz-Lozano, 2004).

La reducción del H₂O₂ y el DOL en plantas de arroz inoculadas con *R. intraradices*, se informó por Ruiz-Sánchez *et al.* (2011), cuando estas fueron expuestas a estrés hídrico en la fase vegetativa por un periodo de 30 días, respecto a las plantas no inoculadas. Igualmente, ocurrió en plantas de soja inoculadas con HMA expuestas a estrés hídrico, donde disminuyó el contenido de PRO y H₂O₂ y el DOL (Porcel y Ruiz-Lozano, 2004).

Por otro lado, la disminución del contenido de ASC en plantas inoculadas con HMA, pudiera asociarse con un mayor consumo de este antioxidante para la reducción del H₂O₂ a H₂O, tal y

como han descrito recientemente Bárzana *et al.* (2015). Pero ese consumo solo se manifestó en las plantas inoculadas que se expusieron ante el estrés a los 30 DDT y 40 DDT, lo que no permite realizar una generalización ni para condiciones de plantas inoculadas con HMA, ni estresadas. El incremento del contenido de GSH se correspondió con la disminución del DOL y del contenido de H_2O_2 encontrados en las plantas de arroz inoculadas con HMA, de lo que se puede inferir su relación directa en la reducción del H_2O_2 a H_2O . Al parecer dado los niveles de GSH encontrados, su acumulación esté relacionada con señales que regulan esta reacción, debido a que este contribuye con la regeneración del ASC (Noctor *et al.*, 2012). El aumento en el contenido de GSH en plantas MA se informó por otros autores (Wu *et al.*, 2006; Wu y Zou, 2009), coincidiendo con una reducción del DOL y del contenido de H_2O_2 .

En las plantas Testigos después de la recuperación (122 DDT), se encontraron los contenidos menores de PRO, de H_2O_2 , de DOL e igual contenido de ASC y mayores de GSH en las inoculadas, respecto a las no inoculadas. Este comportamiento sugiere que la inoculación con HMA es funcional en condiciones de anaerobiosis, a partir de las variaciones que induce esta asociación micorrízica en la respuesta bioquímica de la planta arroz; modificaciones que pudieran estar relacionadas con un mayor absorción de agua y nutrientes, además de la estimulación hormonal, que provocó una mejora en sentido general del estado redox de la planta. Lo anterior permite interpretar que bajo las condiciones de anaerobiosis, el ASC desempeña funciones en la disminución de los excesos de ROS superior al GSH o viceversa, dentro del mecanismo ascorbato-glutatión. Otra interpretación puede ser que bajo estas condiciones, se manifestó un aumento en la actividad enzimática, a partir de la oxidación o reducción de estas dos moléculas (ASC y GSH), aspecto no evaluado en este trabajo.

La acumulación del ASC y el GSH, además de contrarrestar la producción de H_2O_2 en la planta, pudieran estar participando en la eliminación de otras ROS, como es el caso de los radicales libres el superóxido (O_2^-), el hidroxilo (OH^\cdot) y el oxígeno singlete (1O_2).

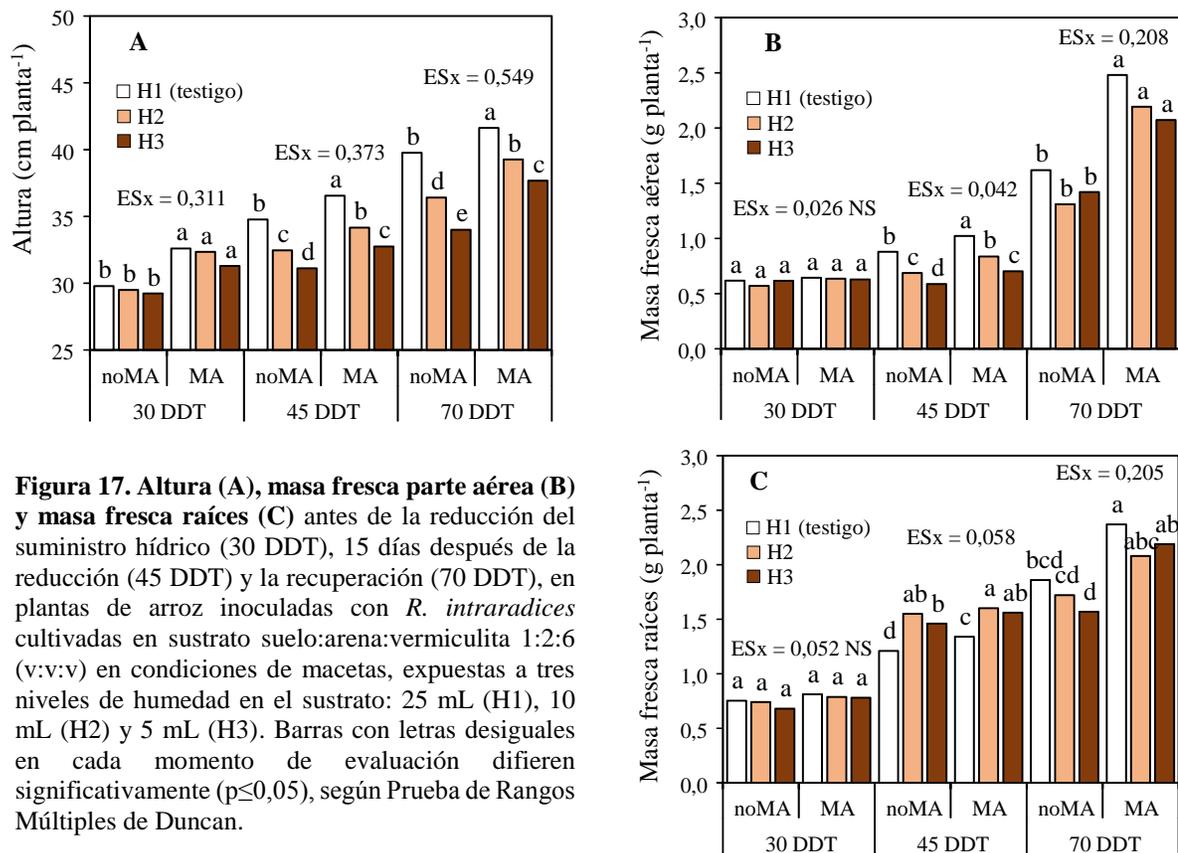
4.3. Evaluación en condiciones de aerobiosis del comportamiento de plantas de arroz, inoculadas con HMA y expuestas a diferentes suministros hídricos

A partir de la respuesta fisiológica y bioquímica manifestada por las plantas de arroz inoculadas o no con HMA, en condiciones de anaerobiosis y expuestas a reducción del suministro hídrico a los 30 DDT por un periodo de 15 días, se consideró oportuno estudiar esta respuesta en condiciones de aerobiosis y su posterior recuperación.

Crecimiento y desarrollo

Antes de iniciar el periodo de reducción del suministro hídrico a los 30 DDT, se observó que la altura de las plantas (ALT) fue superior en las inoculadas, respecto a las no inoculadas en las tres condiciones de humedad en el sustrato (Figura 17 A), aunque en la acumulación de la masa fresca aérea (MFA) y en la radical (MFR) no se encontraron diferencias significativas por efecto de los tratamientos (Figura 17 B y C, respectivamente).

Transcurrido el periodo de reducción del suministro hídrico (45 DDT), se observó que disminuyó la ALT y la MFA expuestas a déficit hídrico, tanto en las MA como en las noMA (H2 y H3); mientras que, la acumulación de la MFR se incrementó, respecto a las plantas del tratamiento testigo (H1). Cuando se aplicaron 5 mL (H3) se observaron los valores menores de ALT y MFA; aunque, en el desarrollo radical no se encontraron diferencias entre el testigo (H1) y el tratamiento con reducción en el suministro hídrico (H2). Al recuperarse las plantas del déficit hídrico (70 DDT) se observaron valores mayores de ALT en los tratamientos testigos (H1) e inoculados con HMA en cada condición de humedad en el sustrato.



Sin embargo, estas no superaron el testigo (H1), comportamiento similar se apreció en las plantas noMA. Es probable que el periodo de rehidratación no haya sido suficiente (25 días) para anular o variar completamente las diferencias en el desarrollo aéreo; mientras que, en la acumulación de la MFR fue superior en las plantas MA y no se encontraron diferencias significativas con el testigo (H1).

En el caso de la MFA y la MFR después de la recuperación, tanto en plantas MA como noMA, no se encontraron diferencias significativas entre las plantas con la reducción del suministro hídrico (H2 y H3) y el testigo (H1). Los valores mayores de MFA se observaron en las plantas MA, incremento que representó en cada condición de humedad en el sustrato (H1, H2 y H3) el 52 %, 67 % y 46 %, respectivamente, en comparación con plantas noMA.

La reducción del suministro hídrico en las plantas condicionó un déficit hídrico, que se evidenció en la disminución del crecimiento foliar. Esta disminución es uno de los primeros efectos que causa el déficit hídrico (Chaves *et al.*, 2003; Volaire, 2003; Kato *et al.*, 2007) y se relaciona con las pérdidas excesivas de agua por la planta y el aumento de la deshidratación celular (Maroco *et al.*, 2000; Chaves *et al.*, 2003 y Volaire, 2003). Por tanto, el crecimiento se hace lento y constituye un rasgo de adaptabilidad y supervivencia ante el estrés, que permite el desvío de los asimilados y la energía hacia otros órganos en crecimiento (Zhu, 2002; Chaves y Oliveira, 2004).

Lo expresado anteriormente, también permitió explicar la disminución en ALT de las plantas expuestas a reducción del suministro hídrico. Al respecto, se informó que el estrés hídrico en la fase vegetativa, provoca una reducción en la ALT (Pirdashti *et al.*, 2004; Laffite *et al.*, 2007), debido a que el alargamiento celular exige determinado grado de turgencia para la extensión de la pared celular (Laffite *et al.*, 2007).

Por lo tanto, estos resultados sugieren que la reducción en el crecimiento y desarrollo están asociado al efecto de la reducción del suministro hídrico; no obstante, la magnitud del efecto en la planta varía con la severidad del mismo y con el momento en que se aplique el estrés durante el ciclo del cultivo (Polón, 2007; García *et al.*, 2009).

A pesar del efecto que provocó la reducción del suministro hídrico, la inoculación micorrízica contribuyó con el crecimiento en ALT y la MFA de la planta, a partir de mantener por un periodo más prolongado la turgencia de las células, aunque la absorción está en dependencia de la disponibilidad de agua existente en el medio y la interrelación entre los simbiosomas. Todo parece indicar que la inoculación con *R. intraradices* mejoró la adaptabilidad de las plantas de arroz ante la condición de déficit hídrico.

El incremento en ALT de las plantas inoculadas se informó por otros autores (Solaiman e Hirata, 1997; Fernández *et al.*, 2006), quienes resaltaron la importancia de los HMA en el desarrollo de las plantas, a partir de un mejor estado hídrico y nutricional de estas. Por otra parte, otros autores demostraron que después de un periodo de estrés hídrico, las plantas retoman de forma acelerada su crecimiento y desarrollo (Polón y Castro, 1999; García *et al.*, 2009; 2010).

En relación a este comportamiento, la inoculación micorrízica estimuló el crecimiento radical como mecanismo de interacción entre los simbioses, el cual favoreció el desarrollo de la parte aérea y radical. En cuanto al efecto del estrés hídrico en el desarrollo radical, se informó por otros autores específicamente en arroz (Polón y Castro, 1999; Sato y Maruyama, 2005; Kato *et al.*, 2007), que la deficiencia de humedad en el suelo favorece el crecimiento radical de la planta.

Comportamiento de otros indicadores fisiológicos en las plantas

En la Figura 18, se muestra el comportamiento del potencial hídrico (Ψ_h) y la conductancia estomática (CE) en plantas de arroz en las tres condiciones de humedad en el sustrato.

A los 45 DDT los valores de Ψ_h disminuyeron con la imposición de la reducción del suministro hídrico estrés hídrico, tanto en plantas MA, como noMA, respecto al testigo, disminución que se acentuó aún más con la aplicación de 5 mL (H3). Los valores mayores de Ψ_h en las plantas MA, respecto a las noMA (Figura 17 A). La disminución del Ψ_h indicó un estrés hídrico en las plantas provocado por la reducción del suministro de agua.

En este momento (45 DDT) la CE no superó los 40 mmol H₂O m⁻².s⁻¹, tanto en plantas MA, como noMA en las tres condiciones de humedad en el sustrato (Figura 18 B). Los valores menores de esta variable se encontraron en las plantas expuestas a estrés hídrico, evidenciando además, una reducción mayor de la CE cuando se intensificó el estrés (H3). Estos resultados

indicaron un déficit hídrico en la planta, asociado con la reducción del crecimiento aéreo, como se analizó anteriormente.

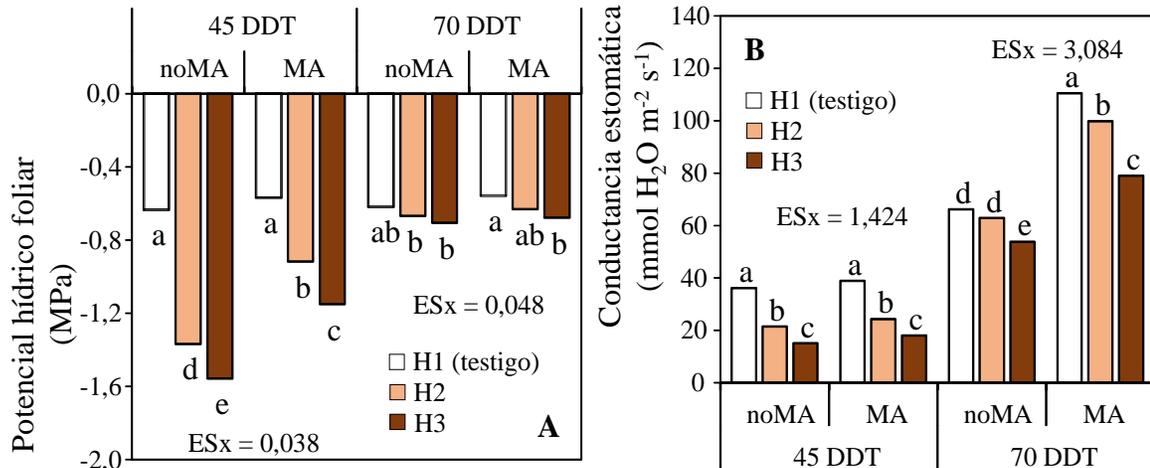


Figura 18. Potencial hídrico foliar (A) y conductancia estomática (B) después de la reducción del suministro hídrico (45 DDT) y la recuperación (70 DDT), en plantas de arroz inoculadas con *R. intraradices* cultivadas en sustrato suelo:arena:vermiculita 1:2:6 (v:v:v) en condiciones de macetas, expuestas a tres niveles de humedad en el sustrato: 25 mL (H1), 10 mL (H2) y 5 mL (H3). Barras con letras desiguales en cada momento de evaluación difieren significativamente ($p \leq 0,05$), según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan.

Después de la recuperación del estrés hídrico (70 DDT) en todos los casos, las plantas exhibieron un incremento en el Ψ_h , con valores que oscilaron entre -0,48 hasta -0,52 MPa; aunque, no se apreciaron diferencias en el Ψ_h en los tratamientos expuestos a estrés hídrico, tanto en las plantas MA, como noMA, en cuanto a la CE, esta se incrementó notablemente en las plantas MA, respecto a las noMA.

A partir de los valores de Ψ_h encontrados a los 45 DDT (Figura 18 A), se pudo categorizar el estado hídrico de las plantas, teniendo en cuenta los rangos de valores propuestos en el experimento anterior (Acápite 4.2). Los tratamientos Testigos (MA y noMA) no sufrieron estrés hídrico y en el caso de los expuestos a estrés hídrico pero no inoculado (noMA, H2 y H3) este fue Moderado, con valores de -1,37 MPa y -1,56 MPa, respectivamente. No obstante destacar que, los valores de Ψ_h en el tratamiento H2 están más próximos al límite

superior del rango de Estrés Ligero (-1,20 MPa) y el tratamiento H3 está próximo al límite del Estrés Severo ($< -1,60$ MPa).

Los tratamientos inoculados expuestos a estrés hídrico (MA, H2 y H3) se pueden categorizar en el rango de Estrés Ligero, con valores de -0,92 MPa y -1,15 MPa, respectivamente. Destacar que, los valores de Ψ_h encontrados en el tratamiento H2 están más próximos al rango Sin Estrés y el tratamiento H3 está próximo al límite superior del rango de Estrés Ligero.

Por otra parte, después de la recuperación (70 DDT) según los rangos de Ψ_h propuestos, solo las plantas que se regaron con 5 mL (H3) no se recuperaron totalmente del estrés hídrico impuesto. Las plantas noMA que se encontraban en estado de Estrés Moderado próximo a severo, pasaron a Estrés Ligero y en las plantas MA con Estrés Ligero próximo a Moderado pasaron a Estrés Ligero muy próximo a Sin Estrés.

El incremento del Ψ_h se puede relacionar con la inoculación micorrízica, a partir de un posible crecimiento hifal, combinado con la capacidad del hongo para absorber el agua en condiciones de Ψ_h bajo (Augé, 2001; 2004; Ruiz-Lozano, 2003; Lehto y Zwiazek, 2011). El aumento en el Ψ_h en las plantas inoculadas, condujo a un mayor crecimiento y desarrollo de la planta, a partir de la mejora del gradiente de Ψ_h , que debió facilitar el flujo de agua hacia las células en alargamiento.

Por otra parte, al parecer los exudados de hormonas de crecimiento por los HMA y la estimulación de estas en la planta, también pudieron condicionar el mayor crecimiento y desarrollo observado, además de que en las plantas inoculadas se apreció un mejor control estomático, vías que utiliza la planta como mecanismo de adaptación, para disminuir las pérdidas de agua (Damour *et al.*, 2010). Ruiz-Sánchez *et al.* (2011) informaron resultados

similares en plantas de arroz expuestas a estrés hídrico por un periodo de 30 días en la fase vegetativa.

No obstante, en este experimento a los 45 DDT no se encontraron diferencias en cuanto a la CE entre las plantas MA y noMA en cada condición de humedad en el sustrato, lo que parece indicar la existencia de mecanismos de señalización no hidráulicos que se transmiten desde la raíz, sugiriendo la implicación de las hormonas vegetales, implicadas en la señalización, como es el caso del ácido abscísico ABA. Al respecto, se demostró en plantas de maíz inoculadas con HMA y no inoculadas expuestas a estrés hídrico incrementaron los valores de ABA, al mismo tiempo que la conductancia hidráulica disminuyó (Bárzana *et al.*, 2012; Aroca *et al.*, 2012).

Aunque, no se encontraron diferencias significativas entre plantas MA y noMA (45 DDT) en cuanto a la CE, los niveles de Ψ_h se incrementaron en las MA, comportamiento que indicó un mejor estado hídrico en estas plantas, a pesar de que Aroca *et al.* (2008) y Ruiz-Lozano *et al.* (2012) señalan que este comportamiento está regulado por la CE. Además, esto se relaciona con la disminución en el crecimiento de la planta, al limitar la entrada de CO_2 y por ende se afecta la fotosíntesis (Damour *et al.*, 2010).

A partir de la recuperación de las plantas (70 DDT), se evidenció que se incrementó el Ψ_h y la CE, este comportamiento estuvo asociado a la rehidratación de los tejidos en la planta y la funcionalidad de la simbiosis micorrízica en promover la transpiración y la apertura estomática, mejorando la CE y la eficiencia en el uso del agua de la planta hospedera (Ruiz-Lozano y Aroca, 2010). Además, se evidenció el efecto negativo del estrés hídrico (H3), tanto en las plantas MA, como noMA, en la CE. Otros estudios, demostraron que durante una deficiencia hídrica en el suelo las plantas MA, con frecuencia, mantienen tasas de intercambio

gaseoso superiores a las plantas noMA de similar tamaño y nivel nutricional (Augé, 2001; Aroca *et al.*, 2008; Ruiz-Lozano y Aroca, 2010).

En sentido general las plantas inoculadas con *R. intraradices* mostraron una mejor recuperación del déficit hídrico, posiblemente debido al incremento de la conductividad hidráulica radical durante la primera fases de la recuperación y el control del intercambio gaseoso, que permitió reajustar los niveles normales de Ψ_h en hojas más rápidamente que las plantas no inoculadas, a pesar del estrés hídrico impuesto.

Comportamiento de indicadores bioquímicos en las plantas

En la Figura 19 se muestra el contenido de prolina (PRO) en plantas de arroz inoculadas o no con HMA, expuestas a tres condiciones de humedad en el sustrato.

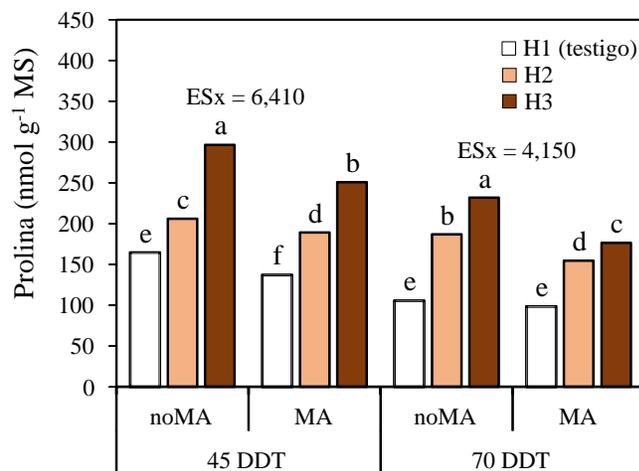


Figura 19. Contenido de prolina foliar, después de la reducción del suministro hídrico (45 DDT) y la recuperación (70 DDT), en plantas de arroz inoculadas con *R. intraradices* cultivadas en sustrato suelo:arena:vermiculita 1:2:6 (v:v:v) en condiciones de macetas, expuestas a tres niveles de humedad en el sustrato: 25 mL (H1), 10 mL (H2) y 5 mL (H3). Barras con letras desiguales en cada momento de evaluación difieren significativamente ($p \leq 0,05$), según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan.

A los 45 DDT se observó que los tratamientos con estrés (H2 y H3), provocó un incremento en el contenido de PRO, en las plantas expuestas a estas condiciones respecto a los testigos (MA H1 y noMA H1). Es importante destacar que en las plantas MA H1 (Testigo) disminuyó esta

variable, respecto a las noMA, al igual que las expuestas a estrés hídrico (H2 y H3) y en el caso de los tratamientos (H3) se encontraron los valores mayores de PRO.

Después de la recuperación a los 70 DDT se encontró que disminuyó las cantidades de PRO, tanto en plantas MA, como noMA, en las tres condiciones de humedad en el sustrato; aunque, los valores de PRO continuaron siendo superiores en las plantas que fueron expuestas a estrés hídrico (H2 y H3), respecto a las plantas testigo (H1).

La PRO en este estadio, a pesar de una recuperación del estatus hídrico de las plantas identificado por los valores de Ψ_h , existieron diferencias entre las plantas MA y las noMA para cada nivel hídrico, siendo menor su acumulación en las MA. Este comportamiento sugirió que aún no se habían recuperado totalmente las plantas del estrés hídrico impuesto.

El efecto de los diferentes tratamientos en el contenido de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), daño oxidativo a lípidos (DOL), ascorbato reducido (ASC) y glutatión reducido (GSH) se observa en la Figura 20.

A los 45 DDT se observó que el estrés hídrico, provocó un incremento en el contenido de H_2O_2 (Figura 20 A) y de DOL (Figura 20 B) en las plantas expuestas a estas condiciones, respecto a los testigos (MA H1 y noMA H1). Es importante destacar que en las plantas MA disminuyeron estas variables, respecto a las noMA, además, las plantas expuestas a estrés hídrico (H3) mostraron los valores mayores de H_2O_2 y de DOL, respecto a las estresadas (H2) y a las plantas testigo, con excepción del DOL que no se encontró diferencias en las plantas MA expuestas a estrés (H2 y H3).

Por otra parte, después de la recuperación a los 70 DDT, disminuyeron las cantidades de H_2O_2 y de DOL, tanto en plantas MA, como noMA, en las tres condiciones de humedad en el sustrato, comportamiento que indicó la recuperación de las plantas al estrés hídrico impuesto.

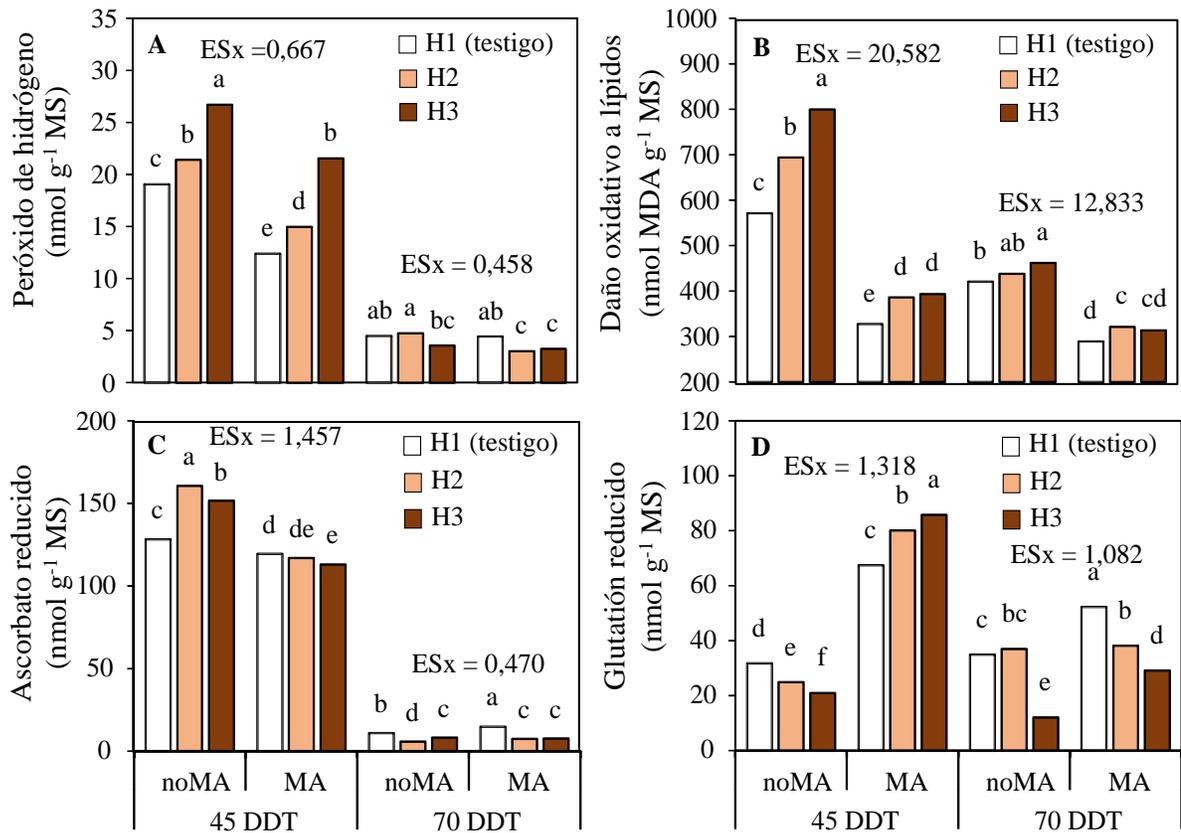


Figura 20. Contenido de peróxido de hidrógeno (A), daño oxidativo a lípidos (B) contenido de ascorbato reducido foliar (C) y de glutatión reducido foliar (D), después de la reducción del suministro hídrico (45 DDT) y la recuperación (70 DDT), en plantas de arroz inoculadas con *R. intraradices* cultivadas en sustrato suelo:arena:vermiculita 1:2:6 (v:v:v) en condiciones de macetas, expuestas a tres niveles de humedad en el sustrato: 25 mL (H1), 10 mL (H2) y 5 mL (H3). Barras con letras desiguales en cada momento de evaluación difieren significativamente ($p \leq 0,05$), según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan.

El contenido de ASC (Figura 21 C) en las plantas noMA y expuestas a estrés hídrico (H2 y H3) mostraron diferencias, con valores superiores, respecto a las plantas noMA testigo (noMA H1) y al resto de las plantas MA.

Es importante resaltar que en los tratamientos inoculados con HMA, se encontraron los valores menores de ASC, cuando estas fueron expuestas a estrés hídrico (H2) y en el tratamiento testigo (H1). La acumulación de ASC después de la recuperación del estrés hídrico disminuyó (70 DDT), con respecto a los valores que se alcanzaron después de este periodo y en las plantas de los tratamientos testigo (H1).

Al analizar los resultados del contenido de GSH a los 45 DDT (Figura 20 D), se encontró que su acumulación fue superior en las plantas MA, respecto a las noMA (200 % de incremento como promedio), este efecto se observó en todas las condiciones de humedad en el sustrato. En el caso de las plantas no inoculadas, en la medida que recibieron menor volumen hídrico, disminuyó el contenido de GSH.

Después de la recuperación de las plantas (70 DDT), el contenido de GSH fue menor en los tratamientos que fueron expuestos a estrés hídrico en las plantas MA y los valores mayores se encontraron en las plantas testigo. En los tratamientos noMA no se encontraron diferencias significativas entre el testigo (H1) y las expuestas a estrés hídrico (H2), en ambos tratamientos las plantas mostraron mayor contenido de GSH.

Colonización micorrízica de las raíces

Al evaluar el porcentaje de colonización micorrízica de las plantas de arroz en los tratamientos no inoculados, no se observó estructuras fúngicas en el interior de la raíz, debido a la esterilización que fue sometido el sustrato; sin embargo, en las que fueron inoculadas con *R. intraradices* (Figura 21), la colonización micorrízica aumentó, en la medida que las plantas tuvieron un desarrollo mayor. Antes de iniciar el estrés hídrico, a los 30 DDT se encontró un 13 % de colonización micorrízica como promedio y después del periodo de estrés, superó el 20 % (45 DDT).

En las plantas de los tratamientos expuestos a estrés hídrico (H2 y H3), se encontraron incrementos en la colonización micorrízica, respecto a las plantas testigo (H1) de 25 % y 17 %, respectivamente. Estos resultados indicaron que el estrés hídrico estimuló la colonización micorrízica en las plantas de arroz. Posterior a la recuperación del estrés (70 DDT) en la raíz se alcanzó el 53 % de colonización micorrízica en las plantas del tratamiento (H2).

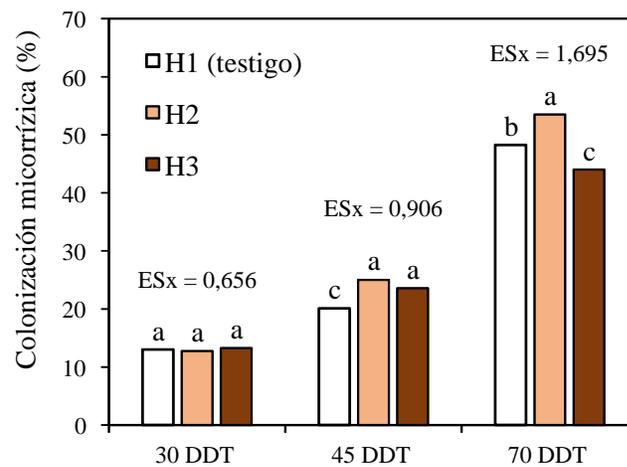


Figura 21. Colonización micorrízica, antes de la reducción del suministro hídrico (30 DDT), después de la reducción (45 DDT) y la recuperación (70 DDT), en raíces de arroz inoculadas *R. intraradices* cultivadas en sustrato suelo:arena:vermiculita 1:2:6 (v:v:v) en condiciones de macetas, expuestas a tres niveles de humedad en el sustrato: 25 mL (H1), 10 mL (H2) y 5 mL (H3). Barras con letras desiguales en cada momento de evaluación difieren significativamente ($p \leq 0,05$), según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan.

A diferencia del experimento anterior, en este experimento el porcentaje de colonización micorrízica se favoreció por las condiciones de aerobiosis en las que se desarrolló el mismo. Después del estrés hídrico a los 45 DDT, se incrementó la colonización micorrízica, comportamiento puede deberse en lo fundamental al déficit hídrico impuesto, el cual estimuló la colonización en la planta, como mecanismo para hacer un uso más eficiente del agua, mecanismo que está relacionado con la regulación hídrica de la planta (Aroca *et al.*, 2008; Ruiz-Lozano y Aroca, 2010) y con la producción de estrigolactonas por la planta en condiciones de aerobiosis, como se ha demostrado recientemente (Ruiz-Lozano *et al.*, 2015).

Si bien, el estrés hídrico estimuló la colonización micorrízica como se observó después de los 45 DDT, transcurrida la recuperación se encontró que las plantas expuestas a estrés hídrico (H3) mostraron valores inferiores de colonización micorrízica, respecto al resto de los tratamientos. Este resultado sugiere que las plantas aún no se han recuperado del estrés hídrico (H3) al que fueron expuestas a los 30 DDT, y por lo tanto, autorregularon la colonización micorrízica, para

limitar el costo energético de la asociación y por consiguiente se suprime el crecimiento intraradical del hongo micorrízico en la planta (García-Garrido y Vierheilig, 2009).

Al respecto, Harris-Valle *et al.* (2009) informaron que las diferencias en la colonización micorrízica dependen de la especie de HMA asociada y parece estar relacionada con la cantidad de micelio producido por el hongo y la frecuencia con la que la raíz es colonizada por estructuras fúngicas vivas y activas, que permitan mantener un equilibrio en el crecimiento y el costo energético que supone la asociación en las condiciones que se establece la interacción HMA-planta.

Kubikova *et al.* (2001) informaron que en condiciones de estrés hídrico, las micorrizas cumplen una función fundamental en activar la difusión de iones y en la absorción de agua hacia las raíces en las plantas hospederas, mejorando la nutrición nitrogenada y la absorción de fósforo. Esto le permite a las plantas soportar las condiciones de sequía y recuperarse con facilidad. Otros autores (Dell'Amico *et al.*, 2002; Fundora *et al.*, 2008) encontraron en plantas de tomate inoculadas con HMA y expuestas a estrés hídrico incrementos en el Ψ_h , además de recuperarse con rapidez en comparación con las no inoculadas.

La mejora del Ψ_h , de la CE y los niveles de PRO encontrados en las plantas MA, indicaron un ajuste osmótico en estas plantas; ajuste que contribuyó a disminuir la acumulación de H_2O_2 y el DOL provocado por el estrés hídrico impuesto. Por otra parte, este comportamiento sugiere además ocurren con mayor eficiencia de los mecanismos de oxidación-reducción, que mejoran el equilibrio redox de la célula, en comparación con las plantas noMA.

Por otra parte, una posible causa de por qué en plantas MA se acumuló menos PRO foliar que en las noMA, después del periodo de estrés hídrico, pudiera deberse a su acumulación en la raíz, mecanismo mediante el cual el hongo ayuda a la planta a tolerar un Ψ_h bajo en el

suelo y mantener un gradiente favorable a la entrada de agua en las raíces, como se informó para el cultivo de la soja (Porcel y Ruiz-Lozano, 2004) y recientemente en lechuga (Ruiz-Lozano *et al.*, 2011).

Por otro lado, el H_2O_2 en las plantas MA pudiera estar actuando como señal en la vía independiente del ABA que funciona en la células oclusivas del estoma para su apertura y cierre estomático (Song y Matsuoka, 2011). Al respecto, se informó que el H_2O_2 en bajas cantidades, actúa como molécula señal (Bienert *et al.*, 2006), controlando gran número de procesos esenciales para el crecimiento y desarrollo normal de las plantas (Quan *et al.*, 2008).

Huang *et al.* (2009) afirman que en las plantas el H_2O_2 puede actuar como segundo mensajero y activador de la síntesis de factores transcripcionales activadores de la expresión de enzimas eliminadoras de H_2O_2 , tales como, ascorbato peroxidasa (APX) y catalasa (CAT) ante condiciones de estrés abiótico y biótico, como se informó por Foyer y Noctor (2000), Mittler *et al.* (2004) y Gill y Tuteja (2010), aunque, no deja de ser una molécula oxidante que a concentraciones elevadas reacciona en la célula, causando el incremento del DOL, siendo esta afectación menor en las plantas MA.

Por otra parte, Porcel y Ruiz-Lozano (2004) informaron que en el cultivo de soja, las plantas inoculadas con *Rhizoglyphus intraradices* y expuestas a estrés hídrico por 10 días incrementaron el contenido de H_2O_2 y en el cultivo de arroz no micorrizado en condiciones de estrés por sequía intensa aumentó la actividad de APX y de la glutatión reductasa (GR), a la vez que disminuyeron los niveles tóxicos de H_2O_2 (Srivalli *et al.*, 2003).

La disminución del DOL (Figura 19 C) en estas plantas se corresponde con el incremento en el Ψ_h , la CE y la disminución del contenido de H_2O_2 . En este sentido, ante una condición de estrés hídrico se activan los mecanismos antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos), los cuales

tienen como función principal eliminar las ROS y por lo tanto, disminuir el daño oxidativo de lípidos (Ma *et al.*, 2008; Mahmood *et al.*, 2010; Scheibe y Beck, 2011; Noctor *et al.*, 2012).

Al respecto, Ruiz-Sánchez *et al.* (2011) informaron que el estrés hídrico por 30 días durante el ahijamiento en plantas de arroz coinoculadas con *R. intraradices* y *Azospirillum brasilense* en condiciones aeróbicas y en macetas, disminuyó en un 13 % el DOL, respecto al control no micorrizado.

En sentido general, se ha visto que las plantas MA presentan menor DOL que las plantas noMA en condiciones de estrés hídrico, tal como mostraron los resultados obtenidos (Figura 19 B), que indicaron la participación más eficientemente de los mecanismos antioxidantes en las plantas inoculadas, evitando el incremento de los daños causados por la acumulación de ROS en condiciones de estrés hídrico.

Los resultados de ASC (Figura 19 C) encontrados sugieren que, bajo condiciones de estrés hídrico, este compuesto está siendo utilizado por las plantas para llevar a cabo el proceso de eliminación del H₂O₂, pudiendo ser ésta la causa del por qué en las plantas MA se encontraron los valores menores del mismo, respecto a los tratamiento noMA. Ruiz-Sánchez *et al.* (2011) informaron en las plantas noMA incrementos en el contenido de ascorbato. Además de que, en condiciones de aerobiosis, la planta posiblemente utilizó el ASC para eliminar otras ROS, además del H₂O₂, que se producen, como el oxígeno singlete, el superóxido y los radicales hidroxilos (Latowski *et al.*, 2010; Noctor *et al.*, 2012).

Por otra parte, Sharma y Dubey (2005) también encontraron una disminución en el contenido de ASC en plantas de arroz en condiciones de sequía, pero no inoculadas con HMA. Otros autores (Latowski *et al.*, 2010; Fotopoulos *et al.*, 2010) destacan la importancia del ASC en el ciclo ascorbato-glutatión; además de estar involucrado en otras funciones tales como el

crecimiento de la planta, la regulación génica, la modulación de algunas enzimas, y la regulación redox de los compuestos antioxidantes unidos a la membrana.

En las plantas MA el contenido de GSH (Figura 19 D) se incrementó cuando fueron expuestas a estrés hídrico (H3) en un 27 %, respecto a las plantas testigo; mientras que, en las noMA su disminución, respecto a las plantas testigo representó un 51 %. Es de resaltar que, en los tratamientos MA el contenido superior de GSH manifiesta la capacidad de los HMA para reducir los efectos negativos del estrés hídrico, basado en la función de este antioxidante dentro del ciclo ascorbato-glutación y en los mecanismos para la eliminación de ROS, contribuyendo al equilibrio redox en la células (Latowski *et al.*, 2010; Noctor *et al.*, 2012; Ruiz-Lozano *et al.*, 2012), lo cual redundará en una mejora del ajuste metabólico y una adaptabilidad mayor de la planta a condiciones de estrés hídrico.

La inoculación con *R. intraradices* en plantas de arroz cultivadas en condiciones de aerobiosis y expuestas a estrés hídrico en la fase vegetativa, favoreció el crecimiento en ALT, el Ψ_h y la CE. Por otra parte, disminuyó los efectos negativos de la acumulación de H_2O_2 y el DOL, mediante el incremento del contenido del GSH y la disminución del ASC. Estas plantas mostraron un comportamiento muy similar, al que se encontró, cuando se cultivaron en condiciones de anaerobiosis y expuestas a estrés hídrico (Acápite 4.2).

4.4. Evaluación en condiciones de campo del comportamiento de plantas de arroz inoculadas con HMA y expuestas a suspensión de la lámina de agua en tres momentos de su desarrollo

Con el fin de validar los resultados del experimento que se realizó en condiciones controladas (Acápite 4.2), con plantas inoculadas con HMA que se expusieron ante condición de estrés hídrico por déficit de agua en diferentes momentos de la fase vegetativa del cultivo, se desarrolló esta investigación en condiciones de campo, donde las consideraciones fisiológicas y

bioquímicas, relacionadas con la inoculación y el estrés fueron las mismas que en el experimento mencionado.

Después de cada periodo sin lámina de agua (15 días), en el momento en que se repuso la misma en cada una de las terrazas, el suelo mostró grietas producto de la contracción coloidal, indicativo de un estrés por déficit hídrico (Figura 22), el cual provocó que más del 50 % de las hojas de las plantas se enrollaran y tomaran una posición erecta en la planta y se originó por cambios de volumen de las células



Figura 22. Efectos de la suspensión de la lámina de agua por un periodo de 15 días a los 30 DDT, en condiciones de campo.

acuíferas, condicionado por el periodo sin lámina de agua impuesto, según IRRI (2002).

Las variables climáticas que incidieron durante el experimento (Anexo 3), en cuanto a las precipitaciones no fueron representativas, debido a que se registraron valores inferiores a los 20,60 mm, pluviometría que se pierde por infiltración o evapotranspiración. Según Polón y Castro (1999) valores por debajo de los 25 mm de precipitación no ocasionan cambios fisiológicos en la planta de arroz.

Rendimiento agrícola

El mayor rendimiento se correspondió con el tratamiento inoculado y estresado a los 30 DDT, el cual disminuyó en la medida en que el estrés se impuso más tardíamente y, el menor rendimiento se encontró en las plantas testigo (Figura 23). Lo anterior corroboró el efecto positivo de la suspensión de lámina de agua durante un corto periodo de tiempo en el rendimiento agrícola del arroz, e indicó además, que la condición de estrés debe de

imponerse en momentos tempranos de la fase vegetativa de las plantas por un periodo de 15 días, independientemente de que en los tres momentos analizados se incrementó el rendimiento, con respecto a las plantas no estresadas.

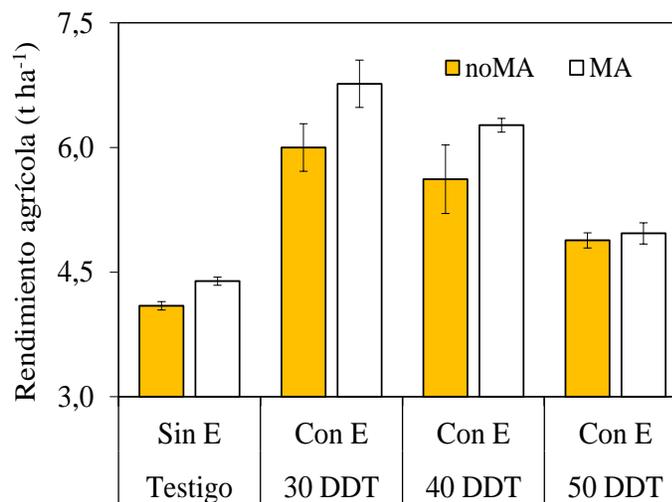


Figura 23. Rendimiento agrícola en el momento de la cosecha (130 DDT) de plantas de arroz inoculadas con *G. cubense* (MA) y no inoculadas (noMA) cultivadas en condiciones de campo, expuestas a suspensión de la lámina de agua (Con E) a los 30, 40 y 50 DDT y el Testigo inundado (Sin E). Marcas sobre las barras indican Intervalos de confianza ($\alpha=0,05$).

Por otro lado, también se encontró el efecto beneficioso de la inoculación con HMA, ya que el rendimiento agrícola fue mayor en las plantas MA, respecto a la noMA, exceptuando las expuestas a estrés hídrico a los 50 DDT donde no se apreciaron diferencias.

El comportamiento encontrado en el campo, resultó similar al del experimento en condiciones controladas ya referido con anterioridad (Acápite 4.2), con la excepción de que en este último, el rendimiento fue igual en los tratamientos inoculados y estresados a los 30 DDT y 40 DDT y que a los 40 DDT no se manifestó efecto de la inoculación con HMA.

El efecto individual de la inoculación y del estrés, así como el efecto de la interacción entre ellos en el incremento del rendimiento del arroz, se presenta en la Tabla 8. Tal como se obtuvo en el experimento desarrollado bajo condiciones controladas, el estrés impuesto a los 30 DDT

provocó mayores incrementos del rendimiento, tanto por efecto de la inoculación, por la condición de estrés, como por la interacción de ambos factores.

Tabla 8. Porcentaje de incrementos del rendimiento del arroz por efecto de la inoculación, del estrés impuesto en diferentes momentos y de la interacción de ambos factores.

| Tratamientos | Incremento, %, por efecto de: | | |
|--------------|-------------------------------|---------|-------------|
| | MA | Estrés | MA + Estrés |
| Sin estrés | 7,33 b | 0,00 | 0,00 |
| 30 DDT | 12,83 a | 46,69 a | 65,52 a |
| 40 DDT | 11,76 ab | 37,16 b | 53,30 b |
| 50 DDT | 0,00 c | 19,31 c | 21,27 c |
| ESx | 1,62** | 1,93** | 1,50** |

** Nivel de significación para el 99 %

Por el contrario, los menores incrementos estuvieron asociados siempre con el tratamiento en el que se impuso el estrés a los 50 DDT. El efecto del estrés superó al de la inoculación con HMA. Es importante resaltar el incremento del rendimiento que se obtuvo cuando interactuó la inoculación y la imposición del estrés por déficit de agua a los 30 DDT.

Colonización micorrízica y densidad visual en las raíces

En la Figura 24, se presentan la colonización micorrízica y la densidad visual después de cada periodo de estrés hídrico (a los 45, 55 y 65 DDT), tanto en las plantas inoculadas con *Glomus cubense* (MA), como en las no inoculadas (noMA).

Se destacó que donde no se inoculó con HMA, las plantas fueron colonizadas por los HMA residentes del suelo. La colonización micorrízica (Figura 24 A) se incrementó en la medida que el estrés se impuso más tardíamente, sin diferencias entre las plantas inoculadas y las colonizadas por HMA residentes, los valores mayores de esta variable se observaron a los 65 DDT en las plantas que fueron expuestas a estrés hídrico (Con E).

Transcurrido el periodo de recuperación (tras reestablecer la lámina de agua hasta el momento de la cosecha), continuó incrementándose el porcentaje de colonización (Figura 24 C). De igual

manera no se encontró diferencias entre los tratamientos que fueron inoculados, respecto a la colonización residente.

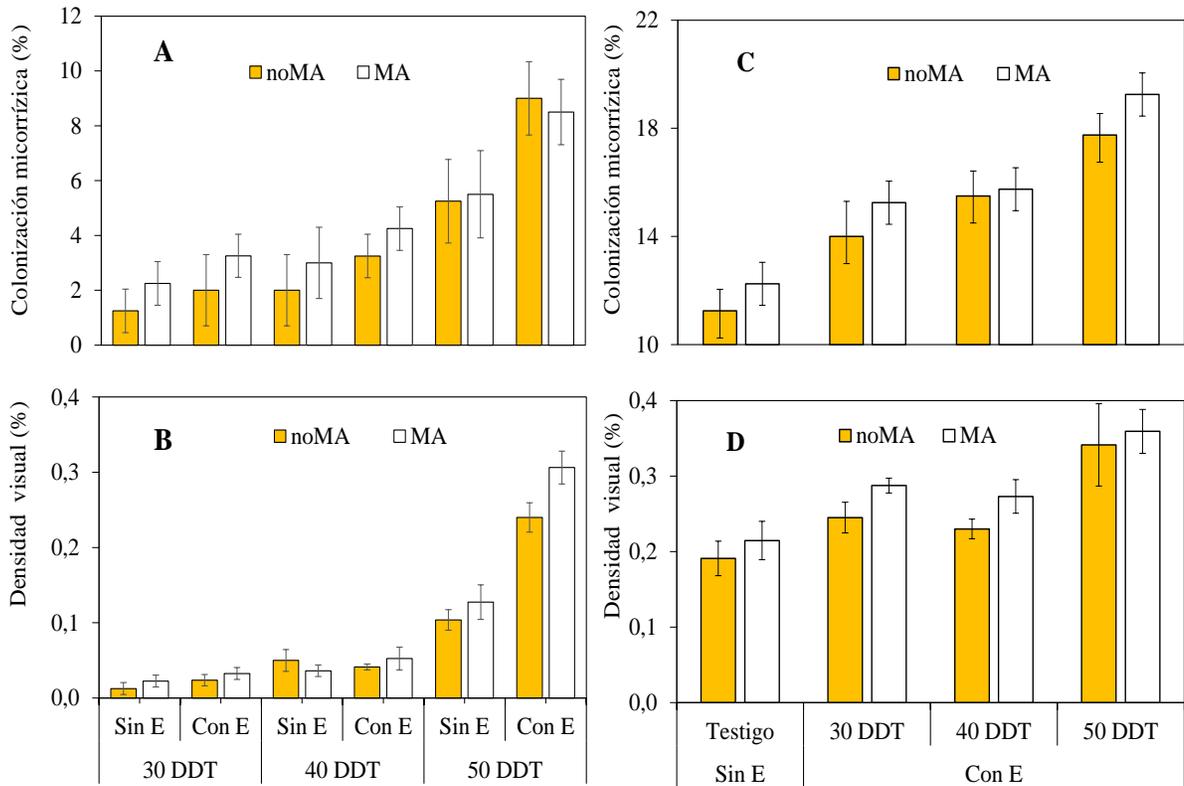


Figura 24. Colonización micorrízica (A y C) y densidad visual (B y D) a los 45, 55 y 65 DDT y en el momento de la cosecha, en raíces de arroz inoculadas con *G. cubense* (MA) y no inoculadas (noMA) cultivadas en condiciones de campo suelo Hidromórfico Gley Nodular Ferruginoso Petroférrico, expuestas a suspensión de la lámina de agua (Con E) a los 30, 40 y 50 DDT y sus respectivos testigos inundados (Sin E). Marcas sobre las barras indican Intervalos de confianza ($\alpha=0,05$).

Por su parte, la DV (Figura 24 B), fue superior a los 65 DDT en las plantas inoculadas, respecto a las colonizadas por HMA residentes, aunque no existe un panorama claro en cuanto a la relación colonización y densidad visual, debido a que las interacciones de los factores externos y de los simbiontes son cambiantes.

Transcurrido el periodo de recuperación (Figura 24 D), en los tratamientos Testigos (Sin E) y el estresado a los 50 DDT, no se encontró diferencias entre las plantas inoculadas, respecto a las

que fueron colonizadas por HMA residentes; mientras que las plantas inoculadas que fueron expuestas a estrés hídrico a los 30 y 40 DDT mostraron una mayor densidad visual.

El incremento de la colonización micorrízica y de la densidad visual entre el momento antes de establecer la lámina de agua y la cosecha, se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Incrementos de la colonización y la densidad visual desde la evaluación realizada el último día del estrés impuesto en cada momento hasta la cosecha.

| Tratamientos | Colonización (%) ¹ | | Densidad visual (%) | |
|--------------|-------------------------------|---------|---------------------|--------|
| | MA | noMA | MA | noMA |
| Sin estrés | 10,00 b | 10,00 b | 0,18 c | 0,16 c |
| 30 DDT | 11,99 a | 12,00 a | 0,26 a | 0,23 b |
| 40 DDT | 11,50 a | 12,25 a | 0,24 b | 0,18 c |
| 50 DDT | 10,25 b | 9,25 b | 0,23 b | 0,24 b |
| ESx | 0,34** | | 0,01** | |

¹ Los incrementos son el resultado de restar los valores encontrados en cada uno de los momentos en que se impuso la suspensión de la lámina de agua correspondiente al momento de la cosecha.

** Nivel de significación para el 99 %

Se constató que la inoculación con HMA no propició incrementos de la colonización micorrízica, destacándose el efecto que ejercieron las cepas residentes en el medio edáfico. Sin embargo, la densidad visual tuvo un mayor incremento cuando las plantas se inocularon y se expusieron ante el estrés a los 30 DDT.

El hecho de haber evaluado la colonización y la densidad visual al momento de la cosecha, pudiera no haber reflejado cabalmente el efecto de la inoculación, si se toma en consideración lo señalado por Rivera *et al.* (2007), relacionado con la disminución de la dependencia micorrízica en el momento de la cosecha, que tiende a disminuir el porcentaje de colonización, más aún en el cultivo del arroz, el cual pasado la etapa de floración disminuye la extracción de nutrientes por la planta y concluye su ciclo con las reservas almacenadas para el llenado del grano y moviliza los carbohidratos con este fin (García *et al.*, 2010).

La colonización de las plantas de arroz por cepas residentes se informó por otros investigadores (Lumini *et al.*, 2011; Maiti *et al.*, 2011 y 2012), aunque no existe un panorama claro en cuanto a efecto positivo de esta colonización micorrízica, respecto a la inoculación de cepas comerciales o aislados de otros agroecosistemas.

En la propia Tabla 8 se puede observar que la inoculación también logró incrementar los rendimientos cuando las plantas se estresaron tempranamente, destacándose en este sentido, el estrés impuesto a los 30 DDT; tratamiento donde resultó más efectiva la interacción entre la inoculación y el estrés, con lo que se logró incrementar el rendimiento hasta 65 %, equivalente en este caso, a un incremento de 2,68 t ha⁻¹.

Es un hecho que el estrés hídrico por defecto en plantas de arroz en etapas tempranas de su ciclo vegetativo incrementa el rendimiento agrícola (Polón *et al.*, 1995). Los incrementos alcanzados oscilaron entre 1,5 t ha⁻¹ y 2,5 t ha⁻¹, en dependencia del ambiente edafoclimático y del sistema de riego que se utilizó (Polón, 2007). Los resultados obtenidos en este trabajo se encuentran en el entorno de los rangos reportados (Tabla 8).

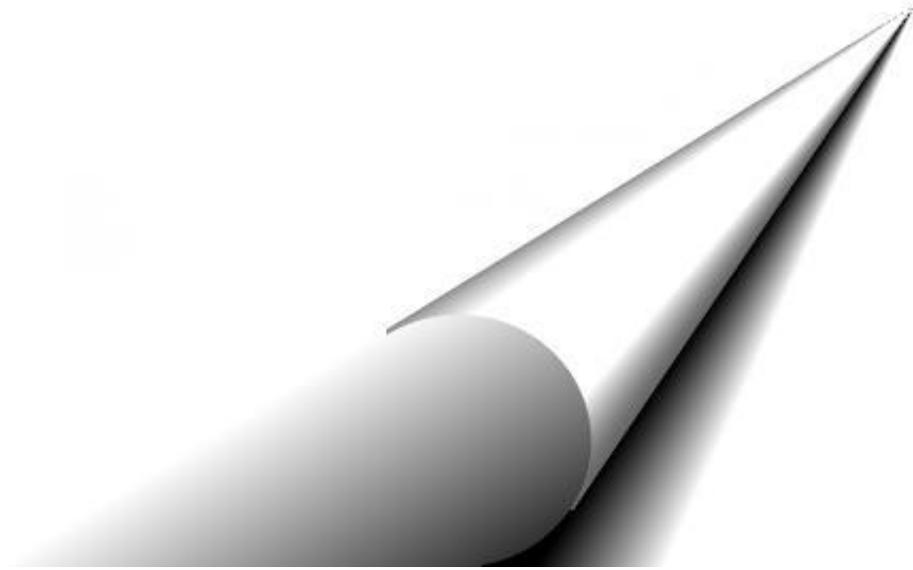
El efecto de la inoculación micorrízica en el rendimiento agrícola no se evidenció, debido a la influencia de las cepas residentes en el medio edáfico, que no permitieron encontrar diferencias en el incremento de la colonización micorrízica (Tabla 9). Sin embargo se interpretó que el incremento en el rendimiento estuvo condicionado por la mayor efectividad de la cepa inoculada, según indicó el incremento encontrado en la DV cuando las plantas se estresaron a los 30 DDT.

Si bien los valores de este indicador resultaron bajos, los resultados indicaron que a pesar de ello, hubo eficiencia simbiótica de la cepa que se inoculó, que fue seleccionada desde el primer estudio realizado de evaluación de cepas (Acápite 4.2), a partir del índice de eficiencia

simbiótica y considerada como eficiente para las condiciones de cultivo que se siguieron, además del posible efecto de esta cepa en la producción y estimulación de hormonas de crecimiento.

La correspondencia entre esta investigación de campo, con la desarrollada en condiciones controladas, cuando se estudió el efecto de la reducción del suministro hídrico impuesto en diferentes momentos del ciclo vegetativo del arroz, en plantas inoculadas y sin inocular, permitió considerar que los indicadores evaluados en este último relacionados con la fisiología y la bioquímica de las plantas (Acápite 4.2), mantuvieron un comportamiento similar o al menos cercano, todo lo cual tuvo incidencia directa en el rendimiento del cultivo. Nuevamente se evidenció que la aplicación del estrés a los 30 DDT en arroz inoculado con una cepa de HMA eficiente, en este caso *Glomus cubense*, provocó obtener rendimientos superiores a cuando la inoculación no se realizó. Por otro lado, se corroboró que la producción de arroz con aniego permanente, limitó los rendimientos, respecto a los tratamientos con suspensión de la lámina de agua. La disminución del rendimiento en estas condiciones (anaerobiosis) pudieran estar relacionado con el gasto energético que realiza la planta en mantener el intercambio gaseoso entre la parte aérea y radical, así como la estimulación del crecimiento aérea para mantener el radical.

*CONCLUSIONES
Y
RECOMENDACIONES*



V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

1. El arroz cultivado en condiciones de anaerobiosis, se coloniza por los hongos micorrízico arbusculares en magnitudes bajas, existiendo especificidad de las cepas producto de las modificaciones que se originan en el suelo.
2. En condiciones de anaerobiosis, resulta eficiente para incrementar el crecimiento y desarrollo del arroz la inoculación con las cepas *Rhizoglyphus intraradices* y *Glomus cubense*.
3. La inoculación de plantas de arroz con hongos micorrízico arbusculares y expuestas a reducción del suministro hídrico en periodos tempranos de su desarrollo vegetativo, modifica la fisiología y bioquímica de la planta de forma tal que, cuando se repone el suministro hídrico, éstas fueron capaces de recuperarse e incrementar el rendimiento agrícola.
4. Las plantas de arroz responden de forma diferente a la deficiencia hídrica en dependencia del momento de su imposición y en los momentos tardíos de su desarrollo provoca un estrés hídrico severo, con valores de potencial hídrico menores a -1,60 MPa, que hacen disminuir el rendimiento agrícola.
5. La categorización del estrés por déficit de agua, a partir del potencial hídrico foliar en el arroz, permite precisar que el momento en que las plantas alcanzan el valor de -1,20 MPa, independientemente de la fase de desarrollo en la que se encuentre el cultivo, se debe

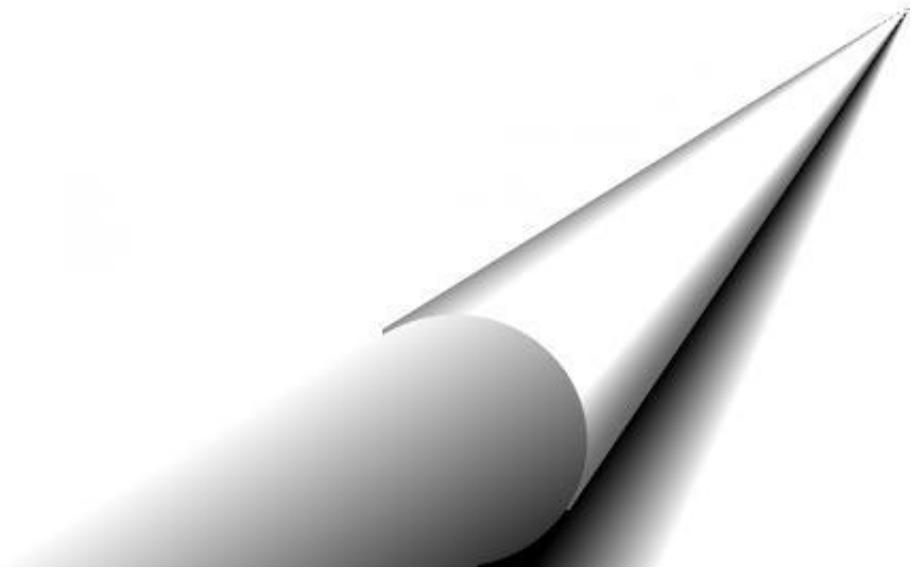
restablecer la lámina de agua para lograr la recuperación de las mismas y alcanzar los rendimientos mayores.

6. El arroz cultivado en condiciones de aerobiosis inoculado con la cepa *Rhizoglyphus intraradices* mejora la respuesta fisiológica y bioquímica de la planta e incrementa su crecimiento y desarrollo.
7. La inoculación del arroz con la cepa de hongo micorrízico arbuscular eficiente *Glomus cubense*, no incrementa los niveles de colonización micorrízica respecto a las cepas residentes de hongos micorrízico arbusculares en el suelo Hidromórfico Gley Nodular Ferruginoso Petroférrico, pero si la densidad visual y el rendimiento agrícola del arroz.

5.2. Recomendaciones

1. Validar los resultados obtenidos en otros cultivares de arroz en diferentes condiciones edafoclimáticas y época de siembra, así como obtener nuevos aislamientos de hongos micorrízico arbusculares con potencial para cada condición edáfica.
2. Profundizar en las investigaciones sobre indicadores fisiológicos y bioquímicos de modo que se puedan esclarecer los mecanismos involucrados en la interacción de los hongos micorrízico arbusculares con plantas de arroz, tanto en condiciones de anaerobiosis, como de aerobiosis.
3. Validar en campo la categorización propuesta del estrés por déficit de agua en condiciones de anaerobiosis y de aerobiosis a partir del potencial hídrico foliar en plantas de arroz.

*REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*



VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acevedo, M., Wu, C., Astrillo, W. y Belmonte, U. 2006. Origen, evolución y diversidad del arroz. *Agronomía Tropical*, vol. 56, no. 2, p. 151-170. ISSN: 0002-192X.
2. Akiyama, K., Matsuzaki, K. y Hayashi, H. 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, vol. 435, p. 824-827. ISSN: 0028-0836.
3. Akiyama, K., Ogasawara, S., Ito, S. y Hayashi, H. 2010. Structural requirements of strigolactones for hyphal branching in AM fungi. *Plant and Cell Physiology*, vol. 51, p. 1104-17. ISSN: 0032-0781.
4. Alemán, L., Cabello, R., Páez, Y. y Manh, T. L. 2008. La producción no especializada (popular) de arroz: una de las alternativas para incrementar la producción en Cuba. Memorias del Cuarto Encuentro Internacional de Arroz. Instituto de Investigaciones de Arroz, La Habana. ISBN: 978-959-282-076-0.
5. Ali, I., Condon, A. G., Peter, L., Tester, M. y Schnurbusch, T. 2008. Different mechanisms of adaptation to cyclic water stress in two south Australian bred wheat cultivars. *Journal of Experimental Botany*, vol. 59, p. 3327-3346. ISSN: 0022-0957.
6. Al-Karaki, G., McMichael, B. y Zak, J. 2004. Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress. *Mycorrhiza*, vol. 14, p. 263-269. ISSN: 0940-6360.
7. Alvarado, J. R. 2007. Mejoramiento Tradicional en arroz [en línea] En: Curso Internacional de Mejoramiento Genético de Arroz (2007, ene. 15-25: Chillán). CIRAD;

- FAO; CIAT. [Consultado: 28 Diciembre 2007] Disponible en: <[http://agr.unne.edu.ar/fao/chile-ppt/3-Fitomejoramiento %20arroz %20 %20Roberto %20Alvarado pdf](http://agr.unne.edu.ar/fao/chile-ppt/3-Fitomejoramiento_%20arroz_%20%20Roberto%20Alvarado.pdf)>.
8. Amini, F. y Ehsanpour, A. A. 2005. Soluble proteins, proline, carbohydrates and Na⁺/K⁺ changes in two tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars under in vitro salt stress. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, vol. 1, p. 212-216. ISSN: 1553-3468.
 9. Angelard, C., Colard, A., Niculita-Hirzel, H., Croll, D. y Sanders, I. R. 2010. Segregation in a mycorrhizal fungus alters rice growth and symbiosis-specific gene transcription. [online]. *Current Biology*. [Consultado: 09/2011]. URL <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2010.05.031>>.
 10. Angladette, A. 1969. *El arroz, técnicas agrícolas y producciones tropicales*. España: Blume, p. 221-232.
 11. Aroca, R., Irigoyen, J. J. y Sánchez-Díaz, M. 2003. Drought enhances maize chilling tolerance. II. Photosynthetic traits and protective mechanisms against oxidative stress. *Physiology Plantarum*, vol. 117, p. 540-49. ISSN: 0031-9317.
 12. Aroca, R., Porcel, R. y Ruiz-Lozano, J. M. 2006. How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold and salinity stresses? *New Phytologist*, vol. 173, p. 808-816. ISSN: 0028-646X.
 13. Aroca, R., Porcel, R. y Ruiz-Lozano, J. M. 2012. Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, vol. 63, No. 1, p. 43-57. ISSN: 0022-0957.

14. Aroca, R., Ruiz-Lozano, J. M., Zamarreño, Á. M., Paz, J. A., García-Mina, J. M., Pozo, M. J. y López-Ráez, J. A. 2013. Arbuscular mycorrhizal symbiosis influences strigolactone production under salinity and alleviates salt stress in lettuce plants. *Journal of Plant Physiology*, vol. 170, p. 47-55. ISSN: 0176-1617.
15. Aroca, R., Vernieri, P. y Ruiz-Lozano, J. M. 2008. Mycorrhizal and non-mycorrhizal *Lactuca sativa* plants exhibit contrasting responses to exogenous ABA during drought stress and recovery. *Journal of Experimental Botany*, vol. 59, p. 2029-2041. ISSN: 0022-0957.
16. Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology*, vol. 50, p. 601-639. ISSN: 1543-5008.
17. Asghari, H., Marschner, P., Smith, S. y Smith, F. 2005. Growth response of *Atriplex nummularia* to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi at different salinity levels. *Plant and Soil*, vol. 273, p. 245-256. ISSN: 0032-079X.
18. Asseng, S. y van Herwaarden, A. F. 2003. Analysis of the benefits to wheat yield from assimilates stored prior to grain filling in a range of environments. *Plant and Soil*, vol. 256, no. 1, p. 217-219. ISSN: 0032-079X.
19. Augé R. M. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*, vol. 11, p. 3-42. ISSN: 0940-6360.
20. Augé, R. M. 2004. Arbuscular mycorrhizae and soil/plant water relations. *Canadian Journal of Soil Science*, vol. 84, p. 373-381. ISSN: 0008-4271.
21. Augé, R. M., Toler, H. D., Sams, C. E. y Nasim, G. 2008. Hydraulic conductance and water potential gradients in squash leaves showing mycorrhiza-induced increases in stomatal conductance. *Mycorrhiza*, vol. 18, p. 115-121. ISSN: 0940-6360.

22. Austin, R. B. 1989. Maximizing crop production in water-limited environment. In: *Drought resistance in cereals*. Edited by FWG Baker. ISCU. CAB. International, 221 p. ISBN: 0-85198-641-2.
23. Azcón-Aguilar, C., Jaizme-Vega, M. C. y Calvet, C. 2002. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the control of soil-borne plant pathogens. In: *Mycorrhizal technology in agriculture*. Birkhäuser Verlag, Germany. p. 187-197. ISBN. 3-7643-6485-8.
24. Barea, J. M., Ferrol, N., Azcón-Aguilar, C. y Azcón-Aguilar, R. 2008. Mycorrhizal symbioses. In: *The Ecophysiology of Plant-Phosphorus Interactions*. Eds. White, P. J. y Hammond, J. P. Dordrecht: Springer. Series: *Plant Ecophysiology*, vol. 7 p. 143-163. ISSN: 1572-5561.
25. Barea, J. M., Pozo, M. J., Azcón-Aguilar, R. y Azcón-Aguilar, C. 2005. Microbial cooperation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, vol. 56, no. 417, p. 1761-1778. ISSN: 0022-0957.
26. Bárzana, G. 2014. Regulación por micorrizas arbusculares de la fisiología y las acuaporinas de maíz (*Zea mays* L.) en relación con la tolerancia de la planta hospedadora al déficit hídrico. *Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Biológicas*. Granada, España, p. 297.
27. Bárzana, G., Aroca, R. y Ruiz-Lozano, J. M. 2015. Localized and non-localized effects of arbuscular mycorrhizal symbiosis on accumulation of osmolytes and aquaporins and on antioxidant systems in maize plants subjected to total or partial root drying. *Plant Cell and Environment*, vol. 38, p. 1613-1627. ISSN: 0140-7791.
28. Bárzana, G., Aroca, R., Paz, J. A; Chaumont, F., Martínez-Ballesta, MC., Carvajal, M. y Ruiz-Lozano, J. M. 2012. Arbuscular mycorrhizal symbiosis increases relative apoplastic

- water flow in roots of the host plant under both well-watered and drought stress conditions. *Annals of Botany*, vol. 109, p. 1009-1017. ISSN: 0305-7364.
29. Bates, L. S., Waldren, R. P. y Teare, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, vol. 39, p. 205-7. ISSN: 0032-079X.
 30. Belder, P., Bouman, B. A. M., Cabangon, R., Guoan, L., Quilang, E. J. P., Li, Y., Spiertz, J. H. J. y Tuong, T. P. 2004. Effect of water-saving irrigation on rice yield and water use in typical lowland conditions in Asia. *Agricultural Water Management*, vol. 65, p. 193-210. ISSN: 0378-3774.
 31. Bernier, J., Atlin, G. N., Serraj, R., Kumar, A. y Spaner, D. 2008. Breeding upland rice for drought resistance. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 88, p. 927-939. ISSN: 1097-0010-0057.
 32. Besserer, A., Becard, G., Jauneau, A., Roux, C., Sejalon-Delmas, N. 2008. GR24, a synthetic analogue of strigolactones, stimulates the mitosis and growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* by boosting its energy metabolism. *Plant Physiology*, vol. 148, p. 402-413. ISSN: 0032-0889.
 33. Bheemareddy, V. S. y Lakshman, H. C. 2011. Effect of AM fungus *Glomus fasciculatum* on metabolite accumulation in four varieties of *Triticum aestivum* L. under shortterm water stress. *Vegetos*, vol. 24, p. 41-49. ISSN: 0970-4078.
 34. Bienert, G. P., Schjoerring, J. K. y Jahn, T. P. 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta- Gene Regulatory Mechanisms*, vol. 1758, p. 994-1003. ISSN: 1874-9399.

35. Bonfante, P. y Genre, A. 2010. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*, vol. 1, no. 4, p. 1-11. ISSN: 2041-1723.
36. Botwright, T. L., Latte, H. R. y Wade, L. J. 2008. Genotype and environment interactions for grain yield of upland rice backcross lines in diverse hydrological environments. *Field Crops Research*, vol. 108, no. 2, p. 117-125. ISSN: 0378-4290.
37. Caballero, J. I., Verduzco, C., Galán, V. J. y Jiménez, E. S. D. 2005. Proline accumulation as a symptom of drought stress in maize: A tissue differentiation requirement. *Journal of Experimental Botany*, vol. 39, no. 7, p. 889-897. ISSN: 0022-0957.
38. Cate, R. B. Jr. y Nelson, L. A. 1971. A simple statistical procedure for partitioning soil test correlation data into two classes. *Soil Science Society of America, Proceedings*, vol. 35, p. 658-659. ISSN: 0038-0776.
39. CIAT. 2005. *Morfología de la planta de arroz*. Centro Internacional de la Agricultura Tropical, p. 16.
40. Cruz de Carvalho, M. H. 2008. Drought stress and reactive oxygen species. Production scavenging and signaling. *Plant Signaling and Behavior*. March, vol. 3, no. 3, p. 156-165. ISSN: 1559-2324.
41. Chaves, M. M. y Oliveira, M. 2004. Mechanisms underlying plant resilience to water deficit: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany*, vol. 50, no. 407, p. 2365-2384. ISSN: 0022-0957.
42. Chaves, M. M., Maroco, J. P. y Pereira, J. S. 2003. Review of understanding plant response to drought from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, vol. 30, p. 239-264. ISSN: 1445-4408.

43. Cho, K., Toler, H., Lee, J., Ownley, B., Stutz, J. C., Moore, J. L. y Augé, R. M. 2006. Mycorrhizal symbiosis and response of sorghum plants to combined drought and salinity stresses. *Journal of Plant Physiology*, vol. 163, p. 17-528. ISSN: 0176-1617.
44. Da Matta, F. 2004. Exploring drought tolerant in coffee: a physiological approach with some insights for plant breeding. *Brazilian Journal Plant Physiology*, vol. 6, no. 1, p. 1-6. ISSN: 1677-0420.
45. Damour, G., Simonneau, T., Cochard, H. y Urban, I. 2010. An overview of models of stomatal conductance at the leaf level. *Plant Cell and Environment*, vol. 33, p. 1419-1438. ISSN: 0140-7791.
46. Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé D. y Van Breusegem, F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 57, p. 779-795. ISSN: 1420-682X.
47. Dell'Amico, J., Rodríguez P., Torrecillas A., Morte, A. y Sánchez-Blanco, M. J. 2002. Influencia de la micorrización en el crecimiento y las relaciones hídricas de plantas de tomate expuestas a un ciclo de sequía y recuperación. *Cultivos Tropicales*, vol. 23, no. 1, p. 29-34. ISSN: 1819-4087.
48. Dhindsa, R. S., Plumb-Dhindsa, P. y Thorpe, T. A. 1981. Leaf senescence: is correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, vol. 32, p. 93-101. ISSN: 0022-0957.
49. El-Mesbahi, M. N., Azcón-Aguilar, R., Ruiz-Lozano, J. M. y Aroca, R. 2012. Plant potassium content modifies the effects of arbuscular mycorrhizal symbiosis on root hydraulic properties in maize plants. *Mycorrhiza*, vol. 22, p. 555-564. ISSN: 0940-6360.

50. FAO, 2014. Perspectivas de cosechas y situación alimentaria, no 3 octubre de 2014. Disponible en : <www.fao.org/3/a-i4096s.pdf>
51. FAO. 2010. Perspectivas de cosechas y situación alimentaria. Diciembre 2010. Disponible en: <www.fao.org/docrep/013/al972s/al972s00.pdf>
52. FAO. 2012. Guía para identificar las limitaciones de campo en la producción de arroz. [en línea] [Consultado: 01/2012]. Disponible en: <www.fao.org/docrep/fao/006/y2778s/y2778s01.pdf>
53. FAO. 2013. Perspectivas alimentarias (Resúmenes de mercado). Noviembre, 2013, p. 13. ISSN: 0251-1541.
54. Fernández, F., Dell'Amico, J. M., Fernández, K., de la Providencia, I. y Rodríguez, Y. 2006. Funcionamiento de un inoculante líquido a base del hongo micorrízico arbuscular *Glomus* sp1 (INCAM-4) en arroz (*Oryza sativa* var. J-104) en suelo salino. *Cultivos Tropicales*, vol. 27, no. 2, p. 27-33. ISSN: 1819-4087.
55. Fernández, F., Gómez, R., Vanegas, L. F., Martínez, M. A., de la Noval, B. M., Rivera, R. 2001. Producto inoculante micorrizógeno. Oficina Nacional de Propiedad Industrial. Cuba, Patente No. 22641.
56. Fernández, K., Fernández, F., González, M. E., Pérez, E., Mirabal, L. y Pozos, M. 2002. Micorrización in vitro de plántulas de *Coffea canephora* var. Robusta: ¿Una realidad? *Cultivos Tropicales*, vol. 23, no. 3, p. 47-52. ISSN: 1819-4087.
57. Ferrol, N. y Pérez-Tienda, J. 2009. Coordinated nutrient exchange in arbuscular mycorrhiza. In: *Mycorrhizas: Functional Processes and Ecological Impact*, Eds. C. Azcón-Aguilar, J. M. Barea, S. Gianinazzi and V. Gianinazzi-Pearson. Heidelberg: Springer-Verlag, p. 73-87. ISBN: 978-1-61122-659-1.

58. Foo, E., Ross, J. J., Jones, W. T. y Reid, J. B. 2013. Plant hormones in arbuscular mycorrhizal symbioses: an emerging role for gibberellins. *Annals of Botany*, vol. 111, p. 769-779. ISSN: 0305-7364.
59. Fotopoulos, V., Ziogas, V., Tanou, G. y Molassiotis, A. 2010. Involvement of AsA/DHA and GSH/GSSG ratios in gene and protein expression and in the activation of defence mechanisms under abiotic stress conditions. Chapter 10. Anjum, N. A. *et al. Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants*, © Springer Science+Business Media B.V, 443 p. ISBN: 978-3-642-19732-1.
60. Foyer, C. H. y Noctor, G. 2000. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *New Phytologist*, vol. 146, p. 359-388. ISSN: 0028-646X.
61. Foyer, C. H. y Noctor, G. 2003. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiology Plantarum*, vol. 119, p. 355-364. ISSN: 0031-9317.
62. Foyer, C. H. y Noctor, G. 2005a. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*, vol. 17, p. 1866-1875. ISSN: 1532-298X.
63. Foyer, C. H. y Noctor, G. 2005b. Oxidant y antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell and Environment*, vol. 28, p. 1056-1071. ISSN: 0140-7791.
64. Fukai, S. y Cooper, M. 1996. Stress physiology in relation to breeding for drought resistance. A case study rice, p. 123-149. *Physiology of stress tolerance in rice*. ed. Singh, V. P., Singh; R. K., Singh, B. B. Zeiger, R. S. Navendra Deva University of Agriculture

- and Technology (NDUTA) y International Rice Research Institute (IRRI), 239 p. ISBN: 81-86789-00-6.
65. Fundora, L. R., Rodríguez, Y., Mena, A., González, P. J., Rodríguez, P. y González-Peña, D. 2008. Estabilidad de la eficiencia de la cepa *Glomus mosseae* en la respuesta del tomate a condiciones de estrés hídrico fuera de su periodo óptimo. *Cultivos Tropicales*, vol. 29, no. 2, p. 47-53. ISSN: 1819-4087.
66. Fusconi, Anna. 2014. Regulation of root morphogenesis in arbuscular mycorrhizae: what role do fungal exudates, phosphate, sugars and hormones play in lateral root formation? *Annals of Botany*, vol. 113, p. 19-33. ISSN: 0305-7364.
67. García, A. 2009. Efectos fisiológicos del déficit hídrico inducido en fases tempranas del crecimiento de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) y su aplicación en la selección de variedades tolerantes. *Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas*. Mayabeque, Cuba, 98 p.
68. García, A., Dorado, M., Pérez, I. y Montilla, E. 2009. Dry mass accumulation of different organs of the rice plant under water deficit conditions. *Agronomía Tropical*, vol. 59, no. 1, p. 15-24. ISSN: 0002-192X.
69. García, A., Dorado, M., Pérez, I. y Montilla, E. 2010. Efecto del déficit hídrico en la distribución de fotoasimilados en plantas de arroz (*Oryza sativa* L.). *Interciencia*, vol. 35, no. 1, p. 47-54. ISSN: 0378-1844.
70. García-Garrido, J. M. y Ocampo, J. A. 2002. Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of Experimental Botany*, vol. 53, no. 373, p. 1377-1386. ISSN: 0022-0957.

71. García-Garrido, J. M., Vierheilig, H. 2009. From a germinating spore to an established arbuscular mycorrhiza: Signaling and regulation. In: *Advances in mycorrhizal science and technology*. Khasa, D., Piché, Y., Coughlan, A. (Eds.). Ottawa: NRC Research Press. p. 15-37. ISBN: 978-0-660-19883-5.
72. Genre, A., Chabaud, M., Faccio, A., Barker, D. G. y Bonfante, P. 2008. Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *The Plant Cell*, vol. 20, p. 1407-1420. ISSN: 1532-298X.
73. Genre, A., Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P. y Barker, D. G. 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *The Plant Cell*, vol. 17, p. 3489-3499. ISSN: 1532-298X.
74. Gill, S. S. y Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 48, p. 909-930. ISSN: 0981-9428.
75. Giovannetti, M. y Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular infection in roots. *New Phytologist*, vol. 84, p. 489-500. ISSN: 0028-646X.
76. Giovannetti, M., Avio, L., Sbrana, C. y Citerinesi, A.S. 1993. Factors affecting appressorium development in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol. y Gerd.) Gerd. and Trappe. *New Phytologist*, vol. 123, p. 115-122. ISSN: 0028-646X.
77. González, P. J., Ramírez, P., Juan, F., Morgan, O., Rivera, R. y Plana, R. 2015. Contribución de la inoculación micorrízica a la reducción de la fertilización fosfórica en *Brachiaria decumbens*. *Cultivos Tropicales*, vol. 36, no. 1, p. 135-142. ISSN: 1819-4087.

78. González-Guerrero, M., Benabdellah, K., Ferrol, N. y Azcón-Aguilar, C. 2009. Mechanisms underlying heavy metal tolerance in arbuscular mycorrhiza. *In: Mycorrhizas: Functional Processes and Ecological Impact*. Eds. Azcón-Aguilar, C., Barea, J. M., Gianinazzi, S. y Gianinazzi-Pearson, V. Heidelberg: Springer-Verlag. p. 107-121. ISBN: 978-1-61122-659-1.
79. Gutjahr Caroline; Casieri, L. y Paszkowski, U. 2009. *Glomus intraradices* induces changes in root system architecture of rice independently of common symbiosis signaling. *New Phytologist*, vol. 182, p. 829-837. ISSN: 0028-646X.
80. Gutjahr, C. 2014. Phytohormone signaling in arbuscular mycorrhizal development. *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 20, p. 26-34. ISSN: 1369-5266.
81. Gutjahr, C. y Parniske, M. 2013. Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 29, p. 593-617. ISSN: 1081-0706.
82. Gutjahr, C., Banba, M., Croset, V., An, K., Miyao, A., An, G., Hirochika, H., Imaizumi-Anraku, H. y Paszkowski, U. 2008. Arbuscular mycorrhiza specific signaling in rice transcends the common symbiosis signaling pathway. *The Plant Cell*, vol. 20, p. 2989-3005. ISSN: 1532-298X.
83. Halliwell, B. y Gutteridge J. M. C. 1989. *Free radical in biology and medicine*. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press. 543 p. ISBN-13: 978-0198568698.
84. Harrison, M. 2005. Signaling in the mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Microbiology*, vol. 59, p. 19-42. ISSN: 0066-4227.
85. Harris-Valle, C., Esqueda, M., Valenzuela-Soto, E. M. y Castellanos, A. E. 2009. Tolerancia al estrés hídrico en la interacción planta-hongo micorrízico arbuscular:

- metabolismo energético y fisiología. *Revista Fitotecnia Mexicana*, vol. 32, no. 4, p. 265-271. ISSN: 0187-7380.
86. Hattori Y., Nagai K. y Ashikari. 2011. Rice growth adapting to deepwater. *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 14, p. 100-105. ISSN: 1369-5266.
87. Hepper, C. M. 1981. Techniques for studying the infection of plants by vesicular arbuscular mycorrhizal fungi under axenic conditions. *New Phytologist*, vol. 88, p. 641-647. ISSN: 0028-646X.
88. Hernández, M. y Cuevas, F. 1999. Evaluación de diferentes cepas de micorriza arbuscular en el cultivo del arroz en condiciones de inundación. *Cultivos Tropicales*, vol. 20, no. 4, p. 19-22. ISSN: 1819-4087.
89. Herrera-Peraza, R., Hamel, Ch., Fernández, F., Ferrer, R. y Furrázola, E. 2011. Soil-strain compatibility: the key to effective use of arbuscular mycorrhizal inoculants? *Mycorrhiza*, vol. 21, p. 183-193. ISSN: 0940-6360.
90. Hildebrandt, U., Janetta, K. y Bothe, H. 2002. Towards growth of arbuscular mycorrhizal fungi independent of a plant host. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, p. 1919-1924. ISSN: 0099-2240.
91. Hoagland, D. R. y Arnon, D. I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Circular California Agricultural Experiment Station*, vol. 347, p. 1-32. ISSN: 0096-0721.
92. Hsiao, T. C. 1973. Plant responses to water stress. *Annual Review Plant Physiology*, vol. 24, p. 519-570. ISSN: 1543-5008.
93. Huang, X-Y., Chao, D-Y., Gao, J-P., Zhu, M-Z., Shi, M. y Lin, H-X. 2009. A previously unknown zinc finger protein, DST, regulates drought and salt tolerance in rice via stomatal aperture control. *Genes and Development*, vol. 23, no. 15, p. 1805-1817. ISSN: 0890-9369.

94. Ike-Izundu, N. E. 2007. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and soil microbial populations in the rhizosphere. *Tesis Doctoral*, Rhodes University, Sudáfrica.
95. IRRI. 1993. *Rice crucial environment*. International Rice Research Institute. Los Baños, Philippines, p. 10-16.
96. IRRI. 2002. *Standard Evaluation System for Rice*. Genetic Resource Center. INGER Manila Philippines, International Rice Research Institute. 56 p. ISBN: 971-22-0122-8.
97. Ishii, T., Shrestha, Y. H., Marsumoto, I. y Kadoya, K. 1996. Effect of ethylene on the Growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and on the mycorrhizal formation of trifoliolate orange roots. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, vol. 65, p. 2525-259. ISSN: 1882-3351.
98. IUSS Working Group WRB. 2014. World Reference Base for Soil Resources 2014. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. World Soil Resources Reports No. 106. FAO, Rome. ISSN: 0532-0488.
99. Jahromi, F., Aroca, R., Porcel, R. y Ruiz-Lozano, J. M. 2008. Influence of salinity on the in vitro development of *Glomus intraradices* and on the in vivo physiological and molecular responses of mycorrhizal lettuce plants. *Microbial Ecology*, vol. 55, p. 45-53. ISSN: 0095-3628.
100. Jakob, B., Heber, U. 1996. Photoproduction and detoxification of hydroxyl radical in chloroplasts and leaves in relation to photoinactivation of photosystems I and II. *Plant and Cell Physiology*, vol. 37, p. 629-635. ISSN: 0032-0781.
101. Jarma, A. A., Degiovanni, V. B. y Montoya, R. A. 2010. Índices fisiotécnicos, fases de crecimiento y etapas de desarrollo de la planta de arroz. Capítulo 5. *Producción Eco-Eficiente del Arroz en América Latina*. Tomo I. ed. Degiovanni, V. B., Martínez, C. R.

- Motta, F. O. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), p. 60-78. ISBN: 978-958-694-103-7.
102. Jiang, F. y Hartung, W. 2007. Long-distance signaling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. *Journal of Experimental Botany*, vol. 59, no. 1, p. 37-43. ISSN: 0022-0957.
103. Kamoshita, A., Babu, R. C., Boopathi, N. M. y Fukai, S. 2008. Phenotypic and genotypic analysis of drought-resistance traits for development of rice cultivars adapted to rainfed environments. *Field Crops Research*, vol. 109, p. 1-23. ISSN: 0378-4290.
104. Kamoshita, A., Rodríguez, R., Yamauchi, A. y Wade, L. 2004. Genotypic variation in response of rainfed lowland to prolonged drought and rewatering. *Plant Production Science*, vol. 7, no. 4, p. 406-420. ISSN: 1343-943X.
105. Kato, Y. y Okami, M. 2010. Root growth dynamics and stomatal behaviour of rice (*Oryza sativa* L.) grown under aerobic and flooded conditions. *Field Crops Research*, vol. 117, p. 9-17. ISSN: 0378-4290.
106. Kato, Y., Kamoshita, A., Yamagishi, J., Himoto, H. y Abe, J. 2007. Growth of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars under upland condition with different level of water supply 3. Root system development, soil moisture change and plant water status. *Plant Production Science*, vol. 10, no. 1, p. 3-13. ISSN: 1343-943X.
107. Kato, Y., Okami, M. y Katsura, K. 2009. Yield potential and water use efficiency of aerobic rice (*Oryza sativa* L.) in Japan. *Field Crops Research*, vol. 113, p. 328-334. ISSN: 0378-4290.
108. Khush, G. 2003. Productivity improvements in rice. *Nutrition Reviews*, vol. 61, p. 114-16. ISSN: 1753-4887.

109. Kiers, E. T., Duhamel, M., Beesetty, Y., Mensah, J. A. y Franken, O. 2011. Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science*, vol. 333, p. 880-882. ISSN: 0036-8075.
110. Kishor, P. B. K., Sangama, R. N., Amrutha, P. S., Laxmi, K. R. Naidu y Rao, K. S. 2005. Regulation of proline biosynthesis degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science*, vol. 88, no. 3, p. 424-438. ISSN: 0011-3891.
111. Koide, R. T. y Mosse, B. 2004. A history of research on arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza*, vol. 14, p. 145-163. ISSN: 0940-6360.
112. Kosuta, S., Hazledine, S., Sun, J., Miwa, H., Morris, R. J., Downie, J. A. y Oldroyd, G. E. 2008. Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis-signaling pathway of legumes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, vol. 105, p. 9823-9828. ISSN: 0027-8424.
113. Kubikova, E., Moore J. L., Ownlew, B. H., Mullen, M. D. y Augé R. M. 2001. Mycorrhizal impact on osmotic adjustment in *Ocimum basilicum* during a lethal drying episode. *Journal of Plant Physiology*, vol. 158, p. 1227-1230. ISSN: 0176-1617.
114. Lafitte, H. R., Guan, Y. S., Shi, Y. y Li, Z. K. 2007. Whole plant responses, key processes, and adaptation to drought stress: the case of rice. *Journal of Experimental Botany*, vol. 58, p. 169-175. ISSN: 0022-0957.
115. Latowski, D., Surówka, E., y Strzałka, K. 2010. Regulatory role of components of ascorbato-glutathione pathway in plant stress tolerance. Chapter 1. Anjum, N. A. *et al.* (Eds.), *Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants*, DOI.

- 10.1007/978-90-481-9404-9_1, © Springer Science+Business Media B.V., p. 1-53. ISBN: 978-3-642-19732-1.
116. Lehto, T. y Zwiazek, J. J. 2011. Ectomycorrhizas and water relations of trees: a review. *Mycorrhiza*, vol. 21, p. 71-90. ISSN: 0940-6360.
117. Leipner, J., Fracheboud, Y. y Stamp, P. 1997. Acclimation by suboptimal temperature diminishes photooxidative damage in maize leaves. *Plant Cell and Environment*, vol. 20, p. 366-72. ISSN: 0140-7791.
118. Li, H., Ye, Z. H., Chan, W. F., Chen, X. W., Wu, F. Y., Wu, S. C. y Wong, M. H. 2011. Can arbuscular mycorrhizal fungi improve grain yield, as uptake and tolerance of rice grown under aerobic conditions? *Environmental Pollution*, vol. 159, p. 2537-2545. ISSN: 0269-7491.
119. Li, J. M. y Jin, H. 2007. Regulation of brassinosteroid signaling. *Trends in Plant Science*, vol. 12, p. 37-41. ISSN: 1360-1385.
120. Lim, P. O., Kim, H. J. y Nam, H. G. 2007. Leaf Senescence. *Annual Review of Plant Biology*, vol. 58, p. 115-136. ISSN: 1543-5008.
121. Liu, J. X., Liao, D. Q., Oane, R., Estenor, L., Yang, X. E. y Li, Z. C. 2006. Genetic variation in the sensitivity of anther dehiscence to drought stress in rice. *Field Crops Research*, vol. 97, p. 87-100. ISSN: 0378-4290.
122. López-Ráez, J. A., Charnikhova, T., Fernández, I., Bouwmeester, H. y Pozo, M. J. 2011. Arbuscular mycorrhizal symbiosis decreases strigolactone production in tomato. *Journal of Plant Physiology*, vol. 168. P. 294-297. ISSN: 0176-1617.

123. Lumini, E., Vallino, M., Alguacil, M. M., Romani, M. y Bianciotto, V. 2011. Different farming and water regimes in Italian rice fields affect arbuscular mycorrhizal fungal soil communities. *Ecological Applications*, vol. 21, p. 1696-1707. ISSN: 1051-0761.
124. Ma, Y. H., Ma, F. W., Zhang, J. K., Li, M. J., Wang, Y. H. y Liang, D. 2008. Effects of high temperature on activities and gene expression of enzymes involved in ascorbate-glutathione cycle in apple leaves. *Plant Science*, vol. 175, p. 761-6. ISSN: 0168-9452.
125. Mahmood, Q., Ahmad, R., Kwak, S., Rashid, A., y Anjum, N. A. 2010. Ascorbate and glutathione: protectors of plants in oxidative stress. Chapter 7. Eds., Anjum, N. A. *et al. Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants*, DOI. 10.1007/978-90-481-9404-9_7, © Springer Science+Business Media B.V, p. 209-229. ISBN: 978-3-642-19732-1.
126. Maiti, D., Singh, R. K. y Variar, M. 2012. Rice-based crop rotation for enhancing native arbuscular mycorrhizal (AM) activity to improve phosphorus nutrition of upland rice (*Oryza sativa* L.). *Biology and Fertility of Soils*, vol. 48, p. 67-73. ISSN: 0178-2762.
127. Maiti, D., Toppo Neha Nancy y Variar M. 2011. Integration of crop rotation and arbuscular mycorrhiza (AM) inoculum application for enhancing MA activity to improve phosphorus nutrition and yield of upland rice (*Oryza sativa* L.). *Mycorrhiza*, vol. 21, no. 8, p. 659. ISSN: 0940-6360.
128. Malik, A I, Colmer, T. D., Lambers H. y Schortemeyer, M. 2003. Aerenchyma formation and radial O₂ loss along adventitious roots of wheat with only the apical root portion exposed to O₂ deficiency. *Plant Cell and Environment*, vol. 26, p. 1713-1722. ISSN: 0140-7791.
129. Maqueira, L. A. 2014. Relación de los procesos fisiológicos del desarrollo y de variables meteorológicas, con la formación del rendimiento en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.)

- en Los Palacios, Pinar del Río. *Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas*. Mayabeque, Cuba, 99 p.
130. Maroco, J. P., Pereira, J. y Chaves, M. M. 2000. Growth, photosynthesis and water-use efficiency of two C4 Sahelian grasses subjected to water deficits. *Journal of Arid Environments*, vol. 45, p. 119-137. ISSN: 0140-1963.
131. Marulanda, A., Barea, J. M. y Azcón-Aguilar, R. 2006. An indigenous drought tolerant strain of *Glomus intraradices* associated with a native bacterium improves water transport and root development in *Retama sphaerocarpa*. *Microbial Ecology*, vol. 52, p. 670-678. ISSN: 0095-3628.
132. Matsuo, T., Kumazawa, K., Ishii, R., Ishihara, K. y Hirata, H. 1995. Science of the rice plant. Volum Two. Physiology. *Food Agriculture Policy Research Center*. Tokyo, 1240 p. ISBN: 4-540-94051-1.
133. Mena, E. A., Portugal, V., Fernández, K., Jerez, M. E. y Serrato, F. R. 2011. Influencia de la inoculación con *Glomus hoi-like* y un conglomerado de especies de HMA en el crecimiento de plantas de sorgo sometidas o no a estrés hídrico. *Cultivos Tropicales*, vol. 32, no. 1, p. 11-17. ISSN: 0258-5936.
134. Mena-Violante. H. G., Ocampo-Jiménez, O., Dendooven, L., Martínez-Soto, G., González-Castañeda, J., Davies, F. T. y Olalde-Portugal, V. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance fruit growth and quality of chile ancho (*Capsicum annuum* L. cv. 'San Luis') plants exposed to drought. *Mycorrhiza*, vol. 16, p. 261-267. ISSN: 0940-6360.
135. Méndez, P. 2011. Arroz: ¿estabilidad o nueva alza de los precios mundiales? [en línea]. Informativo mensual del mercado mundial del arroz, Febrero 2011. Infoarroz, Centro de

- Cooperación Internacional en Investigación Agronómica para el Desarrollo (CIRAD)
[Consulta: junio 2011]. Disponible en: www.infoarroz.org
136. Mesa, A., Naranjo, M., Cancio, R., Martí, A., Clemente, B., Suárez, O. y Pacheco, E. 1984. *Manual de interpretación de los índices físico-químicos y morfológicos de los suelos cubanos*. Ed. Ciencia y Técnica, Ciudad de La Habana, Cuba, 135 p.
137. Mi, G., Tang, L., Zhang, F. y Zhang, J. 2002. Carbohydrate storage and utilization during grain filling as regulated by nitrogen application in two wheat cultivars. *Journal of Plant Nutrition*, vol. 25, no. 2, p. 213-229. ISSN: 0190-4167.
138. MINAG. 1999. *Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba*. Instituto de Suelos. La Habana. Agrinfor. 64 p. ISBN: 959-7023-27-X.
139. MINAG. 2005. *Instructivo técnico del cultivo del arroz*. Cuba, 112 p.
140. MINAG. 2008. *Instructivo técnico del cultivo del arroz*. Cuba, 113 p.
141. MINAG. 2011a. Informe de cierre de campaña, 2010-2011. Los Palacios, Pinar del Río. Cuba, 43 p.
142. MINAG. 2011b. *Modificaciones al instructivo técnico del cultivo del arroz*. Instituto de Investigaciones de Granos. La Habana, 30 p.
143. Miransari, M. 2010. Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to plant growth under different types of soil stress. *Plant Biology*, vol. 12, p. 563-569. ISSN: 1435-8603.
144. Mittler, R. 2002. Oxidative stress: antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, vol. 7, p. 405-410. ISSN: 1360-1385.
145. Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery M. y Van-Breusegem, F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, vol. 9, no. 10, p. 440-449. ISSN: 1360-1385.

146. Moreno, L. P. 2009. Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. *Agronomía Colombiana*, vol. 27, no. 2, p. 179-191. ISSN: 0120-9965.
147. Mostajeran, A. y Rahimi-Eichi, V. 2009. Effects of drought stress on growth and yield of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars and accumulation of proline and soluble sugars in sheath and blades of their different ages leaves. *American-Eurasian Journal Agricultural and Environment Science*, vol. 5, no. 2, p. 264-272. ISSN: 1818-6769.
148. NC 51. 1999. Determinación del por ciento de materia orgánica. Comité Técnico de Normalización. No. 3. Calidad del suelo. Análisis químico. La Habana: Oficina Nacional de Normalización.
149. NC 52. 1999. Determinación de las formas móviles de fósforo y potasio. Comité Técnico de Normalización. No. 3. Calidad del suelo. Análisis químico. La Habana: Oficina Nacional de Normalización.
150. NC 65. 2000. Determinación de la capacidad de intercambio catiónico y de los cationes intercambiables del suelo. Comité Técnico de Normalización. No. 3. Calidad del suelo. Análisis químico. La Habana: Oficina Nacional de Normalización.
151. NC ISO 10390. 1999. Determinación de pH. Comité Técnico de Normalización. No. 3. Calidad del suelo. Análisis químico. La Habana: Oficina Nacional de Normalización
152. Noctor, G. y Foyer, C. H. 1998. Ascorbate and glutathione. Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology*, vol. 49, p. 249-279. ISSN: 1543-5008.
153. Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G. y Foyer, C. H. 2012. Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell and Environment*, vol. 35, p. 454-484. ISSN: 0140-7791.

154. Olah, B., Brière, C., Bécard, G., Dénarié, J. y Gough, C. 2005. Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signaling pathway. *Plant Journal*, vol. 44, p. 195-207. ISSN: 0960-7412.
155. Oldroyd, G. E., Harrison, M. J. y Paszkowski, U. 2009. Reprogramming plant cells for endosymbiosis. *Science (New York, N.Y.)*, vol. 324, no. 5928, p. 753-754. ISSN: 0036-8075.
156. ONEI, 2014. Oficina Nacional de Estadísticas. Anuarios Estadísticos Agropecuarios. Cuba. [Consultado: 04/12/2014]. Disponible en: <http://www.one.cu/aec2013/esp/09_tabla_cuadro.htm >
157. Ortiz, R. y Fernández, F. 1998. Efectividad del recubrimiento de semilla de arroz, pregerminado con inoculante micorrizógeno arbuscular. *Cultivos Tropicales*, vol. 19, no. 2, p. 15-19. ISSN: 1819-4087.
158. Parniske, M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 6, p. 763-775. ISSN: 1740-1526.
159. Paszkowski, U. 2006. A journey through signaling in arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*, vol. 172, p. 35-46. ISSN: 0028-646X.
160. Patterson, B. D., MacRae, E. A y Ferguson, I. B. 1984. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV). *Analytical Biochemistry*, vol. 139, p. 487-92. ISSN: 0003-2697.
161. Pérez, N. y Castro, R. I. 2000. Report of new varieties. *Cultivos Tropicales*, vol. 24, no. 4, p. 55. ISSN: 1819-4087.

162. Phillips, J. M. y Hayman, D. S. 1970. Improve procedures for cleaning root and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infections. *Transfer Britannic Micology Society*, vol. 55, p. 158-161. ISSN: 0007-1536.
163. Pirdashti, Z. H., Sarvestani, T., Nematzadeh, G. H. y Ismail, A. 2004. Study of water stress in different growth stages on yield and yield components of different rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Proceeding of the 4th International Crop Science Congress*. Australia, 26 Sep -1 Oct 2004. ISBN: 1920842209.
164. Plana, R., González, P. J., Dell'Amico, J. M., Fernández, F., Calderón, A. y Marrero, Y. 2008. Efecto de dos inoculantes micorrízicos arbusculares (base líquida y sólida) en el cultivo del trigo duro (*Triticum durum* L.). *Cultivos Tropicales*, vol. 29, no. 4, p. 35-40. ISSN: 1819-4087.
165. Plaut, Z., Butow, B. J. y Blumenthal, C. S. 2004. Transport of dry matter into developing wheat kernels and its contribution to grain yield under post-anthesis water deficit and elevated temperature. *Field Crops Research*, vol. 86, no. (2-3), p. 185-198. ISSN: 0378-4290.
166. Polón, R. 2007. Impacto nacional en el incremento del rendimiento agrícola, economizar agua de riego y energía en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.) como consecuencia del estrés hídrico. XVI FÓRUM DE CIENCIA Y TÉCNICA 2007. Código: 0109604 02. [en línea] [Consultado: 12/2007]. Disponible en: <www.forumcyt.cu/UserFiles/forum/Textos/0109604.pdf>
167. Polón, R. y Castro, R. 1999. Aplicación del estrés hídrico como alternativa para incrementar el rendimiento en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Cultivos Tropicales*, vol. 20, no. 3, p. 37-39. ISSN: 1819-4087.

168. Polón, R., Mesa, S., López, E. y Castro, R. 1995. La aplicación del estrés hídrico como alternativa para incrementar el rendimiento en el cultivo del arroz. *Cultivos Tropicales*, vol. 16, no. 2, p. 18-20. ISSN: 1819-4087.
169. Polón, R., Parra, Y., Castro, I. y Morejón, R. 2001. Diferentes momentos del establecimiento del aniego permanente en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.) y su influencia sobre el rendimiento, sus componentes y control de malezas. *Cultivos Tropicales*, vol. 22, no. 1, p. 53-55. ISSN: 1819-4087.
170. Porcel, R. y Ruiz-Lozano, J. M. 2004. Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *Journal of Experimental Botany*, vol. 55, p. 1743-50. ISSN: 0022-0957.
171. Porcel, R., Aroca, R. y Ruiz-Lozano, J. M. 2012. Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, vol. 32, p. 181-200. ISSN: 1774-0746.
172. Porcel, R., Barea, J. M. y Ruiz-Lozano, J. M. 2003. Antioxidant activities in mycorrhizal soybean plants under drought stress and their possible relationship to the process of nodule senescence. *New Phytologist*, vol. 157, p. 135-43. ISSN: 0028-646X.
173. Porcel, R.; Aroca, R., Azcón-Aguilar, R. y Ruiz-Lozano, J. M. 2006. PIP aquaporin gene expression in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants in relation to drought stress tolerance. *Plant Molecular Biology*, vol. 60, p. 389-404. ISSN: 0167-4412.
174. Potters, G., Pasternak, T., Guisez, P., Y. Palme, K. J. y Jansen, M. A. K. 2007. Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science*, vol. 12, no. 3, p. 99-105. ISSN: 1360-1385.

175. Pozo, M. J. y Azcón-Aguilar, C. 2007. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 10, no. 4, p. 393-398. ISSN: 1369-5266.
176. Pozo, M. J., López-Róez, J. A., Azcón-Aguilar, C. y García-Garrido, J. M. 2015. Phytohormones as integrators of environmental signals in the regulation of mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*, p. 1-5. ISSN: 0028-646X.
177. Qiang-Sheng, W., Ren-Xue, X., Ying-Ning, Z. y Gui-Yang, W. 2007. Osmotic solute responses of mycorrhizal citrus (*Poncirus trifoliata*) seedlings to drought stress. *Acta Physiology Plant*, vol. 29, p. 543-549. ISSN: 0137-5881.
178. Quan, L. J., Zhang, B., Shi, W-W. y Li, H-Y. 2008. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal Integr Plant Biology*, vol. 50, no. 1, p. 2-18. ISSN: 1672-9072.
179. Raveendran, M., Zahra-Sadat, S., Jagadish, S. V. K., Bruskiwich, R., Abdelbagi, I., Leung, H. y Bennett, J. 2011. Physiological and proteomic responses of rice peduncles to drought stress. *Molecular Biotechnology*, vol. 48, p. 173-182. ISSN: 1073-6085.
180. Redecker, D., Schüssler, A., Stockinger, H., Stürmer, S. L., Morton, J. B. y Walker, C. 2013. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza*, vol. 23, no. 7, p. 515-531. ISSN: 0940-6360.
181. Rillig, M. C. y Mummey, D. L. 2006. Mycorrhizas y soil structure. *New Phytologist*, vol. 171, p. 41-53. ISSN: 0028-646X.
182. Rivera, E. R., Fernández, S. K., Ruiz, M. L., González, C. P. J. y Martín, A. G. 2014. Beneficios y factibilidad del modelo planta micorrizada eficientemente como elemento constitutivo de la producción agrícola. [CD-ROM] En: Congreso Científico (XIX: 2014,

- noviembre 6-9: Mayabeque). Memorias. Mayabeque: Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. ISBN: 978-959-7023-73-9.
183. Rivera, R., Fernández, F., Fernández, K., Ruiz, L., Sánchez, C. y Riera, M. 2007. Advances in the management of effective arbuscular symbiosis in tropical ecosystems. In: *Mycorrhizae in Crop Productions*. Hamel, C. y Plenchette, C. (Eds.). The Haworth Press, Inc. USA. p. 151-195. ISBN: 10-1-56022-327-8, 17-37.
184. Rochange, S. 2010. Strigolactones and their role in arbuscular mycorrhizal symbiosis. Chapter 4. Koltai, H. y Kapulnik, Y. (Eds.), *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*, © Springer Science+Business Media B.V., p. 73-90. ISBN: 978-90-481-9489-6.
185. Rodríguez, Y., Fernández, A., Solórzano, E., Peteira, B. y Fernández, F. 2006. Inducción de enzimas de defensa en dos variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) por el hongo micorrízico arbuscular *G. mosseae*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. 8, no 2, p. 35-49. ISSN: 1909-8758.
186. Rodríguez, Y., Dalpé, Y., Séguin, S., Fernández, K., Fernández, F. y Rivera, R. A. 2011. *Glomus cubense* sp. nov., an arbuscular mycorrhizal fungus from Cuba. *Mycotaxon*, vol. 118, p. 337-347. ISSN: 2154-8889.
187. Ruiz-Lozano, J. M. 2003. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress: new perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza*, vol. 13, p. 309-17. ISSN: 0940-6360.
188. Ruiz-Lozano, J. M. y Aroca, R. 2010. Host response to osmotic stresses: stomatal behaviour and water use efficiency of arbuscular mycorrhizal plants. In: *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*, 2nd Edition, Kapulnik, Y. Koltai, H. (Eds) Springer. The Netherlands, p. 239-256. ISBN: 978-81-308-0342-5.

189. Ruiz-Lozano, J. M. y Azcón-Aguilar, R. 1995. Hyphal contribution to water uptake in mycorrhizal plants as affected by the fungal species and water status. *Physiology Plant*, vol. 95, p. 472-478. ISSN: 0031-9317.
190. Ruiz-Lozano, J. M., Aroca, R., Zamarreño, Á. M., Molina, S., Andreo-Jiménez, B., Porcel, R., García-Mina, J. M. Ruyter-Spira, C. y López-Ráez, J. A. 2015. Arbuscular mycorrhizal symbiosis induces strigolactone biosynthesis under drought and improves drought tolerance in lettuce and tomato. *Plant, Cell and Environment* (En Imprinta). DOI. 10.1111/pce.12631.
191. Ruiz-Lozano, J. M., Perálvarez, M. C., Aroca, R. y Azcón-Aguilar, R. 2011. The application of a treated sugar beet waste residue to soil modifies the responses of mycorrhizal and non mycorrhizal lettuce plants to drought stress. *Plant and Soil*, vol. 346, p. 153-166. ISSN: 0032-079X.
192. Ruiz-Lozano, J. M., Porcel, R., Bárzana, G., Azcón-Aguilar, R. y Aroca, R. 2012. Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to plant drought tolerance. State of the art. In: *Plant Responses to Drought Stress: From Morphological to Molecular Features*. Ed. R. Aroca. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, p. 335-362. ISBN: 978-3-642-32652-3.
193. Ruiz-Sánchez, M., Armada, E., Muñoz, Y., García de Salamone, I., Aroca, R., Ruiz-Lozano, J. M. y Azcón-Aguilar, R. 2011. Azospirillum and arbuscular mycorrhizal colonization enhance rice growth and physiological traits under well-watered and drought conditions. *Journal of Plant Physiology*, vol. 168, p. 1031-1037. ISSN: 0176-1617.
194. Ruth, B., Khalvati, M. y Schmidhalter, U. 2011. Quantification of mycorrhizal water uptake via high-resolution on-line water content sensors. *Plant and Soil*, vol. 342, p. 459-468. ISSN: 0032-079X.

195. Sánchez-Castro, I. 2009. Análisis de la estructura and diversidad de las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares asociados a plantas de especial interés ecológico en ambientes mediterráneos. *Tesis Presentada en Opción al Título de Doctor en Ciencias Biológicas*. Granada, España. 197 p.
196. Sanders, I. R. y Croll, D. 2010. Arbuscular mycorrhiza: the challenge to understand the genetics of the fungal partner. *Annual Review of Genetics*, vol. 44, p. 271-292. ISSN: 00664197.
197. Sato, T. y Maruyama, S. 2005. Seedling growth and dry-matter production under drained conditions in rice direct-sown into puddled and levelled soil. *Plant Production Science*, vol. 8, no. 2, p. 209-215. ISSN: 1343-943X.
198. Scheibe, R. y Beck, E. 2011. Drought, desiccation, y oxidative stress. In: *Plant Desiccation Tolerance, Ecological Studies*. U. Lüttge *et al.* (Eds.). # Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 209-231. ISBN: 978-3-642-19105-3.
199. Schüßler, A. y Walker, C. 2011. Evolution of the 'Plant-Symbiotic' Fungal Phylum, Glomeromycota. *Evolution of fungi and fungal-like organisms*. Chapter 7. *The Mycota XIV*. Pöggeler, S. y Wöstemeyer, J. (Eds.) © Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 163-185. ISBN: 78-3-642-19973-8.
200. Secilia, J. y Bagyaraj, D. J. 1994. Evaluation and first-year field-testing of efficient vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for inoculation of wetland rice seedlings. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 10, p. 381-384. ISSN: 1573-0972.
201. Shao, H. B., Chu, L. Y. y Wu, G. 2007. Changes of some antioxidative physiological indices under soil water deficits among 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes at tillering stage. *Biointerfaces*, vol. 54, p. 143-149. ISSN: 0927-7765.

202. Shao, H. B., Liang, Z. S. y Shao, M. A. 2005. Dynamic changes of antioxidative enzymes of 10 wheat genotypes at soil water deficits. *Biointerfaces*, vol. 42, p. 187-195. ISSN: 0927-7765.
203. Sharma, P. y Dubey, R. S. 2005. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regulation*, vol. 46, p. 209-221. ISSN: 0167-6903.
204. Sharma, S. S. y Dietz, K. J. 2006. The significance of amino acids and amino-acid derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany*, vol. 57, no. 4, p. 711-726. ISSN: 0022-0957.
205. Sheng, M., Tang, M., Chen, H., Yang, B., Zhang, F. y Huang, Y. 2008. Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mycorrhiza*, vol. 18, p. 287-296. ISSN: 0940-6360.
206. Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, vol. 58, no. 2, p. 221-227. ISSN: 0022-0957.
207. Sieverding, E., Alves da Silva, G., Berndt, R. y Oehl, F. 2014. *Rhizoglosum*, a new genus of the *Glomeraceae*. *Mycotaxon*, vol. 129, no. 2, p. 373 -386. ISSN: 2154-8889.
208. Silva-Robledo, H., Ortiz-Lizana, M. y Acevedo-Hinojosa, E. 2007. Relaciones hídricas y ajuste osmótico en trigo. *Agrociencia*, vol. 41, no. 1, p. 23-34. ISSN: 1405-3195.
209. Singh, J. C., van Dam. y Feddes, R. A. 2006. Análisis del agua: la productividad de los cultivos de regadío en Sirsa district, India. *Agricultural Water Management*, vol. 82, no. 3, p. 253-278. ISSN: 0378-3774.

210. Siopongco, J. D. L. C., Sekiya, K., Yamauchi, A., Egdane, J., Ismail, A. M. y Wade, L. J. 2008. Stomatal responses in rainfed lowland rice to partial soil drying, evidence for root signals. *Plant Production Science*, vol. 11, p. 28-41. ISSN: 1349-1008.
211. Siopongco, J. D. L. C., Sekiya, K., Yamauchi, A., Egdane, J., Ismail, A. M. y Wade, L. J. 2009. Stomatal responses in rainfed lowland rice to partial soil drying, comparison of two lines. *Plant Production Science*, vol. 12, p. 17-28. ISSN: 1349-1008.
212. Siqueira, J. O. y Franco, A. A. 1988. *Biotecnología do solo. Fundamento e perspectivas*. Brasilia: MEC-Ministerio de Educação, ABEAS; Lavras: ESAL, FAEPE. 236 p.
213. Smith, I. K. 1985. Stimulation of glutathione synthesis in photorespiring plants by catalase inhibitors. *Plant Physiology*, vol. 79, p. 1044-7. ISSN: 0032-0889.
214. Smith, S. E. y Read, D. J. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. 3rd eds. New York: Elsevier, Academic Press. 787 p. ISBN: 978-0-12-088775-0.
215. Smith, S. E., Facelli, E., Pope, S. y Smith, F. A. 2010. Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil*, p. 326:3-20. ISSN: 0032-079X.
216. Solaiman, M. Z. y Hirata, H. 1996. Effectiveness of arbuscular mycorrhizal colonization at nursery stage on growth and nutrition in wetland rice (*Oryza sativa* L.) after transplanting under different soil fertility and water regimes. *Soil Science and Plant Nutrition*, vol. 42, p. 561-571. ISSN: 0038-0768.
217. Solaiman, M. Z. y Hirata, H. 1997. *Glomus*-wetland rice mycorrhizas influenced by nursery inoculation techniques under high fertility soil conditions. *Biology and Fertility of Soil*, vol. 27, p. 92-96. ISSN: 0178-2762.

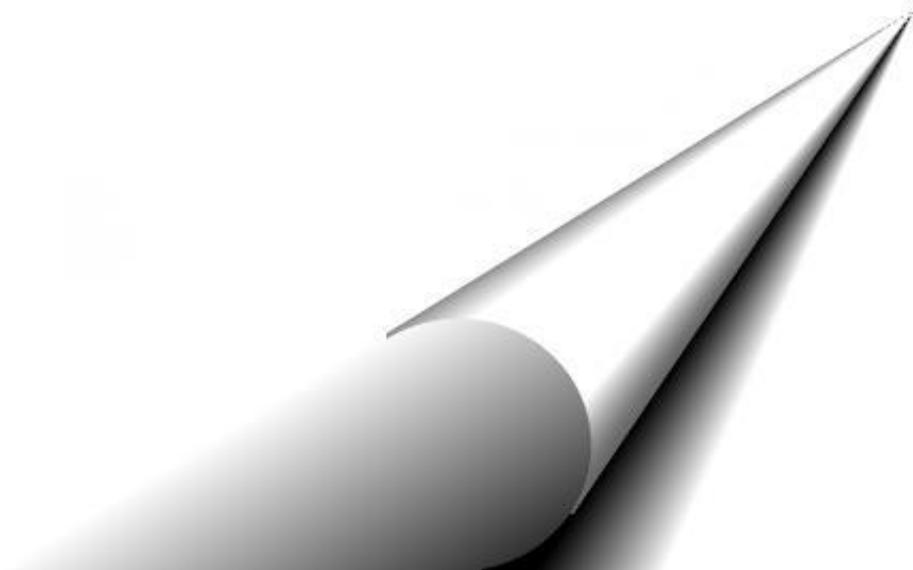
218. Song, X. J. y Matsuoka, M. 2011. Bar the windows: an optimized strategy to survive drought and salt adversities. *Genes and Development*, vol. 23, p. 1709-1713. ISSN: 0890-9369.
219. Srivalli, B., Sharma, G. y Khanna-Chopra, R. 2003. Antioxidative defense system in an upland rice cultivar subjected to increasing intensity of water stress followed by recovery. *Plant Physiology*, vol. 119, p. 503-512. ISSN: 0032-0889.
220. Suzuki, N., Shai, K., Ron, M. y Gad, M. 2012. ROS y redox signaling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell and Environment*, vol. 35, p. 259-270. ISSN: 0140-7791.
221. Taiz, L. y Zeiger, E. 2006. *Plant physiology*. Fourth edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts. 764 p. ISBN: 0-87893-856-7.
222. Torres-Franklin, M. L., Contour-Ansel, D., Zuily-Fodil, Y. y Pham-Thi, A. T. 2008. Molecular cloning of glutathione reductase cDNAs and analysis of GR gene expression in cowpea and common bean leaves during recovery from a moderate drought stress. *Journal of Plant Physiology*, vol. 165, no. 5, p. 514-521. ISSN: 0176-1617.
223. Trouvelot, A., Kough, J. y Gianinazzi-Pearson, V. 1986. Mesure du Taux de Mycorhization VA d'un Systeme Radiculaire. Recherche de Methodes d'Estimation ayant une Signification Fonctionnelle. *Proceedings of the 1st European Symposium on Mycorrhizae: Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*, Dijon, 1-5 July, 1985. (Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S., eds.). INRA, Paris. p. 217-222.
224. Vallino, M., Fiorilli, V. y Bonfante, P. 2014. Rice flooding negatively impacts root branching and arbuscular mycorrhizal colonization, but not fungal viability. *Plant Cell and Environment*, vol. 37, p. 557-572. ISSN: 0140-7791.

225. Vallino, M., Greppi, D., Novero, M., Bonfante, P. y Lupotto, E. 2009. Rice root colonization by mycorrhizal and endophytic fungi in aerobic soil. *Annals of Applied Biology*, vol. 154, p. 195-204. ISSN: 0003-4746.
226. Varma A. 2008. *Mycorrhiza. State of the art, genetics and molecular biology, eco-funcion, biotecnology, eco-physiology, structure and systematics*. Third Edition. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. ISBN: 978-3-540-78826-3.
227. Vendruscolo, E. C. G., Schuster, I., Pileggi, M., Scapim, C. A., Molinari, H. B. C., Marur, C. J. y Vieira, L. G. E. 2007. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *Journal of Plant Physiology*, vol. 164, no. 10, p. 1367-1376. ISSN: 0176-1617.
228. Venuprasad, R., Cruz, M. T. S., Amante, M., MaGcanua, R., Kumar, A. y Atlin, G. 2008. Response to two cycles of divergent selection for grain improving drought tolerance and yield potential yield under drought stress in four rice breeding populations. *Field Crops Research*, vol. 7, p. 232-244. ISSN: 0378-4290.
229. Volaire, F. 2003. Seedling survival under drought differs between and annual (*Hordeum vulgare*) and a perennial grass (*Dactylis glomerata*). *New Phytologist*, vol. 160, p. 501-510. ISSN: 0028-646X.
230. Vranova, E., Inzé, D. y Van Breusegem, F. 2002. Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, vol. 53, p. 1227-1236. ISSN: 0022-0957.
231. Wan, F. Z., Wang, Q. B., Kwon, S. Y., Kwak, S. S. y Su, W. A. 2005. Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide. *Journal of Plant Physiology*, vol. 162, p. 465-472. ISSN: 0176-1617.

232. Watanabe, S., Kojima, K., Ide, Y. y Satohiko, S. 2000. Effects of saline and osmotic stress on proline and sugar accumulation in *Populus euphratica* in vitro. *The Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 63, no. 3, p. 199-206. ISSN: 0167-6857.
233. Wen, X. P., Ban, Y., Inoue, H., Matsuda, N. y Moriguchi, T. 2010. Spermidine levels are implicated in heavy metal tolerance in a spermidine synthase overexpressing transgenic European pear by exerting antioxidant activities. *Transgenic Research*, vol. 19, p. 91-103. ISSN: 0962-8819.
234. Wopereis, M. C. S., Kropff, M. J., Maligaya, A. R. y Tuong, T. P. 1996. Drought-stress responses of two lowland rice cultivars to soil water status. *Field Crops Research*, vol. 46, p. 21-39. ISSN: 0378-4290.
235. Wu, Q. S. y Zou, Y. N. 2009. Mycorrhiza has a direct effect on reactive oxygen metabolism of drought-stressed citrus. *Plant Soil and Environment*, vol. 55, p. 436-442. ISSN: 1214-1178.
236. Wu, Q. S., Xia, R. X. y Zou, Y. N. 2006. Reactive oxygen metabolism in mycorrhizal and non-mycorrhizal citrus (*Poncirus trifoliata*) seedlings subjected to water stress. *Journal Plant Physiology*, vol. 163, p. 1101-1110. ISSN: 0176-1617.
237. Xu, Z. Z. y Zhou, G. S. 2007. Photosynthetic recovery of a perennial grass *Leymus chinensis* after different periods of soil drought. *Plant Production Science*, vol. 10, no. 3, p. 277-285. ISSN: 1343-943X.
238. Yang, J. y Zhang, J. 2006. Grain filling of cereals under soil drying. *New Phytologist*, vol. 169, no. 2, p. 223-236. ISSN: 0028-646X.

239. Yang, Jian-Chang; Liu, Kai; Zhang, Shen-Feng; Wang, Xue-Ming; Wang, Zhi-Qin y Liu, Li-Jun. 2008. Hormones in rice spikelets in responses to water stress during meiosis. *Acta Agronómica Sinica*, vol. 34, no. 1, p. 111-118. ISSN: 0496-3490.
240. Yoshida, S. 1981. *Fundamentals of rice crop science*. The International Rice Research Institute. Los Baños, Laguna, Philippines. P.O. Box 933, Manila, Philippines. 277 p.
241. Yoshida, S., Kameoka, H., Tempo, M., Akiyama, K., Umehara, M., Yamaguchi, S., Hayashi, H., Kyojuka, J. y Shirasu K. 2012. The D3 F-box protein is a key component in host strigolactone responses essential for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, p. 1-9. ISSN: 0028-646X.
242. Zhu, J. K., Scumaker, K. S. y Xiong, L. 2002. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *The Plant Cell*, vol. 14, p. 165-183. ISSN: 1532-298X.
243. Zubarer, M. A., Chowdhury, A. K. M. M. B., Islam, M. Z., Ahmed, T. y Hasan, M.A. 2007. Effects of water stress on growth and yield attributes of Aman rice genotypes. *International Journal of Sustainable Crop Production*, vol. 2, no. 6, p. 25-30. ISSN: 1991-3036.

ANEXOS



ANEXOS

Anexo 1. Principales características de la variedad comercial `INCA LP-5`.

| Carácter | | Clasificación |
|--|---------------------|---------------|
| Duración del Ciclo (días) | Época poco lluviosa | 128 |
| | Época lluviosa | 110 |
| La altura final de la planta (cm) | | 88,6 |
| Granos llenos por panícula | | 86,0 |
| Granos vanos por panícula | | 8,1 |
| Masa seca de 1000 granos (g) | | 29,5 |
| Rendimiento agrícola (t ha ⁻¹) | Época poco lluviosa | 7,6 |
| | Época lluviosa | 6,9 |

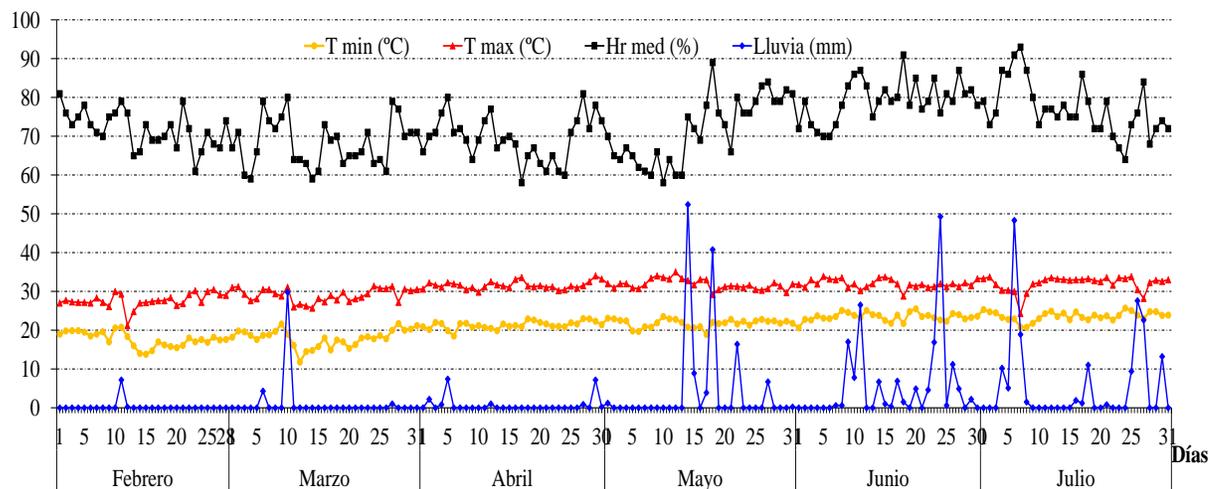
Fuente: Pérez, N. y Castro R. I. 2000. A new short cycle rice variety: `INCA LP-5`. *Cultivos Tropicales*, vol. 21, no. 4, p. 55. ISSN: 1819-4087.

Anexo 2. Composición de la solución nutritiva de Hoagland aplicada.

| Compuesto | Solución (g L⁻¹) | Para 1 litro |
|---|------------------------------------|---------------------|
| KNO ₃ | 50,50 | 5 mL |
| KH ₂ PO ₄ | 13,61 | 5 mL* |
| Ca(NO ₃) ₂ | 118,10 | 5 mL |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | 49,30 | 5 mL |
| H ₃ BO ₃ | 28,57 | 50 µL |
| MnCL ₂ | 18,10 | 50 µL |
| ZnSO ₄ 7H ₂ O | 2,18 | 50 µL |
| CuSO ₄ 5H ₂ O | 0,79 | 50 µL |
| (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ | 0,24 | 50 µL |
| EDTA FeNa | 50,55 | 500 µL |

*Para los tratamientos con micorrizas se aplicó el 25 % de KH₂PO₄ (1,25 mL).

Anexo 3. Comportamiento de las variables meteorológicas diarias (febrero a julio de 2011).



Comportamiento de las variables meteorológicas (febrero a julio de 2011), promedios mensuales

| Meses | Temperaturas (°C) | | | Precipitaciones (mm) | Hr media (%) |
|----------------|-------------------|-------|--------|----------------------|--------------|
| | mínima | media | máxima | | |
| Febrero | 18,4 | 23,0 | 27,6 | 0,00 | 61 |
| Marzo | 18,7 | 23,8 | 28,9 | 11,70 | 67 |
| Abril | 22,0 | 26,8 | 31,5 | 2,81 | 72 |
| Mayo | 22,9 | 27,3 | 31,7 | 20,60 | 76 |
| Junio | 24,3 | 28,1 | 31,9 | 9,38 | 79 |
| julio | 24,6 | 28,2 | 31,9 | 12,74 | 83 |

Leyenda: Humedad relativa (Hr)