



INCA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

Respuesta del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo estrés salino a la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares adaptados a esta condición

Tesis presentada en opción al Título Académico de Máster en Nutrición de las Plantas y Biofertilizantes

Aspirante: Laura R. Medina García
Tutores: Ms.C. Yakelin Rodríguez Yon
Dr.C. Pedro Rodríguez Hernández

La Habana
2010



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

Respuesta del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo estrés salino a la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares adaptados a esta condición

Tesis presentada en opción al Título Académico de Máster en Nutrición de las Plantas y Biofertilizantes

Aspirante: Laura R. Medina García
Tutores: Ms.C. Yakelín Rodríguez Yon
Dr.C. Pedro Rodríguez Hernández

La Habana
2010

A mis padres por quien soy

A mi abuela Eneida por lo mejor de lo que soy

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas por contribuir a mi formación profesional.

A mis tutores la MsC Yakelin Rodríguez Yon y el Dr Pedro Rodríguez Hernández no solo por su asesoría y consejo sino también por su dedicación y apoyo incondicional en realización de este trabajo.

Al colectivo de investigadores, especialistas y técnicos del Laboratorio de Micorrizas del INCA que tanto me ayudaron y además soportaron tanto las alegrías, como las lágrimas y el mal humor.

A los técnicos, investigadores y especialistas del Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas.

Al Proyecto Alba “Empleo de productos bioactivos como alternativa para el incremento de la tolerancia de las plantas al estrés abiótico” y en especial al Dr. Luis Miguel Mazorra por dedicarme tanto su tiempo de trabajo como mucho de su tiempo libre para que se pudieran lograr los análisis bioquímicos de este trabajo.

A todos los que en algún momento me regaron los cubos o me ayudaron en mil pequeñas cosas sin las cuales no hubieran sido posibles estos resultados.

A mis padres por las mil razones que se mencionan siempre y además por ser los responsables de todo lo bueno que haya podido lograr hasta este momento y a mi familia entera que a pesar de no entender de “micorrizas” siempre estuvieron a mi lado.

A Michel por todo el amor y la paciencia con que ha soportado estos tiempos de maestría.

A todos.....Muchas Gracias

RESUMEN

Con el objetivo de determinar la efectividad de cepas de HMA, nativas de suelos con altos contenidos de sales, sobre el comportamiento de plantas de tomate en condiciones de estrés salino, se desarrolló la presente investigación en la zona de Las Caobas en la provincia de Holguín y en las áreas experimentales del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), en San José de las Lajas, La Habana. En un primer experimento se aislaron, caracterizaron y multiplicaron cepas de HMA nativas de la zona afectada por altos contenidos de sales en la provincia de Holguín. En un segundo ensayo, empleando el tomate (*Solanum lycopersicon* L.) como planta indicadora, se evaluó la efectividad del conglomerado aislado de las cepas en estudio sobre algunos indicadores fisiológicos y bioquímicos, en plantas de tomate sometidas a estrés salino y se caracterizó la respuesta nutricional del cultivo a la inoculación con estas cepas. Los tratamientos se distribuyeron en un diseño completamente aleatorizado con arreglo bifactorial (3 x 3), donde los factores estudiados fueron las cepas de HMA y los niveles de salinidad. Como material fúngico se empleó un conglomerado de las 28 cepas nativas obtenidas al reproducir las especies encontradas en el suelo afectado por altos contenidos de sales, un inóculo certificado a base de cepas de *Glomus hoi*-like proveniente del cepario del Laboratorio de Micorrizas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, y la composición de cepas nativas que existían en el sustrato de origen. Los tratamientos salinos fueron impuestos a partir de diferentes concentraciones de NaCl en el agua del riego: 0, 50 y 100 mM. Los resultados mostraron que los suelos estudiados, con altos contenidos de sales, presentaban una alta diversidad de hongos micorrízicos arbusculares, encontrándose en ellos 28 morfotipos de HMA, muchos de los cuales pueden considerarse como potenciales especies nuevas. Bajo condiciones de estrés salino, el conglomerado compuesto por las especies aisladas, fue efectivo en la colonización de las raíces de tomate incrementando la producción de biomasa, así como provocando cambios positivos a nivel celular en la inducción de sistemas antioxidantes e incrementando la eficiencia en la absorción de nutrientes por el cultivo.

ÍNDICE

I- INTRODUCCIÓN	1
II- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 La salinidad	4
2.1.1 Origen y localización de los procesos degradativos ocasionados por las sales	4
2.1.2 Salinización secundaria del suelo	5
2.2 Las plantas y la salinidad del suelo	6
2.2.1 Absorción de agua	6
2.2.2 Absorción de iones	7
2.2.3 Efectos nutricionales	7
2.3 Los hongos micorrízicos arbusculares	9
2.3.1 Clasificación de los HMA	9
2.3.2 Identificación morfológica	10
2.3.3 Establecimiento de la simbiosis micorrízica	11
2.3.4 Beneficios que reportan los HMA a los cultivos y al suelo	13
2.3.5 Efectos sobre las plantas sometidas a estrés	16
2.3.5.1 Estrés hídrico	16
2.3.5.2 Estrés salino	17
2.4 El tomate y la salinidad del suelo	19
2.4.1 Uso de los HMA como una alternativa para la producción de tomate en condiciones salinas	21
2.5 Inóculos mixtos	22
III- MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1 Aislamiento e identificación de cepas nativas de HMA provenientes de suelos con alto contenido de sales	24
3.1.2 Análisis del suelo	24
3.1.3 Extracción y cuantificación de esporas	25
3.1.4 Propagación de esporas	25
3.1.5 Identificación morfológica de las esporas	26
3.2 Efectividad de diferentes cepas de HMA en plantas de tomate sometidas a estrés salino	27
3.2.1 Características generales del experimento	28
3.3 Determinaciones realizadas	30

3.3.1 Indicadores micorrízicos	30
3.3.2 Indicadores fisiológicos del crecimiento y desarrollo	31
3.3.3 Indicadores bioquímicos	33
3.3.4 Indicadores nutricionales	35
3.4 Análisis estadístico	36
IV- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
4.1 Experimento I: Aislamiento e identificación de cepas nativas de HMA provenientes de suelo salino	37
4.2 Experimento II: Efectividad de diferentes cepas de HMA en plantas de tomate sometidas a estrés salino	50
4.2.1 Indicadores micorrízicos	50
4.2.2 Indicadores fisiológicos del crecimiento y desarrollo	54
4.2.3 Indicadores bioquímicos	61
4.2.4 Efectos nutricionales	65
4.3 Consideraciones generales	71
V- CONCLUSIONES	74
VI- RECOMENDACIONES	75
VII- REFERENCIAS	76

I- INTRODUCCIÓN

En la naturaleza las plantas se encuentran expuestas a muchas condiciones de estrés que retardan su desarrollo y disminuyen sus rendimientos. Uno de los problemas agrícolas más extendidos es la acumulación de sales en la superficie del suelo (Cano *et al.*, 1998). La salinidad afecta completamente un tercio de las tierras bajo riego en áreas con escasez de agua, altas temperaturas, alta evapotranspiración o cuando se practica un manejo de riego deficiente por parte de los agricultores. Además, con la disminución de las fuentes de agua disponibles, usar aguas salinas para el riego es casi inevitable (Alrahman *et al.*, 2005).

En general, la salinidad inhibe el crecimiento de las plantas y su productividad. La alta salinidad induce desequilibrios en las relaciones osmóticas entre el suelo y las plantas y en el metabolismo de estas. Existen un grupo de factores que aumentan la tolerancia de las plantas a la salinidad, la incorporación o aplicación de estos puede facilitar a las plantas una mejor resistencia al estrés salino y pueden ayudar a mejorar la productividad de cultivos bajo estas condiciones (Ashraf y Foolad, 2006; Ghazi y Al-Karaki, 2008).

La tolerancia al estrés en la plantas es un fenómeno complejo que involucra numerosos cambios a nivel bioquímico y fisiológico. Sin embargo, los mecanismos detrás de la tolerancia al estrés parecen estar afectados por la colonización de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) (Al-Karaki, 2000).

La simbiosis micorrízica arbuscular es el resultado evidente de la interacción entre las raíces de las plantas y un hongo y es un excelente ejemplo de las extensas alteraciones morfológicas que las raíces experimentan con el fin de acomodarse a la presencia de un simbiote. Los HMA reciben fotosintatos de la planta, mientras que esta mejora su habilidad para la toma de nutrientes y agua a la vez que mejora la tolerancia al estrés tanto abiótico como biótico (Ruíz-Lozano y Azcón, 1996; Rabie y Almadini, 2005).

Varios estudios han demostrado que la inoculación con estos hongos mejora el crecimiento de las plantas bajo estrés salino (Tian *et al.*, 2004; Choa *et al.*, 2006; Ghazi y Al-Karaki, 2008). Esto puede ser atribuido al incremento en la adquisición de nutrientes minerales como P, Zn, Cu y Fe. También existen indicios de que los HMA protegen el metabolismo de las hojas de la toxicidad por Na (Yano-Melo *et al.*, 2003; Giri y Mukerji, 2004).

Según Ruiz-Lozano y Azcón (1996) y Azcón y Tobar (1998), el estrés ambiental induce distintos tipos de respuestas en las plantas, que provocan la generación de compuestos que pueden llegar a ser tóxicos, tales como especies reactivas de oxígeno, las cuales, si están en exceso y no son eliminadas del sistema radical o del foliar de la planta, pueden dañar permanentemente estructuras básicas para el mantenimiento de las funciones celulares normales. Sin embargo, la presencia de enzimas y metabolitos antioxidantes le permite a la célula vivir en condiciones de estrés oxidativo (Maldonado y Pahlich, 2004).

Se plantea que, en condiciones de estrés salino, las plantas que se encuentran micorrizadas desarrollan mecanismos antioxidantes que las hacen menos sensibles a esta condición desfavorable y, por lo tanto, presentan mejores condiciones adaptativas para su desarrollo que aquellas no micorrizadas (Azcón y Tobar, 1998).

Aunque la asociación micorrízica arbuscular ha sido definida generalmente como inespecífica, McGonigle y Fitter (1990) señalaron que el comportamiento de las poblaciones de HMA es modulado por diversos factores ambientales que pueden influir sobre su comportamiento, y existe evidencia que estas asociaciones presentan “especificidad ecológica”, la cual consiste en la posibilidad de encontrar en un inóculo mixto o bajo condiciones nativas un tipo particular de HMA que colonice preferentemente a un hospedero (Tuinen *et al.*, 1998).

El conocimiento de las interacciones entre distintas especies de HMA y las condiciones edáficas lleva al establecimiento de poblaciones mejor adaptadas y más efectivas que garanticen los beneficios de la asociación simbiótica (Plenchette y Fortin, 2009).

Como se ha observado, el estrés salino afecta el crecimiento de la planta, y los efectos de la salinidad en la actividad metabólica de esta pueden cambiar de acuerdo al uso de los HMA, por lo que se hace necesario realizar estudios que profundicen en la selección de cepas efectivas de HMA para mejorar el desarrollo de las plantas bajo condiciones de estrés.

Atendiendo a los aspectos anteriormente descritos se plantea en el presente estudio la siguiente **hipótesis**:

La inoculación con cepas de HMA nativas de suelos con altos contenidos de sales produce respuestas más efectivas en plantas de tomate bajo condiciones de estrés salino.

Para corroborar la hipótesis se trazó como **objetivo general**:

Determinar la efectividad de cepas de HMA nativas de suelos con altos contenidos de sales, sobre el comportamiento de plantas de tomate en condiciones de estrés salino.

Y los siguientes **objetivos específicos**:

1. Aislar, caracterizar y multiplicar cepas de HMA nativas de una zona afectada por altos contenidos de sales en la provincia de Holguín.
2. Evaluar la efectividad del conglomerado aislado de las cepas en estudio, sobre algunos indicadores fisiológicos y bioquímicos en plantas de tomate sometidas a estrés salino.
3. Caracterizar la respuesta nutricional del tomate bajo estrés salino a la inoculación con las cepas en estudio.

II- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 La salinidad

Entre las condiciones adversas de los sistemas agrícolas, la salinidad es el factor que más ha influido sobre el establecimiento de las poblaciones humanas y existen registros históricos de migraciones provocadas por la salinización del suelo cultivable (James *et al.*, 1982).

Esta se ha convertido en un gran problema para la agricultura mundial, y su extensión crece anualmente a razón de 3 ha.min⁻¹ (Mashaly, 1999). Por su parte, Hussein y Hamdi (1990) coincidieron que la salinidad es un serio problema para la agricultura, fundamentalmente para las regiones áridas y semi-áridas, y que cerca del 40 % de las tierras a nivel mundial pueden ser caracterizadas como fuertemente salinas. A su vez, Cordovilla *et al.* (1994) plantearon que muchas de estas áreas están distribuidas, en lo fundamental, en las regiones tropicales.

En el año 2006, en Cuba se reportó que el 14,9 % de las áreas agrícolas se encontraban afectadas por esta problemática, estando involucradas la mayoría de las áreas que se dedican a la producción de cultivos importantes para la alimentación humana y animal (ONE, 2006).

2.1.1 Origen y localización de los procesos degradativos ocasionados por las sales

El origen de los distintos tipos de sales en el suelo puede ser muy diverso, pudiendo ser, de manera general, de origen natural o antrópico.

Los suelos con problemas de salinidad se localizan en lugares donde la evaporación es mayor que las precipitaciones (Feign, 1985). Es por ello que las áreas climáticas más afectadas por las sales son las que se encuentran en zonas áridas, semiáridas y las estepas, zonas donde la evaporación es dominante.

Los factores que tienen mayor influencia en la formación de los suelos salinos son: topografía, actividad biológica, condiciones climáticas; procesos geomorfológicos de sedimentación, erosión, redistribución de materiales; así como cambios en la hidrología superficial y subterránea, además de las acciones humanas tales como: la labranza, el riego con agua de mala calidad y la fertilización química (Pessarakli, 1994; Francois y Maas, 1993; Matson, 1997).

El riego con aguas que contienen sales tiene un efecto inevitable en el incremento de la concentración de sales en la zona radical de las plantas (Pendergast, 1993); lo anterior depende de varios factores que incluyen la cantidad y calidad del agua de riego aplicada, el método de riego y un drenaje adecuado (Pessarakli, 1994; Noborio y McInnes, 1993; Lax *et al.*, 1994).

2.1.2 Salinización secundaria del suelo

Los problemas por salinidad que aparecen cuando se concentran sales solubles procedentes del regadío en suelos productivos, se denominan salinización secundaria. La misma es provocada fundamentalmente por los efectos del regadío, el uso de aguas de mala calidad, el drenaje restringido, la baja permeabilidad del suelo y el mal uso de la fertilización (Mashaly, 1999).

Durante mucho tiempo se tuvo el criterio que la salinización secundaria no era un problema en los suelos tropicales, ya que por las características del clima este proceso no ocurre. No obstante, la incidencia de este fenómeno, sobre todo en regiones de clima tropical subhúmedo, demuestran lo contrario (Hernández *et al.*, 2006a)

La actividad antrópica ha incrementado la extensión de áreas salinizadas al ampliarse las zonas de regadío con el desarrollo de grandes proyectos hidrológicos, que han provocado cambios en el balance de agua y sales de los sistemas hidrogeológicos. La proporción de suelos afectados por salinidad se cifra en un 10 % del total mundial, y se estima que entre un 25 y 50 % de las zonas de regadío están salinizadas (Rhoades *et al.*, 1992).

En Cuba se ha observado que, independientemente de las condiciones climáticas existentes, el uso del riego sin tomar en consideración las características del suelo, su origen, régimen de lluvias, evapotranspiración, calidad del agua de riego entre otras, puede acarrear procesos de degradación muy negativos (Hernández *et al.*, 2006a). Un ejemplo lo constituye la utilización de riego en épocas de seca sin las medidas adecuadas de drenaje que afectó principalmente a las llanuras orientales del país, perjudicando los rendimientos de la caña de azúcar, arroz y otros cultivos (Hernández, 1996).

2.2 Las plantas y la salinidad del suelo

El efecto más común de la salinidad sobre las plantas es la reducción del desarrollo debido a: una disminución del potencial osmótico del medio y, en consecuencia, del potencial hídrico del suelo; una toxicidad específica, normalmente asociada con la absorción excesiva de Na^+ y de Cl^- ; un desequilibrio nutricional debido a la interferencia de los iones salinos con los nutrientes esenciales; y la combinación de los efectos antes indicados. Como consecuencia de estos efectos primarios, a menudo ocurren otros estreses secundarios, como el daño oxidativo (Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2000).

2.2.1 Absorción de agua

Uno de los efectos más evidentes del estrés salino es la reducción en la capacidad de absorción de agua, que se puede manifestar como los efectos del estrés hídrico: reducción de expansión foliar y pérdida de turgencia (Bray *et al.*, 2000).

Una célula vegetal expuesta a un medio salino equilibra su potencial hídrico perdiendo agua, lo que produce la disminución del potencial osmótico y del de turgencia. Esta situación genera señales químicas (aumento del Ca^{2+} libre intracelular, síntesis de ABA, etc.) que desencadenan posteriores respuestas adaptativas (Hasegawa *et al.*, 2000).

Los cambios macroscópicos que se observan bajo condiciones de salinidad, como reducción del área foliar y de la relación parte aérea/raíz, entre otros cambios

también reflejan el ajuste necesario para recuperar el balance hídrico (Chinnusamy *et al.*, 2005).

2.2.2 Absorción de iones

En un suelo salino, la elevada concentración de iones Na^+ y Cl^- (o SO_4^{2-}), produce una interferencia en la absorción de nutrientes (K^+ , Ca^{2+} , NO_3^-) e impide la captación de los mismos, al tiempo que pueden alcanzar niveles citosólicos tóxicos para el metabolismo celular (Marschner, 1995).

La raíz, como principal órgano de absorción de agua e iones, tiene gran importancia en la respuesta a corto y largo plazo al estrés salino. En este órgano se sintetiza ácido abscísico (ABA), una de las señales tempranas de estrés capaz de producir cambios fisiológicos locales (conductividad hidráulica) y a distancia (cierre estomático) (Hartung *et al.*, 2002). Las características anatómicas y morfológicas de la raíz pueden tener gran influencia en la capacidad de adaptación a la salinidad (Reinhardt y Rost, 1995; Maggio *et al.*, 2001).

2.2.3 Efectos nutricionales

La presencia en la solución del suelo de iones salinos, a partir de un determinado nivel crítico de concentración, origina un desplazamiento del equilibrio nutricional mineral de las plantas. Este efecto se produce de dos maneras:

1. La fuerza iónica del suelo tiene un efecto directo sobre la absorción y translocación de nutrientes. Una evidencia de este efecto es que la salinidad induce una absorción y acumulación de fósforo en ciertas especies. Este es un efecto osmótico y se presenta independientemente del tipo de sal utilizado (Kafkafi, 1991).
2. El mecanismo más común por el que la salinidad altera la nutrición mineral de las plantas es por la interacción directa del Cl^- y el Na^+ sobre la absorción y translocación de nutrientes dentro de la planta (Marschner, 1995).

Numerosos estudios muestran que la concentración de K^+ en la planta, disminuye al aumentar la salinidad o la relación Na^+/Ca^{2+} en el suelo (Okusanaya y Ungar, 1984; Cramer *et al.*, 1985; Janzen y Chang, 1987; Subbarao *et al.*, 1990).

La reducción en la absorción de K^+ en la planta por el Na^+ es un proceso competitivo. Aunque las plantas tienen una selectividad alta de K^+ con respecto a Na^+ , cantidades excesivas de K^+ pueden tener un efecto negativo sobre las plantas (Rush y Epstein, 1981). Quizás por ello, a pesar de los numerosos estudios que indican la disminución en la absorción y translocación de K^+ en las plantas cultivadas en sustratos donde predomina el Na^+ , hay pocos datos que demuestren que la adición de K^+ en dichas condiciones mejore el desarrollo de las plantas (Muhammed *et al.*, 1987).

Además de este clásico desequilibrio iónico, una disminución de la concentración de NO_3^- en la planta en condiciones salinas ha sido ampliamente documentada en distintas condiciones experimentales y con diferentes especies vegetales (Torres y Bingham, 1973; Helal *et al.*, 1975; Kafkafi *et al.*, 1982; Aslam *et al.*, 1984; Ward *et al.*, 1986; Feigin *et al.*, 1987, Silberbush y Ben-Asher, 1987; Klobus *et al.*, 1988; Martínez y Cerdá, 1989). Sin embargo, a pesar de la drástica reducción de la concentración de NO_3^- en la hoja como respuesta a la salinidad, aumentan (o al menos no disminuyen) diversas fracciones nitrogenadas como el contenido en prolina, betaínas y aminoácidos o proteínas solubles totales (Gorham *et al.*, 1986).

Por otra parte, se ha comprobado que el NaCl puede también inducir toxicidad de fósforo en algunas especies como maíz (Bernstein, 1975; Nieman y Clark, 1976), ciertas variedades de soja (Grattan y Maas, 1984) y lupino (Treby y van Steveninck, 1988).

En condiciones salinas también pueden surgir problemas con la disponibilidad de micronutrientes, aunque la influencia de la salinidad sobre las concentraciones de los mismos en las plantas depende tanto de la planta como del micronutriente considerado (El-Motaium *et al.*, 1994; Wimmer *et al.*, 2001).

2.3 Los hongos micorrízicos arbusculares

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son simbioses de las raíces de las plantas que pueden ser considerados la piedra angular del mutualismo en los ecosistemas terrestres (Öpik *et al.*, 2008)

La simbiosis micorrízica representa una relación muy antigua. Hifas y arbusculos han sido reportados en fósiles provenientes del período Devónico temprano y estudios moleculares sugieren la presencia de Glomales alrededor de 350-460 millones de años atrás, evolucionando conjuntamente con las plantas que iban conquistando la Tierra (Mohammadi *et al.*, 2008).

Las micorrizas arbusculares han sido ampliamente descritas como favorecedoras del crecimiento vegetal (Smith y Read, 2008c). La colonización micorrízica produce cambios físicos, bioquímicos y fisiológicos en las raíces que conducen a un mejor estado general de la planta y contribuyen a aliviar las situaciones de estrés de carácter abiótico (metales pesados, salinidad) y bióticos (ataques de patógenos, cambios microbianos en la rizosfera) (Barea y Jeffries, 1995).

2.3.1 Clasificación de los HMA

Los HMA fueron ubicados inicialmente en la división Eumycota y la clase de los Zygomycetos (hongos con micelio cenocítico, sin septos, cuyo principal componente estructural de la pared celular es la quitina) (Morton y Benny, 1990). Su clasificación se basó en características morfológicas de la pared de las esporas (asexuales) producidas por estos hongos. Este tipo de clasificación permitió describir lo que se denomina morfoespecies fúngicas (Schenk y Pérez, 1990).

Anteriormente, la clasificación de las especies se basó en el estudio de las esporas en función de su pared y grupos o capas que las conforman (Walker, 1992) pero a partir de la última década, la biología molecular ha representado una herramienta valiosa y viable en la clasificación de las especies de los hongos formadores de este tipo de micorriza (Calvente *et al.*, 2004), así como en la

identificación de las moléculas orgánicas que intervienen en la estimulación e inhibición de la germinación de esporas y en el establecimiento de los hongos micorrízicos arbusculares en la planta hospedante (Bago *et al.*, 2000; Noval, 2008).

Basados tanto en las técnicas taxonómicas tradicionales como en los métodos moleculares se reconocen hasta el momento 4 órdenes, 13 familias, 19 géneros y 214 especies de HMA (**Figura 1**).

phylum
Glomeromycota

clase
Glomeromycetes

orden (4)	familia (13)	genero (19)	no. especies (214)
<i>Glomerales</i>	<i>Glomeraceae</i>	<i>Glomus</i>	105
<i>Diversisporales</i>	<i>Gigasporaceae</i>	<i>Gigaspora</i>	9
	<i>Scutellosporaceae</i>	<i>Scutellospora</i>	10
	<i>Racocetraceae</i>	<i>Racocetra</i> & <i>Cetraspora</i>	9 & 5
	<i>Dentiscutataceae</i>	<i>Dentiscutata</i> & <i>Fuscutata</i> & <i>Quatunica</i>	7 & 4 & 1
	<i>Acaulosporaceae</i>	<i>Acaulospora</i> & <i>Kuklospora</i>	34 & 2
	<i>Entrophosporaceae</i>	<i>Entrophospora</i>	2
	<i>Pacisporaceae</i>	<i>Pacispora</i>	7
	<i>Diversisporaceae</i>	<i>Diversispora</i>	4 & 1
<i>Paraglomerales</i>	<i>Paraglomeraceae</i>	<i>Paraglomus</i>	3
<i>Archaeosporales</i>	<i>Geosiphonaceae</i>	<i>Geosiphon</i>	1
	<i>Ambisporaceae</i>	<i>Ambispora</i>	8
	<i>Archaeosporaceae</i>	<i>Archaeospora</i> & <i>Intraspora</i>	1 & 1

Figura 1. Clasificación actual de los HMA (*Glomeromycota* TAXONOMY, 2009)

2.3.2 Identificación morfológica

Las características morfológicas, macro y microanatómicas, forman las bases para la identificación y taxonomía del hongo. La diversidad de los HMA puede ser explorada en otros niveles por los estudios de las características de las esporas

asi como de las características de la ultraestructura y el diseño de la colonización radical (Schonbeck y Raschen, 1995).

La identificación tradicional de los HMA está basada exclusivamente en la descripción morfológica de los diferentes tipos de esporas. Muchas especies nuevas han sido reportadas desde la revisión de la historia de la familia *Endogonaceae* (Peterson y Farquhar, 1994).

Dentro de las características morfológicas más notorias de los HMA se encuentran el tamaño, el color y la forma de las esporas, estas de tamaño grande, entre 20 y 500 μm según la especie; su forma puede ser globosa, elíptica, ovoide, reniforme, claviforme o irregular, además de poseer una gran gama de colores que ayuda también a su identificación. Algunas especies forman esporocarpos, mientras que otras forman esporas solas, ya sea en el interior o exterior de la raíz (Almeida *et al.*, 1987; Reddell *et al.*, 1997).

La diversidad ontogénica es considerada como el diagnóstico en la diferenciación de dos géneros; esta abarca la dilucidación y descripción detallada del proceso de formación de esporas basada en el reconocimiento de taxa morfológicamente similares, el cual sólo se conoce en unas cuantas especies (Schenck y Pérez, 1990; Giovannetti y Gianiniazzi-Pearson, 1994).

La germinación es una parte integral del ciclo de vida del HMA y sus características tienen gran importancia en la taxonomía, siendo usado por ejemplo para distinguir entre el género *Gigaspora* y *Scutellospora* (Shenck y Pérez, 1990; Giovannetti y Gianiniazzi-Pearson, 1994).

2.3.3 Establecimiento de la simbiosis micorrízica

El proceso de colonización de plantas hospederas por HMA está caracterizada por distintas etapas (**Figura 2**), que comprenden una serie de complejos cambios morfogenéticos en el hongo y culmina con múltiples beneficios a la planta

hospedera en la adquisición de nutrientes, resistencia al estrés, tolerancia a los patógenos, entre otros (Juge *et al.*, 2009).

Los HMA son capaces de colonizar las células corticales y epidérmicas de las raíces pero no de atravesar el sistema vascular de estas. Los estadios morfológicos del desarrollo de la colonización son variables, dependiendo principalmente de la planta involucrada. Por lo general, la hifa del hongo crece desde una espora que se encuentra en el suelo o en la raíz de una planta adyacente, hasta hacer contacto con la superficie de una raíz, donde se diferencia para formar un apresorio, siendo este el primer indicio de reconocimiento entre el hongo y la planta. Después de la germinación, la hifa sigue un crecimiento lineal con una fuerte dominancia apical. Esta presenta gruesas paredes, entre 5 y 10 μm de ancho, sin septo y multinucleada (Smith y Read, 2008a).

La penetración de la raíz ocurre por la vía del apresorio y el hongo comúnmente accede a la planta a través de dos células epidérmicas. Una vez dentro de la raíz, puede producir enrollamientos en las paredes de las células subepidérmicas seguido de un crecimiento hacia el interior del córtex de la raíz. Al alcanzar el interior del córtex, las hifas se ramifican y penetran las paredes de las células corticales diferenciándose y formando estructuras conocidas como arbuscúlos. A pesar de atravesar las paredes celulares, los arbuscúlos no afectan la membrana plasmática, se invaginan y desarrollan alrededor de ella formando un nuevo compartimento apoplástico. Aquí el simbionte se encuentra en íntimo contacto con la planta, separado solo por sus membranas. Esta interfase asume el rol de sitio de intercambio de compuestos carbonados, nutrientes y agua entre el hongo y la planta y es generalmente conocido como la estructura clave en la simbiosis (Giovannetti *et al.*, 2004).

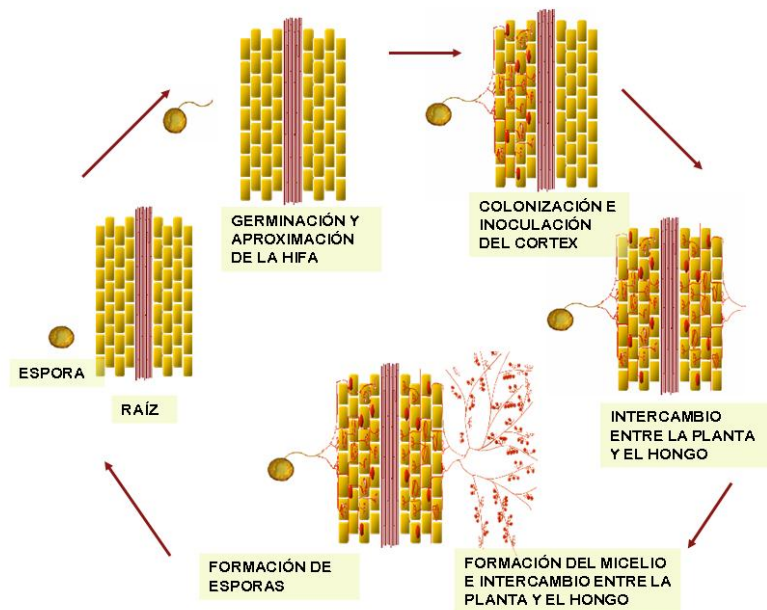


Figura 2. Esquema representativo del ciclo de vida de los HMA (Tapia, 2003)

2.3.4 Beneficios que reportan los HMA a los cultivos y al suelo

-Principales efectos sobre la nutrición vegetal

La contribución de los HMA a la toma de nutrientes por parte de la planta está principalmente relacionada con la adquisición de nutrientes (especialmente fósforo) del suelo por las hifas extrarradicales del hongo, fundamentalmente las que no se encuentran cercanas a la raíz, teniendo un efecto significativo en el crecimiento y desarrollo de la planta (Smith y Read, 2008b).

Las hifas de los hongos son funcionalmente análogas a los pelos radicales, siendo su diámetro muy similar, pero la densidad por unidad de longitud de las hifas es de 10 a 100 veces mayor que la de la raíz, lo cual extiende la efectividad de absorción de las plantas micorrizadas más allá de la zona cercana a la raíz donde los nutrientes pueden escasear.

La gran densidad hifal no tiene igual significación para la toma de todos los iones del suelo, siendo más importante para iones con menor coeficiente efectivo de

difusión en el suelo como el H_2PO_4^- . La evidencia sugiere que los HMA producen fosfatasa extracelular, solubilizando fosfato orgánico para su absorción (Koide y Kabir, 2000).

-El Nitrógeno

Las micorrizas arbusculares aparentemente no desempeñan un papel importante en cuanto a la absorción directa del nitrógeno (Smith y Read, 2008b), pero se ha demostrado que incrementa la capacidad de fijación de dinitrógeno en las leguminosas. La mayoría de las plantas colonizadas se benefician con la simbiosis y muestran un incremento en el crecimiento, absorción de nutrientes, fijación de N_2 atmosférico (si también se le asocia con *Rhizobium* o con *Frankia*), etc.; sin embargo, la mayoría de las plantas muestra estas respuestas fisiológicas a los HMA a niveles bajos de P en la solución del suelo. También, con una alta fertilización nitrogenada, se ha demostrado que se afecta negativamente la simbiosis (Daft y El-Giahmi, 1978; Boisson-Dernier *et al.*, 2001).

-El Fósforo

El principal papel de los HMA es proveer las necesidades de fósforo a la planta, debido a que este elemento es extremadamente poco móvil en el suelo. Aun si el fósforo se adiciona en forma soluble al suelo, este terminará por quedar retenido como fósforo inorgánico o cualquier otra forma de baja solubilidad (Jackson y Mason, 1984; Wetterauer y Killorn, 1996).

El nivel de P en la solución del suelo está relacionado con la colonización radicular por HMA. Al haber un nivel bajo de P, hay un bajo nivel de fosfolípidos en la membrana vegetal, que conduce a una mayor exudación radicular, lo cual trae como consecuencia una estimulación en la colonización del endófito (Smith y Read, 2008b). Las formas existentes del fósforo en el suelo son poco solubles en el agua y por ello su concentración es muy pequeña en la solución del suelo ($0,03 \text{ mg L}^{-1}$) (Nelsen *et al.*, 1981).

Entre un 95 y 99 % del fósforo del suelo no está disponible para las plantas; esto incluye las formas orgánicas y minerales insolubles. La adición de cantidades bajas de fertilizante fosfatado es compatible y beneficia la simbiosis con HMA, ya que estimula el crecimiento de la planta, pero al incrementar la dosis se comienza a interferir la formación de la simbiosis, llegando a la inhibición de la colonización. Las diferentes especies de HMA pueden mostrar distintos grados de respuesta a la aplicación de fertilizantes y productos fitosanitarios (Hayman, 1982).

-Los micronutrientes

La importancia de los HMA relacionada con los micronutrientes tiene dos vías; primero ayudan a la absorción de estos elementos considerados como relativamente inmóviles, y segundo, los HMA toman estos elementos y los almacenan lo que previene que las concentraciones de estos alcancen niveles tóxicos en el vegetal.

-Estructura del suelo

La influencia de los HMA en la mejora de la estructura y agregación de los suelos puede ser visto como los de una cuerda pegajosa. Las hifas del hongo enredan y entranpan las partículas de suelo formando agregados y secretan, de forma abundante por su superficie, la glicoproteína glomalina. En términos de fisiología del hongo, la glomalina es una molécula recalcitrante e hidrófoba (Wright y Upadhyaya, 1998).

-Interacciones con otros microorganismos del suelo

La existencia de los HMA en el suelo provoca que se produzcan una serie de interacciones con otros microorganismos que viven también en ese hábitat. La micorrizosfera es la rizosfera de una planta micorrizada, y es en ella donde se producen las interacciones que se pueden resumir como: interacciones con microorganismos beneficiosos y con funciones específicas, e interacciones con patógenos (Lioussanne *et al.*, 2009).

Entre los microorganismos beneficiosos podemos citar a las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), a las bacterias fijadoras de nitrógeno (tanto libres como simbiontes), a los actinomicetos y a algunos hongos saprofitos que actúan como antagonistas de patógenos del suelo y que pueden ser empleados para el control biológico. En muchos casos las interacciones establecidas son de tipo positivo, llegándose a registrar un efecto de sinergismo, donde la presencia del HMA y del otro microorganismo produce un incremento del crecimiento, vigor y protección de la planta (St-Arnaud y Elsen, 2005).

Se han propuesto una serie de mecanismos a través de los cuales ocurre la interacción micorrizas/patógenos, ya que no se ha demostrado nunca que los HMA actúen directamente sobre éstos, ya sea por antagonismo, antibiosis, o por depredación, sino que su efecto es indirecto. (Azcón-Aguilar y Barea, 1997)

2.3.5 Efectos sobre las plantas sometidas a estrés

2.3.5.1 Estrés hídrico

Numerosos estudios reportan la mayor sobrevivencia de plantas micorrizadas sobre las que no lo están, bajo condiciones de estrés hídrico (Choa *et al.*, 2006; Porcel *et al.*, 2006; Aroca *et al.*, 2007; Fundora, 2007). Uno de los mecanismos que permite esto puede ser la absorción y translocación directa del agua por la vía de la red de hifas, de manera similar a la toma de nutrientes, pero el efecto real de la colonización micorrízica sobre la tolerancia de las plantas al estrés hídrico está relacionada con la adquisición de nutrientes, dado que en los suelos secos estos se vuelven menos disponibles.

Se ha observado que la mayor densidad por unidad de longitud de las hifas de HMA disminuyen la distancia de difusión para los nutrientes y enriquecen la superficie de absorción, lo que bajo condiciones de déficit hídrico constituye una ventaja para las plantas micorrizadas (Al-Karaki y Clark, 1998).

2.3.5.2 Estrés salino

Existen pocos estudios referentes a los efectos de los HMA sobre el crecimiento de las plantas bajo condiciones de salinidad y los efectos de esta sobre la colonización micorrízica.

Los HMA tienen la habilidad de proteger a las plantas del estrés provocado por la salinidad, pero los mecanismos que ocurren no están muy claros. No obstante, los pocos datos disponibles indican que estos hongos tienen el potencial de aumentar los beneficios derivados de los cultivos tolerantes a las sales cuando se seleccionan y combinan adecuadamente (Choa *et al.*, 2006).

Es conocida su existencia en ambientes salinos, donde pueden mejorar precozmente el crecimiento de plantas tolerantes a la salinidad (Juniper y Abbott 1993; Aliasgharzadeh *et al.*, 2001). Se considera que, en suelos salinos, los HMA mejoran el suministro de nutrientes minerales a las plantas, especialmente el suministro de fósforo que tiende a ser precipitado por iones como Ca^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+} (Al-Karaki y Clark, 1998; Al-Karaki, 2000; Al-Karaki *et al.*, 2001; Porrás-Soriano *et al.*, 2009). Adicionalmente a la mejora nutricional, los HMA benefician procesos fisiológicos como la capacidad de absorción de agua por las plantas, al incrementar la conductividad hidráulica de las raíces y favorecer la adaptación del balance osmótico y la composición de carbohidratos (Rosendahl y Rosendahl, 1991; Sharifia *et al.*, 2007). De esta manera, estos hongos atenúan los efectos adversos del exceso de sal acumulada en las raíces (Giri y Mukerji, 2004).

El rol de las micorrizas en condiciones salinas está aun inconcluso. Unos pocos estudios han demostrado sus efectos en el ajuste osmótico (Rosendahl y Rosendahl, 1991; Giri y Mukerji, 1999), pero todos han sido conducidos en condiciones de baja salinidad.

La discusión sobre la ecología de los HMA en un medio ambiente salino puede ser confusa por la necesidad de distinguir entre los efectos bióticos y los abióticos en

la distribución y la relativa abundancia del hongo (Neumann *et al.*, 1994). No se observa colonización micorrízica cuando el sodio del suelo es superior a $3\ 131\ \text{mg.g}^{-1}$, pero se han encontrado plantas con las raíces colonizadas y esporas de hongos micorrízicos arbusculares, en hábitats donde encontramos suelos salinos con una conductividad eléctrica (CE) arriba de $185\ \text{dS.m}^{-1}$ (Juniper y Abbott, 1993).

Varios estudios reportan la identificación de especies de HMA presentes en suelos salinos. La identificación positiva de estos hongos hasta especie es un proceso difícil y de alta especialización, y puede ser imposible cuando el material es colectado de esos suelos (Juniper y Abbott, 1993).

Según estos mismos autores, la atención de los efectos de la salinidad en la formación de micorriza arbuscular tiene que incluir, por lo tanto, los efectos de la salinidad en el crecimiento de la planta hospedante.

La reducción de los niveles de la colonización radical por los HMA con el incremento de la salinidad de los suelos, se puede deber a los cambios fisiológicos por los efectos directos a su simbiosis, o por un efecto indirecto sobre el hongo por la influencia de otros parámetros del suelo, como el pH, la textura, la materia orgánica, la aireación, el contenido de arcilla, las características físicas y químicas del suelo y los factores bióticos (Duvert *et al.*, 1990).

2.3.6 Cambios en la actividad de enzimas antioxidantes durante la simbiosis

Las enzimas catalasa y las peroxidasas están involucradas en los mecanismos de defensa de las plantas. La catalasa y la ascorbato peroxidasa son inducidas por estrés oxidativo puesto que convierten el peróxido de hidrógeno en agua. Existen estudios (Blilou *et al.*, 2000; Aguirreolea *et al.*, 2006) que indican que el incremento de estas enzimas coincide con el momento de formación del apresorio en la superficie de la raíz, una vez que se da la interacción de tabaco con *G. mosseae*. Estos autores sugieren que la respuesta de las células de la raíz a la

invasión del HMA es una respuesta de defensa y que tiene lugar en estadios tempranos de la colonización, y proponen que el incremento en catalasa y peroxidasa puede estar relacionado con su papel antioxidante contra moléculas de oxígeno activo generadas durante el estado inicial de penetración del hongo. Se requieren más estudios para correlacionar la actividad de las enzimas con las alteraciones bioquímicas en el metabolismo oxidativo en células colonizadas. Las enzimas catalasa y ascorbato peroxidasa, normalmente inducidas por estrés oxidativo, son también inducidas en los comienzos de la colonización micorrízica para posteriormente ser reprimidas (Gianinazzi-Pearson, 1996; Ghorbanli *et al.*, 2004).

2.4 El tomate y la salinidad del suelo

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) puede ser considerado como una de las hortalizas de mayor importancia económica en el mundo, según su demanda como alimento por una amplia parte de la población mundial, siendo en Cuba la principal hortaliza tanto por el área que ocupa como por el nivel de producción que se obtiene (Álvarez *et al.*, 2003; Castellanos y Muñoz, 2003; Peralta *et al.*, 2005).

Está considerado como un cultivo con alta demanda de fertilización mineral, la cual se encuentra en el orden de 120-200 kg de N.ha⁻¹, 140-160 kg de P₂O₅.ha⁻¹ y 100-225 kg de K₂O.ha⁻¹, de acuerdo al tipo de suelo y al rendimiento esperado (Terry, 2005).

Cuando se cultiva en suelos salinos, no se encuentra ajeno a una disminución de los rendimientos puesto que es una especie glicófita, medianamente sensible a las sales y que presenta un umbral respecto al contenido total de sales cuantificadas en el extracto de saturación del suelo y expresado como conductividad eléctrica (CEs) de 2,5 dS.m⁻¹ (Chinnusamy *et al.*, 2005)

Pocos efectos de las sales en el tomate presentan un carácter positivo. La mayoría de ellos son adversos, tanto en la germinación, como en los órganos de las plantas (Romero-Aranda *et al.*, 2001).

Los efectos de la salinidad en el porcentaje de germinación de las semillas de tomate se encuentran estrechamente relacionados a las concentraciones de las sales en el medio de siembra, así como también al cultivar o especie de que se trate (Singer, 1994; El-Habbasha *et al.*, 1996; Cuartero y Fernández-Muñoz, 1999).

El efecto de las sales en las raíces de las plantas de tomate siempre resulta en un menor crecimiento de estos órganos, hecho que puede afectar el crecimiento general de la planta al reducirse el volumen de suelo que pueden explorar sus raíces (Almasoum, 2000). También las sales afectan el crecimiento, al alterar la absorción de agua por las raíces, fenómeno que se denomina componente osmótico, y sería el efecto inicial que padecen las plantas (Shannon y Grieve, 1999).

Se ha observado que al existir un aporte suplementario de calcio y potasio se mejora la respuesta de la planta al estrés salino. Así, la adición de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y KNO_3 a una solución de 50 mM NaCl, con la que regaron cinco cultivares de tomate, mejoraba el volumen radicular de éstos (López y Satti, 1996).

Otros estudios, que relacionaban distintos niveles de salinidad con las concentraciones de nitratos en las raíces y tallos y con el periodo de aplicación de las soluciones salinas en tres cultivares de tomate, con diferentes tolerancias a las sales, demostraron que los efectos de la salinidad en las concentraciones de nitrógeno total y, particularmente, nitratos, dependen parcialmente de los niveles de NaCl y de la duración del estrés (Romero-Aranda *et al.*, 2001).

La altura de las plantas de tomate disminuye con el incremento de la salinidad. A nivel de hojas, la salinidad genera una reducción en su número y en el área foliar (Romero-Aranda *et al.*, 2001). También se observa clorosis, necrosis, disminución de la densidad estomática en la cara adaxial y, simultáneamente, un aumento en la cara abacial, aumento de clorofila e incremento de actividad de la peroxidasa (Romero-Aranda *et al.*, 2001). Asimismo, afecta la floración y la producción de frutos entre otros (Rosario *et al.*, 1990; Pérez-Alfocea *et al.*, 1996; Cucci *et al.*, 2000).

Contrastantemente, al regar las plantas de tomate con aguas salobres, se ha observado que algunos atributos inherentes a la calidad de los frutos mejoran, por cuanto éstos presentan un mayor contenido de sólidos solubles (Satti y López, 1994; Amor *et al.*, 2001; Fernández-García *et al.*, 2004; Serio *et al.*, 2004), sólidos totales y acidez total (Guichard *et al.*, 2001), carotenoides y licopeno (Maggio *et al.*, 2001).

Para atenuar el efecto adverso de las sales en el rendimiento del tomate, existen una serie de prácticas agronómicas posibles de implementar, tales como el lavado de los suelos, su micronivelación y el mejoramiento del drenaje (FAO, 1999), inoculación con HMA (Copeman *et al.*, 1996; Al-Karaki *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2004), aplicación de fertilización potásica (Satti y López, 1994), injerto sobre patrones tolerantes (Rivero *et al.*, 2003) y uso de mulch (Munns, 2005), entre otras.

2.4.1 Uso de los HMA como una alternativa para la producción de tomate en condiciones salinas

Los HMA representan una alternativa para el cultivo del tomate en zonas salinas. Estos hongos pueden mejorar la producción de tomate en condiciones tanto no salinas (Martínez *et al.*, 2004) como salinas (Al-Karaki *et al.*, 2001). La mayor productividad de plantas micorrizadas ha sido atribuida al mejoramiento en la absorción de nutrientes tales como P, Zn, Cu, K, Ca, Mg y S, y al mejoramiento de

la absorción de agua, dado que las hifas del hongo se extienden más allá de la zona donde los pelos radicales pueden alcanzar nutrientes y agua (Martínez *et al.*, 2004).

Al evaluar la cepa *Glomus mosseae* en cultivares de tomate Pello (sal-tolerante) y Marriha (sal-sensitivo) en condiciones salinas (CEe 4,9 dS.m⁻¹) y no salinas (CEe 1,4 dS.m⁻¹), se observó un aumento significativo en el rendimiento en las plantas inoculadas. El mejoramiento en el rendimiento por planta, debido a la inoculación, puede ser atribuido a un mejoramiento de la fotosíntesis asociado a un incremento en la absorción del potasio (Al-Karaki *et al.*, 2001).

Estudios anteriores a los ya citados, que evaluaron la acción de hongos de micorrizas colectados de suelos salinos y suelos no salinos, en plantas de tomate cv Heinz 1350 VF 402, regadas durante 8 semanas con soluciones de 1, 2, 5, y 10 dS.m⁻¹ (producida diluyendo 1M de NaCl y 1 M de CaCl₂ en agua desionizada), mostraron que los hongos provenientes del suelo salino suprimieron el crecimiento de la parte aérea y raíces de las plantas (Copeman *et al.*, 1996). Sin embargo, las plantas inoculadas con HMA colectados en suelos no salinos y los testigos mostraron un incremento cuadrático en la concentración de Cl⁻ en las hojas, en respuesta al incremento de la salinidad, mientras que las plantas inoculadas con el hongo proveniente de suelos salinos mostraron un incremento lineal en la concentración de Cl⁻ en las hojas. De esta forma, a pesar de que el hongo originario de suelos salinos no promueve un mayor crecimiento, interviene en la reducción del Cl⁻ en las hojas a niveles moderados de salinidad, hecho que tiene implicancias positivas para la sobrevivencia de las plantas de tomate en suelos salinos.

2.5 Inóculos mixtos

El uso de los HMA encaja muy bien en los objetivos múltiples que persigue la agricultura sostenible. A nivel ambiental, contribuyen al aumento de productividad de los cultivos, regeneración de comunidades vegetales degradadas y

mantenimiento del equilibrio del ecosistema. A nivel económico, contribuyen sustancialmente al aprovechamiento eficiente de fertilizantes, y a nivel social contribuyen a un desarrollo rural integrado, con el uso de recursos naturales (desarrollo de inóculos nativos) a escala local, favoreciendo así al establecimiento de agroecosistemas de producción sostenida.

Se ha visto que las poblaciones naturales de hongos micorrízicos son a veces insuficientes o ineficientes para que se dé una buena simbiosis, lo que afecta negativamente al desarrollo de los cultivos; es por ello que se pueden incrementar estos hongos mediante la producción de inóculos nativos de un determinado suelo, o también se han aplicado hongos que, sin ser nativos, han resultado ser eficientes y competitivos (Smith y Read, 2008c). De estas dos prácticas, se prefiere el manejo agro cultural de los hongos nativos y no la introducción de hongos exóticos, pues estos últimos no están adaptados a las condiciones edáficas de un ecosistema en particular (Tapia, 2003), pudiendo ser más eficientes los inóculos mixtos dada la sinergia que se establece entre las especies (Montaño *et al.*, 2007).

III- MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento I

3.1 Aislamiento e identificación de cepas nativas de HMA provenientes de suelos con alto contenido de sales

3.1.1 Caracterización de la zona

El área escogida fue la zona de Las Caobas, municipio de Gibara, en la provincia de Holguín. Cuenta con una superficie agrícola de 409,2 ha, de ellas son cultivables 118,8 ha y se encuentran bajo riego 68,64 ha.

El agua de riego se obtiene de 20 pozos y es salobre. Esta se caracterizó por una conductividad eléctrica ($CE_{25^{\circ}C}$) y sales disueltas totales (SDT) entre 2,97 - 6,27 $dS.m^{-1}$ y 1 770 – 4 017 $mg.L^{-1}$, respectivamente, y un pH en torno a 8,0. Esta información resulta del análisis de 18 fuentes de abasto.

El clima de la región se caracteriza por temperaturas de 30,3°C y precipitaciones de 1 008 mm, como valores medios anuales.

En el momento del muestreo la zona se encontraba cultivada de tomate y maíz, y no se le había aplicado con anterioridad ningún bioproducto a partir de HMA.

3.1.2 Análisis del suelo

El suelo de la zona se encuentra dentro del agrupamiento Húmico Sialítico, tipo Rendzina y subtipo roja según la Nueva Clasificación Genética de los Suelos de Cuba (Hernández, 2006b), que se correlaciona con Feozem Calcaric rhodic skeletal del Word Reference Base (IUSS, 2006). En la tabla 1 se muestran los análisis realizados al suelo.

Tabla I. Algunas características químicas del suelo seleccionado

Na	K	Ca	Mg	P	MO	pH	C.E	SST
	cmol.kg ⁻¹			mg.L ⁻¹	%		dS.cm ⁻¹	mg.L ⁻¹
5,8	1	32,8	5,2	35	4,0	8,6	5,55	3 552

Las determinaciones fueron realizadas en el Laboratorio de Análisis Químico del INCA mediante los siguientes métodos: para calcio (Ca²⁺), potasio (K⁺), sodio (Na⁺) y magnesio (Mg²⁺), Maslova; fósforo (P), Oniani; materia orgánica (MO), Walkley y Black; pH(H₂O), por conductividad con dilución 1:2.5. (Paneque, 2002).

3.1.3 Extracción y cuantificación de esporas

Se tomaron, al azar, 13 muestras de suelo de 200g c/u de la zona rizosférica de las plantas presentes, a 0 - 40 cm de profundidad, las que fueron secadas al aire y guardadas en bolsas plásticas a 4°C hasta el momento de su uso.

Las muestras colectadas se llevaron al Laboratorio de Micología del Instituto de Ecología y Sistemática. Las esporas de HMA presentes en las muestras fueron extraídas del suelo utilizando el método de decantado húmedo y tamizado, modificado por Herrera (1995) del protocolo descrito por Gerdemann y Nicholson (1963), a través de dos tamices de 400 y 40 µm, respectivamente, y centrifugado con solución de sacarosa 2M – Tween 80, decantándose luego la fracción líquida con los componentes fúngicos. Se realizó un conteo total de las esporas en estereomicroscopio (Stemi C-200), utilizando placas de conteo de nemátodos, para conocer la cantidad de esporas con que se contaba.

3.1.4 Propagación de esporas

Para la propagación de esporas, se utilizaron 50g de cada una de las muestras de suelo que contenían las esporas. Estas se propagaron en macetas de 5 L de capacidad, que contenían como sustrato suelo Ferralítico Rojo lixiviado según la Nueva Versión de Clasificación de los Suelos de Cuba (MINAG, 1999), que se correlaciona con un Nitisol Ferrálico éutrico, ródico (IUSS, 2006). Este se esterilizó, para la destrucción de los microorganismos en crecimiento activo y sus

estructuras de resistencia, tales como las esporas, con una solución de formaldehído al 5% por 5 días, al cabo de los cuales el sustrato fue removido y lavado con agua hasta la eliminación del producto.

Se utilizó sorgo como cultivo trampa, debido a su alta dependencia micorrízica, a razón de tres plantas por maceta; a las semillas se les dio un tratamiento de esterilización utilizando una solución de hipoclorito de sodio al 10 % por 10 minutos (Ortega y Rodés, 1986). Una vez que se decantó la solución, las mismas se lavaron tres veces con agua destilada.

Una vez que germinaron las semillas, se aplicó solución nutritiva modificada a partir de Hewitt (Hewitt *et al.*, 1975) cada 10 días. El cultivo trampa se mantuvo por un periodo de tres meses. Después de este tiempo, se extrajeron las esporas por el método anteriormente mencionado, y se seleccionaron las esporas viables para la identificación taxonómica con ayuda del estereomicroscopio (Stemi C-200).

3.1.5 Identificación morfológica de las esporas

Para la identificación de los HMA de suelos con altos contenidos de sales, las esporas se separaron en grupos, de acuerdo con su color y tamaño, preparándose portaobjetos con las esporas extraídas, utilizando alcohol polivinílico y ácido láctico glicerol (PVLG) y PVLG con reactivo Melzer, preparado con 100g de hidrato de cloral, 1,5g de yodo y 5g de yoduro de potasio en 100ml de agua destilada, como líquidos de montaje, aplicándose una ligera presión sobre cada uno de los cubreobjetos para romper levemente las esporas y secando cada preparación a temperatura ambiente durante 72 horas. Después de este tiempo, se procedió a analizar las preparaciones con ayuda del sistema AxioVision (Carl Zeiss) y se clasificaron las mismas de acuerdo con sus características morfológicas: forma, color, tamaño, contenido, unión hifal y tipos de paredes o grupos de paredes, considerando además el tipo y distribución de las ornamentaciones. El color de las esporas se obtuvo con ayuda de la carta de color del INVAM (2009). Para la identificación de las especies se utilizó el manual de Schenck y Pérez (1990), la

colección fotográfica del Departamento de Biofertilizantes del Instituto de Ecología y Sistemática (IES) de esporas de hongos Glomales, así como la página web del INVAM y las descripciones originales de las especies publicadas en literatura especializada, mediante el método propuesto por Herrera *et al.* (1994).

Experimento II

3.2 Efectividad de diferentes cepas de HMA en plantas de tomate sometidas a estrés salino

Con el objetivo de evaluar algunos aspectos fisiológicos, bioquímicos y nutricionales en el cultivo del tomate con diferentes cepas de HMA en condiciones de estrés salino, se realizó un experimento durante los meses de febrero y marzo del año 2009, en una casa de cultivo ubicada en el Área Central del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), en San José de las Lajas (**Figura 3**).



Figura 3. Imagen que muestra las condiciones en que se desarrollo el experimento

3.2.1 Características generales del experimento

Material vegetal:

Se utilizaron plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) de la variedad Vyta, cuyas semillas fueron suministradas por el Departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal del INCA. Esta variedad se caracteriza por presentar frutos firmes, grandes, de buen comportamiento en condiciones de campo. Es una variedad que puede trasplantarse fuera de la época óptima.

Las semillas utilizadas fueron esterilizadas con una solución de hipoclorito de sodio al 10 % por 10 minutos (Ortega y Rodés, 1986). Una vez que se decantó la solución, las mismas se lavaron varias veces con abundante agua destilada. Se sembraron 5 semillas por recipiente, en macetas plásticas de 5 L de capacidad y, posteriormente, se realizó un raleo, dejando dos plantas por recipiente. Las plantas de tomate crecieron bajo condiciones ambientales de temperatura y humedad relativa, así como fotoperíodo natural.

Sustrato:

Se utilizó suelo Ferralítico Rojo lixiviado, según la Nueva Versión de Clasificación de los Suelos de Cuba (MINAG, 1999), que se correlaciona con un Nitisol Ferrálico éutrico, ródico (IUSS, 2006), cuyas características químicas se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Características del suelo Ferralítico Rojo lixiviado utilizado como sustrato en el experimento II

Na	K	Ca	Mg	P	MO	pH
cmol.kg ⁻¹			mg.L ⁻¹		%	
0,19	0,34	25,0	7,5	97	0,77	7,5

Diseño experimental:

Los tratamientos se distribuyeron en un diseño completamente aleatorizado con arreglo bifactorial (3X3), donde los factores estudiados fueron las cepas de HMA (Factor I) y los niveles de salinidad (Factor II). Constó de nueve tratamientos (ver Tabla 3), con diez réplicas cada uno.

Tabla 3. Descripción de los tratamientos estudiados

TRAT.	
1	Testigo/ 0 mM NaCl
2	Conglomerado /0 mM NaCl
3	<i>G. hoi like</i> /0 mM NaCl
4	Testigo/ 50 mM NaCl
5	Conglomerado/ 50 mM NaCl
6	<i>G. hoi like</i> /50 mM NaCl
7	Testigo/ 100 mM NaCl
8	Conglomerado/100 mM NaCl
9	<i>G. hoi like</i> / 100 mM NaCl

Factor I.

En uno de los tratamientos del Factor I (material fúngico a base de cepas de HMA), se empleó un inóculo certificado a base de cepas de *Glomus hoi like* proveniente del cepario del Laboratorio de Micorrizas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). En otro de los tratamientos de este mismo factor se empleo un conglomerado de las 28 cepas nativas obtenido en el **Experimento I**, al reproducir las especies encontradas en el suelo afectado por altos contenidos de sales. Ambos inóculos de HMA poseían un título promedio de 50 esporas.g⁻¹ de suelo fresco, y fueron certificados en el Laboratorio de Micorrizas del INCA. La inoculación se hizo a razón de 5g por planta (aproximadamente 250 esporas por recipiente).

Para el otro tratamiento del Factor I, se mantuvo solo la composición de cepas nativas que existían en el sustrato de origen (testigo). La composición de HMA presentes en el sustrato se describen en la Tabla 4

Tabla 4. Especies de HMA y cantidad de esporas presentes en suelo Ferralítico Rojo lixiviado (Morell *et al.*, 2006)

Especie	No. de esporas por gramo de suelo
<i>Glomus</i> sp	0,45
<i>Gigaspora</i> sp	0,10
<i>Acaulospora</i> sp	0,40
Total	2,34

Para ninguno de los tratamientos el suelo se esterilizó, a fin de mantener las cepas nativas presente y las características de la flora microbiana en la rizofera del cultivo.

Factor II

Los tratamientos salinos fueron impuestos a partir de diferentes concentraciones de NaCl en el agua del riego: 50 y 100 mM. Las soluciones fueron preparadas con sal común comercial con un 99,97% de NaCl y 0,03 % de yodato de potasio. Los tratamientos comenzaron a partir de los 15 días después de la germinación de las semillas, durante 45 días, y para ello se realizó el riego con las diferentes soluciones una vez por semana, hasta que las macetas llegaron a su máximo nivel de retención de humedad.

3.3 Determinaciones realizadas

Las evaluaciones se realizaron a los 60 días después de germinadas las plantas para la mayoría de los indicadores estudiados; solo en caso de los indicadores de biomasa seca, área foliar y número de hojas se realizó al inicio y final del periodo de estrés.

3.3.1 Indicadores micorrízicos

La colonización radical por los hongos micorrízicos arbusculares se determinó a través del porcentaje de colonización y la densidad visual, en tres muestras de

raicillas por tratamiento, procedentes de nueve plantas. Las evaluaciones se realizaron a los 60 días después de germinadas las plantas.

Porcentaje de colonización

Para la determinación de esta variable se usó la metodología de tinción descrita por Phillips y Hayman (1970). La cuantificación se realizó a través del método de los interceptos descrito por Giovannetti y Mosse (1980). Los resultados fueron transformados utilizando la función $\arcsen\sqrt{x}$, de acuerdo con Lerch (1977).

Densidad Visual

El cálculo matemático de la densidad visual se realizó a través de la metodología descrita por Trouvelot *et al.* (1986).

3.3.2 Indicadores fisiológicos del crecimiento y desarrollo

A los 15 y 60 días después de la germinación se tomaron nueve plantas por tratamientos, al azar, y se procedió con las evaluaciones de las variables fisiológicas relacionadas con el crecimiento y desarrollo, momentos que correspondían con el inicio y final del periodo de estrés impuesto.

Biomasa seca

La evaluación del crecimiento en biomasa seca de los órganos de las plantas (hojas, tallos, raíz y total (g.planta^{-1})) se determinó por muestreo destructivo de los órganos por separado, secados en estufa a 80°C hasta masa constante. Para calcular la masa total se hizo la sumatoria de los diferentes órganos evaluados.

Superficie foliar por hojas

Para esta determinación se tomaron cinco hojas por planta. Debido a dificultades para realizar la medición con un medidor de superficie foliar profesional, se procedió a realizar la estimación de esta mediante una técnica de procesamiento de la imagen de las hojas de las plantas.

Para ello (Figura 4), se dibujó en una hoja de papel de grosor uniforme la imagen (área) de la superficie de cada hoja muestreada. Posteriormente se hizo el recorte minucioso con tijera de la parte considerada como superficie foliar y se pesó el área del papel (imagen de hoja de planta). Las hojas muestreadas se secaron en estufa a 80°C hasta masa constante. Luego se calculó la superficie que representaba.

Se partió de la base que el área y el peso original del papel eran conocidos, así como su superficie, lo que permitió realizar el cálculo de la superficie desconocida, mediante la siguiente expresión:

$$SFH = (STP \times MSHp) / (MTP)$$

donde:

SFH.- Superficie foliar de las hojas recortadas expresada en cm².

STP.- Superficie total del papel en cm².

MTP.- Masa total del papel en g.

MSHp.- Masa de la superficie del papel que representa la imagen de la hoja recortada de la planta en g.



Figura 4. Determinación del área foliar de las hojas

Número de hojas

El número de hojas se hizo por conteo visual en todas las plantas evaluadas por tratamiento.

Superficie foliar total

La superficie foliar por planta fue el resultado de producto del área foliar por hojas y del número de hojas por plantas.

Índices del crecimiento

La tasa relativa de crecimiento (TRC) es la medida principal del análisis de crecimiento y se define como la ganancia de biomasa por unidad de biomasa y tiempo. La tasa de asimilación neta (TAN) es la tasa de incremento en el peso de la planta por unidad de área foliar.

En el período de estrés, a partir de la superficie foliar y la biomasa seca, y de acuerdo con Beadle (1993), se calcularon estos indicadores, utilizando las expresiones siguientes:

$$\text{TRC} = (\ln M_2/M_1) / (t_2-t_1) \text{ expresada en: } g \cdot g^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$$

$$\text{TAN} = [(M_2 - M_1) / (SF_2 - SF_1)] [(\ln SF_2 / SF_1) / (t_2 - t_1)] \text{ expresada en: } g \text{ m}^2 \text{ día}^{-1}$$

donde:

M_1 y M_2 – Masa seca total al inicio y final del estrés.

SF_1 y SF_2 – Superficie foliar al inicio y final del estrés.

MSF_1 y MSF_2 – Masa seca foliar al inicio y final del estrés.

t_1 y t_2 – Tiempo al inicio y final del estrés

3.3.3 Indicadores bioquímicos

Se determinó en las hojas y raíces de plantas de tomate la actividad específica de algunos sistemas enzimáticos pertenecientes al sistema antioxidante de las plantas: peroxidasa (POX), catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX). Se

seleccionaron para la determinación de las mismas, en hojas jóvenes, la tercera hoja y, en hojas adultas, la sexta hoja de las plantas muestreadas.

Extracción de enzimas

Para la obtención de los extractos enzimáticos foliares y radicales se procedió según la metodología descrita y estandarizada por Solórzano (1997), procesando tres réplicas en cada caso. Se utilizó una solución amortiguadora de extracción fosfato 50 mM pH 7,0; polivinilpirrolidona al 5 %, en proporción 1:1 (p/v). El sobrenadante obtenido se guardó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la determinación de las actividades enzimáticas.

Determinación de las proteínas solubles totales

La concentración de proteínas solubles de cada uno de los extractos se determinó por triplicado a través del método de Bradford (1976), utilizando la albúmina de suero bovino (1 g.L^{-1}) como estándar.

Actividad peroxidasa

Para el ensayo de la actividad peroxidasa, POX (EC 1.11.1.7) se utilizó $5,0 \cdot 10^{-5}$ L del extracto enzimático en una mezcla de reacción que contuvo $0,1\text{ mol.L}^{-1}$ del tampón fosfato a pH 7,0, pirogalol $4,0 \cdot 10^{-2}\text{ mol.L}^{-1}$ y H_2O_2 0,25% (v/v), en un volumen total de $1,0 \cdot 10^{-3}$ L. Las concentraciones de los sustratos pirogalol y H_2O_2 se estandarizaron antes de realizar los ensayos. La formación de pirogalol oxidado se estimó en un espectrofotómetro (Genesys 10 UV, Thermo), a través del monitoreo del incremento de la absorbancia de la purpurogalina a 420 nm cada 10 segundos, en un intervalo de 1 minuto (Bergmeyer, 1974). Una unidad de actividad POX se definió como la cantidad de enzima que causó un incremento de 0,1 unidades de absorbancia por minuto a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Aebi, 1984).

Actividad catalasa

Para determinar la actividad catalasa, CAT (EC 1.11.1.6), se utilizaron $5,0 \cdot 10^{-5}$ L del sobrenadante en la mezcla de reacción con tampón fosfato $5,0 \cdot 10^{-2}\text{ mol.L}^{-1}$ (pH 7,0) y peróxido de hidrógeno $1,0 \cdot 10^{-2}\text{ mol.L}^{-1}$, en un volumen de $1,0 \cdot 10^{-3}$ L. La

descomposición del H_2O_2 se evaluó cada 10 segundos durante 1 minuto, y la cantidad de H_2O_2 se estimó por la absorbancia a 420 nm (coeficiente de extinción del H_2O_2 a 240 nm $43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) en un espectrofotómetro (Genesys 10 UV, Thermo). Una unidad de actividad de la CAT correspondió a la cantidad de la enzima que descompone $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol H}_2\text{O}_2$ por minuto a 25°C (Aebi, 1984).

Actividad ascorbato peroxidasa

Para el análisis de la ascorbato peroxidasa, APX (EC 1.11.1.11), se partió de un extracto que se preparó con ácido ascórbico $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, ya que la enzima es inestable en ausencia del sustrato. Se utilizó $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ L}$ del sobrenadante en la mezcla de reacción que contuvo tampón fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 7,0), ácido ascórbico $5,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$, EDTA $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ y peróxido de hidrógeno $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, en un volumen final de $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ L}$. El monitoreo de la oxidación del ascorbato dependiente del H_2O_2 se evaluó 10 veces en un intervalo de 100 segundos por la disminución de su absorbancia a 290 nm (coeficiente de extinción del ascorbato a 290 nm = $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) en un espectrofotómetro (Genesys 10 UV, Thermo). Una unidad de APX se definió como la cantidad de enzima necesaria para descomponer $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$ ácido ascórbico por minuto a 25°C (Nakano y Asada, 1981).

La actividad específica en todos los casos se determinó de la siguiente forma:

$$\text{Act. Específica} = \text{UAE} / \text{concentración de proteína}$$

y se expresó como $\text{UAE. mg proteína}^{-1}$, siendo esta la presentada en nuestros resultados para todas las enzimas.

3.3.4 Indicadores nutricionales

En hojas, tallos y raíces se determinaron los porcentajes de N, P, K y Na, en todos los casos por digestión húmeda ($\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{Se}$), evaluando el N por el método

de Nessler, el P por formación de azul de molibdeno y el K y el Na por fotometría de llama (Paneque, 2002).

3.4 Análisis estadístico

Al finalizar las evaluaciones, se procedió al análisis de los resultados de la siguiente forma:

Los datos del porcentaje de colonización micorrízica (%C) fueron transformados por la función $\arcsen\sqrt{x}$.

Los resultados obtenidos en los indicadores nutricionales, bioquímicos y de crecimiento y desarrollo se procesaron mediante análisis factoriales para determinar la interacción entre factores analizados. Los indicadores que presentaron diferencias entre tratamientos fueron docimados según la prueba de Comparación de Rangos Múltiples de Duncan, (Cochran y Cox, 1990) con $p \leq 0.05\%$, utilizando el programa estadístico SPSS 11.5 para Windows.

Los resultados del análisis factorial fueron reflejados en forma de tablas, mientras los análisis de varianza de los indicadores por separados se mostraron en forma de graficas, reflejando las diferencias encontradas mediante letras diferentes sobre la barra del error estándar de los tratamientos que difieren entre sí.

IV- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Experimento I: Aislamiento e identificación de cepas nativas de HMA provenientes de suelo salino

En la Figura 5 se presentan, de manera ilustrativa, los conteos totales de esporas de HMA correspondientes a 1 gramo de suelo para cada una de las muestras tomadas.

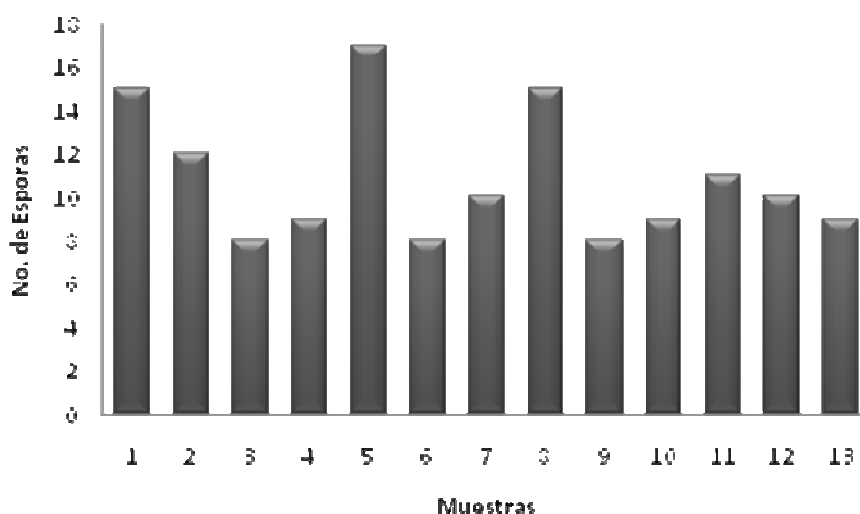


Figura 5. Cantidad de esporas de HMA nativos por gramo de suelo aislados en suelo con altos contenidos de sales de Las Caobas, Gibara, Holguín.

El número de esporas encontradas por gramo (8 - 17) no es bajo para condiciones nativas, según los datos reportados por Collins *et al.* (1991) quienes encontraron entre 0 y 49 esporas en 25 gramos de suelo, en un experimento en el que se evaluaron poblaciones de HMA asociadas con cultivos de cinco años de maíz y soya.

Howeler *et al.* (1987) registraron conteos de esporas nativas asociadas a *Brachiaria decumbens*, que no superan las 10 esporas por gramo de suelo seco. Igualmente, Douds *et al.* (1995) encontraron entre 1 y 43 esporas por 50 cm³ (aproximadamente 50 g) de suelo, en cultivos de maíz, soya y trigo en sistemas

con labranza convencional y mínima, y Serralde y Ramírez (2004) reportaron de 4 a 16 esporas por gramo de suelo seco en poblaciones de HMA nativas asociadas al cultivo del maíz.

Se identificaron, por sus características morfológicas, 28 morfotipos de HMA agrupados según su homogeneidad respecto a la forma, el color, la apariencia de la pared externa, el tamaño de la espora y la presencia, forma y coloración de la conexión hifal, todo lo cual se describe a continuación, mostrando, además, las imágenes de las distintas esporas de los HMA nativos aislados, así como el género y especie a que pertenece cada una.

Estos valores son similares a los reportados por diversos autores, citados por Serralde y Ramírez (2004), que, para condiciones de cultivos en campo, han encontrado entre 3 y 15 especies nativas de HMA. Sin embargo, es interesante observar que el total de morfotipos encontrados en este estudio (28), es bastante alto comparado con los reportes mencionados, lo que indica un buen establecimiento de las poblaciones de HMA bajo condiciones nativas para estos suelos.

Género *Acaulospora*

Especie *Acaulospora koskei* like

Color Pardo rojizo

Tamaño (µm) 120-240

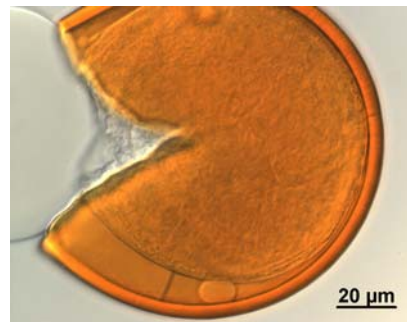
Forma Globosa, subglobosa

Paredes Compuesto por tres capas.

L1: hialina, lisa, 1,3-2,2 micras de espesor; aparece como una capa granular en la superficie

L2: Una capa de compuesto de sub-capas muy finas y adherentes (o láminas), amarillo-marrón. La superficie de esta capa es suave.

L3: Otra capa laminada de 1,2-1,6 micras de espesor; en las esporas maduras se encuentra cerrada entre la pared y el cuello del sáculo funcionando como una endospora.



Género *Acaulospora*

Especie *Acaulospora mellea* like

Color Amarillo naranja

Tamaño (µm) 90-140

Forma Globosa, subglobosa

Paredes Tres capas (L1, L2 y L3).



L1: hialina, delgada (<0,5 micras), muy flexible produciendo a menudo extensas arrugas.
 L2: Una capa compuesta de sub-capas muy finas y adherentes (láminas), de color anaranjado-amarillo, 3,6-5,1 micras de espesor.
 L3: Amarillo pálido-marrón, semirígida, laminada.

Género *Acaulospora*

Especie *Acaulospora scrobiculata* like

Color Amarillo pálido

Tamaño (µm) 80-160

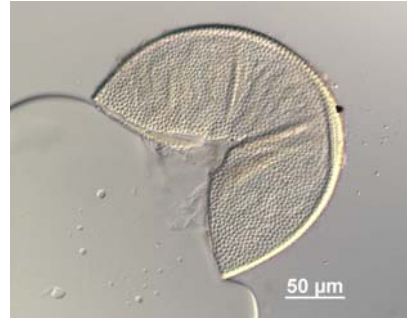
Forma Globosa, subglobosa

Paredes Tres capas (L1, L2 y L3), continuas con el exterior de la pared.

L1: hialina; 0,8-1,2 micras de espesor, a menudo ausente en las esporas maduras.

L2: Una capa espesa de color amarillo pálido, con subcapas (o láminas), con depresiones ovoides cóncava en la superficie. Algunas se unen para formar los canales de 5-12 micras de largo.

L3: a veces se separa ligeramente de la pared de las esporas y ha definido los límites.



Género *Acaulospora*

Especie *Acaulospora spinosa*

Color Pardo rojizo

Tamaño (µm) 120-140

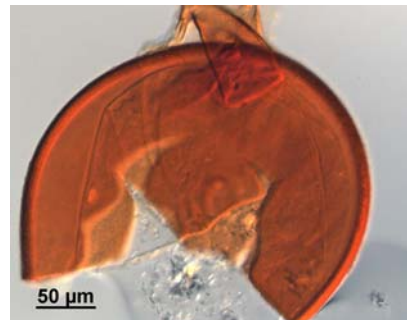
Forma Globosa, subglobosa

Paredes Tres capas (L1, L2 y L3), el exterior continúa con la pared del cuello de la matriz del sáculo.

L1: hialina, 1,2-1,6 micras de espesor. Se degrada muy temprano en la diferenciación de la pared de las esporas.

L2: Una capa espesa de color amarillo pálido formada por subcapas (o láminas) y espinas.

L3: Una sola capa hialina, 0,6-1,2 micras de espesor, que se adhiere a la L2 (y por lo tanto difícil de ver).



Género *Acaulospora*

Especie *Acaulospora spinosa* like

Color Pardo rojizo

Tamaño (µm) 120-140

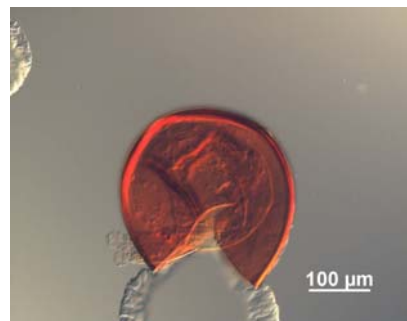
Forma Globosa, subglobosa

Paredes Tres capas (L1, L2 y L3), el exterior continúa con la pared del cuello de la matriz del sáculo.

L1: hialina, 1,2-1,6 micras de espesor. Se degrada muy temprano en la diferenciación de la pared de las esporas.

L2: Una capa espesa de color pardo rojizo formada por subcapas (o láminas) y espinas.

L3: Una sola capa hialina, 0,6-1,2 micras de espesor; hay un mayor grado de separación de la pared de las esporas.



Género *Gigaspora*

Especie *Gigaspora* sp.

Color Hialino

Tamaño (µm) 160-200

Forma Globosa, subglobosa

Paredes Consta de tres capas (L1, L2 y L3), las dos primeras adherentes y de igual grosor, con L2 como engrosamiento de la pared de esporas.

L1: una capa externa rígida con una superficie lisa, color hialino a amarillo pálido.

L2: Una semi-capa con subcapas (o láminas) que aumentan en número con la diferenciación, lo que varía considerablemente el grosor de las esporas maduras, 14-26 micras de espesor.

L3: Un Capa hialina y adherente.



Género *Glomus*

Especie *Glomus albidum* like

Color Hialino

Tamaño (µm) 40-100

Forma Elipsoidal

Paredes Se compone de dos capas diferentes separables (L1 y L2).

L1: hialina, 0,5-2 micras de espesor, se degrada y desprende con la edad.

L2: Una capa de color amarillo pálido y de grosor similar al de L1 (0,5-2 micras).



Género *Glomus*

Especie *Glomus ambisporum*

Color Pardo rojizo

Tamaño (µm) 60-100

Forma Globosa

Paredes Consta de tres capas (L1, L2 y L3).

L1: subhialina, 2-4 micras de espesor, que se extiende a todo lo largo de la unión de hifas en el centro del esporocarpo. Tiene una superficie reticulada que contiene placas hexagonales en una disposición ordenada.

L2: se compone de subcapas finamente adheridas (o laminadas), 3-14 micras de espesor, de color pardo oscuro.

L3: es delgada y flexible (<1 micra de grosor), se origina de la sub-capa más interna de la pared de la hifa.



Género *Glomus*

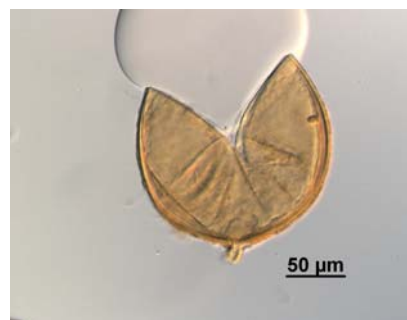
Especie *Glomus claroideum*

Color Pardo

Tamaño (µm) 80-160

Forma Globosa, subglobosa

Paredes Cuatro capas (L1, L2, L3 y L4), sólo las dos primeras presentes en la mayoría de las esporas jóvenes.



L1: capa hialina mucilaginosa, 0,6-1,8 micras de espesor en las esporas jóvenes, produciendo un color rosa. No hay reacción con el reactivo de Melzer.

L2: hialina, formada en las esporas más jóvenes con L1, 0,6-2,0 micras de espesor. Puede degradarse lo cual, al parecer, provoca atracción de los desechos orgánicos que pueden acumularse en la superficie de las esporas.

L3: Una capa delgada y muy adherente de color amarillo pálido, subcapas (o láminas), 2,8-6,2 micras de espesor en las esporas maduras.

L4: Una capa incolora, a menudo puede parecer bastante delgada (<0,5 micras) o engrosar con subcapas hasta alrededor de 3 micras.

Género *Glomus*

Especie *Glomus clarum*

Color Crema-amarillo

Tamaño (µm) 100-260

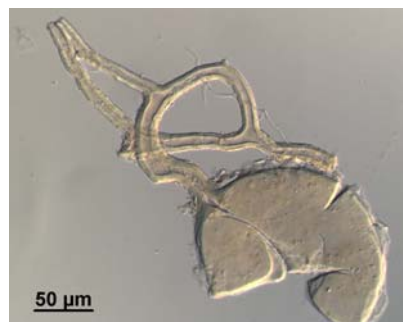
Forma Elíptica, oblonga

Paredes Tres capas (L1, L2 y L3), todas pueden estar adheridas a L3, pero frecuentemente se separan en las esporas maduras.

L1: Una capa hialina mucilaginosa, generalmente degradada y desprendida de manera que a menudo está ausente en las esporas maduras, 1,0-4,7 micras de espesor.

L2: Una capa hialina permanente, 9-14,5 micras de espesor, consiste en sub-capas de una consistencia granulosa que provoca el agrietamiento y la fragmentación de la pared de las esporas.

L3: Otra capa permanente, que generalmente consiste en 2-4 subcapas (o láminas), de color amarillo oscuro, 1,2-3,5 micras de espesor. Las subcapas generalmente son adherentes.



Género *Glomus*

Especie *Glomus clarum* like

Color Pardo

Tamaño (µm) 100-260

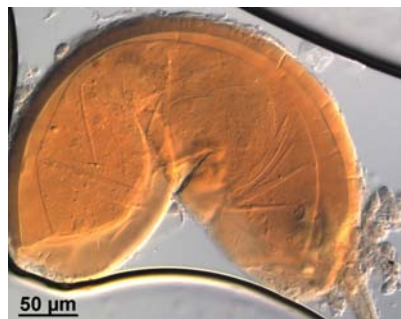
Forma Globosa, elíptica, oblonga

Paredes Consta de tres capas (L1, L2 y L3).

L1: Una capa hialina mucilaginosa, generalmente degradada, 1,0-4,7 micras de espesor.

L2: Una capa hialina permanente, 9-14,5 micras de espesor, consiste en sub-capas de una consistencia granulosa que provoca el agrietamiento y la fragmentación de la pared de las esporas.

L3: Otra capa permanente, que generalmente consiste en 2-4 subcapas (o láminas), de color amarillo oscuro, 1,2-3,5 micras de espesor.



Género *Glomus*

Especie *Glomus etunicatum* like

Color Pardo claro

Tamaño (µm) 60-160

Forma Globosa, subglobosa

Paredes Consta de dos capas (L1 y L2).

L1: mucilaginosa, con cierta plasticidad y con la superficie exterior desigual, 0,6-2,8 micras de espesor en las esporas jóvenes, se tiñe con manchas rosadas a rojo púrpura en el reactivo de Melzer.

L2: Una capa formada por subcapas (o láminas) delgadas



adherentes, color de pardo claro a rojo-pardo, 4,4-6,4 micras de espesor.

Género *Glomus*

Especie *Glomus geosporum*

Color Pardo oscuro

Tamaño (µm) 120-240

Forma Globosa, subglobosa, algunas irregulares

Paredes Tres capas (L1, L2 y L3), el espesor combinado 16 micras.

L1: Una capa hialina, menos de 1 micra de espesor, no reacciona en el reactivo de Melzer, puede degradarse y a continuación se forma una capa granular de desprendimiento.

L2: Una capa rígida compuesta por subcapas adherentes (o láminas), de color amarillo-marrón y naranja, 6-14 micras de espesor.

L3: Capa rígida 1-2.5 micras de espesor, con frecuencia adherida a L2, pero generalmente se diferencian por el color ligeramente más oscuro (amarillo a naranja-marrón), el crecimiento continuo en el lumen de la hifa forma un tabique recurvado ininterrumpido.



8-

Género *Glomus*

Especie *Glomus intraradices* like

Color Pardo rojizo

Tamaño (µm) 40-140

Forma Globosa, subglobosa

Paredes Consta de tres capas (L1, L2 y L3).

L1: capa más externa hialina, mucilaginosa, 0,6-3,2 micras de espesor, intacta en las esporas jóvenes, en las maduras aparece granulada y se pueden acumular algunos desechos.

L2: adherida a la capa externa mucilaginosa, hialina, 1,5-4,9 micras de espesor. Con la edad, se degrada y adquiere un aspecto granular.

L3: una capa compuesta por subcapas (o láminas) de color amarillo pálido-marrón, que se quedan adheridas. El grado de separación entre las subcapas varía considerablemente entre las esporas y, a menudo se ve afectada por la edad, la cantidad de parasitismo, o la cantidad de presión aplicada después del montaje.



Género *Glomus*

Especie *Glomus intraradices* like 2

Color Pardo rojizo

Tamaño (µm) 40-140

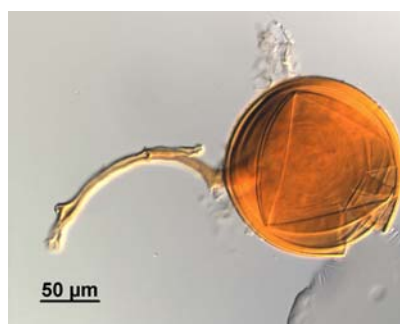
Forma Globosa, subglobosa, irregular

Paredes Consta de tres capas (L1, L2 y L3).

L1: De coloración rojo rosado a púrpura pálido en el reactivo de Melzer, Con la edad esta capa casi siempre se degrada y se descompone de manera natural y por la acción de los microorganismos.

L2: Capa hialina y mucilaginosa. Las esporas maduras a menudo carecen de L1 y L2.

L3: Capa laminada, en las esporas más jóvenes la subcapa inicial presenta 0,5-1 micras de espesor y luego engrosa con la formación de sub-capas adicionales. El espesor varía 3,2-12 micras en las esporas maduras. Así se forma la capa simultáneamente en la pared de la hifa.



Género *Glomus*

Especie *Glomus luteum* like

Color Pardo claro

Tamaño (µm) 60-180

Forma Globosa, subglobosa

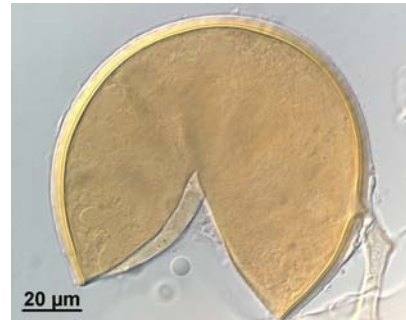
Paredes Consta de cuatro capas (L1, L2, L3 y L4), todas se adhieren con L4.

L1: capa hialina mucilaginosa con considerables variaciones en el espesor, 1,3-5,0 micras, no reacciona al reactivo de Melzer. En las esporas maduras esta capa puede estar totalmente ausente.

L2: hialina, semi-rígida, 1,3-6,5 micras de espesor. Se degrada en las esporas maduras.

L3: Capa permanente rígida, consiste en varias subcapas adherentes (o láminas), de color amarillo pálido a amarillo parduzco, 2,5-10 micras de espesor.

L4: Capa delgada y flexible. Su apariencia se asemeja mucho a la de una pared germinal. Se considera una capa separada en lugar de una subcapa de L3, ya que siempre separa a los distintos grados de la pared de esporas. En algunas esporas se aparta completamente de la pared de la espora, y tiene una pequeña protuberancia en la que se adjunta a la pared de hifa.



Género *Glomus*

Especie *Glomus mosseae* like

Color Pardo claro

Tamaño (µm) 100-260

Forma Globosa, subglobosa

Paredes Consta de tres capas (L1, L2 y L3).

L1: hialina, mucilaginosa, 1,4-2,5 micras de espesor, se tiñe con manchas rojo-rosado en el reactivo de Melzer, descamación en las esporas maduras, apareciendo granular en estado avanzado de degradación; 2,5-3,5 micras de espesor.

L2: hialina, 0,8-1,6 micras de espesor, por lo general rígida.

L3: Una capa de color amarillo pardo, compuesta por subcapas (o láminas), 3,2-6,4 micras de espesor.



Género *Glomus*

Especie *Glomus viscosum* like

Color Hialino

Tamaño (µm) 50-120

Forma Globosa, subglobosa

Paredes Consta de tres capas (L1, L2 y L3).

L1: Una semi-capas hialina flexible; 1-2 micras de espesor. Esta capa no reacciona en el reactivo de Melzer. En las esporas maduras esta capa tiende a permanecer, pero se separa en diferentes grados tanto de la pared de la hifa como de las restantes capas.

L2: Una semi-capas fina, flexible, hialina (0,5 micras o menos). Tiende a separarse de L3 en menos del 10 % de las esporas aplastadas, pero se observa sistemáticamente.

L3: Una capa hialina que espesa a través de subcapas (o láminas). Esta capa es más rígida que la L1 o L2, de modo que produce pliegues en la superficie interior, después de ser aplastada.



Género *Glomus*

Especie *Glomus* sp1

Color Hialino

Tamaño (µm) 100-120

Forma: Globosa, subglobosa

Paredes Consta de tres capas (L1, L2 y L3).

L1: capa más externa hialina, 0,6-3,2 micras de espesor.
L2: adherente a la capa externa mucilaginosa, hialina, 1,5-4,9 micras de espesor. Con la maduración adquiere un aspecto granular.

L3: una capa compuesta por subcapas (o láminas) de color amarillo pálido.



Género *Glomus*

Especie *Glomus* sp2

Color Hialino

Tamaño (µm) 30-50

Forma Globosa, subglobosa

Paredes Consta de tres capas (L1, L2 y L3).

L1: Hialina, 2-4 micras de espesor, que se extiende a todo lo largo de la unión de la hifa.

L2: se compone de subcapas finamente adheridas (o laminadas), 3-14 micras de espesor.

L3: es delgada y flexible (<1 micra de grosor), se origina de la sub-capas más interna de la pared de la hifa.



Género *Glomus*

Especie *Glomus* sp3

Color Hialino

Tamaño (µm) 15-30

Forma Globosa, subglobosa

Paredes Consta de tres capas (L1, L2 y L3).

L1: Una semi-capas hialina, flexible, 1-2 micras de espesor. Esta capa no reacciona en el reactivo de Melzer

L2: Una semi-capas fina, flexible, hialina (0,5 micras o menos de espesor).

L3: Una capa hialina más rígida que la L1 o L2, de modo que produce pliegues en la superficie interior, después de ser aplastada.



Género *Glomus*

Especie *Glomus* sp4

Color Hialino

Tamaño (µm) 100-140

Forma Globosa, subglobosa

Paredes Consta de tres capas (L1, L2 y L3).

L1: Una capa hialina mucilaginosa, generalmente degradada y desprendida de manera que a menudo está ausente en las esporas maduras, 1,0-4,7 micras de espesor.

L2: Una capa hialina permanente, 9-14,5 micras de espesor, consiste en sub-capas de una consistencia granulosa.



L3: Una sola capa hialina, 0,6-1,2 micras de espesor, que se adhiere a la L2 (y por lo tanto difícil de ver).

Género *Glomus*

Especie *Glomus* sp5

Color Pardo oscuro

Tamaño (µm) 60-120

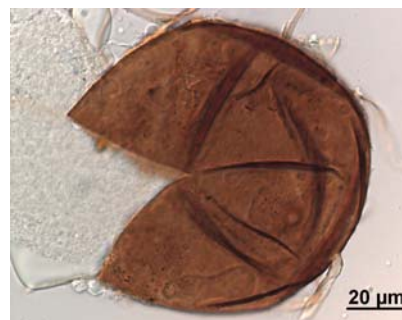
Forma Globosa, subglobosa

Paredes Consta de tres capas (L1, L2 y L3).

L1: Una capa hialina, menos de 1 micra de espesor, no reacciona en el reactivo de Melzer.

L2: Una capa rígida compuesta por subcapas adherentes (láminas), de color pardo, 6-14 micras de espesor.

L3: Capa rígida 1-2,5 micras de espesor, con frecuencia adherida a L2, pero generalmente se diferencia por el color ligeramente más oscuro.



(o

Género *Glomus*

Especie *Glomus* sp6

Color Pardo rojizo

Tamaño (µm) 100-150

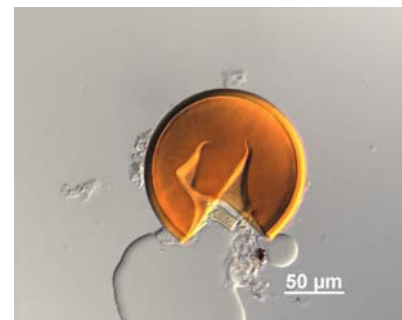
Forma Globosa, subglobosa

Paredes Consta de tres capas (L1, L2 y L3).

L1: De coloración púrpura en el reactivo de Melzer. Con la edad, esta capa, casi siempre se degrada y se descompone de manera natural y por la acción de los microorganismos.

L2: Capa hialina y mucilaginoso.

L3: Capa laminada. En las esporas más jóvenes, la subcapa inicial presenta 0,5-1 micras de espesor y espesa con la formación de sub-capas adicionales. Así se forma la capa simultáneamente en la pared de la hifa.



Género *Glomus*

Especie *Glomus* sp7

Color Pardo rojizo

Tamaño (µm) 60-100

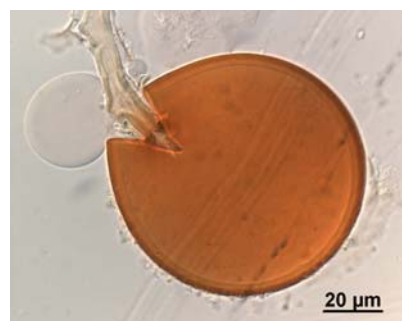
Forma Globosa, subglobosa

Paredes Consta de tres capas (L1, L2 y L3).

L1: hialina, lisa, 1,3-2,2 micras de espesor.

L2: Una capa compuesta de sub-capas muy finas y adherentes, de color amarillo-pardo. La superficie de esta capa es suave.

L3: Otra capa laminada de 1,2-1,6 micras de espesor.



Género *Glomus*

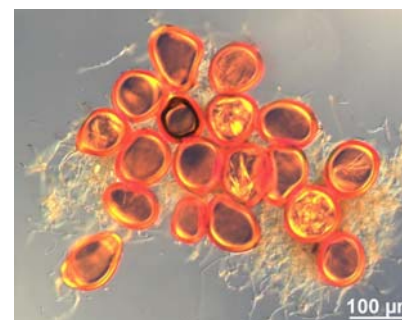
Especie *Glomus* sp8

Color Rojo

Tamaño (µm) 60-100

Forma Globosa, subglobosa, elíptica

Paredes Consta de tres capas (L1, L2 y L3).



45

L1: hialina, 2-4 micras de espesor, que se extiende a todo lo largo de la unión de las hifas en el centro del esporocarpio.

L2: se compone de subcapas finamente adheridas (o laminadas), 3-14 micras de espesor, de color rojo intenso.

L3: delgada, se origina de la sub-capa más interna de la pared de la hifa.

Género *Glomus*

Especie *Glomus sinuosum*

Color Rojo

Tamaño (µm) 200-360

Forma Elíptica, organizadas en una capa a partir de un plexo central.

Paredes Una capa (L1), rodeada por el peridio de la hifa. L1: de color marrón-naranja pálido, subcapas (o láminas) que siempre son adherentes. El espesor varía considerablemente de una sola espora, 1,5-6 micras, siendo más gruesa en la base.



Género *Scutellospora*

Especie *Scutellospora* sp.

Color Hialino

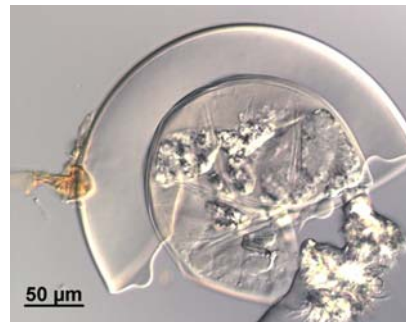
Tamaño (µm) 120-200

Forma Oblonga, en algunos casos irregular

Paredes Consta de dos capas (L1 y L2).

L1: Una capa hialina única, inferior a 1 micra de grosor.

L2: Una capa hialina delgada, inferior a 1 micra de grosor, que se separa fácilmente del resto de la pared las esporas, salvo en su fijación a la pared de la hifa.



de

A partir del análisis morfológico de las esporas aisladas, se encontraron cuatro de los géneros conocidos (*Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora*), el más común de los cuales fue el género *Glomus* al cual pertenecen 21 morfotipos, seguido por el género *Acaulospora* al que pertenecen 5 de los morfotipos encontrados. Por el contrario, los géneros menos frecuentes son *Gigaspora* y *Scutellospora*, en los que sólo se identificó un morfotipo (Figura 6).

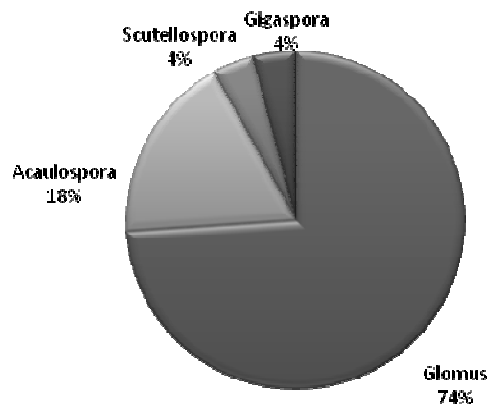


Figura 6. Distribución porcentual de los géneros de los HMA nativos encontrados en suelos afectados por altos contenidos de sales de Las Caobas, Gibara, Holguín.

Estos resultados se corresponden con los encontrados por Blaszkowski (1993), Oehl *et al.* (2005) y Castillo (2005), lo que ubica a *Glomus* como un género dominante en la mayoría de las poblaciones nativas, y es posible que se encuentre en simbiosis activa en mayor proporción que los demás, lo que refleja su capacidad de adaptación a las condiciones edáficas y ofrece un alto potencial para su uso como biofertilizante.

Es conocido que especies como *Gigaspora* o *Scutellospora* necesitan una prolongada fase de colonización radical para llegar a la fase de esporulación; en contraste con esto, la esporulación no es requerida para la colonización de nuevas raíces en la mayoría de las especies de *Glomus*, siendo la colonización por estas especies mucho más abundante e iniciada por hifas, micelio o fragmentos de raíces en el suelo, lo que pudiera explicar su éxito ecológico (Opick *et al.*, 2008).

El 35% de los morfotipos encontrados presentaron características que no se ajustan a las descripciones publicadas en la literatura. Estas se consideraron como potenciales especies nuevas y se requiere de mayor investigación para su identificación. Este número de especies nuevas es similar al informado por Oehl *et al.*, (2003), en ocho agroecosistemas de Europa central, donde detectaron un 20% de especies no descritas de un total de 45, y por Castillo (2005), que de 39

especies encontradas en una prospección al sur de Chile, el 23% correspondía a especies nuevas.

Es válido aclarar que la identificación basada únicamente en la morfología de las esporas requiere personal altamente calificado, así como largos años de experiencia visual, por lo que, en la actualidad, se complementa este criterio realizando técnicas moleculares (DeBellis y Widden, 2006; Lee *et al.*, 2008; Öpik *et al.*, 2008), las cuales constituyen una herramienta valiosa y viable para estos fines.

4.2 Experimento II: Efectividad de diferentes cepas de HMA en plantas de tomate sometidas a estrés salino

4.2.1 Indicadores micorrízicos

Las plantas de tomate no sometidas a estrés salino muestran un alto porcentaje de colonización radical, sin que existan diferencias significativas entre las plantas inoculadas con el conglomerado y las inoculadas con *Glomus hoi* like. A medida que aumenta la salinidad en los tratamientos, la colonización radical va decreciendo en las plantas afectadas, siendo significativamente mayor en plantas inoculadas con cepas de HMA provenientes del conglomerado aislado de suelos con altos contenidos de sales, que en las inoculadas con *Glomus hoi* like o las plantas colonizadas por las cepas nativas pertenecientes a los tratamientos testigo (Figura 7).

El alto porcentaje de colonización por parte de los tratamientos salinos inoculados probablemente se deba a que, al estar sometidas a condiciones estresantes, las plantas de tomate tienen un mayor grado de dependencia hacia las micorrizas arbusculares para su supervivencia. Resultados similares fueron encontrados por González-Monterrubio (2003) en plantas estresadas de *Opuntia streptacantha*, que llegaron a alcanzar entre un 60 y 80 % de colonización.

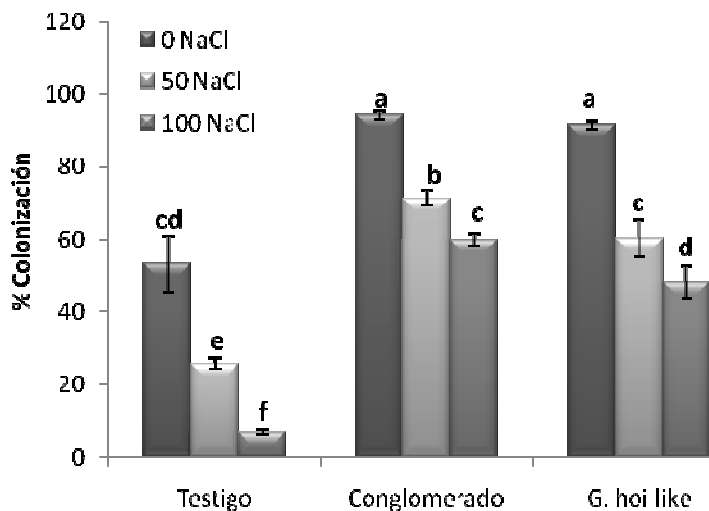


Figura 7. Porcentajes de colonización micorrízica radical de plantas de tomate sometidas a condiciones de salinidad. Barras con letras comunes no difieren entre sí según Duncan_{0.05}. Las barras de error representan el error típico de la media por tratamiento.

El hecho de que las cepas aisladas de suelos con altos contenidos de sales, y posteriormente replicadas para producir el inóculo, alcancen altos porcentajes de colonización radical, prueba que conservaron su capacidad infectiva, además de poder considerarse altamente infectivas, según lo planteado por Bago *et al.* (2000) que estableció que una cepa puede considerarse como tal si alcanza más del 50% de colonización.

Debe destacarse que los valores de los porcentajes de colonización son relativamente altos para el cultivo del tomate si se compara con resultados obtenidos por Rodríguez *et al.*, (2003), Terry (2005) y Fundora (2007), quienes encontraron valores de este parámetro entre 15 y 40 %. También se ha encontrado (Aliasgharzadeh *et al.*, 2001) que, en terrenos inoculados, el porcentaje de colonización se incrementa significativamente bajo condiciones de estrés salino. Refiriéndose a la colonización, Giri *et al.* (2003) encontraron que, para una misma cepa de HMA, adaptada a ecosistemas salinos, en suelos afectados por la salinidad, la colonización micorrízica de las raíces y la

esporulación fue significativamente mayor en plantas inoculadas con la misma cepa en suelos no salinos.

Respecto al porcentaje de densidad visual (DV) (Figura 8), indicador que refleja la intensidad de la colonización micorrízica pues expresa la cantidad porcentual de estructuras fúngicas en el interior de la raíz (Figura 9), se observan diferencias significativas entre los tratamientos, destacándose, en primer lugar, las plantas inoculadas con el conglomerado, que mantuvieron altos niveles de este indicador, incluso ante la aplicación de los tratamientos salinos, los cuales disminuyeron considerablemente los porcentajes tanto de colonización como de densidad visual.

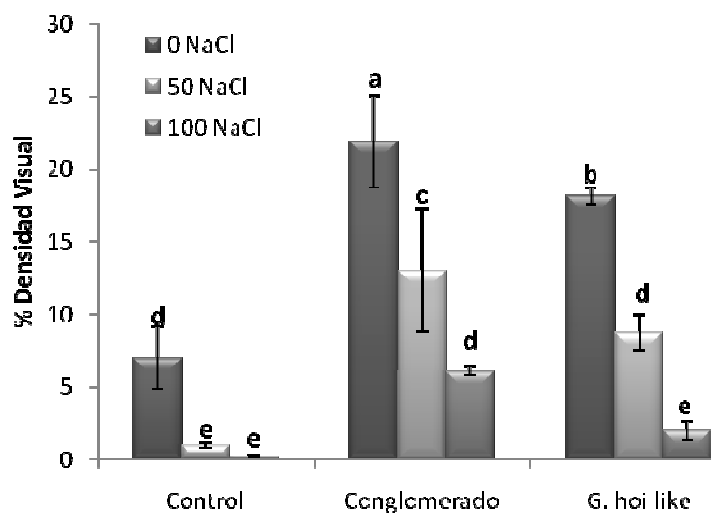


Figura 8. Intensidad de la colonización micorrízica representada por la densidad visual en plantas de tomate sometidas a condiciones de salinidad. Barras con letras comunes no difieren entre sí según Duncan_{0,05}. Las barras de error representan el error típico de la media por tratamiento.

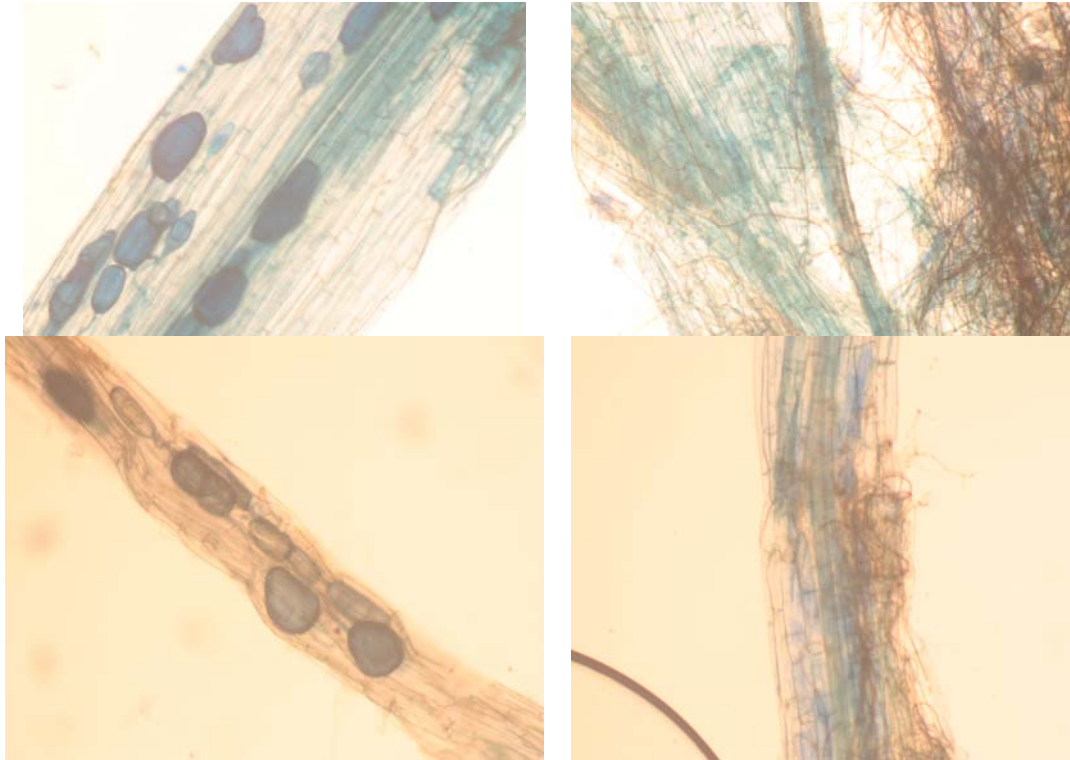


Figura 9. Fragmentos de raíces colonizadas por cepas de HMA pertenecientes al conglomerado

Los resultados de DV observados en nuestro estudio son altos si se comparan con los obtenidos por Terry (2005), Fundora (2007) y Mujica y Medina (2008) que, para el mismo cultivo, obtuvieron valores entre 2,70 y 4,12 %, pero se corresponden a los porcentajes de colonización obtenidos.

La explicación de tan altos niveles de intensidad de la colonización debe ser similar a la planteada en el caso de la colonización micorrízica, y deben ser observados como diferencias habituales en cuanto a intensidad de colonización mostradas por diversos aislados de micorrizas, junto con diferencias de adaptación de distintos aislados micorrízicos, dependiendo de la zona ecológica de la que procedan. Se hace necesario, por tanto, un diseño lo más “a la carta” posible de los inoculantes micorrízicos a aplicar (Pozo y Azcón-Aguilar, 2007).

4.2.2 Indicadores fisiológicos del crecimiento y desarrollo

A continuación, se presenta el comportamiento de algunas variables del crecimiento y desarrollo de las plantas de tomate, relacionando el efecto de las diferentes combinaciones de HMA con los niveles de salinidad estudiados.

El crecimiento y desarrollo de las plantas expresan aspectos morfológicos que son de gran importancia para considerar, con un criterio aceptado, el estado fisiológico de las mismas.

Análisis Factorial

El análisis factorial realizado a los indicadores evaluados del crecimiento y desarrollo al final del periodo de estrés, e indicadores calculados también del crecimiento y desarrollo durante el período de estrés de las plántulas evaluadas (Tabla 5), demostró que, prácticamente, no había interacción en ninguno de los índices evaluados, por lo que las respuestas de las plantas a las diferentes fuentes de inoculación con HMA no estarían condicionadas por los niveles de salinidad utilizados. Solamente los valores obtenidos para la biomasa seca del sistema radical mostraron un efecto significativo en la interacción entre los dos factores estudiados, lo que implica que las respuestas a la salinidad en, cuanto a biomasa seca de este órgano de la planta, está condicionada por la composición del inóculo micorrízico presente en el sustrato.

Tabla 5. Resultados del análisis factorial de los indicadores del crecimiento y desarrollo evaluados al final del estrés.

Factor	Masa seca raíz	Sig.	Masa seca tallo	Sig.	Masa seca hojas	Sig.	Masa seca total	Sig.
HMA	0.000000	***	0.000000	***	0.000000	***	0.0000	***
SAL	0.000000	***	0.000012	***	0.000027	***	0.0000	***
HMA * SAL	0.006297	**	0.074520	n.s	0.8383	n.s	0.3603	n.s

Al evaluar el efecto de los factores por separados, es de apreciar que entre diferentes niveles de salinidad solo el área foliar por hoja, según se muestra en la Tabla 6, no se vio afectado por este tipo de estrés.

Tabla 6. Resultados del análisis factorial de los indicadores área foliar y número de hojas al final del estrés.

Factor	Área foliar	Sig.	No. hojas	Sig.	Área hoja	Sig.
HMA	0.0000	***	0.4318	n.s	0.0000	***
SAL	0.00002	***	0.00466	**	0.0883	n.s
HMA * SAL	0.1774	n.s	0.6411	n.s	0.8972	n.s

También se encontró que las diferencias en el tipo de inoculante de HMA, solo provocaron cambios en los indicadores número de hojas por planta (Tabla 5) y tasa de asimilación neta (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados del análisis factorial de los índices de crecimiento y desarrollo evaluados al final del estrés.

Factor	TCR	Sig.	TAN	Sig.
HMA	0.0000	***	0.0631	n.s
SAL	0.0038	**	0.0015	***
HMA * SAL	0.3222	n.s	0.4007	n.s

El comportamiento de los índices de crecimiento y desarrollo se analiza más detalladamente en el siguiente acápite, en el cual, aunque solo se encontró interacción en uno de los indicadores estudiados, se eligió comparar todos los tratamientos entre sí para facilitar la interpretación de los resultados.

Biomasa seca de la raíz, tallo, hoja y total.

En la Figura 10 se observan los valores de biomasa seca (MS) obtenidos en raíz, tallo, hojas y planta total. En el análisis de la misma no se encontró interacción significativa entre los factores en estudio, indicando que el desarrollo del cultivo tuvo dependencia tanto de las especies de HMA presentes en el suelo como del nivel de salinidad.

Se puede apreciar que en las variantes micorrizadas, en general, la producción de masa seca por órganos y total, fue mayor en comparación con el testigo sin

inocular, tanto en condiciones normales (0 NaCl) como bajo estrés salino (50 y 100 NaCl), resultando el conglomerado de cepas procedentes del suelo con alto contenido de sales, en todos los casos, el tratamiento más efectivo en el incremento de este indicador.

En este sentido, se pone en evidencia la mayor eficiencia de cepas adaptadas a estrés salino y las ventajas de la sinergia que se establece entre las distintas especies cuando se trabaja con un conglomerado de cepas.

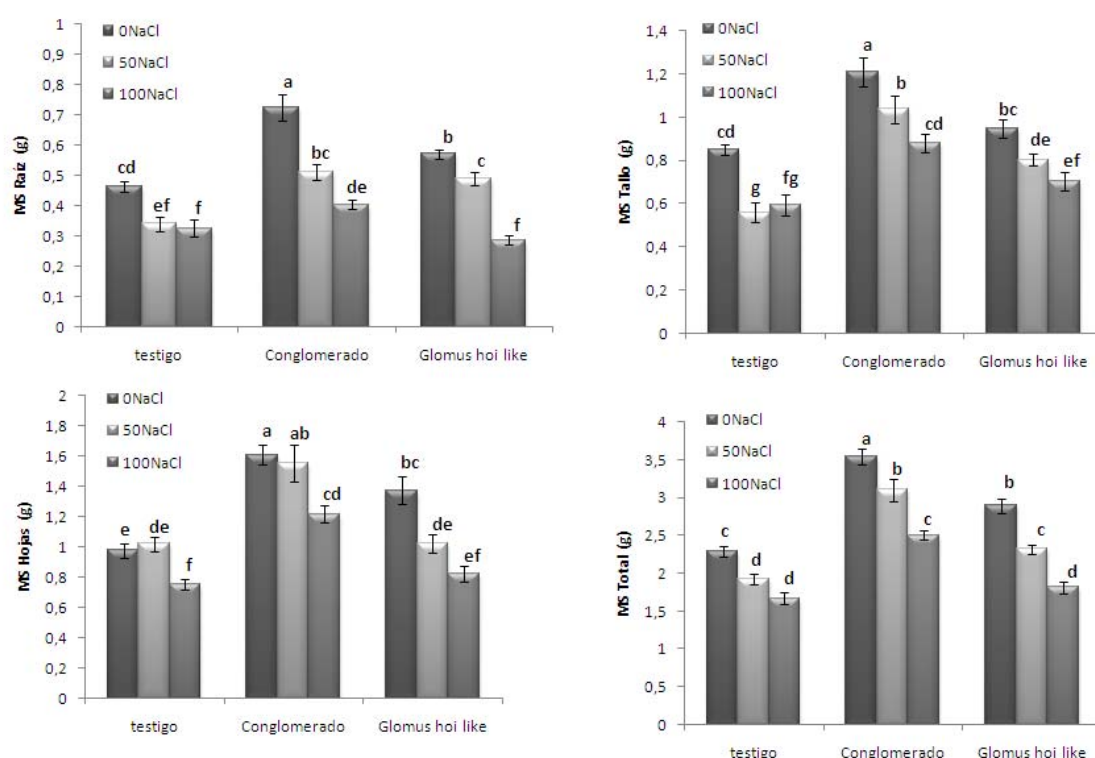


Figura 10. Valores de masa seca, por órganos y total, de plantas de tomate, sometidas a condiciones de salinidad. Barras con letras comunes no difieren entre sí según Duncan_{0.05}. Las barras de error representan el error típico de la media por tratamiento.

Así, bajo condiciones de salinidad media (50 NaCl), resalta el hecho que, para todos los órganos evaluados y para la planta en conjunto, en el tratamiento con el conglomerado de cepas se alcanzan valores de masa seca similares a los obtenidos con la cepa *G. hoi like* en condiciones de no salinidad y superiores a aquellos que mostraron los tratamientos con esta última cepa en condiciones de

estrés salino y todos los tratamientos, salinizados o no, de la variante no micorrizada (testigo).

De igual forma, a altos niveles de estrés salino (100 NaCl), los efectos sobresalientes del conglomerado de cepas se mantienen en general, aunque variaron entre órganos. Se puede apreciar que para el tallo y las hojas, la producción de masa seca de la variante conglomerado de cepas fue igual o superior que la alcanzada con *G. hoi* like sin estrés salino (0 NaCl) y medianamente estresada (50 NaCl) y al testigo. Solo para la raíz y para la planta en conjunto se obtuvo un efecto igual o menor que el alcanzado en el testigo y la cepa *G. hoi* like no salinizados y en el tratamiento con *G. hoi* like a niveles medios de salinidad.

Giri *et al.* (2003) reportan que, en plántulas micorrizadas de 30 a 60 días, ocurre un aumento significativo en la masa seca de raíces y brotes, en comparación con plantas no micorrizadas; esto coincide con reportes previos de plantas inoculadas con HMA que presentan un mayor crecimiento que las no inoculadas bajo condiciones de estrés salino (Juniper y Abbott, 1993; Copeman *et al.*, 1996; Al-Karaki, 2000; Al-Karaki *et al.*, 2001; Cantrell y Linderman, 2001).

En condiciones de estrés hídrico, Fundora (2007) encontró que la inoculación con la cepa *Glomus hoi* like aumentaba de manera significativa la masa seca de las raíces, alcanzando valores similares a los obtenidos en el experimento que se discute; no obstante, como ya fue señalado, estos son superados ampliamente por los resultados obtenidos por el conglomerado de cepas.

Número de hojas y área foliar por hoja y total

En la Figura 11 se puede apreciar el comportamiento de área foliar de las plantas y los resultados de los dos indicadores que la conforman (número de hojas y área foliar por hoja).

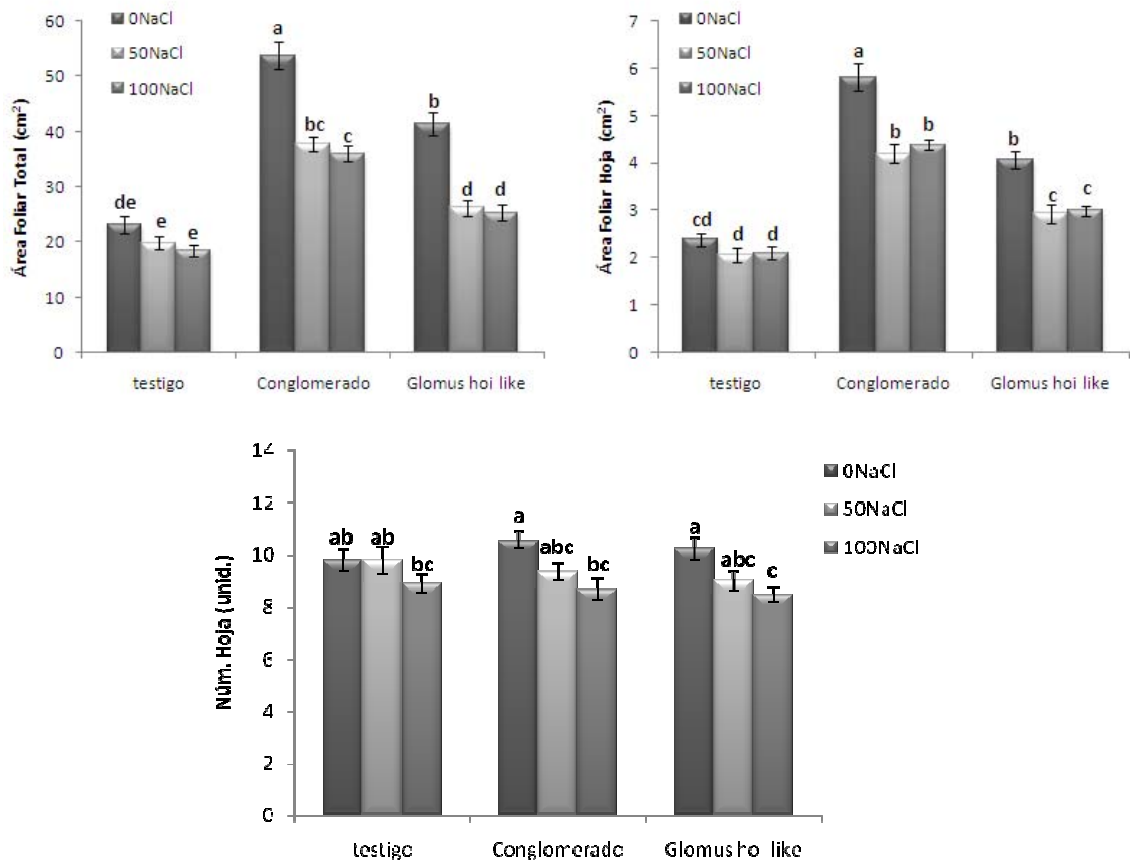


Figura 11. Área foliar total y por hoja y número de hojas de plantas de tomate, sometidas a condiciones de salinidad. Barras con letras comunes no difieren entre sí según Duncan_{0.05}. Las barras de error representan el error típico de la media por tratamiento.

Al igual que para la variable de biomasa seca, los resultados de los indicadores de área foliar se corresponden con el tipo de inóculo evaluado. Las plantas inoculadas con el conglomerado de cepas nativas de suelo con altos contenidos de sales presentaron los valores más altos, seguido por los tratamientos micorrizados con *Glomus hoi like*.

En cuanto al efecto de la salinidad, la misma provocó que, en este estado de desarrollo de las plantas y en las condiciones de micorrización, las hojas tuvieran un tamaño significativamente menor aunque similar, tanto en el tratamiento salino medio como en el más severo (50 y 100 NaCl). Debe resaltarse que en las variantes no inoculadas con HMA, el área foliar de las hojas no fue afectada por la

salinidad. No obstante, dichos valores siempre fueron menores que los correspondientes a las variantes micorrizadas sometidas o no a estrés salino.

Respecto al indicador número de hojas se encontró que, en general, el mismo no estuvo afectado por la presencia o no de estrés salino ni por la inoculación con HMA, y solo se apreciaron ligeras disminuciones cuando la salinización fue más elevada (100 NaCl), sobre todo en las plantas micorrizadas.

A partir del resultado antes analizado, se hace evidente que los incrementos en el área foliar total dependieron, fundamentalmente, de los aumentos en el área foliar por hoja, la cual, a su vez, está estrechamente relacionada con los incrementos de la biomasa seca foliar ya discutidos (Azcón-Bieto y Talón, 2001).

Tasa Relativa de Crecimiento (TRC) y Tasa de Asimilación Neta (TAN)

La TRC y la TAN son variables que permiten caracterizar, en conjunto, el crecimiento y el desarrollo del cultivo, así como la eficiencia fotosintética del órgano foliar.

En la Figura 12 se aprecia el comportamiento de la TRC y TAN durante el período en que las plantas fueron sometidas a la condición de estrés salino. Se observa que, para la TRC, los tratamientos inoculados con el conglomerado de cepas presentaron los mayores valores aun al nivel de 100 mM de NaCl, aunque a este nivel de salinización, el comportamiento de la variante inoculada con el conglomerado de cepas no difirió significativamente de aquel de las variantes no salinizadas sin micorrizar e inoculada con *Glomus hoi* like. También se aprecia que los tratamientos más afectados fueron aquellos con 100 mM de NaCl cuando las plantas fueron inoculadas con *Glomus hoi* like o solo contaban con las cepas nativas del suelo utilizado (testigo).

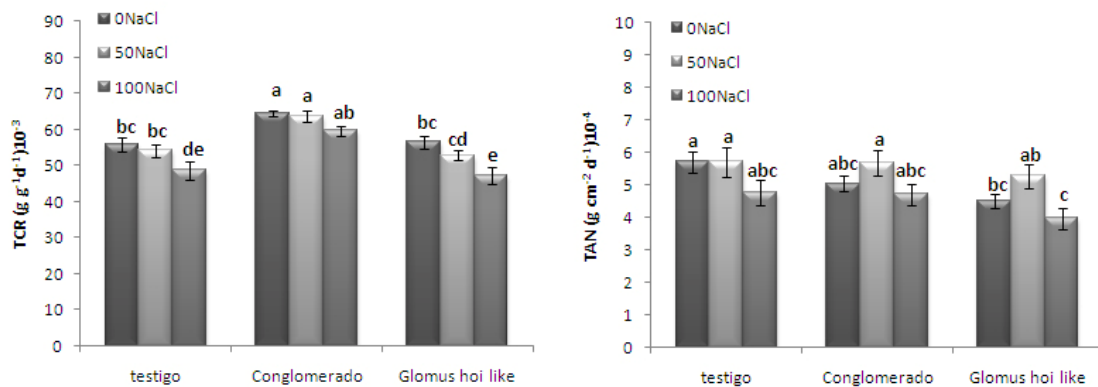


Figura 12. Tasa Relativa de Crecimiento (TRC) y Tasa de Asimilación Neta (TAN) durante el periodo de estrés salino. Tratamientos con letras diferentes difieren entre si a $p \leq 0,05$.

La Tasa de Asimilación Neta es un indicador que refleja la eficiencia de la superficie foliar para producir biomasa vegetal. Como se observa en la Figura 12, y de forma general, no se encontraron diferencias significativas para los valores de este índice entre los tratamientos estudiados. Este resultado permite inferir que la salinización del medio, aun a la dosis más alta, no afecto al aparato fotosintético ni su capacidad de producir biomasa.

A partir de las consideraciones anteriores, se puede plantear que las diferencias entre los valores de la TRC de las plantas inoculadas y el testigo son debidas, probablemente, a que las micorrizas proveen a su planta hospedera de mayores cantidades de nutrientes minerales y agua, optimizando de esta manera los recursos disponibles y aumentando el desarrollo de las plantas (González-Monterrubio, 2003).

Está ampliamente documentado el efecto beneficioso de los HMA sobre el crecimiento y desarrollo de los cultivos, tanto en condiciones óptimas como de estrés. Al-Karaki *et al.* (2001) estudiaron el efecto de la cepa *Glomus mosseae* bajo condiciones de estrés salino, demostrando el efecto beneficioso de esta cepa en el crecimiento y desarrollo de plantas que habitan ecosistemas salinos y la dependencia micorrízica desarrollada por estas. Por su parte, Choa *et al.* (2006), en un estudio realizado para conocer la respuesta del sorgo micorrizado y sin

micorrizar ante estreses salino e hídrico, señalaron que la presencia de un exceso de Na en el suelo agranda las diferencias en la respuestas de plantas micorrizadas y sin micorrizar ante la sequía.

Rodríguez *et al.*, (2003) encontraron diferencias significativas en los valores de la TRC de plantas de tomate inoculadas con seis cepas diferentes de HMA, sobresaliendo los tratamientos inoculados con las especies *G intrarradices*, *G. mosseae*, *G. clarum*, *G. fasciculatum* y *A. scrobiculata*, con valores que oscilaron entre 0,68 y 0,70 g.g⁻¹.d⁻¹. De la misma manera, Fundora (2007), al estudiar los efectos de una biofertilización a base de HMA en plantas de tomate sometidas a estrés hídrico, encontró que la TRC disminuía considerablemente cuando a las plantas en estudio les era retirado el riego, coincidiendo esto con el resto de las variables agronómicas estudiadas, alcanzando los valores mayores en las plantas inoculadas con la cepa *Glomus mosseae*.

El mismo autor, al no encontrar diferencias en los valores de la TAN entre plantas de tomate inoculadas y no con la cepa *Glomus mosseae*, señala que la presencia de los HMA no logró aumentar la eficiencia del aparato fotosintético del cultivo.

Como se puede observar en los estudios anteriormente mencionados, la inoculación con HMA incrementa de manera considerable las respuestas fisiológicas y agronómicas de los cultivos, tanto sometidos a estrés como los que no lo están, en comparación con aquellos que no se encuentran inoculados. Los resultados de este trabajo coinciden con lo anterior, mostrando, además, las ventajas de emplear tanto cepas adaptadas a diferentes condiciones estresantes, tales como la salinidad, como de inóculos constituidos por varias especies de HMA.

4.2.3 Indicadores Bioquímicos

Para entender los mecanismos que conducen a la tolerancia de las plantas a la salinidad, los factores bioquímicos que intervienen en este proceso son de

extrema importancia. Las enzimas antioxidantes constituyen un grupo que intervienen en la eliminación de las especies más reactivas del oxígeno. Algunas de las principales enzimas antiestrés están representadas por la catalasa (CAT), la peroxidasa (POX) y la ascorbato peroxidasa (APX) (Zhang *et al.*, 2006).

Al estudiar la actividad enzimática de plantas de tomate, en respuesta al estrés oxidativo inducido por la salinidad, como puede observarse en la Figura 13, la actividad catalasa, detectada en los extractos de hojas jóvenes y adultas, mostró un incremento en aquellas plantas que se encontraban micorrizadas, tanto con el conglomerado de cepas nativas de suelo con alto contenido de sales como con la cepa *Glomus hoi like*, alcanzando los valores significativamente más elevados. Se observó que, en ambos tipos de hojas, la actividad de la enzima fue significativamente mayor en las plantas inoculadas con el conglomerado.

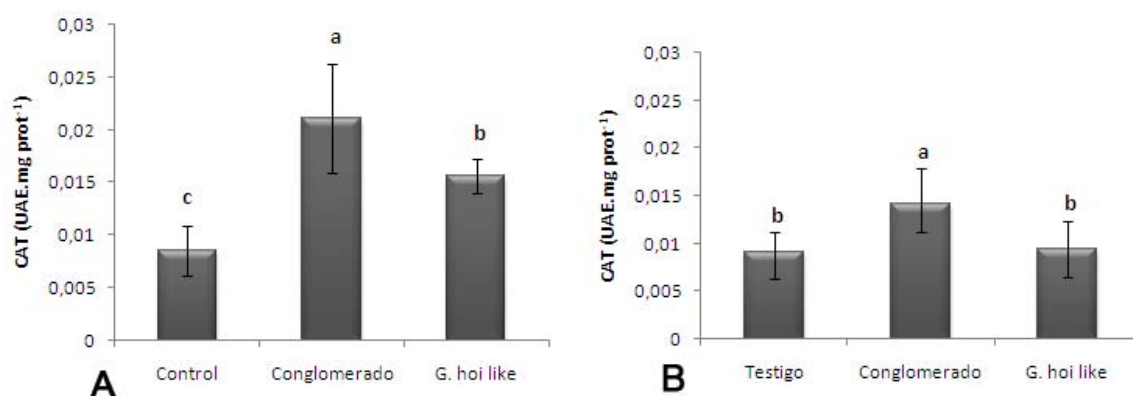


Figura 13. Actividad enzimática catalasa (CAT) en hojas jóvenes (A) y adultas (B) de plantas de tomate micorrizadas y no, sometidas a condiciones de salinidad. Barras con letras comunes no difieren entre sí según Duncan_{0.05}. Las barras de error representan el error típico de la media por tratamiento.

Un efecto similar se observó en la actividad de la POX (Figura 14) donde nuevamente las plantas inoculadas con el conglomerado registraron valores mayores. Zeinab *et al.* (2001) obtuvieron incrementos similares en la actividad de esta enzima, trabajando con cultivares de tomate sometidos a estrés salino con concentraciones entre 10 mM y 100 mM.

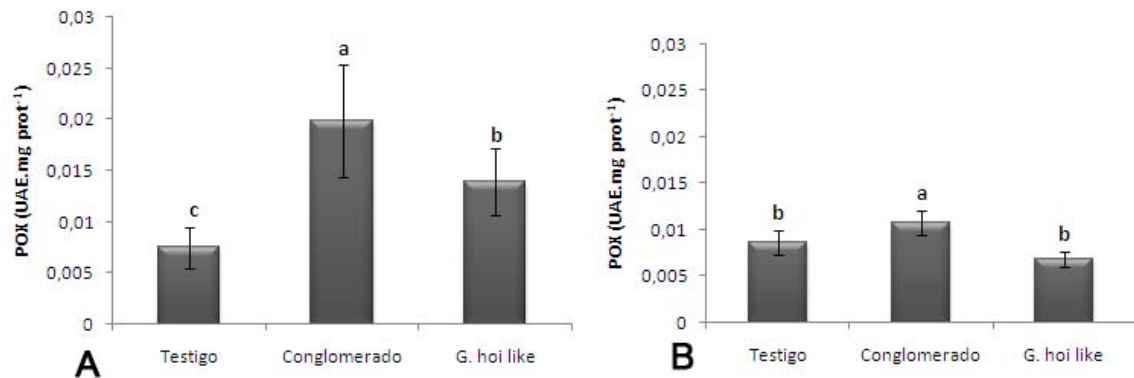


Figura 14. Actividad enzimática peroxidasa (POX) en hojas jóvenes (A) y adultas (B) de plantas de tomate micorrizadas y no, sometidas a condiciones de salinidad. Barras con letras comunes no difieren entre sí según Duncan_{0.05}. Las barras de error representan el error típico de la media por tratamiento.

En la Figura 15 se presentan los resultados de la actividad APX en las raíces de plantas de tomate sometidas a la salinidad, resultando significativamente mayor la actividad de esta enzima en las plantas que se encontraban micorrizadas. Sin embargo, no se encontró diferencia entre los tratamientos inoculados con *Glomus hoi like* y con el conglomerado de cepas.

Al respecto, es conocido que la simbiosis entre los HMA y las plantas no solo promueve el crecimiento y mejora la adquisición de nutrientes, sino que también modifica las propiedades bioquímicas de la planta, aumentando su resistencia al estrés (Noval *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos parecen indicar que la respuesta de las plantas de tomate ante los procesos oxidativos que deben aumentar con el estrés, está favorecida por la micorrización, en especial con las cepas que componen el conglomerado, tal y como demuestran los valores de actividad enzimática en las plantas inoculadas con este.

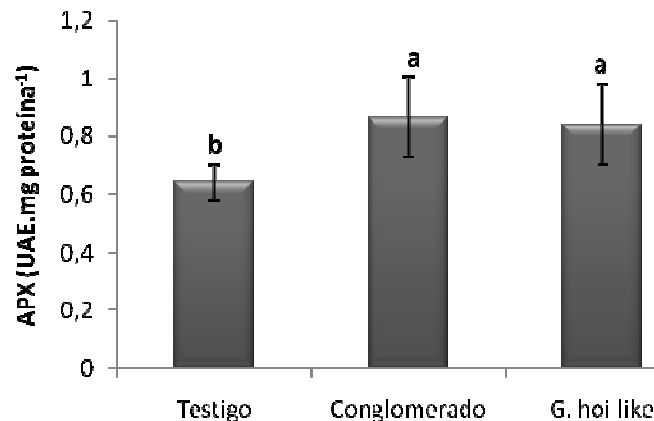


Figura 15. Actividad enzimática ascorbato peroxidasa (APX) en raíces de plantas de tomate micorrizadas y no, sometidas a condiciones de salinidad. Barras con letras comunes no difieren entre sí según Duncan_{0.05}. Las barras de error representan el error típico de la media por tratamiento.

Existen evidencias que indican una relación entre el incremento de las actividades POX, CAT, APX y otras, bajo condiciones de estrés salino y de otros tipos de estreses como temperatura y sequía, siendo aun más significativo este incremento en aquellas especies y variedades tolerantes a los mismos (Sairam y Tyagi, 2004). De manera similar, varios autores han encontrado una actividad incrementada de estas y otras enzimas en respuesta al estrés por salinidad, así como una elevada actividad antioxidante en especies y variedades tolerantes (Gómez *et al.*, 1999; Hernández, J. *et al.*, 2006). De lo anterior podemos concluir que, al ser mayor la actividad de estas enzimas en plantas micorrizadas, mayor será su tolerancia a la salinidad.

Los resultados obtenidos para las actividades enzimáticas de los sistemas antioxidantes estudiados están en correspondencia con las respuestas alcanzadas por las otras variables ya analizadas, haciéndose evidente que las cepas presentes en el conglomerado proveniente del suelo con alto contenido de sales, son las más efectivas en el aumento de la resistencia del tomate al estrés provocado por la salinidad. Todos los efectos observados se encuentran en concordancia con los aumentos de los niveles de estas enzimas en respuesta a

estreses abióticos encontrados en otros estudios (Mazorra y Núñez, 2000; Camejo *et al.*, 2002).

4.2.4 Efectos Nutricionales

Sodio

En la Figura 16 se muestran los contenidos de Na, por órganos y total, en plantas de tomate sometidas a estrés salino. Resultan notables los reducidos valores que exhiben las hojas, tallos y el total de las plantas inoculadas con el conglomerado de cepas y con *Glomus hoi* like, en comparación con el testigo no inoculado.

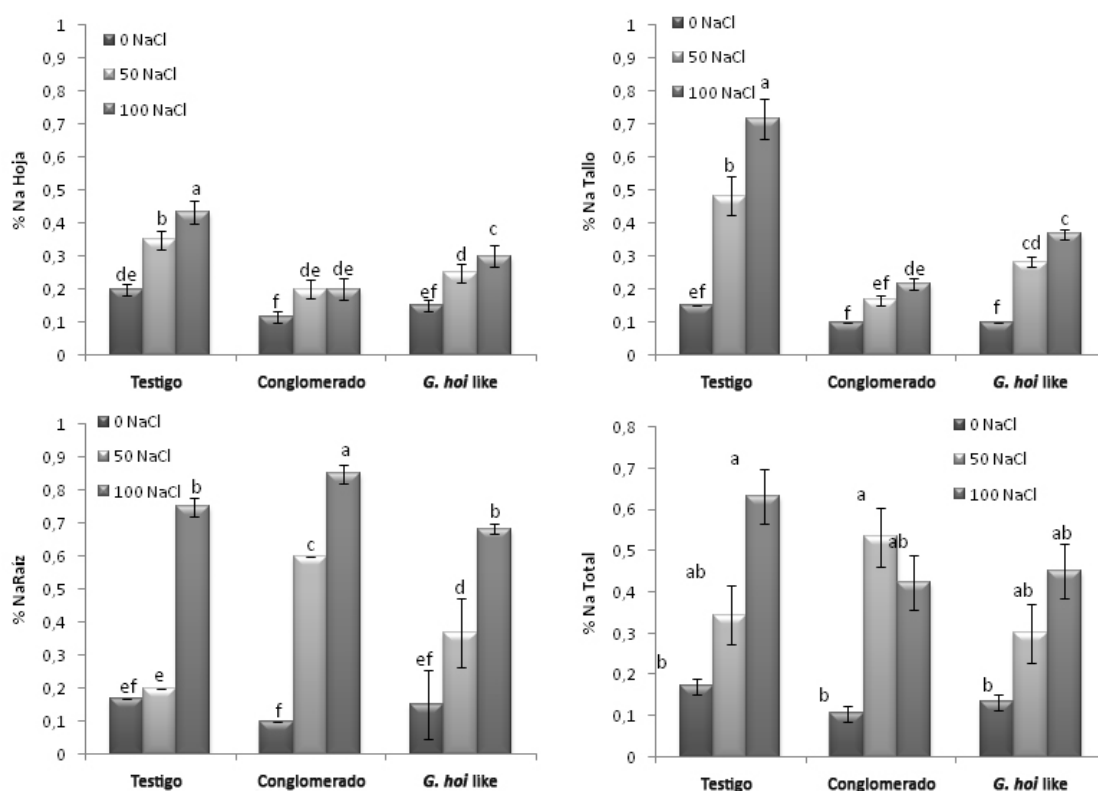


Figura 16. Efecto de la micorrización en el contenido de Na en hojas (A), tallos (B), raíces (C) y total (D) de plantas de tomate sometidas a estrés salino. Barras con letras comunes no difieren entre sí según Duncan_{0,05}. Las barras de error representan el error típico de la media por tratamiento.

Sin embargo, se puede observar que en las raíces no ocurre el mismo efecto, siendo significativos los incrementos del contenido de Na en el sistema radical de las plantas inoculadas con el conglomerado, a concentraciones de NaCl de 100

mM, en relación al resto de los tratamientos. De igual forma, para concentraciones de 50 mM de NaCl, tanto las plantas inoculadas con el conglomerado como con la cepa *Glomus hoi* like mostraron mayores contenidos de Na que los tratamientos salinizados y no en la variante sin inocular (testigo).

Existen evidencias de que, aparentemente, elementos tóxicos para las plantas a grandes concentraciones (Na, Cd, Pb, Ni, Ba, As) son secuestrados en gránulos de polifosfato en el interior de las hifas de los HMA, no siendo transferidos a otros órganos de la planta (Smith y Read, 1997; Rivera-Becerril *et al.*, 2002; Brito *et al.*, 2008), y estas pudieran ser las grandes concentraciones de Na que se encontraron en las raíces colonizadas.

En base a lo anterior, pudiera plantearse un posible mecanismo para explicar el papel de los HMA en la disminución del estrés salino en las plantas, a partir de la disminución de la absorción del Na y su translocación a los tejidos de la planta, por acumulación del elemento en las hifas. Como se puede observar en la Figura 16, las plantas micorrizadas presentan menos Na en sus órganos aéreos que las no micorrizadas.

Nitrógeno

En la Figura 17 se presentan los contenidos de nitrógeno, por órganos y total, en las plantas de tomate bajo diferentes niveles de salinidad, donde se puede observar una notable y significativa disminución de los contenidos de nitrógeno en todos los órganos, excepto la raíz, de las plantas, tanto micorrizadas como no, al aumentar las concentraciones de sales. Este efecto resulta de interés, dado que puede apreciarse también que los contenidos del nutriente fueron significativamente superiores en los tratamientos micorrizados, indicativo de una mayor absorción del elemento, sobre todo en la variante inoculada con el conglomerado de cepas.

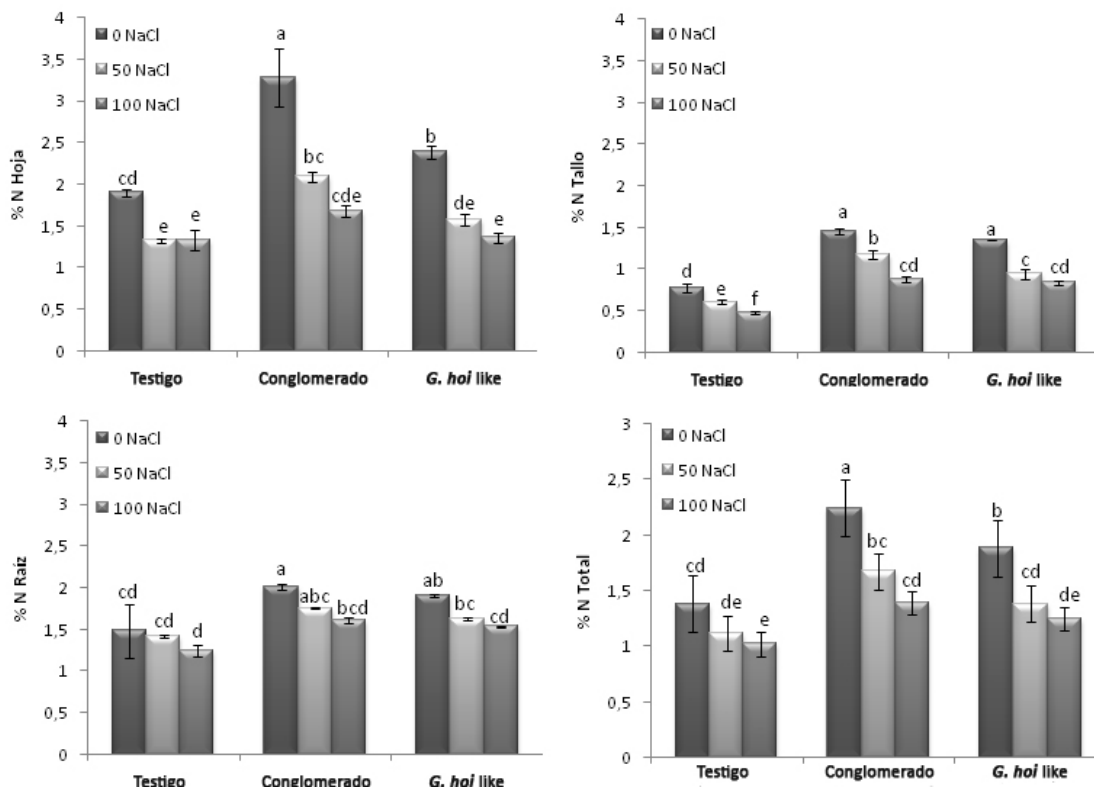


Figura 17. Efecto de la micorrización en el contenido de N en hojas (A), tallos (B), raíces (C) y total (D) de plantas de tomate sometidas a estrés salino. Barras con letras comunes no difieren entre sí según Duncan_{0,05}. Las barras de error representan el error típico de la media por tratamiento.

Aunque en valores más discretos que el resto de los nutrientes, se ha reportado un aumento de la adquisición de N en plantas micorrizadas. Corkidi *et al.* (2002) reportaron aumentos en la absorción del N en poblaciones vegetales de zonas áridas que se encontraban micorrizadas, resultados que concuerdan con los encontrados en este experimento en plantas que se encontraban inoculadas con las cepas del conglomerado.

Fósforo

Los contenidos de este nutriente en las plantas sometidas a estrés salino tuvieron un comportamiento similar al descrito anteriormente para el nitrógeno. En la Figura 18 se presentan los valores de los contenidos del elemento, por órganos y total, en plantas de tomate inoculadas y no, a diferentes niveles de salinización.

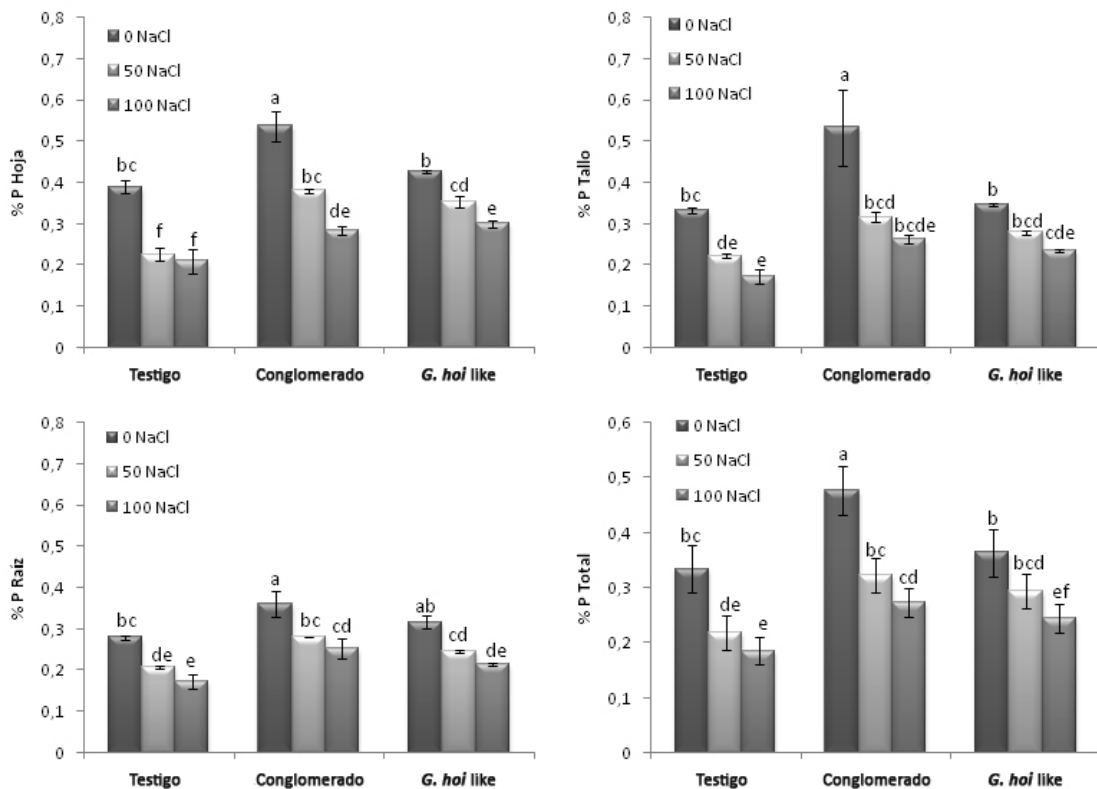


Figura 18. Efecto de la micorrización en el contenido de P en hojas (A), tallos (B), raíces (C) y total (D) de plantas de tomate sometidas a estrés salino. Barras con letras comunes no difieren entre sí según $Duncan_{0,05}$. Las barras de error representan el error típico de la media por tratamiento.

Así, aunque los contenidos de fósforo en las hojas, tallo, raíces y total de las plantas inoculadas con el conglomerado fueron significativamente mayores, al aplicarse los tratamientos con NaCl, los contenidos del elemento disminuyeron de forma similar tanto en las plantas inoculadas con el conglomerado como en las inoculadas con *Glomus hoi* like y las no inoculadas.

El incremento de la absorción de P por las plantas micorrizadas es una realidad que se encuentra ampliamente documentada. Modificaciones en la rizosfera pueden aumentar la transferencia de P a las raíces de las plantas y la eficiencia con que los cultivos utilizan este elemento (Bolan, 1991). Plaut *et al.* (1990) encontraron que el incremento del P trae como resultados una disminución del Na, lo que puede estar indirectamente relacionado con la toma del Ca y el Mg.

Cantrell y Linderman (2001) sugieren que los HMA aumentan la nutrición del P en plantas bajo estrés salino y reducen los efectos negativos del Na, manteniendo la integridad de la membrana vacuolar, lo que impide que estos iones puedan intervenir en las rutas metabólicas y facilita la compartimentación en el interior de las vacuolas y la admisión selectiva de iones.

Por otra parte, es conocido que la salinidad del suelo reduce significativamente la absorción de nutrientes minerales, especialmente fósforo, ya que los iones fosfato se precipitan con los cationes presentes en suelos salinos, tornándose no disponibles para la planta (Poss *et al.* 1985; Munns 1993; Grattan and Grieve 1999).

Por lo tanto, el mejor estado nutricional fosfórico que se observa en las plantas micorrizadas, tanto por el conglomerado como por la cepa *Glomus hoi* like, es beneficioso para el crecimiento de la planta y puede ayudar a mitigar el estrés salino, al superar la capacidad de retención del fósforo en el suelo. Se ha señalado que los HMA muestran una influencia positiva en la composición de los nutrientes minerales, especialmente los de pobre movilidad como el fósforo, en plantas que crecen bajo condiciones de salinidad (Giri y Mukerji, 2004)

Potasio

Como se observa en la Figura 19, el comportamiento del contenido de potasio en planta, ante las diferentes variantes evaluadas, también fue semejante al ya analizado para el N y el P, de forma que la inoculación con el conglomerado de cepas permitió obtener contenidos del nutriente superiores en todos los órganos, así como para el conjunto de la planta. Asimismo, los niveles de K disminuyeron en todas las variantes de inoculación con el aumento del nivel de salinización.

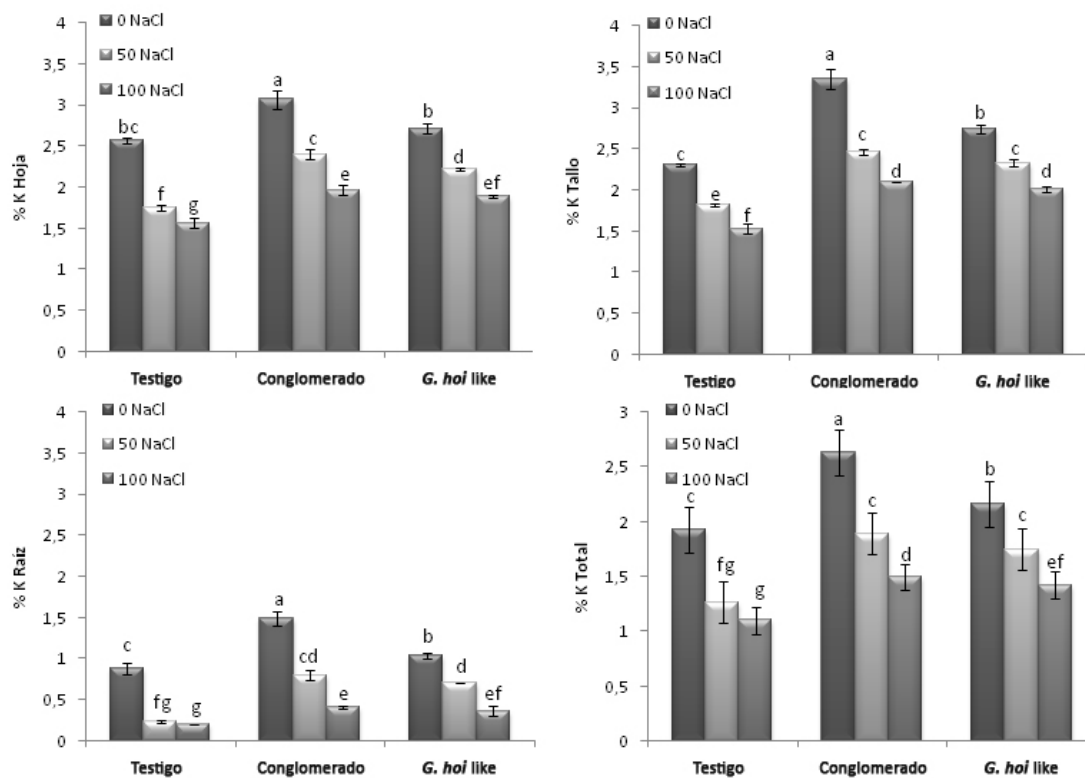


Figura 19. Efecto de la micorrización en el contenido de K en hojas (A), tallos (B), raíces (C) y total (D) de plantas de tomate sometidas a estrés salino. Barras con letras comunes no difieren entre sí según Duncan_{0,05}. Las barras de error representan el error típico de la media por tratamiento.

Cuando el agua en el suelo es limitada, bajo condiciones de salinidad, las plantas sufren una pérdida de turgencia y comienzan a marchitarse, síntomas típicos de deficiencia de K. Como soluto en las vacuolas, el K juega un importante rol en el control de las relaciones hídricas ayudando a mantener alto el nivel de agua en los tejidos, incluso bajo condiciones osmóticas desiguales. Así, la mayor acumulación de K en los tejidos de las plantas micorrizadas puede constituir una importante contribución hacia el mantenimiento del potencial osmótico de las células y los tejidos de las plantas sometidas a estrés salino (Porrás-Soriano *et al.*, 2009)

Además, Ojala *et al.* (1983) encontraron que plantas de cebolla inoculadas con HMA tenían mayores concentraciones de K en retoños y bulbos bajo condiciones de estrés salino, lo que puede ser beneficioso para el mantenimiento de una alta

relación Na/K e influenciar en el balance iónico del citoplasma (Founoune *et al.*, 2002).

Los resultados de los indicadores del estado nutricional de las plantas inoculadas sometidas a estrés salino, se encuentran en correspondencia con los observados para los indicadores de crecimiento ya analizados. Cruz *et al.* (2008) relacionan el aumento de la biomasa de plantas inoculadas con HMA con la mejora en la nutrición mineral por parte de estas, reconociendo este efecto como una fuerte evidencia de los beneficios de la colonización micorrízica.

Se puede resumir, después de lo anteriormente observado, que la reducción en la entrada a la planta de Na, unida al incremento en la absorción de N, P y K observados en las plantas micorrizadas, sobre todo en aquellas inoculadas con cepas adaptadas a ambientes con alto contenido de sales, puede ser un importante mecanismo de alivio para plantas que crecen en suelos salinos.

4.3 Consideraciones generales

Haciendo un análisis integral de los resultados, se puede plantear que la simbiosis micorrízica desencadena un sinnúmero de respuestas morfológicas y fisiológicas en las plantas, que se potencian cuando se tiene en cuenta una correcta selección de los cultivos y de los inoculos micorrízicos a emplear para las condiciones de estrés abiótico específicas de cada zona. El conglomerado de HMA nativos de suelos con altos contenidos de sales propició a las plantas inoculadas con él, una mejor respuesta ante el estrés ocasionado por la salinidad tanto a nivel fisiológico y bioquímico como agronómico.

Los suelos de la zona estudiada, con altos contenidos de sales, presentaron una alta diversidad de especies de HMA, encontrándose en ellos varios de los géneros descritos en la literatura. La correcta selección y manejo de estos hongos puede permitir el desarrollo de inóculos micorrízicos más eficientes para condiciones similares.

La colonización de las plantas por HMA disminuye considerablemente los efectos perjudiciales que tiene sobre los cultivos el estrés ocasionado por el aumento de la salinidad en los suelos. Si la inoculación se realiza por cepas de estos hongos que se encuentran adaptadas a esta condición, los resultados encontrados son superiores en la mayoría de los parámetros estudiados.

Se conoce la idea que la asociación micorrízica no es específica, partiendo del hecho de que una misma planta puede ser colonizada por varias especies de HMA al mismo tiempo. A pesar de esto, los resultados de estas asociaciones dependen de las especies que se hallen envueltas en el proceso. No todas las plantas se benefician de la misma manera de la simbiosis micorrízica y los beneficios de esta dependen de la comunidad fúngica que se encuentre en la rizosfera (Jakobsen *et al.*, 2002; Cruz *et al.*, 2008).

Características importantes relacionadas con los HMA, como pueden ser el porcentaje de colonización y el aumento en la absorción y translocación de nutrientes, ponen de manifiesto la eficiencia de los inóculos utilizados.

El conglomerado de cepas aisladas demostró ser altamente efectivo si tenemos en cuenta que, en todos los casos, las plantas inoculadas con él presentaron los más altos índices de colonización micorrízica y porcentaje de densidad visual, y en la mayoría de ellos se encontraron en mejor estado nutricional que los restantes tratamientos.

Smith *et al.* (2003) demostraron que la ganancia de biomasa y nutrientes de las plantas micorrizadas depende tanto de estas como de las especies fúngicas envueltas en la simbiosis. También podemos plantear que la diversidad taxonómica está relacionada con la diversidad funcional; por ello, resulta de suma importancia identificar que géneros o asociaciones de ellos podemos encontrar

para diferentes condiciones edafoclimáticas, lo cual permitiría optimizar los beneficios de esta asociación en ecosistemas similares.

En concordancia con los planteamientos anteriores, está reconocido en numerosos estudios que los inóculos compuestos por asociaciones de varias especies resultan muy efectivos debido a los efectos beneficiosos de la sinergia que se establece entre las especies.

Lara (1987) observó que la altura y materia seca de la parte aérea de tres leguminosas nativas de zonas áridas, propagadas por semilla, respondieron diferencialmente a la inoculación de 13 consorcios naturales de HMA, aislados de la zona árida de Zacatecas. Por otra parte, Estrada-Luna y Davies (1999) mencionaron que la inoculación del consorcio micorrízico *Glomus* sp. Zac.-19 (conformado por tres especies; *G. clariodeum*, *G. diaphanum* y *G. albidum*), en condiciones de aplicación de 11 mg P.kg⁻¹, después de siete meses, produjo incrementos significativos en el crecimiento de plantas micropropagadas de *Opuntia amyclaea tenore* cv. Reyna. Los resultados encontrados aquí reafirman lo encontrado en estos estudios, al presentar el conglomerado utilizado los mejores resultados en la mayoría de las variables estudiadas.

VI- CONCLUSIONES

1. Los suelos con altos contenidos de sales estudiados presentan una alta diversidad de hongos micorrízicos arbusculares, representada por cuatro de los 19 géneros conocidos (*Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora*). El más abundante fue el género *Glomus*, con el 74% de las especies aisladas, por lo cual se destaca como el de mayor éxito ecológico para las condiciones del área en estudio.
2. Se aislaron, caracterizaron y reprodujeron 28 morfotipos de HMA, de los cuales el 35% se consideraron como potenciales especies nuevas por no encontrarse descritas en la literatura.
3. El conglomerado compuesto por los 28 morfotipos aislados, fue igualmente efectivo en la colonización de las raíces de tomate como el inoculante a base a la cepa *Glomus hoi* like, de reconocida eficiencia micorrízica. En condiciones de suelos afectados por sales, las plantas inoculadas con el conglomerado de cepas alcanzaron mayores niveles de colonización micorrízica.
4. Con la inoculación del conglomerado de cepas se alcanzaron mayores índices de crecimiento y desarrollo de las plantas afectadas por estrés salino, incrementando la producción de biomasa, así como provocando cambios positivos y específicos a nivel celular en la inducción de sistemas antioxidantes como catalasa, ascorbato peroxidasa y peroxidasa.
5. Las plantas inoculadas con las cepas provenientes del conglomerado tuvieron un mejor estado nutricional, tanto en condiciones normales como sometidas a estrés salino, siendo notable la disminución de los contenidos de sodio en las plantas colonizadas por dichas cepas bajo condiciones de estrés por salinidad.

VII- RECOMENDACIONES

1. Continuar los estudios sobre la ecología y diversidad de los hongos micorrízicos arbusculares y la caracterización del potencial micorrízico de los suelos en zonas representativas de afectaciones por salinidad.
2. Demostrar, en condiciones de campo afectadas por salinidad, la efectividad de aislados micorrízicos de zonas salinas, sobre todo en cultivos poco tolerantes a este tipo de estrés.
3. Continuar desarrollando estudios fisiológicos y bioquímicos para evaluar la eficiencia de cepas de hongos micorrízicos arbusculares adaptados a condiciones de salinidad , así como los mecanismos que intervienen en este proceso.
4. Emplear los resultados de esta tesis como material de consulta para la enseñanza pre y posgraduada.

VII- REFERENCIAS

1. Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 105: p. 119–122.
2. Aguirreolea, J., I. Garmendia, y N. Goicoechea (2006). Defence-related Enzymes in Pepper Roots During Interactions with Arbuscular Mycorrhizal Fungi and/or *Verticillium dahliae* *BioControl*. 51(3): p. 293-310.
3. Aliasgharzadeh, N., N. Rastin, H. Towfighi, y A. Alizadeh (2001). Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in saline soils of the Tabriz plain of Iran in relation to some physical and chemical properties of soil. *Mycorrhiza*. 11: p. 119–122.
4. Al-Karaki, G. (2000). Growth of mycorrhizal tomato and mineral acquisition under salt stress. *Mycorrhiza*. 10: p. 51-54.
5. Al-Karaki, G. y R. Clark (1998). Growth, mineral acquisition and water use by mycorrhizal wheat grown under water stress. *J Plant Nutr* 21: p. 263–276.
6. Al-Karaki, G., R. Hammad, y M. Rusan (2001). Response of two tomato cultivars differing in salt tolerance to inoculation with mycorrhizal fungi under salt stress. *Mycorrhiza*. 11: p. 43–47.
7. Almasoum, A. (2000). Effect of planting depth on growth and productivity of tomatoes using drip irrigation with semi saline water. *Acta Hort*. 537: p. 773-778.
8. Almeida, R.T.d., V. Freire, y F. Vasconcelos (1987). Tipos de esporos de fungos micorrízicos Va EM solos sob leguminosas arboreas do estado do Ceara, Brasil. *Cien. Agron*. 18(2): p. 41-50.
9. Alrahman, A., N. Shibli, R. Ereifej, y K. Hindiyeh (2005). Influence of salinity on growth and physiology of in vitro grown cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Jordan Agric. Sci*. 1: p. 93 - 106.
10. Álvarez, M., S. Härtel, R. Godoy, y W. Heyser (2003). New perspectives in determination of phosphatase activity in ectomycorrhiza of *Nothofagus obliqua* forests in southern Chile. *Gayana Botanica*. 60(1): p. 41-46.
11. Amor, F.D., M. Martínez, y A. Cerda (2001). Salt tolerance of tomato plants as affected by stage of plant development. *HortScience*. 36(7): p. 1260-1263.
12. Aroca, R., R. Porcel, y J. Ruiz-Lozano (2007). How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses? *New Phytologist*. 173: p. 808–816.
13. Ashraf, M. y M. Foolad (2006). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exptl. Bot*. 59: p. 206-216.

14. Aslam, M., R. Huffaker, y D. William (1984). Early Effects of Salinity on Nitrate Assimilation in Barley Seedlings. *Plant Physiology*. 76: p. 321-325.
15. Azcón, R. y R. Tobar (1998). Activity of nitrate reductase and glutamine synthetase in shoot and root of mycorrhizal *Allium cepa*. Effect of drought stress. *Plant Science* 133: p. 1-8.
16. Azcón-Aguilar, C. y J. Barea (1997). Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. *Aust. J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 68: p. 1-24.
17. Azcón-Bieto, J. y M. Talón (2001). *Fundamentos de fisiología vegetal* Madrid: McGRAW-HILL. 522.
18. Bago, B., P. Pfeffer, y Y. Schachar-Hill (2000). Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology*. 124: p. 1-10.
19. Barea, J. y P. Jeffries (1995). Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil plant systems, en *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology*, A. Varma y B. Hock, Editors, Springer: Heidelberg. p. 521-59.
20. Beadle, C. (1993). Growth analysis, en *Photosynthesis and Production in Changing Environment*, D.O. Hall, J.M.O. Scurlock, H.R. Bolhar-Nordentrampf, R.C. Leegood, y S.P. Long, Editors, Chapman & Hall: London. p. 36-45.
21. Bergmeyer, H. (1974). Reagents for enzymatic analysis, en *Methods of Enzymatic Analysis*, H. Bergmeyer y K. Gawehn, Editors, Verlag: Weinheim. p. 494-495.
22. Bernstein, I. (1975). Effects of salinity y sodicity on plant growth. *Annu. Rev. Phytopathol.* 13: p. 295-312.
23. Blaszkowski, J. (1993). Comparative studies on the occurrence of arbuscular fungi and mycorrhizae (*Glomales*) in cultivated and uncultivated soils of Poland. *Acta Mycol.* 28: p. 93-140.
24. Blilou, I., J. Ocampo, y J. García-Garrido (2000). Induction of Ltp (lipid transfer protein) and Pal (phenylalanine ammonia-lyase) gene expression in rice roots colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *J Exp Bot.* 51: p. 1969-1977.
25. Boisson-Dernier, A., M. Chabaud, F. Garcia, G. Bécard, C. Rosenberg, y D. Barker (2001). Hairy roots of *Medicago truncatula* as tools for studying nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbioses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: p. 693-700.
26. Bolan, N. (1991). A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plant. *Plant and Soil* 134: p. 189-207.

27. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* 72: p. 248-254.
28. Bray, E., J. Bailey-Serres, y E. Weretilnyk (2000). Responses to abiotic stresses, en *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, B. Buchanan, W. Gruissem, y R. Jones, Editors, American Society of Plant Physiologists: Rockville. p. 1158–1203.
29. Brito, B., A. Toffanin, R. Prieto, J. Imperial, T. Ruiz-Argüeso, y J. Palacios (2008). Host-Dependent Expression of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Hydrogenase Is Controlled at Transcriptional and Post-Transcriptional Levels in Legume Nodules *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 21(5): p. 597-604.
30. Calvente, R., C. Cano, N. Ferrol, C. Azcón-Aguilar, y J. Barea (2004). Analysing natural diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in olive tree (*Olea europaea* L.) plantations and assessment of the effectiveness of native fungal isolates as inoculants for commercial cultivars of olive plantlets. *Applied Soil Ecology* 26: p. 11–19.
31. Camejo, D., J. Alarcón, W. Torres, P. Rodríguez, y J. Dell' Amico (2002). Changes induced by high temperatures in photosynthesis and antioxidant response on two genotypes of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Cultivos Tropicales* 23(4): p. 33-37.
32. Cano, E., F. Perez-Alfocea, V. Moreno, M. Caro, y M. Bolarin (1998). Evaluation of salt tolerance in cultivated and wild tomato species through in vitro shoot apex culture. *Plant Cell Tissue Org Cult.* 53: p. 19–26.
33. Cantrell, I. y R. Linderman (2001). Preinoculation of lettuce and onion with VA mycorrhizal fungi reduces deleterious effects of soil salinity. *Plant Soil* 233: p. 269–281.
34. Castellanos, J. y R. Muñoz (2003). La Industria de la Horticultura Protegida en México, en *Manual de Producción Hortícola en Invernadero*, JJ Muñoz-Ramos y J. Castellanos, Editors, INCAPA: México. p. 1-17.
35. Castillo, C., (2005). Biodiversidad y efectividad de hongos micorrízicos arbusculares en ecosistemas agro-forestales del centro sur de Chile. Universidad de la Frontera Temuco, Chile
36. Chinnusamy, V., A. Jagendorf, y J.-K. Zhu (2005). Understanding and Improving Salt Tolerance in Plants *Crop Sci* 45: p. 437-448

37. Choa, K., H. Tolera, J. Leeb, B. Ownley, J.C. Stutz, J.L. Moore, y R.M. Auge (2006). Mycorrhizal symbiosis and response of sorghum plants to combined drought and salinity stresses. *Journal of Plant Physiology* 163: p. 517—528.
38. Cochran, W. y G. Cox (1990). *Diseños experimentales México*: Trellas.
39. Collins, N., F. Pflieger, R. Crookston, S. Simmons, y P. Coipeland (1991). Vesicular-Arbuscular mycorrhizas respond to corn and soybean cropping history. *New Phytologist*. 117: p. 657-663.
40. Copeman, R., C. Martin, y J. Stutz (1996). Tomato growth in response to salinity and mycorrhizal fungi from saline or no-saline soils. *Aust. J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 31: p. 341-344.
41. Cordovilla, M., F. Ligeró, y C. Lluch (1994). The effect of salinity on N fixation and assimilation in *Vicia faba*. *T. Exp. Bot.* 45: p. 1483-1488.
42. Corkidi, L., D. Rowland, N. Johnson, y E. Allen (2002). Nitrogen fertilization alters the functioning of arbuscular mycorrhizas at two semiarid grasslands. *Plant and Soil*. 240(2): p. 299-310.
43. Cramer, G., A. Lauchli, y A. Polito (1985). Displacement of Ca by Na from the plasmalemma of root cells. A primary response to salt stress. *Plant Physiol* 79: p. 207–211.
44. Cruz, R., A. Díaz-Franco, V. Pecina-Quintero, I. Garza-Cano, y J. Loera-Gallardo (2008). *Glomus intraradices* and *Azospirillum brasilense* in wheat grown under two regimes of soil humidity. *Publicaciones Uciencia*. 24(3): p. 239-245.
45. Cuartero, J. y R. Fernández-Muñoz (1999). Tomato and salinity. *Scientia Horticulture*. 78: p. 83-125.
46. Cucci, G., V. Cantore, F. Boari, y A. De Caro (2000). Water salinity and influence of SAR on yield and quality parameters in tomato. *Acta Hort.* 537: p. 663-670.
47. Daft, M. y A. El-Giahmi (1978). Effects of arbuscular mycorrhiza on plants growth. VIII. Effects of defoliation and light on selected host. *New Phytologist*. 80: p. 365-372.
48. DeBellis, T. y P. Widden (2006). Diversity of the small subunit ribosomal RNA gene of the arbuscular mycorrhizal fungi colonizing *Clintonia borealis* from a mixed-wood boreal forest. *Microbiol. Ecol.* 58: p. 225–235.
49. Douds, D., L. Galvez, R. Janke, y P. Wagoner (1995). Effect of tillage and farming system upon populations and distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Agricultura. Ecosystems and Environment*. 52: p. 111-118.

50. Duvert, P., R. Perrin, y C. Plenchette (1990). Soil receptiveness to VA mycorrhizal association: concept and method. *Plant and soil*. 124: p. 1 – 6.
51. El-Habbasha, K., A. Shaheen, y F. Rizk (1996). Germination of some tomato cultivars as affected by salinity stress condition. *Egyptian-Journal-of-Horticulture*. 23(2): p. 179-190.
52. El-Motaium, R., H. Hu, y P. Brown (1994). The relative tolerance of six *Prunus rootstocks* to boron and salinity. *Journal of American Society for Horticultural Science*. 119: p. 1169±1175.
53. Estrada-Luna, A. y F. Davies (1999). Effects of mycorrhizal fungi and phosphorus on growth and nutrient uptake of micropropagated prickly pear cactus plantlets (*Opuntia amyclaea* Tenore cv. Reyna. *HortScience*. 34(3): p. 47.
54. FAO, ISRIC, y SICS (1999). Base Referencial Mundial del Recurso Suelos.
55. Feigin, A., I. Rylski, A. Meiri, y J. Shalhevet (1987). Response of melon and tomato plants to chloride-nitrate ratios in saline nutrient solutions. *J. Plant Nutr.* 10: p. 1787-1794.
56. Feign, A. (1985). Fertilization management of crops irrigated with saline water. *Plant and soil*. 89(13): p. 285-299
57. Fernández-García, N., V. Martínez, A. Cerda, y M. Carvajal (2004). Fruit quality of grafted tomato plants grown under saline conditions. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 79(6): p. 995-1001.
58. Founoune, H., R. Duponnois, A. Ba, y F. El Bouami (2002). Influence of the dual arbuscular endomycorrhizal/ectomycorrhizal symbiosison the growth of *Acacia holosericea* (A. Cunn. ex G. Don) in glasshouse conditions. *Ann For Sci* 59: p. 93-98.
59. Francois, L. y E. Maas (1993). Crop response and management on salt-affected soils, en *Handbook of Plant and Crop Stress*, M. Pessaracle, Editor.
60. Fundora, L., (2007). La biofertilización micorrízica: una alternativa ecológica para cultivar tomate en condiciones de recursos hídricos limitados. Tesis de Maestría, UNAH La Habana.
61. Gerdemann, J. y T. Nicolson (1963). Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans Br Mycol Soc*. 46: p. 235–244.
62. Ghazi, N. y Al-Karaki (2008) Response of Wheat and Barley during Germination to Seed Osmopriming at Different Water Potential. Volume, 229-235 DOI: 10.1111/j.1439-037X.1998.tb00422.x

63. Ghorbanli, M., H. Ebrahimzadeh, y M. Sharifi (2004). Effects of NaCl and mycorrhizal fungi on antioxidative enzymes in soybean. *Biologia Plantarum* 48: p. 575–581.
64. Gianinazzi-Pearson, V. (1996). Plant cell response to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. *Plant Cell* 8: p. 1871–1883.
65. Giovannetti, M. y V. Gianinazzi-Person (1994). Biodiversity in arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research*. 98: p. 705-715.
66. Giovannetti, M. y B. Mosse (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular infection in roots. *New Phytologist* 84: p. 489–500.
67. Giovannetti, M., C. Sbrana, L. Avio, y P. Strani (2004). patterns of below-ground plant interconnection established by means of arbuscular mycorrhizal network. *New Phytologist*. 164: p. 175-181.
68. Giri, B., R. Kapoor, y K. Mukerji (2003). Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and salinity on growth, biomass, and mineral nutrition of *Acacia auriculiformis*. *Biol Fertil Soils*. 38: p. 170–175.
69. Giri, B. y K. Mukerji (1999). Improved growth and productivity of *Sesbania grandiflora* Pers. under salinity stress through mycorrhizal technology. *J Phytol Res* 12: p. 35–38.
70. Giri, B. y K. Mukerji (2004). Mycorrhizal inoculant alleviates salt stress in *Sesbania aegyptiaca* and *Sesbania grandiflora* under field conditions: evidence for reduced sodium and improved magnesium uptake. *Mycorrhiza*. 14: p. 307–12.
71. Glomeromycota TAXONOMY. Consultado [13 de diciembre del 2009]. Disponible en: <http://www.lrz-muenchen.de/~schuessler/amphylo/>
72. Gomez, N., M. Ojeda, y M. Gimenez (1999). Incorporation of $^3\text{H}_2\text{O}$ into lipids. *Radioanal Nucl Chem* 240: p. 455–456.
73. González-Monterrubio, C., (2003). Influencia de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) en el desarrollo de plántulas de *Opuntia streptacantha* Lem. sometidas a sequía, en condiciones de invernadero. Universidad Nacional Autónoma de México México, D.F.
74. Gorham, J., E. Budrewicz, E. McDonell, y R. Wyn Jones (1986). Salt tolerance in the Triticeae: salinity-induced changes in the leaf solute composition of some perennial Triticeae. *J Exp Botany* 37: p. 1114–1128.
75. Grattan, S. y C. Grieve (1999). Mineral nutrient relations in horticultural crops. *Scientia Horticulture*. 78: p. 127-157.

76. Grattan, S. y E. Maas (1984). Interactive effects of salinity and substrate phosphate on soybean. *Agron. J.* 76: p. 668-676.
77. Guichard, S., N. Bertin, C. Leonardil, y C. Gary (2001). Tomato fruit quality in relation to water and carbon fluxes. *Agronomie.* 21: p. 385-392.
78. Hartung, W., A. Sauter, y E. Hose (2002). Abscisic acid in the xylem: where does it comes from, where does it goes to? *Journal of Experimental Botany.* 53: p. 27-32.
79. Hasegawa, P., R. Bressan, J. Zhu, y H. Bohnert (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* 51: p. 463-499.
80. Hayman, D. (1982). Influence of soil and fertility on activity and survival of vesicular - arbuscular fungi. *Phytopathology.* 72: p. 1119-1125.
81. Helal, M., K. Koch, y K. Mengel (1975). Effect of salinity and potassium on the uptake of nitrogen and on nitrogen metabolism in young barley plants. *Physiol Plant* 35: p. 310–313.
82. Hernández, A., Los procesos de salinización secundaria de las llanuras del clima tropical relativamente seco de las provincias orientales de Cuba, in Taller ABIOTIC 96. X Seminario Científico. 1996: INCA. p. 121.
83. Hernández, A., O. Ascanio, M. Morales, J. Bojórquez, N. García, y J. García (2006a). El Suelo: Fundamentos de su formación, cambios globales y su manejo México: Universidad de Nayarit.
84. Hernández, A., J.M. Pérez, D. Bosch, y L. Rivero (2006b). Nueva Versión de Clasificación Genética de los Suelos de Cuba La Habana: AGRINFOR. 64.
85. Hernandez, J., C. Escobar, G. Creissen, y P. Mullineaux (2006). Antioxidant enzyme induction in pea plants under high irradiance. *Biologia Plantarum* 50(3): p. 395-399.
86. Herrera, R. (1995). Estrategia de Funcionamiento de las Micorrizas VA en un Bosque Tropical. Biodiversidad en Iberoamerica: Ecosistemas, Evolución y procesos sociales. Programa iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo. Subprograma XII ,diversidad biologica Mérida: Maximina Monasterio.
87. Herrera, R., R. Ferrer, L. Ruiz, F. Fernández, N. Medina, E. Furrázola, M. Orozco, J. Cueto, M. Garcia, L. Exposito, E. Pouyu, L. Ojeda, A. Valdez, R. Rivera, y C. Sánchez. (1994). Perspectivas para la generalización del uso de las MA en la agricultura cubana, in Resúmenes V REBRAM. Univ. Federal Sta. Catarina Florianópolis, SC, Brazil. p. 37.

88. Hewitt, E., D. James, y A. Eaglesham (1975). The non-enzymic reduction of nitrite by benzyl viologen (free-radical) in the presence and absence of ammonium sulphate. *Mol Cell Biochem.* 6(2): p. 101–105.
89. Howeler, R., E. Sieverding, y S. Saif (1987). Practical aspects of mycorrhizal technology in some tropical crops and pastures. *Plant and Soil.* 100: p. 249-283.
90. Hussein, Z. y A. Hamdi (1990). Rhizobium legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in Arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 63(4): p. 968-989
91. INVAM. Consultado [25 de noviembre del 2009]. Disponible en: <http://www.invam.caf.wvu.edu>
92. IUSS (2006). Working Group WRB World Reference Base for Soil resources Vol. 103 Roma: FAO. 128.
93. Jackson, R. y P. Mason (1984). *Mycorrhiza* London, UK: Edward Arnold Ltd
94. Jakobsen, I., S. Smith, y F. Smith (2002). Function and diversity of arbuscular mycorrhizae in carbon and mineral nutrition, en *Mycorrhizal ecology*, M.V.d. Heijden y I. Sanders, Editors, Springer-Verlag: Berlin. p. 75-92.
95. James, D., R. Hanks, y J. Jurinak (1982). *Modern irrigated soils* New York Wiley.
96. Janzen, H. y C. Chang (1987). Cation nutrition of barley as influenced by soil solution composition in a saline soil. *Can. J. Soil Sci.* 67: p. 619–629.
97. Juge, C., P. Coughlan, A. Fortin, y Y. Piché (2009). Growth and branching of asymbiotic, presymbiotic and extraradical AM fungal hyphae: clarification of concept and terminology, en *Advances in mycorrhizal science and technology*, D. Khasa, Y. Piché, Andrew, y P. Coughlan, Editors, NRC Research Press: Ottawa. p. 39-50.
98. Juniper, S. y L. Abbott (1993). Vesicular arbuscular mycorrhizas and soil salinity. *Mycorrhiza.* 4: p. 45–57.
99. Kafkafi, U. (1991). Root growth under stress. Salinity, en *The Plant Roots: "The Hidden Half"*, E. Waisel, A. Eshel, y U. Kafkafi, Editors, Marcel Dekker: New York. p. 375-391.
100. Kafkafi, U., N. Valoras, y J. Letey (1982). Chloride interaction with nitrate and phosphate nutrition in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *J. Plant Nutr.* 5: p. 1369-1385.
101. Klobus, G., M. Ward, y R. Huffaker (1988). Characteristics of injury and recovery of net Nos- transport of barley seedlings from treatments of NaCl. *Plant Physiol.* 87: p. 878-882.

102. Koide, R. y Z. Kabir (2000). Extraradical hyphae of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* can hydrolyse organic phosphate. *New Phytologist* 148: p. 511-517.
103. Lara, F., (1987). Estudio de la endomicorriza (V-A) en los agroecosistemas de las zonas áridas y semiáridas del Altiplano Potosino-Zacatecano. Universidad Nacional Autónoma de México México. DF.
104. Lax, A., E. Díaz, V. Castillo, y J. Albaladejo (1994). Reclamation of physical and chemical properties of a salinized soil by organic amendment. *Arid Soil Res. Rehabil.* 8: p. 9–17.
105. Lee, J., S. Lee, y P. Young (2008). Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *Microbiol. Ecol.* 65: p. 339-349.
106. Lerch, G. (1977). La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas La Habana: Científico-Técnica. 28.
107. Lioussanne, L., M. Beauregard, C. Hamel, M. Jolicoeur, y M. St-Arnaud (2009). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and soil microorganism. *Advances in mycorrhizal science and technology.* 195: p. 51-69.
108. López, M. y S. Satti (1996). Calcium and potassium enhanced growth and yield of tomato under sodium chloride stress. *Plant-Science-Limerick.* 114(1): p. 19-27.
109. Maggio, A., P. Hasegawa, R. Bressan, M. Consiglio, y R. Joly (2001). Unravelling the functional relationship between root anatomy and stress tolerance. *Australian Journal of Plant Physiology.* 28: p. 999-1004.
110. Maldonado, C. y E. Pahlich (2004). Dinámica autogenerativa del sistema antioxidativo en plantas, en *Fisiología ecológica en plantas. Mecanismos y respuestas a estrés en los ecosistemas*, H. Cabrera, Editor, Ediciones Universitarias: Santiago de Chile. p. 27-41.
111. Marschner, H. (1995). *Mineral Nutrition of Higher Plants. Second Edition* ed London: Academic Press Ltd.
112. Martínez, F., J. Reyes, F. Despaigne, y M. Baldaquín (2004). Efecto de los hongos micorrizógenos arbusculares en el crecimiento y desarrollo del cultivo del tomate Granma: Universidad de Granma. Facultad de Ciencias Agrícolas. 6.
113. Martínez, V. y A. Cerdá (1989). Influence of N source on rate of Cl, N, Na, and K uptake by cucumber seedlings grown in saline conditions. *J. Plant Nutr.* 12: p. 971-983.
114. Mashali, A., Overview of FAO Global Net Work on Soil management for sustainable use of salt affected soil, in 3th International work shop on Integrated Soil

- Management for sustainable Use of Salt Affected Soil. 1999: Bureau of soils and Water Management. Soil Research and Development Center Deliman Quezoncity, Filipinas. p. 1-36.
115. Matson, P. (1997). NO_x emissions from soils and its consequences for the atmosphere and biosphere. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*. 48: p. 1-6.
 116. Mazorra, L. y M. Núñez (2000). Brassinosteroid analogues differentially modify preoxidase activity, Superoxide dismutase activity and protein content in tomato seedlings. *Cultivos Tropicales* 21(4): p. 29-33.
 117. McGonigle, T. y A. Fitter (1990). Ecological specificity of vesicular arbuscular mycorrhizal associations. *Mycological Research*. 94(1): p. 120-122.
 118. MINAG (1999). Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba La Habana: Instituto de Suelos Agrinfor. 64.
 119. MINAG (2007). Instructivo técnico para el cultivo del tomate La Habana.
 120. Mohammadi, E., D. Rezaee, R. Prasad, y A. Varma (2008). Mycorrhizal Fungi: What We Know and What Should We Know?, en *Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology*, A. Varma, Editor, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
 121. Montaña, N., S. Camargo-Ricalde, R. García-Sánchez, y A. Monroy, eds. *Micorrizas arbusculares en ecosistemas áridos y semiáridos 2007*, Mundi-Prensa SA de CV, UAM Iztapalapa, FES Zaragoza, UNAM: Distrito Federal, México. 460.
 122. Morell, F., A. Hernández, F. Fernández, y Y. Toledo (2006). Caracterización agrobiológica de los suelos Ferralíticos Rojos lixiviados de la región de San José de las Lajas, en relación con el cambio en el manejo agrícola. *Cultivos Tropicales*. 27(4): p. 13-18.
 123. Morton, J. y G. Benny (1990). Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Zygomycetes*): A new order, *Glomales*, Two new suborders, *Glominae* and *Gigasporinae* and two new families, *Acaulosporaceae* and *Gigasporaceae*, with and amendment of *Glomaceae*. *Micotaxon*. 37: p. 471-491.
 124. Muhammed, S., M. Akbar, y H. Neue (1987). Effect of Na/Ca and Na/K ratios in saline culture solution on the growth and mineral nutrition of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant and Soil* 104: p. 57-62.
 125. Mujica, Y. y N. Medina (2008). Respuesta del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) a la formulación líquida de cuatro cepas de *Glomus* en condiciones de campo. *Cultivos Tropicales*. 29(3): p. 23-25.

126. Munns, R. (1993). Physiological responses limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environ* 16: p. 15–24.
127. Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: ringing them together. *New Phytologist*. 167(3): p. 645-660.
128. Nakano, Y. y K. Asada (1981). Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant Cell Physiol*. 22: p. 867 - 880.
129. Nelsen, C., N. Balgiano, S. Furutani, G. Safir, y B. Sandstra (1981). The effect of soil phosphorus lends on mycorrhizal infection on field grown onion plants and on mycorrhizal reproduction. *Journal of American Society of Horticultural Science* 106: p. 786–788.
130. Neumann, M., H. Azaizeh, y D. Leon (1994). Hardening of root cell walls: a growth inhibitory response to salinity stress. *Plant, Cell and Environment*. 17: p. 303-309.
131. Nieman, R. y R. Clark (1976). Interactive effects of salinity and phosphorus nutrition on the concentration of phosphate and phosphate esters in mature photosynthesizing corn leaves. *Plant Physiol*. 57: p. 157–161.
132. Noborio, K. y K. McInnes (1993). Thermal conductivity of salt-affected soils. *Soil Sci. Soc. Am J*. 57: p. 329-334.
133. Noval, B.d.l., (2008). Efecto de la interacción HMA-Sistemina–tomate(*Solanum lycopersicum* L variedad Amalia) sobre proteínas de defensa y respuesta a patógenos. Tesis Doctorado, Universidad Agraria de la Habana La Habana.
134. Noval, B.d.l., E. Pérez, V. Olalde, J. Délano, y N. Martínez (2004). Inducción de β -1,3-glucanasas y quitinasas en plántulas de tomate por hongos micorrízicos arbusculares y sistemina. *Cultivos Tropicales*. 25(1): p. 5-12.
135. Oehl, F., E. Sieverding, K. Ineichen, P. Mader, T. Boller, y A. Wiemken (2003). Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. *Appl. Environ. Microbiol*. 69: p. 2816-2824.
136. Oehl, F., E. Sieverding, K. Ineichen, E. Ris, T. Boller, y A. Wiemken (2005). Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi at different soil depths in extensively and intensively managed agroecosystems. *New Phytologist*. 165: p. 273-283.
137. Ojala, J., W. Jarrell, J. Menge, y E. Johnson (1983). Influence of mycorrhizal fungi on the mineral nutrition and yield of onion in saline soil. *Agron J*. 75: p. 255–259.

138. Okusanaya, O. y I. Ungar (1984). The growth and mineral composition of three species of *Spergularia* as affected by salinity and nutrients at high salinity. *Am J Bot* 71: p. 439-447.
139. ONE (2006). Anuario Estadístico Cuba.
140. Öpik, M., M. Moora, M. Zobel, U. Saks, R. Wheatley, F. Wright, y T. Daniell (2008). High diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreal herb-rich coniferous forest *New Phytologist* 179: p. 867-876.
141. Ortega, E. y R. Rodés (1986). Manual de prácticas de laboratorio de fisiología vegetal. Ciudad de la Habana: Pueblo y Educación. 196.
142. Paneque, V. (2002). Manual análisis de suelo y planta La Habana: Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.
143. Pendergast, B. (1993). A model of crop yield response to irrigation water salinity: theory, testing and application. *Irrigation Science*. 13: p. 157-164.
144. Peralta, I., S. Knapp, y D. Spooner (2005). New species of wild tomatoes (*Solanum* Section *Lycopersicon*: *Solanaceae*) from Northern Peru. *Systematic Botany*. 30: p. 424-434.
145. Pérez-Alfocea, F., M. Balibre, A. Santa-Cruz, y M. Están (1996). Agronomical and physiological characterization of salinity tolerance in a commercial tomato hybrid. *Plant-and-Soil*. 180(2): p. 251-257.
146. Pessarakli, M. (1994). Handbook of plant and crop stress Tucson. Arizona: University of Arizona. 697.
147. Peterson, R. y M. Farquhar (1994). Mycorrhizas integrated development between roots and fungi. *Mycologia*. 86: p. 311-326.
148. Philips, J. y D. Hayman (1970). Improved procedure of clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*. 55: p. 158-160.
149. Plaut, Z., C. Grieve, y E. Maas (1990). Salinity effects on CO₂ assimilation and diffusive conductance of cowpea leaves. *Physiol. Plant*. 79: p. 31-38.
150. Plenchette, C. y A. Fortin (2009). The relative field mycorrhizal dependency concept and its usefulness in agronomy, en *Advances in mycorrhizal science and technology*, NRC Research Press: Ottawa. p. 87-91.
151. Porcel, R., R. Aroca, R. Azcón, y J. Ruiz-Lozano (2006). PIP aquaporin gene expression in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants in relation to drought stress tolerance. *Plant Molecular Biology* 60: p. 389-404.

152. Porrás-Soriano, A., M. Soriano-Martí, A. Porrás-Piedra, y R. Azcón (2009). Arbuscular mycorrhizal fungi increased growth, nutrient uptake and tolerance to salinity in olive trees under nursery conditions. *Journal of Plant Physiology* article in press
153. Poss, J., E. Pond, J. Menge, y W. Jarrell (1985). Effect of salinity on mycorrhizal onion and tomato in soil with and without additional phosphate. *Plant Soil* 88: p. 307-19.
154. Pozo, M. y C. Azcón-Aguilar (2007). Unraveling mycorrhiza induced resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10 p. 393-398.
155. Rabie, G. y A. Almadini (2005). Role of bioinoculants in development of salt-tolerance of *Vicia faba* plants under salinity stress. *Afr J Biotech.* 4: p. 210-22.
156. Reddell, P., Y. Yun, y W. Shipton (1997). Cluster roots and mycorrhizae in *Casuarina cunninghamiana* - their occurrence and formation in relation to phosphorus supply. *Australian Journal of Botany.* 45: p. 41-51.
157. Reinhardt, D. y T. Ropst (1995). Salinity accelerates endodermal development and induces an exodermis in cotton seedling roots. *Environmental Experimental Botany.* 35: p. 563-574.
158. Rhoades, J., A. Kandiah, y A. Mashali (1992). The use of saline waters for crop production. *FAO Irrigation and Drainage paper.* 48.
159. Rivera-Becerril, F., C. Calantzis, K. Turnau, J. Caussanel, A. Belimov, S. Gianinazzi, R. Strasser, y V. Gianinazzi-Pearson (2002). Cadmium accumulation and buffering of cadmium induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L. genotypes. *Journal of Experimental Botany.* 53: p. 1177-1185.
160. Rivero, R., J. Ruiz, y L. Romerp (2003). Role of grafting in horticultural plants under stress conditions. *Food, Agriculture & Environment.* 1(1): p. 70-74.
161. Rodríguez, Y., B. Noval, E. Pérez, y F. Fernández (2003). Expresión de peroxidasas y polifenoloxidasas en raíces de *Sorghum bicolor* inoculadas con distintas especies de hongos micorrízicos arbusculares *Cultivos Tropicales.* 24(2).
162. Romero-Aranda, R., T. Soria, y J. Cuartero (2001). Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. *Plant Science.* 160: p. 265-272.

163. Rosario, D.D., A. Sumague, V. Roxas, y B. TS (1990). Response of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) to salt stress. *The Philippine agriculturist*. 73(2): p. 193-198.
164. Rosendahl, C. y S. Rosendahl (1991). Influence of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus* spp.) on the response of cucumber (*Cucumis sativus* L.) to salt stress. *Environ Exp Bot*. 31(3): p. 13-8.
165. Ruíz-Lozano, M., R. Azcón, y M. Gómez (1996). Alleviation of salt stress by arbuscular-mycorrhizal *Glomus* specie in *Lactuca sativa* plants. *Physiologia plantarum*. 98: p. 767-772.
166. Rush, D. y E. Epstein (1981). Comparative studies on the sodium, potassium and chloride relations of a wild halophytic and a domestic salt sensitive tomato species. *Plant Physiol*. 68: p. 1308-1311.
167. Sairam, R. y A. Tyagi (2004). Physiological and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Curr, Sci*. 86: p. 407-420.
168. Satti, S. y M. López (1994). Effect of increasing potassium levels for alleviating sodium chloride stress on the growth and yield of tomato. *Commun. Soil Sci. Plant Anal*. 25: p. 15-16.
169. Schenck, N. y Y. Pérez (1990). Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. 3th Edition ed Gainsville: Synergistic Publications.
170. Schönbeck, F. y Raschen (1995). Symbioses: mycorrhizae. *Botany*. 56: p. 457-471.
171. Serio, F., L. De Gara, y S. Caretto (2004). Influence of an increased NaCl concentration on yield and quality of cherry tomato grown in posidona (*Posidonia oceanica* (L). Delile. 14: p. 1885-1890.
172. Serralde, A. y M. Ramírez (2004). Análisis de poblaciones de micorrizas en maíz (*Zea mays*) cultivado en suelos ácidos bajo diferentes tratamientos agronómicos. *Revista Corpoica*. 5: p. 31-40.
173. Shannon, M. y C. Grieve (1999). Tolerance of vegetable crops to salinity. *Scientia Hortoculturae*. 78: p. 5-38.
174. Sharifia, M., M. Ghorbanlib, y H. Ebrahimzadehc (2007). Improved growth of salinity-stressed soybean after inoculation with salt pre-treated mycorrhizal fungi *Journal of Plant Physiology*. 164: p. 1144-1151.
175. Silberbush, M. y J. Ben-Asher (1987). The effect of salinity on parametiers of potasium and mtrate uptake of colton. *Comm. in Soil Sci. Flan! Anal*. 18(1): p. 65-81.

176. Singer, S. (1994). Germination responses of some tomato genotypes as affected by salinity and temperature stress. *Egyptian-Journal-of-Horticulture*. 21(1): p. 47-64.
177. Smith, S. y D. Read (2008a). Colonization of roots and anatomy of arbuscular mycorrhiza, en *Mycorrhizal Symbiosis*, Academic Press: London. p. 42-90.
178. Smith, S. y D. Read (2008b). Mineral nutrition, toxic element accumulation and water relations of arbuscular mycorrhizal plants en *Mycorrhizal Symbiosis*, Academic Press: London. p. 144-187.
179. Smith, S. y D. Read (2008c). Mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry en *Mycorrhizal Symbiosis*, Academic Press,: London. p. 121-143.
180. Smith, S., F. Smith, y I. Jackobsen (2003). Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiol*. 133: p. 16-20.
181. Smith, S.E. y D.J. Read (1997). *Mycorrhizal Symbiosis*. Second Edition ed London, UK: Academic Press. 605.
182. Solórzano, E., (1997). Inducción y caracterización parcial de proteínas asociadas con la patogénesis en la interacción tomate-*Alternaria solani*. Tesis Maestría, Universidad de la Habana La Habana.
183. St-Arnaud, M. y A. Elsen (2005). Interaction of arbuscular mycorrhizal fungi with soil-borne pathogens and non-pathogenic rhizosphere micro-organism, en *In vitro culture of mycorrhiza*, S. Declerck, D.-G. Strullu, y J. Fortin, Editors, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg. p. 217-231.
184. Subbarao, G., C. Johansen, M. Jana, y J. Kumar Rao (1990). Effects of sodium/calcium ratio in modifying salinity response of pigeonpea (*Cajanus cajan*). *J plant Physiol*. 136: p. 439-443.
185. Tapia, J., (2003). Identificación de HMA aislados de suelos salinos y su eficiencia en plantas de (*Lactuca sativa* L.). Tesis Doctorado, Universidad de Colima
186. Terry, A., (2005). Microorganismos benéficos y productos Bioactivos como alternativas para la Producción ecológica de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill. Var. "Amalia"). INCA
187. Tian, C., G. Feng, X. Li, y F. Zhang (2004). Different effects of arbuscular mycorrhizal fungal isolates from saline or non-saline on salinity tolerance of plants. *Applied Soil Ecology* 26: p. 143-148.

188. Torres, B. y F. Bingham (1973). Salt tolerance of Mexican wheat: 1. Effects of NO₃ and NaCl on mineral nutrition, growth and production of four wheats. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 37: p. 711-715.
189. Trebby, M. y R. van Stevenick (1988). The influence of salinity on phosphate uptake and distribution in lupin roots. *Physiol Plant.* 72: p. 617-622.
190. Trouvelot, A., J. Kough, y V. Gianinazzi-Pearson (1986). Mesure du Taux de Mycorrhization VA d'un Systeme Radiculaire. Recherche de Methodes d'Estimation ayant une Signification Fonctionnelle, en Proceedings of the 1st European Symposium on Mycorrhizae: Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae, V. Gianinazzi-Pearson y S. Gianinazzi, Editors, INRA: Dijón. p. 217-222.
191. Tuinen, D.V., D. Jacquot, B. Zhao, A. Gollote, y V. Gianinazzi-Pearson (1998). Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted Nested PCR. *Molecular Ecology.* 7: p. 879-887.
192. Walker, C. (1992). Systematic and taxonomy of the arbuscular endomycorrhizal fungi (*Glomales*) a possible way forward. *Agronomy.* 12: p. 887-897.
193. Ward, M., M. Aslam, y R. Huffaker (1986). Enhancement of nitrate uptake and growth of barley seedlings by calcium under saline conditions. *Plant Physiol.* 80: p. 520-524.
194. Wetterauer, D.G. y R.J. Killorn (1996). Fallow- and flooded-soil syndromes: Effects on crop production. *J. Prod. Agric.* 9: p. 39-41.
195. Wimmer, M., K. Mühling, P. Brown, A. Laeuchli, y H. Goldbach (2001). Interactions of salinity and boron toxicity in wheat: the significance of boron partitioning *Bonn: Boron.* 64.
196. Wright, S. y A. Upadhyaya (1998). A survey of soil for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil.* 198: p. 97-107.
197. Yano-Melo, A., O. Saggin, y L. Maia (2003). Tolerance of mycorrhized banana (*Musa* sp. cv. Pacovan) plantlets to saline stress. *Agric Ecosyst Environ.* 95: p. 343-8.
198. Zeinab, A., M. Salama, y M. El-Fouly (2001). Differential Responses of Two Tomato Cultivars (*Lycopersicon esculentum* L.) to NaCl Stress *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 4.

199. Zhang, J., W. Jia, J. Yang, y Ismail (2006). AM. Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Research*. 97: p. 111-119.
200. Zhu, J. (2000). Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 124: p. 941-948.