DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

Influencia de la micorriza arbuscular en la actividad fotosintética, las relaciones hídricas y el crecimiento de *Carica papaya* var. Maradol, bajo condiciones limitantes de fósforo y agua

Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias y biotecnología de plantas

PRESENTA

YOLANDA NAVA GUTIÉRREZ

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A.C.

Mérida, Yucatán, México
2008

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE FISIOLOGÍA VEGETAL DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN (CICY) BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. JORGE SANTAMARÍA FERNÁNDEZ Y CON APOYO DEL PROGRAMA PARA EL MEJORAMIENTO DEL PROFESORADO (PROMEP).

Con Gran Cariño Dedico Este Trabajo a:

Mis padres

Ana María Gutiérrez Hernández
Feliciano Nava Carreto

Ani y Adris

Toda mi gran familia

Quienes me brindan su amistad

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Tlaxcala, por darme la oportunidad de realizar los estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán por darme la oportunidad de formar parte de su posgrado.

A la Secretaría de Investigación Científica y Posgrado y al Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la UAT por las facilidades otorgadas para la realización del posgrado.

Al Dr. Jorge Santamaría Fernández, por aceptarme en su laboratorio y dirigir mi trabajo de tesis.

A mi comité tutoral: Dr. Ronald Ferrera-Cerrato, Dr. Arturo Estrada Torres, Dra. Aileen O'Connor Sánchez, Dr. José Luis Andrade Torres y Dr. Jorge Santamaría Fernández por su buena disposición para orientar este trabajo.

Al comité revisor de tesis: Dr. Ronald Ferrera-Cerrato, Dr. Arturo Estrada Torres, Dra. Aileen O'Connor Sánchez, Dr. José Luis Andrade Torres, Dr. Luis Sáenz Carbonell, Dr. Alejandro Alarcón y Dr. Jorge Santamaría Fernández por las valiosas observaciones y sugerencias que hicieron para mejorar el documento de tesis.

Al área de Microbiología Postgrado de Edafología del Colegio de Postgraduados, particularmente al Dr. Ronald Ferrera-Cerrato por proporcionarme el inóculo micorrízico utilizado en este trabajo.

Contenido

	Página
Reconocimientos	i
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Índice	v
Lista de abreviaturas	xi
Lista de figuras	xiii
Lista de cuadros	xv
Resumen	xvii
Abstract	xix
Introducción	1
Capítulo 1	
Antecedentes	5
1.1 LA ASOCIACIÓN MICORRÍZICA ARBUSCULAR	
1.1.1 Características	5
1.1.2 Importancia	8
1.1.3 Clasificación de los hongos micorrizógenos arbusculares	.9
1.1.4 El estudio de la micorriza arbuscular en México	.10
1.1.5 Estudio de la micorriza arbuscular en *Carica papaya*	11
1.2 *Carica papaya* L.	
1.2.1 Características del frutal	12
1.2.2 Requerimientos y problemática del cultivo	14
1.2.3 Importancia económica de *Carica papaya* L.	16

1.3 IMPORTANCIA DEL FÓSFORO
1.3.1 En el crecimiento de las plantas 17
1.3.2 En la fotosíntesis 18

1.4 HIPÓTESIS GENERAL 20

1.5 OBJETIVOS
1.5.1 General 20
1.5.2 Particulares 20

1.6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL 21

1.7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 23

Capítulo 2
Efecto de la micorriza arbuscular sobre la capacidad fotosintética de papaya Maradol bajo estrés por deficiencia de Pi

2.1 INTRODUCCIÓN 31

2.2 OBJETIVOS
2.2.1 General 35
2.2.2 Particulares 35

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS
2.3.1 Condiciones experimentales 35
2.3.2 Obtención de plántulas e inoculación micorrízica 36
2.3.3 Aplicación de tratamientos con fósforo 38
2.3.4 Variables evaluadas 38
2.3.4.1 Fotosíntesis (*Pn*) y conductancia estomática (g_s) 39

2.3.4.2 Fluorescencia de clorofila 39
2.3.4.3 Contenido de clorofila 39
2.3.4.4 Contenido de sacarosa y almidón 40
2.3.4.5 Crecimiento 41
2.3.4.6 Colonización micorrízica arbuscular 41
2.3.5 Diseño experimental y análisis estadístico 42

2.4 RESULTADOS
2.4.1 Fotosíntesis (*Pn*) y conductancia estomática (g_s) 42
2.4.2 Contenido de clorofilas 47
2.4.3 Fluorescencia de clorofilas 47
2.4.4 Concentración de azúcares 47
2.4.5 Contenido de fósforo 49
2.4.6 Crecimiento 49
2.4.7 Colonización micorrízica arbuscular 50

2.5 DISCUSIÓN 53

2.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 58

Capítulo 3
Efecto de la micorriza arbuscular sobre las relaciones hídricas de papaya Maradol estresada por deficiencia de agua y fósforo

3.1 INTRODUCCIÓN 63

3.2 OBJETIVOS
3.2.1 General 65
3.2.2 Particulares 65
3.3
3.3 MATERIALES Y METODOS
3.3.1 Condiciones experimentales 66

3.3.2 Diseño experimental 66
3.3.3 Sustrato y material biológico 66
3.3.4 Inoculación con MA 68
3.3.5 Riego 68
3.3.6 Fertilización 69
3.3.7 Variables medidas 70
3.3.7.1 Potencial hídrico 70
3.3.7.2 Contenido relativo de agua (CRA) 70
3.3.7.3 Conductancia estomática 71
3.3.7.4 Fluorescencia de clorofila 71
3.3.7.5 Crecimiento 71
3.3.7.6 Colonización micorrízica arbuscular 72
3.3.8 Análisis estadísticos 72

3.4 RESULTADOS
3.4.1 Potencial hídrico 73
3.4.2 Contenido relativo de agua (CRA) 74
3.4.3 Conductancia estomática (g_s) 75
3.4.4 Fluorescencia de clorofila 76
3.4.5 Crecimiento 77
3.4.6 Colonización micorrízica 80

3.5 DISCUSIÓN 81

3.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 87

Capítulo 4
Glomus intraradices attenuates the negative effect of low Pi suplly on photosynthesis and growth of papaya Maradol plants

4.1 ABSTRACT 91

4.2 INTRODUCTION 92

4.3 MATERIALS AND METHODS
4.3.1 Plants, AM fungi and growing conditions 94
4.3.2 Growth measurements 95
4.3.3 Photosynthesis and FV/FM measurements 95
4.4.5 Phosphorus measurements 96
4.4.5 Arbuscular mycorrhizal colonization 96

4.4 RESULTS
4.4.1 Plant growth 97
4.4.2 Photosynthesis and F_V/F_M 97
4.4.3 Phosphorus content 98
4.4.4 Arbuscular mycorrhizal colonization 98

4.5 DISCUSSION 104

4.6 ACKNOWLEDGEMENTS 108

4.7 REFERENCES 109

Capítulo 5
Discusión general y conclusiones

5.1 DISCUSIÓN GENERAL 113

5.2.CONCLUSIONES GENERALES 116

5.3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 118

ANEXOS 119

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
CRA	Contenido relativo de agua
DW	Dry weight
FSII/PSII	Fotosistema II/Photosystem II
F_V/F_M	Cociente F_V/F_M –Eficiencia máxima del FSII
gs	Conductancia estomática
HMA	Hongos micorrizógenos arbusculares
MA/AM	Micorriza arbuscular/Arbuscular mycorrhizae
mM	Milimolar
msnm	Metros sobre el nivel del mar
P	Fósforo
Pi	Fósforo inorgánico/Inorganic phosphate
Pn	Fotosíntesis neta/Net Photosynthesis
PSA	Peso seco de la parte aérea
PSR	Peso seco de la raíz
PST/TDW	Peso seco total/Total dry weight
SH/HS	Solución de Hoagland/Hoagland's solution
SDW	Shoot dry weight
+Mic	Plantas con micorriza
-Mic	Plantas sin micorriza

Lista de figuras

		Página
1.1	Arbúsculo, estructura típica de la micorriza arbuscular	6
1.2	Diagrama de las funciones sugeridas para Mtchit III-3 durante la formación de los arbúsculos en la MA en *Medicago truncatula*	7
1.3	Clasificación de los hongos micorrízicos arbusculares, basada en caracteres morfológicos y moleculares	11
1.4	Intercambio de Pi-triosa - fosfato del cloroplasto al citosol para la producción de azúcares	19
1.5	Diagrama del trabajo experimental	22
2.1	Ciclo reductivo de las pentosas-P y distribución del carbono fotosintético para la síntesis de almidón y sacarosa en el cloroplasto y el citoplasma respectivamente	32
2.2.	Relación entre la *Pn* y la g_s en papaya Maradol	46
2.3.	Contenido de clorofila en papaya Maradol	48
2.4.	Crecimiento de papaya Maradol	51
2.5.	Altura desarrollada por papaya Maradol	52
2.6.	Colonización micorrízica arbuscular en papaya Maradol	52
3.1.	Contenido relativo de agua en hojas de papaya Maradol	75
3.2.	Conductancia estomática (g_s) en hojas de papaya Maradol	76
3.3.	Fluorescencia de clorofila en papaya Maradol	77
3.4.	Área foliar de papaya Maradol	80
3.5.	Colonización micorrízica arbuscular en papaya	81

4.1	Growth of papaya Maradol plants	99
4.2	Dry weight of papaya Maradol plants	100
4.3	Pn changes in papaya Maradol plants	101
4.4.	*PSII* maximum efficiency (F_V/F_M) in papaya Maradol	102
4.5.	Total leaves P content in papaya Maradol	103

Lista de cuadros

		Página
1.1.	Clasificación de los hongos micorrizógenos arbusculares	13
1.2.	Programa de fertilización fosfatada para papaya Maradol	15
2.1.	Tratamientos para determinar el efecto de la micorriza arbuscular en la eficiencia fotosintética de papaya Maradol en condiciones de estrés por deficiencia de Pi.	37
2.2.	Cantidad y/o frecuencia de aplicación de los factores de tratamiento.	37
2.3.	Efecto de la disponibilidad de fósforo y la condición micorrízica sobre la fotosíntesis, conductancia estomática, contenido de azúcares, fósforo foliar y peso seco total de papaya Maradol.	44
3.1.	Tratamientos para determinar el efecto de la micorriza arbuscular en las relaciones hídricas de papaya Maradol en condiciones de estrés por deficiencia de agua y fósforo.	67
3.2.	Factores de tratamientos. Cantidad y/o frecuencia de aplicación.	69
3.3.	Efecto de la micorriza arbuscular en el potencial hídrico, el potencial osmótico y la turgencia de hojas de papaya Maradol.	74
3.4.	Efecto de la micorriza arbuscular sobre el peso seco de papaya Maradol.	79

4.1 Arbuscular mycorrhizal colonization (%) in roots of papaya Maradol plants five weeks after the AM colonization began. 104

Resumen

En diferentes especies vegetales, la micorriza arbuscular (MA) facilita la absorción de fósforo y la toma de agua, propiedades que podrían ser útiles en cultivos que requieren aportes frecuentes de fósforo y agua para alcanzar altos rendimientos. En el cultivo de papaya Maradol podría repercutir sobre: el costo de producción, el impacto ecológico de la elevada fertilización fosfatada y el uso sustentable de los recursos agua y fósforo.

Utilizando un sistema hidropónico con agrolita como sustrato, se evaluaron diferentes concentraciones de fósforo inorgánico (Pi) en solución nutritiva de Hoagland y dos niveles de riego para determinar si la asociación con el hongo micorrízico arbuscular *Glomus intraradices* permite a las plantas de papaya Maradol atenuar el efecto negativo de la baja disponibilidad de Pi y de agua sobre su fotosíntesis, estatus hídrico y crecimiento.

En plantas con alta disponibilidad de Pi el porcentaje de colonización micorrízica fue menor que el nivel de colonización encontrado en plantas con baja disponibilidad de Pi. La papaya Maradol micorrizada atenuó el efecto negativo del déficit de fósforo sobre el crecimiento, efecto que parece relacionarse con una mayor capacidad de toma de fósforo en las plantas micorrizadas, y sobre la fotosíntesis, observándose mayor asimilación de CO_2 en plantas micorrizadas que en no micorrizadas. Sin embargo, la micorriza parece no influir sobre el efecto de déficit hídrico, encontrándose que los resultados de potencial hídrico, contenido relativo de agua y conductancia estomática fueron estadísticamente iguales entre los tratamientos.

Bajo las condiciones experimentales de este trabajo, la MA atenuó los efectos del bajo aporte de fósforo, implicando que podría reducirse la cantidad de fertilizante fosforado que se utiliza dentro del paquete tecnológico de producción de papaya Maradol. Se requiere más investigación para corroborar si tal efecto positivo se mantiene en etapas posteriores e impacta en el mantenimiento de un adecuado rendimiento de frutos en plantaciones comerciales.

Abstract

In different plant species, the arbuscular mycorrhiza (AM) facilitates the phosphorus absorption and the water uptaking capacity, properties that could be useful for plants that require frequent and high phosphorus and water supply, in order to obtain good yields. In papaya Maradol the use of AM could reduce the production cost, the ecological impact produced by the high phosphate fertilization, as well as it could have benefits on a sustainable use of both water and phosphorus.

Using a hydroponics system with agrolite as substrate, different inorganic phosphorus (Pi) concentration in Hoagland's solution and two irrigation levels were evaluated to compare the performance of papaya Maradol plants with AM and without AM. The aim was to define whether the AM association of papaya Maradol plants with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* would attenuate the negative effect of the low availability of Pi and water on the photosynthesis, water status and growth.

Arbuscular mycorrhizal colonization was reduced in plants with high Pi but high colonization levels were found in plants with low Pi supply. Papaya Maradol plants with AM were able to reduce the negative effect of low phosphorus on plants growth, which could be related to a greater ability of mycorrhizal plants to uptake phosphorus. Mycorrhizal plants were also capable to show a reduced effect of low Pi supply on photosynthetic rate, showing more CO_2 assimilation in mycorrhizal than in non mycorrhizal plants. Nevertheless, AM did not have a significant effect on minimizing the effect of water stress on plant performance, at least under our experimental conditions. Water potential, relative water content and stomatal conductance showed similar values in both treatments.

Under our experimental conditions AM attenuated the low Pi effects, that involves the possibility of reduce the amount of phosphorus fertilizer that is currently used by papaya Maradol growers. More research is required in order to corroborate if this positive effect of AM documented in the present thesis, would be maintained in latter stages in the field and proves relevant to fruit yields in commercial plantations.

Introducción

La micorriza arbuscular (MA) es una asociación simbiótica formada por una amplia gama de especies vegetales incluyendo angiospermas, gimnospermas, pteridofitas e incluso algunas briofitas (Smith & Read, 1997), y un grupo de hongos, relativamente pequeño, pertenecientes al phylum *Glomeromycota* (Schüβler *et al.*, 2001), llamados hongos micorrízicos arbusculares (HMA). Esta simbiosis se desarrolla en las raíces de las plantas cuando el hongo coloniza las células corticales para poder acceder al carbono que aporta el hospedante. Las plantas con MA suelen tener mayor capacidad para tomar los nutrimentos minerales que se encuentran en la solución del suelo.

Los HMA son componentes esenciales de casi todos los ecosistemas pero en los sistemas agrícolas las técnicas de cultivo empleadas, como la desinfección de los sustratos, pueden disminuir e incluso eliminar las poblaciones de estos hongos. Por otro lado, la aplicación frecuente de fertilizantes fosforados inhibe la asociación entre las plantas y los HMA y disminuye el beneficio que las plantas obtienen de la asociación micorrízica (Bittman *et al.*, 2006). No obstante se ha comprobado que al ser cultivadas con baja disponibilidad de nutrimentos, principalmente el fósforo, las plantas con micorriza tienen mayor potencial de crecimiento, igualando incluso el de plantas de la misma especie que reciben aporte de nutrimentos suficiente para un buen crecimiento.

Este aporte de nutrimentos a través de fertilizantes químicos ha sido intensivo y continuo, convirtiéndose desafortunadamente a la vez en un factor importante de contaminación debido a que no todo el fertilizante que se aplica es consumido por las plantas, quedando excedentes que se acumulan en el suelo y

que posteriormente, a través de los procesos de lixiviación, se depositan en los mantos freáticos, contaminando así los cuerpos de agua (Vance *et al.*, 2003). Ante esta problemática, se propone el uso de organismos como los HMA, que permitan aprovechar mejor los nutrimentos del suelo y que contribuyan de alguna forma a disminuir el efecto negativo del exceso de aplicación de fertilizantes (Schachtman *et al.*, 1998). Por otro lado, y aún cuando es posible que el efecto no sea tan evidente como lo es para la absorción de Pi, la micorriza arbuscular también afecta aspectos relacionados con la disponibilidad de agua, como la hidratación de los tejidos o el intercambio gaseoso en las hojas (Ruiz-Lozano, 2003). Este efecto puede ser transitorio y probablemente depende de las circunstancias y de los simbiontes involucrados.

En este sentido, es necesario realizar trabajos de investigación que permitan conocer el beneficio de los HMA en cultivos de importancia económica como *Carica papaya* var. Maradol, para el aprovechamiento tanto de nutrimentos como de agua.

Papaya Maradol es uno de los cultivos que, a fin de satisfacer la demanda del mercado internacional, desde las primeras etapas de su ciclo de cultivo es manejado intensivamente con la frecuente aplicación de fertilizantes. Por otro lado, aunque se ha considerado que en general *Carica papaya* es relativamente resistente a la sequía, para crecer adecuadamente y tener buenos rendimientos requiere el aporte de agua abundante.

Con base en lo anterior, este trabajo de investigación se enfocó hacia la evaluación del papel de la micorriza arbuscular sobre la fotosíntesis y las relaciones hídricas de papaya Maradol bajo condiciones de estrés por deficiencia de Pi y de agua, determinando si éste se relaciona con el crecimiento de las plantas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bittman, S., C.G. Kowalenko, D.E. Hunt, T.A., Forge and X. Wu (2006). *Starter phosphorus and broadcast nutrients on corn with contrasting colonization by mycorrhizae.* Agronomy Journal, 98, 394-401.

Ruiz-Lozano J.M. (2003). *Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress: new perspective for molecular studies.* Mycorrhiza, 13, 309-317.

Schachtman D.P., R.J. Reid and S.M. Ayling (1998). *Phosphorus uptake by plants: from soil to cell.* Plant Physiology, 116, 447-453.

Schüβler A., D. Schwarzott and C. Walker (2001). *A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution.* Mycological Research, 105, 1413-1421.

Smith S.E. and D.J. Read (1997). *Mycorrhizal Symbiosis.* 2d. Ed. Acad. Press. London 605 p.

Vance C.P., C. Uhde-Stone and D.L. Allan (2003). *Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource.* New Phytologist, 157, 423-447.

Capítulo 1

Antecedentes

1.1. LA ASOCIACIÓN MICORRÍZICA ARBUSCULAR

1.1.1 Características

La asociación micorrizica arbuscular (AMA) fue descubierta hace más de 100 años, pero su estudio fue considerado como una actividad multidisciplinaria hasta la década de 1980 (Friberg, 2001). Esta asociación es de tipo mutualista y se desarrolla entre hongos del suelo conocidos como hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) y alrededor del 80% de las plantas vasculares terrestres (Smith & Read, 1997). La AMA se inicia con la penetración de las hifas del hongo en las células corticales de las raíces, dentro de las que posteriormente se desarrollan sufriendo una serie de modificaciones para formar diferentes estructuras como las vesículas, los enrollamientos hifales y los arbúsculos. Estos últimos son estructuras que se forman debido a una continua ramificación dicotómica de las hifas (Figura 1.1) y son tan característicos que gracias a ellos se reconoce y se dio nombre a la asociación. Además, se sugiere que los arbúsculos son la principal estructura a través de la que se lleva a cabo el intercambio nutrimental entre los simbiontes (Ezawa *et al.*, 2002; Ferrol *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2004). Cuando el hongo coloniza las células corticales, la membrana plasmática de la célula vegetal se invagina y desarrolla en torno a la hifa que se desarrolla y ramifica dentro de ella, generándose un espacio entre las membranas plasmáticas vegetal y fúngica, llamado interfase o espacio

periarbuscular (http://plantbiology.unibas.ch/molbio/molbio.htm) (Figura 1.2).

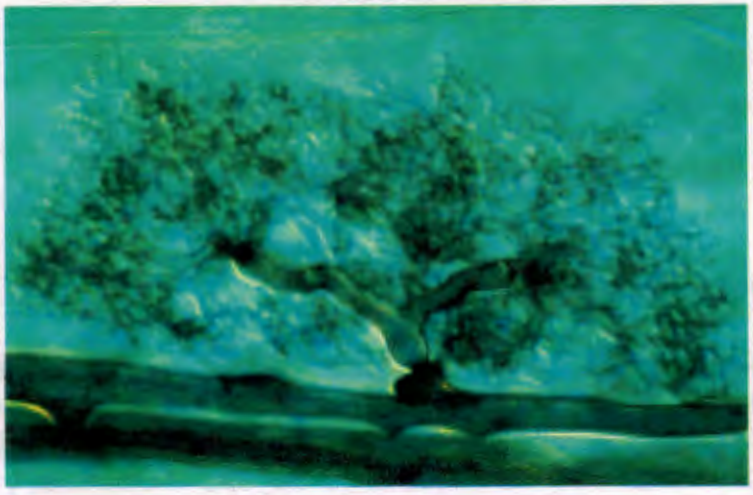


Figura 1.1. *Arbúsculo, estructura típica de la micorriza arbuscular (tomado de www.ffp.csiro.au/mycorrhiza/paris.html)*

Se ha propuesto que al ser colonizadas por los HMA, en la pared celular de las raíces se producen enzimas hidrolíticas en cantidades pequeñas y localizadas, lo cual permite mantener la viabilidad del hospedero sin que se dispare una respuesta de defensa, desarrollándose así un alto grado de compatibilidad entre los simbiontes (Bonfante & Perotto, 1995). Por su parte, investigadores del Botanical Institute Section Plant Physiology han encontrado una clase de gen quitinasa III, el gen Mtchit III-3, el cual se expresa de *novo* de manera específica en la interfase (Figura 1.2) de la asociación micorrízica, y sugieren que éste podría ser importante en la formación de la micorriza arbuscular de modo que las quitinasas serían parte del mecanismo molecular que permite a los HMA penetrar las

raíces sin que sean detectados como organismos extraños (http://plantbiology.unibas.ch/molbio.htm).

También se propone que el intercambio de nutrimentos y fotosintatos entre plantas y hongos tiene lugar a través de la interfase y, por tanto, en las células que contienen a los arbúsculos (Hirsch & Kapulnik, 1998). Aunque el intercambio nutrimental entre los simbiontes es el principal beneficio que ambos obtienen, aún se está muy lejos de entender por completo los mecanismos bioquímicos que regulan dicho intercambio (Solaiman & Saito, 2001) debido principalmente a que los HMA son organismos biótrofos obligados, condición que dificulta el aislamiento y estudio de la membrana periarbuscular (Ezawa *et al.*, 2002).

Figura 1.2. *Diagrama de las funciones sugeridas para el gen Mtchit III-3 durante la formación de los arbúsculos en la simbiosis micorrízica arbuscular en Medicago truncatula (tomado de University of Basel, Botanical Institute, Section Plant Physiology, http://plantbiology.unibas.ch/molbio/molbio.htm).*

1.1.2 Importancia

La MA es una de las pocas asociaciones hongo-planta de las que se tienen registros fósiles, datándose su origen desde hace 353-462 millones de años, lo cual sugiere que estos hongos podrían haber sido un instrumento vital en el éxito que tuvieron las plantas ancestrales en la colonización del ambiente terrestre (Kiers & van der Heijden, 2006). En la actualidad, la MA es el tipo de asociación hongo-raíz más extendido y común que se considera, por un lado como cosmopolita debido a que se le encuentra en la mayoría de las regiones naturales terrestres, y por otro lado, como generalista en el sentido de que una planta puede albergar diferentes especies de hongos al mismo tiempo, en tanto que una especie de hongo es capaz de colonizar diferentes especies de plantas (Smith & Read, 1997; Stukenbrock & Rosendahl, 2005). También se considera que la MA es un factor importante en la diversidad de la flora (Grime *et al.*, 1987) pues es muy probable que puedan modificar la estructura y el funcionamiento de la comunidad vegetal de forma completamente impredecible (Francis & Read, 1994; Dell, 2002; Ayres *et al.*,2006). Pese a que se les puede encontrar asociados con muchas familias vegetales, diversos estudios indican que los HMA difieren tanto en su capacidad para colonizar a las diferentes especies vegetales como en el beneficio que les puedan conferir (Bohrer *et al.*, 2003).

El micelio de los HMA crece en el suelo y funciona como una extensión del sistema radical, hecho que aumenta la capacidad de exploración de las raíces e incrementa así la adquisición de iones que, como el fósforo (P), son de lenta difusión. De esta manera las plantas micorrizadas tienen mayor accesibilidad a estos iones, mientras que los hongos a cambio reciben parte de los fotosintatos producidos por la planta hospedera (Rasmussen *et al.*, 2000). Se ha encontrao que aunque en menor proporción, esta asociación incrementa la absorción de otros nutrimentos del suelo, como K, Ca y N (Trindade *et al.*, 2001a; Bohrer *et al.*, 2003).

Además del papel que la MA desempeña en el mejor aprovechamiento de nutrimentos por las plantas, también se han realizado estudios que determinan el efecto benéfico de esta asociación en otros aspectos relacionados con las plantas, como el incremento a la tolerancia que éstas pueden presentar ante la escasez de agua (Ruiz-Lozano *et al.*, 1995; Kaya *et al*, 2003; Porcel & Ruiz-Lozano, 2004) aunque también se reporta que la micorriza contribuye poco o nada a la resistencia de las plantas a este tipo de estrés (Cho *et al.*, 2006). En relación al efecto que puede presentarse sobre el suelo, se ha demostrado que a través de las hifas de los hongos participantes en la AMA puede mejorarse el proceso de fitorremediación en suelos contaminados con metales pesados como el zinc y el cadmio (Gaur & Adholeya, 2004), contribuyendo al establecimiento de vegetación en este tipo de suelos (Ning & Cumming, 2001; Turnau *et al.*, 2008). Por otra parte, la presencia de HMA promueve la estabilidad de los agregados del suelo (van der Heijden *et al.*, 2006) a través de la red de hifas que crecen extraradicalmente y que atrapan las partículas de suelo más finas, pero también a través de la producción de glomalina que es una glicoproteína recalcitrante y aparentemente hidrofoba que ha demostrado tener una fuerte influencia en la estabilidad de los agregados del suelo ante la acción del agua (Rillig *et al.*, 2002).

1.1.3 Clasificación de los Hongos Micorrizógenos Arbusculares

Tradicionalmente la taxonomía de estos hongos ha sido basada en la morfología de las esporas. Para la designación de familias y géneros el carácter utilizado es la manera en que la espora se forma a partir de la hifa de sostén, mientras que para la designación de las especies se utiliza el patrón estructural de la pared de las esporas (tipo y número de láminas, además de la ornamentación) (Morton, 1988). Hasta hace algunos años estos hongos estaban ubicados entre los Zigomicetos dentro del orden Glomales con tres familias y dos géneros cada una:

Glomaceae con *Glomus* y *Sclerocystis*; Acaulosporaceae con *Acaulospora* y *Entrophosphora*; y Gigasporaceae, integrada por *Gigaspora* y *Scutellospora* (Schenck & Pérez, 1990; Honrubia *et al.*, 1995). Considerando caracteres moleculares, además de los morfológicos, Morton & Redecker (2001) propusieron una nueva clasificación que considera cinco familias y siete géneros, mientras que basándose en la secuenciación de rADN y la aparente falta de zigosporas estos hongos han sido reclasificados en el nuevo phylum Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001) (Figura 1.3). La utilización de métodos moleculares para elucidar sus relaciones filogenéticas ha permitido el surgimiento de diversas propuestas, de modo que su clasificación ha sufrido una rápida transición (Walter, *et al.*, 2004; Walter & Schüßler, 2004; Oehl & Sieverding, 2004; Sieverding & Oehl, 2006; Redecker *et al.*, 2007; Plazola *et al.*, 2008) y en la actualidad se reconocen alrededor de 184 especies de HMA, conformadas en cuatro órdenes, nueve familias y 13 géneros (Cuadro 1.1).

1.1.4 El estudio de la micorriza arbuscular en México

El estudio de la micorriza arbuscular en México se ha enfocado a aspectos relacionados con el incremento de la producción agrícola. Aborda principalmente aspectos sobre el efecto de los HMA sobre el crecimiento de cultivos y/o especies nativas, de forma aislada (Gardezi *et al.*, 2000; Pola-López, 2000; Alarcón *et al.*, 2001) o en interacción con otros microorganismos del suelo (Brown *et al.*, 2000; Sánchez-Colín *et al.*, 2000), el estatus micorrízico de diferentes especies vegetales nativas (Reyes-Quintanar *et al*, 2000; Sánchez-Gallén & Guadarrama, 2000; Camargo-Ricalde *et al.*, 2003), el efecto de estos hongos sobre el establecimiento de plantas en sistemas perturbados (Ramos-Zapata y Guadarrama, 2004), el efecto de la contaminación de agua o la perturbación de los suelos sobre las poblaciones de este tipo de hongos (Nava-Gutiérrez, 1994; Ortega-Larrocea, 2001), así como el potencial efecto de la asociación micorrízica sobre las características del suelo

(Nava-Gutiérrez, 2000). También se han elaborado listados de las especies de hongos micorrizógenos que se encuentran en diferentes ambientes (Guadarrama *et al.*, 2007; Pezzani *et al.*, 2006).

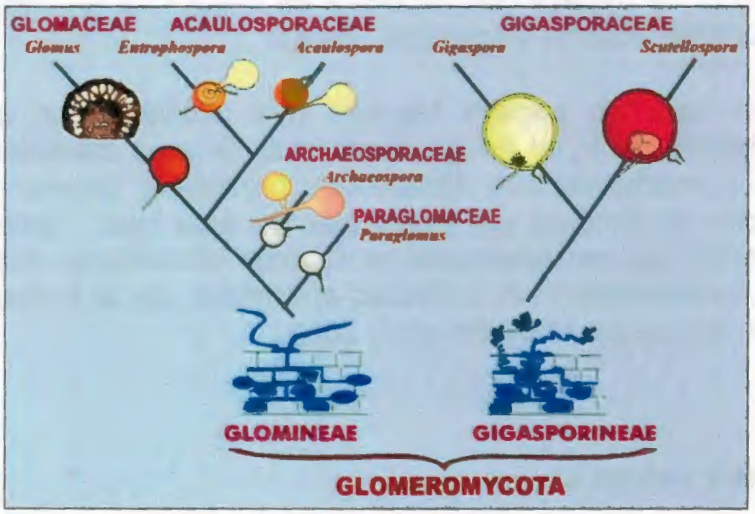


Figura 1.3. *Clasificación de los hongos micorrizógenos arbusculares, basada en caracteres morfológicos y moleculares. (tomado de International Cultural Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) http://invam.caf.wvu.edu.).*

1.1.5 Estudio de la asociación micorrízica arbuscular en *Carica papaya*

Aunque se ha trabajado relativamente poco en el estudio del efecto de la MA sobre *Carica papaya*, en plantaciones de papaya var. Solo, la intensidad de la colonización MA mostró un intervalo muy amplio el cual depende de la disponibilidad de P en el suelo, correlacionándose positivamente con el contenido de arena y el pH del mismo (Trindade *et al.*, 2006). Bajo condiciones limitantes de P, la MA favorece el crecimiento de este frutal, efecto que difiere entre las variedades comerciales de papaya, dependiendo además de la especie de

hongo que participe en la asociación (Alarcón *et al.*, 2002; Minhoni & Auler, 2003; Trindade *et al.*, 2001b), incluso con bajo aporte de agua (Cruz *et al.*, 2000). También se ha encontrado que la micorriza proporciona a las plantas cierta protección contra el ataque de nemátodos, observándose que el crecimiento de papaya con micorriza es mejor que en plantas sin micorrizas (Jaizme-Vega *et al.*, 2006).

Por otro lado, en papaya Maradol roja cultivada con baja disponibilidad de P, el hongo micorrízico *Glomus claroideum,* solo o en interacción con *Azospirillum brasilense*, favoreció la producción de biomasa y el incremento del área foliar. También se encontró que en presencia de *Glomus claroideum*, dichas plantas incrementaron la actividad enzimática de la fosfatasa ácida en sus raíces (Alarcón *et al.*, 2002).

1.2 *Carica papaya* L.

1.2.1 Características del frutal

El papayo pertenece a la división Spermatophyta, Sub-división Angiospermatophyta, clase Dicotiledoneae, familia Caricaceae, género *Carica* y especie *Carica papaya* L. (Cituk-Chan, 2006). Es un frutal de crecimiento rápido originario de América tropical, cuya altura va de tres a ocho metros, en un solo tallo erecto, grueso, fistuloso, carnoso, de entre 20 y 30 centímetros de diámetro, con corteza lisa marcada con cicatrices foliares grandes y numerosas. Al crecer, se torna de color grisáceo y se hace hueco. Los pecíolos de las hojas maduras generalmente se extienden horizontalmente desde el tallo principal hasta alcanzar una longitud aproximada de 45 a 70 centímetros, dependiendo del cultivar. Las flores aparecen en las axilas de las hojas conformando inflorescencias que son cimas modificadas. El tipo floral que aparece depende de la forma sexual de la planta.

Cuadro 1.1. Clasificación actual de los hongos micorrizógenos arbusculares pertenecientes al phylum Glomeromycota

Orden	Familia	Género
Archaeosporales	Archaeosporaceae	*Archaeospora*
	Ambisporaceae	*Ambispora*
		Intraspora
Paraglomerales	Paraglomeraceae	*Paraglomus*
Glomerales	Glomeraceae	*Glomus*
Diversisporales	Pacisporaceae	*Pacispora*
	Diversisporaceae	*Diversispora*
		Otospora
	Acaulosporaceae	*Acaulospora*
		Kuklospora
	Entrophosporaceae	*Entrophospora*
	Gigasporaceae	*Gigaspora*
		Scutellospora

Tomado de: http://www.lrz-muenchen.de/~shussler/amphylo

Actualmente el cultivo de papaya se realiza intensivamente en todos los trópicos y sub-trópicos, desde el nivel del mar hasta los 1000 msnm, aunque los mayores rendimientos se obtienen por debajo de 800 msnm. En la mayoría de las plantaciones comerciales de México se utilizaba la semilla de tipos criollos entre los que destacan "Cera", "Coco" y "Amameyado". Sin embargo, la variedad "Maradol" de origen cubano empezó a tener gran demanda en el mercado internacional (Gobierno del Estado de Yucatán, 1997) y actualmente es la variedad más cultivada en México.

Papaya Maradol fue obtenida a partir de la variedad corralillo a través de numerosas cruzas (Monforte-Peniche *et al.*, 2003) y se caracteriza porque su fruto es de forma alargada y cilíndrica muy uniforme, característica que se obtiene porque entre 50% y 70% de las plantas que se seleccionan para cosecha son hermafroditas. Tiene además, excelente consistencia y

resistencia al transporte y su peso oscila entre 1.3 y 2.7 kg (Gobierno del Estado de Yucatán, 1997).

1.2.2 Requerimiento y problemática del cultivo

El cultivo de papaya requiere temperaturas medias óptimas entre 24°C y 27°C a una altitud máxima de 400 msnm. En plantas con flores hermafroditas, temperaturas superiores a 33°C pueden provocar atrofia de ovario de modo que el fruto no se desarrolla (hermafroditas estériles de verano) (Gobierno del Estado de Yucatán, 1997). Aunque puede desarrollarse donde no se produzcan heladas, el frío reduce su crecimiento y rendimiento pero sobre todo afecta la calidad del fruto haciéndolo insípido y/o deforme. Se requieren también grandes cantidades de agua y luz para tener un buen desarrollo (INIFAP, 1997).

Las plantas de papaya puede crecer en suelos muy diversos pero para un buen desarrollo y alta producción requiere de suelos fértiles, de textura media, con un contenido de arcilla de 10% a 30%, profundidad mayor de 80 centímetros, con buena estructura y drenaje, para evitar encharcamientos de más de 48 horas que pueden causar daños a la planta y en ocasiones hasta la muerte. Los suelos con pedregosidad superficial de hasta 50% se consideran apropiados para el cultivo de papaya. El pH puede variar de 5.6 a 7.0; en suelos con condiciones por debajo o arriba de estos límites es recomendable aplicar algún remediador que regule el pH (Gobierno del Estado de Yucatán, 1997).

En plantaciones de riego el tratamiento de fertilización consiste en aplicar 160 kg de N por hectárea, 100 de fósforo y 160 de potasio durante todo el ciclo, dividido en tres aplicaciones pero también se recomienda efectuar las aplicaciones en función de la edad de las plantas y del sistema de riego que se utilice (INIFAP, 1997). A lo largo del ciclo de cultivo, la aportación de

fertilizante fosfatado es muy importante para la producción de papaya (Cuadro 1.2).

Ante esta situación, que suele ser la constante de la agricultura intensiva, se torna vital la búsqueda de alternativas de manejo que conduzcan a la disminución de los costos de producción y que además contribuyan a disminuir el daño ecológico que se genera debido a la acumulación de los fertilizantes aplicados en la agricultura, los cuales en el largo plazo contaminan tanto el suelo como los mantos freáticos.

Cuadro 1.2. Programa de fertilización fosfatada para papaya Maradol*

Tipo de Fertilizante	Días después de la siembra	g/planta
Superfosfato triple	15, 45 y 75	5.0
	105, 165 y 195	10.0
Triple 17	15, 45, 75 y 105	25
	135 y 165	50
	195	80
	240, 285, 330, 375, 420, 465 y 510	120
Fertilizante foliar (20-20-20)	75, 90, 105, 120, 150, 165, 180, 195, 210, 225, 240, 255, 270, 285, 300, 315, 330, 345, 360, 375, 390, 405, 420, 435, 450, 465, 480, 495, 510, 525 y 540.	0.5

FUENTE: Gobierno del Estado de Yucatán. Secretaría de Desarrollo Rural (1997).

1.2.3 Importancia económica de *Carica papaya* L.

La papaya es, desde el punto de vista económico, el integrante más importante de la familia Caricaceae. El uso más común de este fruto es su consumo en fresco y se le considera una buena fuente de calcio, con alto contenido de vitaminas A y C, por tanto, es una buena fuente nutricional. Otro producto económicamente importante que se extrae de la papaya es la papaína, una enzima proteolítica a la que se le han encontrado diversas aplicaciones industriales: en la fabricación de cosméticos, en la aclaración de la cerveza, en la elaboración de gomas de mascar, como suavizante de carnes y en el proceso de tinción de pieles. La papaina también se encuentra en fármacos utilizados en medicina de patente y tradicional, debido a que posee propiedades bactericida y antihelmíntica (SAGARPA, 2005).

Dado que la papaya es un producto altamente vulnerable a las condiciones atmosféricas, así como a diversas plagas, los rendimientos tienden a presentar variabilidad de un año a otro. En 2002, el rendimiento promedio mundial fue de 16.54 ton/ha aunque en México se obtuvo un rendimiento de 40.15 ton/ha. En ese mismo año nuestro país fue el tercer productor a nivel mundial, superado por Brasil y Nigeria, países que dedican mayor superficie al cultivo de este fruto (SAGARPA, 2005). De particular interés es que en México, la mayoría de la superficie dedicada a este cultivo es para papaya Maradol y papaya roja, mientras que para las otras variedades es casi nula.

La dinámica internacional de la papaya ha propiciado que en los últimos años las exportaciones muestren un incremento acelerado. En el 2002, México destacó como el principal exportador mundial, al exportar el 37 por ciento de su producción total, seguido por Brasil y Malasia. Datos del Banco de México indican que el principal comprador de la producción mexicana es Estados Unidos, pero el producto también es exportado a Canadá, Alemania, Reino Unido, Francia,

Bermudas, Guatemala, Japón y los Países Bajos (SAGARPA, 2005).

1.3 IMPORTANCIA DEL FÓSFORO

1.3.1 En el crecimiento de las plantas

El fósforo es uno de los 17 elementos esenciales que las plantas requieren para su crecimiento (Raghothama, 1999). Su concentración en las plantas va de 0.05 a 0.50% del peso seco total (Vance *et al.*, 2003). Este elemento es necesario para diversas funciones biológicas, incluyendo la generación de energía, la síntesis de ácidos nucléicos, la fotosíntesis, la glicólisis, la respiración, la síntesis y estabilidad de membrana, la activación/inactivación de enzimas, reacciones redox, señalización, metabolismo de carbohidratos y fijación de nitrógeno (Marschner, 1995; Rausch & Bucher, 2002; Vance *et al.*, 2003).

El gradiente de concentración del suelo a las células vegetales es 2000 veces mayor, con una concentración de fosfato inorgánico (Pi) de 1 µM en la solución del suelo, concentración que está muy por debajo de la *Km* para la absorción de las plantas. Por tanto, aunque es abundante en muchos suelos, su baja disponibilidad lo convierte en el elemento más limitante para el crecimiento y desarrollo de los cultivos en aproximadamente 30% - 40% de los suelos arables en el mundo. Además, se ha estimado que las reservas mundiales de este elemento podrían agotarse hacia el año 2050 por lo cual, desde los puntos de vista humanitario, ambiental y económico, es importante conocer los medios por los que las plantas pueden hacer más eficiente la adquisición y uso del fósforo (Vance *et al.*, 2003).

1.3.2 En la fotosíntesis

El Pi tiene un papel importante en la regulación de la fotosíntesis, desde la asimilación del CO_2 hasta su conversión en sacarosa (Leegood, 1989). En condiciones que promueven la asimilación intensiva de carbono (concentración baja de O_2 o alta de CO_2), el reciclamiento del Pi es insuficiente y la fotosíntesis no se incrementa (Kondracka & Rychter, 1997). Cuando las plantas crecen en condiciones limitantes de fósforo, la actividad fotosintética puede verse afectada negativamente por varias causas: 1) el efecto directo sobre la energía para la transducción en el sistema tilacoidal, 2) la inhibición de enzimas clave del ciclo de Calvin y, 3) la inhibición de la retroalimentación por gradientes de pH a través de la membrana tilacoidal o el estado redox de los transportadores de electrones. Cuando la producción de asimilados excede la exportación de azúcares-fosfato en los cloroplastos, el nivel de Pi en el estroma disminuye. Esta reducción de sustrato limita la síntesis de ATP en la membrana tilacoidal y también inhibe la regulación de la RUBISCO, reduciendo por tanto la asimilación de carbono y la fotosíntesis neta.

La triosa fosfato producida durante la fotosíntesis en las células del mesófilo puede permanecer en el estroma y utilizar adenin difosfato-glucosa (ADPG) para convertirse en almidón, o bien, pasar al citosol para convertirse en fructosa-1,6-bifosfato y posteriormente en fructosa-6-fosfato. Con la uridin difosfato-glucosa (UDPG) como sustrato, la fructosa-6-fosfato se transforma en sacarosa fosfato. La sacarosa fosfato puede liberar parte del Pi para reintegrarse al estroma o bien convertirse finalmente en sacarosa la cual a su vez puede ser utilizada en los procesos subsecuentes del metabolismo o mantenerse como reserva para la planta (Figura 1.4). El equilibrio en la relación Pi/triosa fosfato es importante para la síntesis de almidón o de sacarosa. Si la concentración de Pi en el citosol es baja, el transporte de triosa fosfato desde el cloroplasto es limitado y se promueve la síntesis de almidón, el

cual se acumula en el cloroplasto, sin que pueda ser usado para el crecimiento de las plantas (Plaxton & Carswel, 1999).

El efecto de la deficiencia de Pi sobre las enzimas involucradas en la fotosíntesis de plantas C_3 y C_4, tales como la RUBISCO y PEPCasa, y sobre procesos relacionados, como la síntesis de almidón y sacarosa, son los mayores determinantes en la inhibición del crecimiento y desarrollo de las plantas.

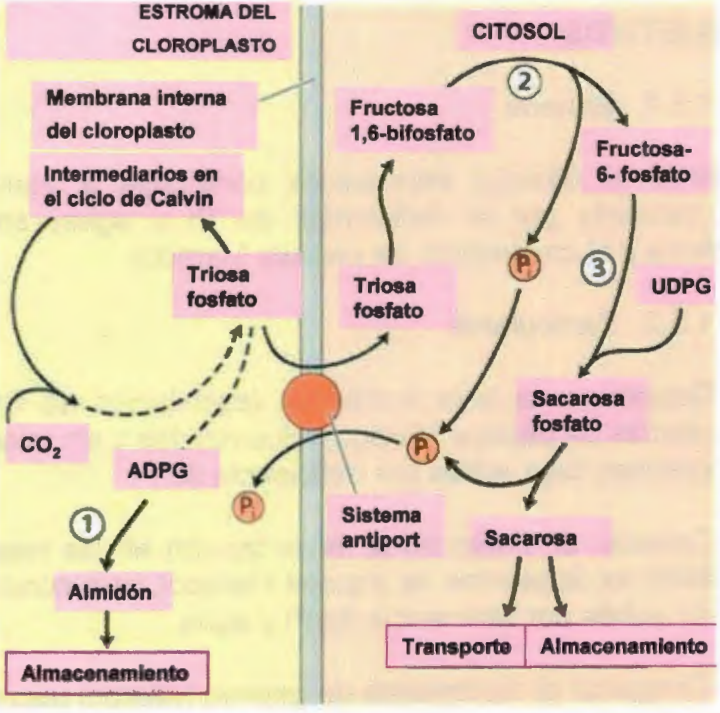


Figura 1.4. *Intercambio de Pi-Triosa y fosfato de estroma a citosol, que se utilizan para producción de almidón en el estroma o sacarosa en el citosol. Involucra almacenamiento (1), metabolismo (2) y transporte (3). (Modificado de Taiz y Zeiger, 2002. p. 216).*

1.4. HIPÓTESIS GENERAL

Debido a que la micorriza arbuscular incrementa la capacidad de las plantas para tomar Pi y agua, las plantas de papaya Maradol micorrizadas tendrán mayor capacidad para atenuar los efectos negativos de la deficiencia de Pi y agua sobre su tasa fotosintética y su crecimiento.

1.5. OBJETIVOS

1.5.1 General

Determinar si *Glomus intraradices* contribuye a atenuar el estrés causado por la deficiencia de Pi y agua, sobre la fotosíntesis y el crecimiento de papaya Maradol.

1.5.2 Particulares

- Determinar la tasa fosintética (asimilación de CO_2) de plantas de papaya Maradol micorrizadas y sin micorrizar, crecidas bajo estrés por deficiencia de Pi.
- Conocer el efecto de la micorrización en las relaciones hídricas de plantas de papaya Maradol, bajo condiciones de estrés por deficiencia de Pi y agua.
- Comparar el crecimiento de papaya Maradol micorrizada y sin micorrizar, cultivada con deficiencia de Pi y agua.

1.6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Los experimentos se realizaron en el invernadero del Centro de Investigación Científica de Yucatán. La temperatura promedio al medio día es de 35°C, la incidencia de luz es de 400 µmol m^{-2} s^{-1} y la humedad relativa promedio es de 70%.

La estrategia para establecer los tratamientos experimentales se basa en la determinación del crecimiento y tasa fotosintética de plantas de papaya Maradol micorrizadas dentro de un gradiente de disponibilidad de fósforo y agua. Los resultados se compararon contra los obtenidos en plantas de la misma variedad, sin micorrización pero cultivadas bajo las mismas condiciones. En el anexo 1 se ilustran los materiales biológicos utilizados en los experimentos. La figura 1.5 esquematiza las actividades para alcanzar los objetivos planteados.

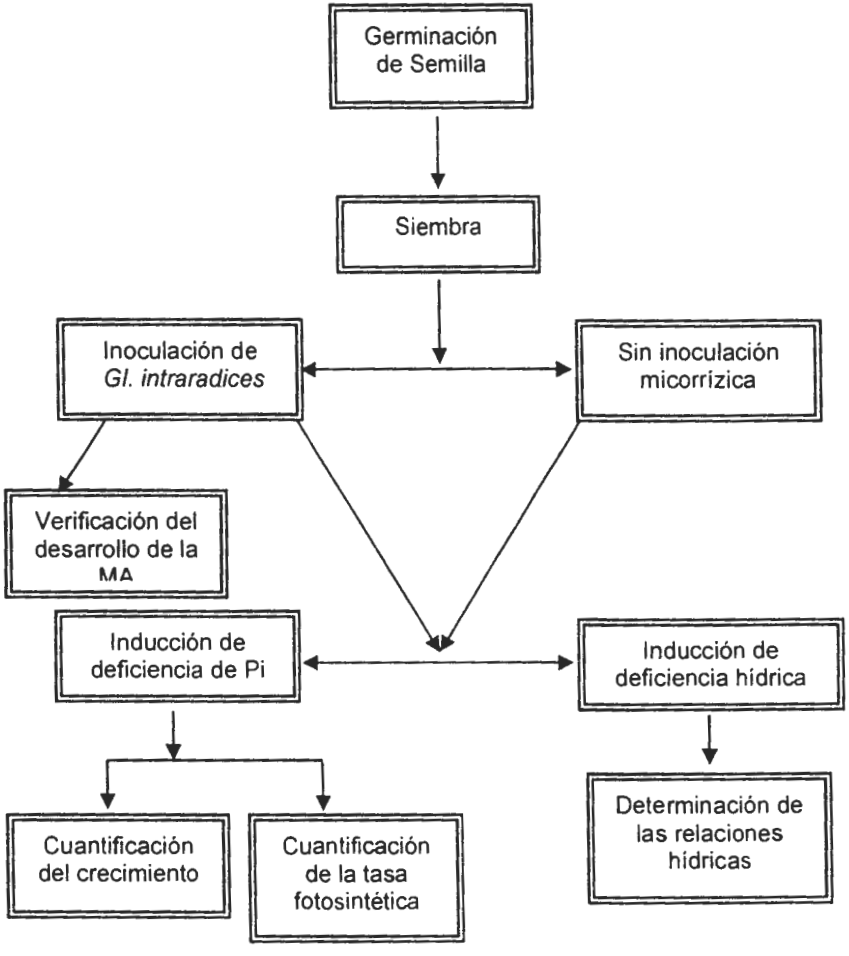


Figura 1.5. *Diagrama del trabajo experimental*

1.7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alarcón A., M.C. González-Chávez, R. Ferrera-Cerrato y A. Villegas-Monter (2001). *Efectividad de Glomus fasciculatum y Glomus etunicatum en el crecimiento de plántulas de Vitis vinifera L. obtenidas por micropropagación.* Terra, 19, 29-35.

Alarcón A., F.T. Davies Jr., J.N. Egilla, T.H. Fox, A. Estrada-Luna and R. Ferrera-Cerrato (2002). *Short term effects of Glomus claroideum and Azospirillum brasilense on growth and root acid phosphatase activity of Carica papaya L. under phosphorus stress.* Revista Latinoamericana de Microbiología, 44(1), 31-37.

Ayres R.L., A.C. Gange and D.M. Aplin (2006). *Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and intraspecific competition affect size, and size inequality, of Plantago lanceolata L.* Journal of Ecology, 94, 285-294.

Bonfante B. and S. Perotto (1995). *Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants.* New Phytologist, 130, 3-21.

Bohrer G., V. Kagan-Zur, N. Roth-Bejerano, D. Ward, G. Beck and E. Bonifacio (2003). *Effects of different Kalahari-desert VA mycorrhizal communities on mineral acquisition and depletion from the soil by host plants.* Journal of Arid Environment, 55, 193-208.

Brown G.G., D. Trejo y L. Lara (2000). Interacción entre lombrices de tierra (*Pontoscolex corethrurus*) y hongos micorrízicos arbusculares en la nutrición y producción de pasto *Brachiaria decumbens*, in *Ecología, Fisiología y Biotecnología de la micorriza arbuscular* Alarcón A y R. Ferrera-Cerrato (eds). Mundi Prensa, México. pp. 16-38

Camargo-Ricalde S.L., S.S. Dhillion and C. Jiménez-González (2003). *Mycorrhizal perennials of the "matorral xerófilo" and the "selva baja caducifolia" communities in the semiarid Tehuacán-Cuicatlán Valley Mexico.* Micorriza, 13, 77-83.

Cruz A.F., T. Ishii and K. Kadoya (2000). *Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on tree growth, leaf water potential, and levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and ethylene in the roots of papaya under water-stress conditions.* Mycorrhiza, 10, 121-123.

Cho K., H. Toler, J. Lee, B. Ownley, J.C Stutz, J.L. Moore and R.M. Augé (2006). *Mycorrhizal symbiosis and response of sorghum plants to combined drought and salinity stresses.* Journal of Plant Physiology, 163, 517-528.

Cituk-Chan D.E. (2006). *Paquete tecnológico de producción de papaya (Carica papaya* L). Instituto Tecnológico de Conkal, SEP. Conkal, Yucatán.

Dell B. (2002). *Role of mycorrhizal fungi in ecosystems.* CMU. Journal, 1(1), 47-60.

Ezawa T., S.E. Smith and F.A. Smith (2002). *P metabolism and transport in AM fungi.* Plant Soil, 244, 221-230.

Ferrol N., J.M. Barea and C. Azcón Aguilar (2002). *Mechanisms of nutrient transport across interfaces in arbuscular mycorrhizas.* Plant Soil, 244, 231-237.

Francis R. and D.J. Read (1994). The contribution of mycorrhizal fungi to the determination of plant community structure, in *Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry*, Robson, A.D., L.K. Abbot, N. Malajczuk (eds) Kluwer Acad. Pub. Netherlands. pp. 11-25.

Friberg S. (2001). *Distribution and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in traditional agriculture on the Niger inland delta, Mali, West Africa.* CBM:s Skriftserie, 3, 53-80.

Gardezi A., V.M. Cetina, D. Talavera, R. Ferrera-Cerrato, F. Rodríguez y Larqué M. (2000). *Efecto de inoculación con endomicorriza arbuscular y dosis creciente de fertilización fosfatada en el crecimiento de chapulixtle (Dodonaea viscosa).* Terra, 18(2), 153-159.

Gaur A. and A. Adholeya (2004). *Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils.* Current Science, 86(4), 528-534.

Gobierno del Estado de Yucatán, Secretaría de Desarrollo Rural. (1997) *Experiencias obtenidas en el cultivo de papaya Maradol en el Estado.* 115 pp,

Grime J.P., J.M.L. Mackey, S.H. Hillier and D.J. Read (1987). *Floristic diversity in a model system using experimental microcosms.* Nature, 328, 420-422.

Guadarrama, P., S.L. Camargo-Ricalde, L. Hernández-Cuevas y S. Castillo (2007). *Los hongos micorrizógenos arbusculares de la región de Nizanda, Oaxaca, México.* Boletín de la Sociedad Botanica de Mexico, 81, 131-137.

Hirsch A.M. and Y. Kapulnik (1998). *Signal transduction pathways in mycorrhizal associations: comparisons with the Rhizobium-legume symbiosis.* Fungal Genetics Biology, 23, 205-212.

Honrubia M., P. Torres, G. Díaz y A. Monte (1995). *Biotecnología forestal: técnicas de micorrización y micropropagación de plantas.* Secretariado de Publicaciones. Universidad de Murcia.

INIFAP Centro de Investigación, Campo Experimental Cotaxtla (1997). *Manual de producción de papaya en el estado de Veracruz.* Folleto Técnico Núm. 17, División Agrícola.

Jaizme-Vega M.C., A.S. Rodríguez-Romero and L.A. Barroso-Núñez (2006). *Effect of the combined inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria on papaya (Carica papaya L.) infected with the root-knot nematode Meloidogyne incognita.* Fruits, 61, 151-162.

Kaya C., D. Higgs, H. Kirnak and L. Tas (2003). *Mycorrhizal colonization improves fruit yield and water use efficiency in watermelon (Citrullus lanatus thumb.) grown under well-watered and water-stressed conditions.* Plant Soil, 253, 287-292.

Kiers .E.T. and M.G.A. van der Heijden (2006). *Mutualistic stability in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: exploring hypotheses of evolutionary cooperation.* Ecology, 87(7), 1627-1636.

Kondracka A. and A.M. Rychter (1997). *The role of Pi recycling processes during photosynthesis phosphate-deficient bean plants.* Journal of Experimental Botany, 48, 1461-1468.

Leegood R.C. (1989). Biochemical studies of photosynthesis: from CO_2 to sucrose, in *Photosynthesis,* Briggs W. (ed) Alan Liss, Inc. N.Y.

Marschner H. (1995). Function of mineral nutrients: macronutrients, in *Mineral Nutrition of Higher Plants,* Marschner H.. 2d. Ed. Acad. Press. San Diego CA. pp. 265-277.

Minhoni M.T.A. and P.A.M. Auler (2003). *Efeito do fósforo, fumigação substrato e fungo micorrízico arbuscular sobre o crescimento de plantas de momoeiro.* Revista Brasileira. Ci Solo, 27, 841-847.

Monforte-Peniche R., A.N. Novell y F.J. Rodríguez (2003). *El cultivo de la papaya Maradol en la península de Yucatán.* Campo experimental "Rancho San Pedro Sucila". Yucatán.

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

Morton J.B. and D. Redecker (2001). *Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera Archaeospora and Paraglomus, based on concordant molecular and morphologic characters.* Mycologia, 93(1), 181-195.

Nava-Gutiérrez Y. (1994). *Población de hongos micorrízicos arbusculares en tepetates recuperados para uso agrícola.* Tesis de Licenciatura. Departamento de Agrobiología, Universidad Autónoma de Tlaxcala, México. 83 p.

Nava-Gutiérrez Y. (2000) *Efecto de la asociación hongos micorrízicos arbusculares -leguminosas en las características de un suelo tepetatoso.* Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 78 p.

Ning J. and J.R. Cumming (2001). *Arbuscular mycorrhizal fungi alter phosphorus relations of broomsedge (Andropogon virginicus L.) plants.* Journal of Experimental Botany, 52(362), 1883-1891.

Oehl F. and E. Sieverding (2004). *Pacispora, a new vesicular arbuscular mycorrhizal fungal genus in the glomeromycetes.* Journal of Applied Botany Food Quality, 78(1), 72-82.

Ortega-Larrocea P. (2001). Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) spore abundance is affected by wastewater pollution in soils of Mezquital Valley in Central Mexico, in *Sustaining the Global Farm,* Stott D.E, R.H Mohtar and G.C. Steinhardt (eds). pp. 676-681.

Palenzuela J. and N. Ferrol (2008). *Otospora bareai, a new fungal species in the Glomeromycetes from a dolomitic shrub land in Sierra de Baza Nacional Park (Granada, Spain).* Mycologia, 100(2), 296-305.

Pezzani, F. C. Montaña and R. Guevara (2006). *Associations between arbuscular mycorrhizal fungi and grasses in the succesional context of a two-phase mosaic in the Chihuahua desert.* Mycorrhiza, 16, 285-295.

Plaxton W.C.and M. Ch. Carswell (1999). Metabolic aspects of the phosphate starvation response in plants, in *Plant responses to environmental stresses: from phytohormones to genome reorganization,* Lerner H.R. (Ed.). Marcel Dekker, Inc. New Cork. pp 349-372.

Pola-López R. (2000) *Crecimiento de Citrus volkameriana inoculado con la micorriza arbuscular Glomus intraradix durante la primera etapa de vivero en tres sustratos regionales de Yucatán.* Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo, Centro Regional Universitario, Península de Yucatán, México.

Porcel R. and J.M. Ruiz-Lozano (2004). *Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants to drought stress.* Journal of Experimental Botany, 55(403), 1743-1750.

Raghothama K.G. (1999). *Phosphate acquisition.* Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 50, 665-693.

Ramos-Zapata J. y P. Guadarrama (2004). *Los hongos micorrizógenos arbusculares en la restauración de comunidades tropicales.* Universidad y Ciencia, 1, 59-65.

Rausch C. and M. Bucher (2002). *Molecular mechanisms of phosphate transport in plants.* Planta, 216, 23-37.

Rasmussen N., D.C. Lloyd, R.G. Ratcliffe, P.E. Hansen and I. Jakobsen (2000). *^{31}P NMR for the study of P metabolism and translocation in arbuscular mycorrhizal fungi.* Plant Soil, 226, 245-253.

Redecker D., P. Raab, F. Oehl, F.J. Camacho and R. Courtecuisse (2007). *A novel clade of sporocarp-forming species of glomeromycotan fungi in the Diversisporales lineage.* Mycological Progress, 6, 35-44.

Reyes-Quintanar C.K., R. Ferrera-Cerrato, A. Alarcón y Rodríguez (2000). Microbiología de la relación de nodricismo entre leguminosas arbóreas y *Neobuxbaumia tetetzo* en suelos no erosionados y erosionados en Zapotitlán de las Salinas, Puebla, in *Ecología, Fisiología y Biotecnología de la Micorriza Arbuscular,* Alarcón A. y R. Ferrera-Cerrato (eds.) Mundi Prensa. México. pp 57-68 .

Rillig M.C., S.F. Wright and V.T Eviner (2002). *The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five plant species.* Plant Soil, 238(2), 325-333.

Ruiz-Lozano J.M., R.Azcón and M. Gómez (1995). *Effects of arbuscular-mycorrhizal Glomus species on drought tolerance: physiological and nutritional plant responses.* Applied Environmenl Microbiology, 61(2), 465-460.

Sánchez-Colín M.J., P.J. Ramírez y N. Torrescano (2000). Micorriza arbuscular y *Rhizobium* presentes en leguminosas establecidas en suelo andosol, in *Ecología, Fisiología y Biotecnología de la Micorriza Arbuscular*,

Alarcón A. y R. Ferrera-Cerrato (eds.) Mundi Prensa. México. pp 46-55.

Sánchez-Gallén I. y P. Guadarrama (2000). Influencia de la micorriza arbuscular en el crecimiento de plántulas en la selva húmeda tropical de los Tuxtlas, Veracruz, in *Ecología, Fisiología y Biotecnología de la Micorriza Arbuscular,* Alarcón A. y R. Ferrera-Cerrato (eds.). Mundi Prensa. México. pp 69-77.

Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2005) *Plan Rector Sistema Nacional Papaya*. México.

Schüßler A., D. Schwarzott and C. Walker (2001). *A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution.* Mycological Research, 105, 1413-1421.

Schenck N. and Y. Pérez (1990) *Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi.* 3ra. ed. INVAM, Gainesville. 286 p.

Sieverding E. and F. Oehl (2006). Revision of *Entrophospora* and description of *Kuklospora* and *Intraspora*, two new genera in the arbuscular mycorrhizal glomeromycetes. Journal of Applied Botany and Food Quality, 80(1), 69-81.

Smith S.E. and D.J. Read (1997). *Mycorrhizal Symbiosis*. 2d. Ed. Acad. Press. London. 605 pp.

Smith S.E., F.A. Smith and I. Jakobsen (2004). *Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake.* New Phytologist, 162, 511-524.

Solaiman M.Z. and A. Saito (2001) *Phosphate efflux from hyphae of Gigaspora margarita in vitro and its implication for phosphorus translocation.* New Phytol., 151, 525-533.

Stukenbrock E.H and S. Rosendahl (2005). *Distribution of dominant arbuscular mycorrhizal fungi among five plant species in undisturbed vegetation of a coastal grassland.* Mycorrhiza, 15, 497-503.

Taiz L. and E. Zeiger (2002). *Plant physiology*. The benjamin/Cummings Pub. Co. Inc. Redwood City. 705 p.

Trindade A.V., D.J.L. Loyola, F. Pinto de Almeida and M.I.C. Silva (2001a). *Estimativa do coeficiente de determinação genotípica em mamoeiros (Carica papaya L.) inoculados com fungo micorrízico arbuscular.* Revista Brasileira Frutic., 23(3), 607-612.

Trindade A.V., O. Siqueira and F. Pinto de Almeida (2001b). *Dependência micorrízica de variedades comerciais de mamoeiro.* Pesquisa. Agropecuaria. Brasileira, Brasilia, 36(12), 1485-1494.

Trindade A.V., O. Siquiera and S.L. Stürmer (2006). *Arbuscular mycorrhizal fungi in papaya plantations of Espiritu Santo and Bahia, Brazil.* Brazilian Journal of Microbiology, 37, 283-289.

Turnau K., T. Anielska and P. Ryszka (2008). *Establishment of arbuscular mycorrhizal plants originating from xerothermic grasslands on heavy metal rich industrial wastes-new solution for waste revegetation.* Plant Soil, 305, 267-280.

Vance C.P., C. Uhde-Stone and D.L. Allan (2003). *Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource.* New Phytol., 157, 423-447.

Van der Heijden M.G.A., A. Wiemken and I.R. Sanders (2003). *Different arbuscular mycorrhizal fungi alter coexistencie and resource distribution between co-occurring plant.* New Phytologist, 157, 569-578.

Walker C. and A. Schuβler (2004). *Nomenclatural clarifications and new taxa in the Glomeromycota.* Mycological Research, 108, 981-982

Walker C., J. Blaszkowski, D. Schwarzott and A. Schüβler (2004). *Gerdemannia gen. nov., a genus separated from Glomus, and Gerdemanniaceae fam. Nov., a new family in the Glomeromycota.* Mycological Research, 108(6), 707-718.

Capítulo 2

Efecto de la micorriza arbuscular sobre la capacidad fotosintética de papaya Maradol bajo estrés por deficiencia de fósforo

2.1. INTRODUCCIÓN

La vida en la tierra depende fundamentalmente de la energía solar. El proceso mediante el cual las plantas, algas y cianobacterias usan directamente esta energía para sintetizar compuestos orgánicos es llamado fotosíntesis, proceso que origina la producción de toda la materia orgánica que conocemos. La ruta para la transducción de energía es compleja e involucra mecanismos tanto físicos como químicos. El proceso se inicia cuando la luz es absorbida por las moléculas antena dentro de la membrana fotosintética. La energía absorbida es transferida en forma excitada, es atrapada en los centros de reacción y usada para hacer trabajo químico, o bien es disipada principalmente como calor y, en menor proporción, emitida como radiación – fluorescencia. La energía luminosa es convertida a compuestos de alta energía como el ATP y el NADPH los cuales posteriormente son utilizados para la fijación del carbono (Malkin & Niyogi, 2000).

Una vez que el carbono ha sido asimilado a través de la fotosíntesis, se distribuye tanto en el interior como en el exterior del cloroplasto por acción de un transportador específico, situado en la membrana interna de este organelo, mediante el cual intercambia fósforo inorgánico (Pi) por triosas-P, controlando la entrada y salida de Pi y de triosas-P del cloroplasto (Figura 2.1). Posteriormente las triosas-P pueden

iniciar la síntesis del almidón y/o de la sacarosa, que son los productos finales de la fotosíntesis. La distribución relativa entre la síntesis de almidón y de la sacarosa depende de cada especie vegetal y es importante para la regulación global del proceso fotosintético (Malkin & Niyogi, 2000).

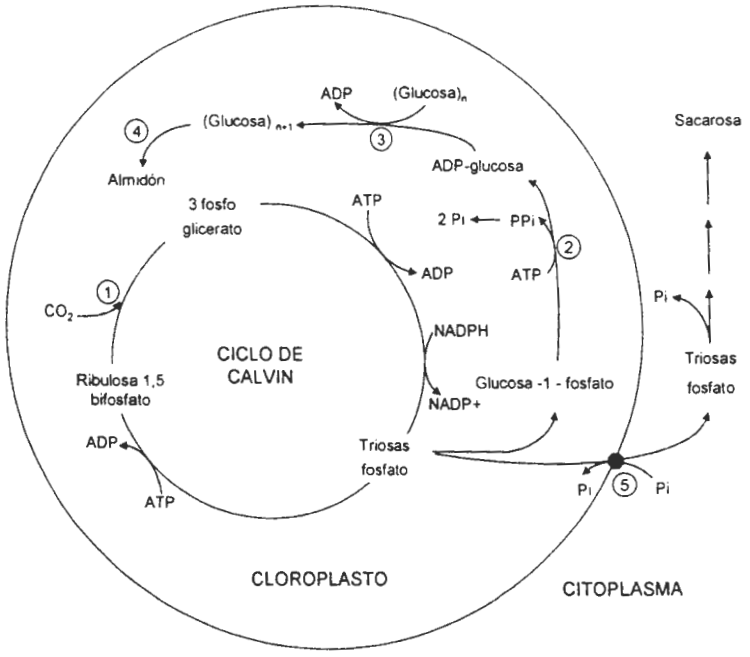


Figura 2.1. *Ciclo reductivo de las pentosas-P y distribución del carbono fotosintético para la síntesis de almidón y sacarosa en el cloroplasto y el citoplasma respectivamente. Las enzimas involucradas son: 1) RuBisCO, 2) ADP-Glucosa pirofosforilasa, 3) almidón sintetasa, 4) enzima ramificadora, 5) proteína intercambiadora de Pi y Triosas-P. (Tomado de Ciencia Hoy en Línea 5 (27): 41-55).*

El proceso de la fotosíntesis puede ser naturalmente afectado por fluctuaciones en la intensidad de la luz (Barradas & Jones, 1996), por la baja disponibilidad de agua (Taiz & Zeiger, 1991), por el exceso de luz (Alves *et al.*, 2002) o por el nivel nutrimental del sustrato (Jacob & Lawlor, 1992; Groot *et al.*, 2003). Todo esto puede además influir en el cierre y apertura de estomas, lo cual a su vez juega un papel importante en el proceso fotosintético. Cuando la concentración de CO_2 en el aire es mayor que en el interior de la hoja, los estomas se abren y el CO_2 difunde desde la atmósfera a las diferentes células de la hoja. El consumo de CO_2 durante la fotosíntesis mantiene la diferencia de concentración y permite la continua difusión de CO_2 desde el aire. En este proceso, la apertura de estomas es fundamental para el proceso fotosintético, ya que de ella depende en gran parte la disponibilidad de CO_2 (Jarvis & Davies, 1997; Salisbury & Ross, 2000). Por otro lado, la concentración de agua en el interior de las hojas es superior a la del aire que las rodea por lo que cuando los estomas se abren el agua se difunde en dirección contraria a la del CO_2, de modo que al captar el CO_2 necesario para la fotosíntesis, las plantas se exponen a la pérdida de agua a través de las hojas (Jones, 1998). La manera como se soluciona el conflicto entre captación de CO_2 y pérdida de agua puede convertirse en un aspecto crucial para una planta sujeta a condiciones ambientales adversas.

De particular interés en este trabajo es la limitación de fósforo, debida en parte a su escasa movilidad, cuya absorción es favorecida especialmente por la micorriza arbuscular (Fitter, 2006) y porque su deficiencia en el sustrato puede afectar la fotosíntesis de las plantas al promover cambios en la actividad de las enzimas del ciclo de Calvin-Benson (ciclo de reducción de las pentosas), en la regeneración de la RuBisCO y/o en la actividad de la RuBisCO (Rao & Terry, 1989; Jacob & Lawlor, 1991; Sawada *et al.*, 1992). Tal como sucede ante la deficiencia de nitrógeno, se ha sugerido que la causa de la limitación de retroalimentación de la fotosíntesis por falta de Pi

se debe a una disminución de la fijación de CO_2 al haber bajo aporte de fósforo (Pieters *et al.*, 2001). No obstante, las plantas poseen mecanismos que les permite enfrentar las adversidades del ambiente y en el caso de la deficiencia nutrimental, se ha encontrado que particularmente bajo condiciones de deficiencia de Pi, la micorriza arbuscular incrementa la capacidad de las plantas para adquirir el Pi presente en el sustrato, contribuyendo así a atenuar el estrés al que están sujetas las plantas con baja disponibilidad de Pi y que, finalmente, podría afectar la actividad fotosintética (Black *et al.*, 2000; Bucher, 2007). Este trabajo tuvo como objetivo determinar si bajo condiciones de baja disponibilidad de Pi la micorrización promueve la mejor toma de Pi en plantas de papaya Maradol, y se convierte en factor que modifique la tasa fotosintética con respecto a la de las plantas sin micorrización.

Además de la asimilación de CO_2, se ha utilizado la fluorescencia de la clorofila-*a* emitida por las plantas verdes porque refleja la actividad fotosintética. La determinación de la fluorescencia en hojas intactas es un método no destructivo para monitorear los eventos fotosintéticos y determinar el estado fisiológico de las plantas. Las características de la fluorescencia emitida están determinadas básicamente por la absorción de los pigmentos, la transferencia de la energía excitada, así como la naturaleza y orientación de los pigmentos fluorescentes (Strasser *et al.* 2000; Malkin & Niyogi, 2000). En general, probamos la hipótesis de que al ser cultivadas con baja disponibilidad de Pi, las plantas de papaya Maradol micorrizadas tendrán mayor tasa fotosintética que sus contrapartes sin micorriza. Además, si la micorriza contribuye a que las plantas tengan mayor disponibilidad de Pi el contenido de sacarosa será mayor en las hojas de las plantas micorrizadas, mientras que el contenido de almidón será menor.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 General

Determinar la contribución de la micorriza arbuscular para mantener y/o mejorar la actividad fotosintética de papaya Maradol ante la deficiencia de fósforo.

2.2.2 Particulares

Comparar la tasa de asimilación de CO_2 entre plantas de papaya Maradol micorrizadas y sin micorrizar.

Comparar la fluorescencia de clorofila-*a* entre papaya Maradol micorrizada y papaya Maradol sin micorrizar.

Comparar el contenido de clorofilas en plantas micorrizadas y sin micorrizar.

Determinar el contenido de sacarosa y de almidón en plantas de papaya Maradol micorrizadas y sin micorrizar.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Condiciones experimentales

El experimento se llevó a cabo en el invernadero del Centro de Investigación Científica de Yucatán. La temperatura promedio fue de 35°C, la humedad relativa promedio de 70% e intensidad luminosa de 400 µmol $m^{-2}s^{-1}$. La duración del experimento fue de seis semanas contadas a partir del inicio de la aplicación de las diferentes concentraciones de Pi

(tratamientos). Para minimizar el efecto del sustrato en la disponibilidad de Pi para las plantas, se utilizó agrolita por ser un medio inerte. Desde la siembra de las semillas hasta el final del experimento se utilizó agua destilada para el riego. A partir del trasplante a los contenedores finales, cada planta recibió 250 mL de agua por semana.

2.3.2 Obtención de plántulas e inoculación micorrízica

Las plantas de papaya Maradol se obtuvieron a partir de semilla certificada (Carisem). Estas semillas fueron hidratadas y desinfectadas con solución fungicida (Captán Ultra, 3 g/L) por periódos de 24 horas; se eliminó la solución fungicida y se lavaron con agua destilada. Posteriormente, las semillas fueron germinadas en cámara húmeda (cajas de petri con discos de papel filtro saturados con agua destilada) y en oscuridad a 35°C ± 2°C. Las semillas que germinaron se sembraron en charolas para vivero, colocando una semilla por cavidad y se regaron diariamente con agua destilada. Las plántulas fueron mantenidas en las charolas hasta que desarrollaron de 4 a 6 hojas, trasplantándolas entonces a bolsas negras para vivero de 35 × 25 cm, previamente llenas con agrolita, en las que se les mantuvo durante todo el experimento.

La inoculación de las plántulas con el hongo micorrízico arbuscular (MA) fue simultánea al trasplante, al inicio del experimento. En este experimento se inocularon alrededor de 110 esporas por planta, puesto que se ha sugerido que en cultivos agrícolas es suficiente el uso de 100 a 200 esporas por planta para la inoculación micorrízica (Sieverding, 1983). Para realizar la inoculación, el lote de plantas fue dividido en dos grupos con 40 plantas cada uno. Uno de estos grupos fue inoculado con el hongo MA *Glomus intraradices* (plantas denominadas +Mic), en tanto que el otro no recibió inóculo micorrízico (plantas denominadas −Mic) (Cuadros 2.1 y 2.2). Además de las esporas, el inóculo del hongo MA *Glomus intraradices*, consistió en micelio y trozos de raíces

colonizadas. Este inóculo fue producido en el Área de Microbiología, Posgrado de Edafología del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México, utilizando como sustrato una mezcla de tezontle-suelo y sorgo como planta trampa.

Cuadro 2.1. Tratamientos para determinar el efecto de la micorriza arbuscular en la eficiencia fotosintética de papaya Maradol en condiciones de estrés por deficiencia de Pi

	Micorrización	
Concentración de Pi	***Glomus intraradices* (+Mic)**	**Sin micorriza (−Mic)**
0.6 mM (+P)	+Mic+P	−Mic+P
0.3 mM (-P)	+Mic−P	−Mic−P

Cuadro 2.2. Cantidad y/o frecuencia de aplicación de los factores de tratamiento

Micorriza	110 esporas de hongo MA/planta (+Mic)
	Sin inóculo (−Mic)
Disponibilidad de Pi en solución nutritiva	0.3 mM 250 mL/semana (−P)
	0.6 mM 250 mL/semana (+P)

2.3.3 Aplicación de tratamientos con fósforo

La fertilización se realizó con solución nutritiva de Hoagland (SH) (Hoagland & Arnon, 1950) modificada en su concentración de fósforo (Pi 1.0 mM) para evaluar concentraciones menores (Pi 0.3 mM y 0.6 mM) (Anexo 2). A fin de no interferir en el proceso de colonización micorrízica del grupo inoculado con el hongo MA, durante seis semanas a partir del trasplante, todas las plantas recibieron 250 mL de SH con la concentración de Pi más baja a evaluar (0.3 mM).

Posteriormente, de cada grupo previamente dividido en +Mic y –Mic, se tomaron 20 plantas para aplicarles SH con Pi 0.3 mM y 20 plantas para aplicar SH con Pi 0.6 mM. Cada planta recibió 250 mL de SH con la concentración correspondiente, por semana (Cuadros 2.1 y 2.2). El grupo control consistió en plantas de papaya sin micorrizar fertilizadas con SH sin modificar (1.0 mM). La concentración de N en la solución nutritiva modificada fue ajustada con nitrato de amonio.

2.3.4 Variables evaluadas

El efecto de la micorriza arbuscular sobre la eficiencia fotosintética de papaya Maradol fue evaluado básicamente a través de aspectos que involucran la capacidad de captación de CO_2, el metabolismo del carbón fotosintético y la incorporación de éste en los productos finales de la fotosíntesis: asimilación de CO_2, contenido de sacarosa y contenido de almidón en las hojas y fluorescencia de clorofila-*a*. Todas las muestras de tejido y mediciones se tomaron en las hojas más jóvenes completamente extendidas (tercera y cuarta hojas, del ápice hacia la base del tallo), en las cuales el sistema fotosintético está totalmente desarrollado. Los datos de asimilación de CO_2 se tomaron entre las 11:00 y 13:00 horas, posteriormente se tomaron los datos de fluorescencia de clorofila. Además, se tomaron muestras de tejido foliar para determinar el contenido de clorofilas.

- 2.3.4.1 Fotosíntesis (*Pn*) y conductancia estomática (g_s)

Cada dos semanas se evaluó la tasa fotosintética (asimilación de CO_2) en hojas individuales sin escindir, de plantas +Mic y -Mic. Los datos se tomaron usando un analizador de gas infrarrojo (IRGA) modelo Li-6200, LICOR. Para ello se colocó la hoja elegida dentro de la cámara para hojas. Cuando la hoja fue más grande que la cámara se sujetó entre la tapa y la base de la cámara cuidando de no maltratarla. Además de la asimilación de CO_2, mediante este proceso se obtuvieron simultáneamente los datos de conductancia estomática.

- 2.3.4.2 Fluorescencia de clorofila

Esta variable se estimó usando los datos de la relación existente entre la fluorescencia variable y la fluorescencia máxima (F_V/F_M) que indica la máxima eficiencia fotosintética del fotosistema II (*FII*), utilizando las hojas en las que se midió la asimilación de CO_2. Dichas hojas fueron adaptadas previamente a oscuridad colocándoles durante 30 minutos, una pinza para hojas. Posteriormente, usando un fluorímetro Hansatech (PEA MK2), se hizo pasar un rayo de luz saturante al 70%, durante dos segundos.

- 2.3.4.3 Contenido de clorofila

Para la extracción de clorofilas de las hojas se utilizaron 50 mg de tejido fresco. El tejido fue macerado utilizando morteros enfriados a 4°C, se agregaron 2 mL de acetona fría al 80% y el macerado se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, se tomaron los datos de absorbancia en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU-650, a una longitud de 663 nm para clorofila-*a* y de 646 para clorofila-*b* (Wellburn, 1994).

- 2.3.4.4 Contenido de sacarosa y almidón

Para la estimación del contenido de sacarosa en hojas se utilizaron los datos de azúcares totales y de azúcares reductores. Las muestras de tejido foliar se conservaron a -80°C hasta que fueron procesadas. Las lecturas de absorbancia se hicieron utilizando un espectrofotómetro Beckman Coulter DU-650. Se describen brevemente los procedimientos:

Para la determinación de azúcares totales se tomaron 20 mg de tejido y se preparó un extracto con etanol al 80%; se tomó un mL del extracto y se agregó 1 mL de fenol al 5%; se dejó en reposo durante 10 minutos y enseguida se agitó en un vortex; se enfrió en baño de hielo durante 15 minutos y se tomó la lectura de absorbancia a una longitud de 490 nm (método de Fenol-Ácido Sulfúrico, Dubois *et al.*, 1956). Para los azúcares reductores, se utilizaron 20 mg de tejido fresco. El tejido se maceró en etanol al 80% y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos; se tomó una alícuota de 0.25 mL, se agregaron 0.75 mL de reactivo DNS y se incubó en baño María a ebullición durante 20 min; se dejó enfriar, se agregaron cuatro mL de agua destilada y se midió la absorbancia a 570 nm (método del DNS, Miller, 1959).

El contenido de almidón en hojas fue determinado utilizando el sedimento que se obtuvo al procesar la muestra para la determinación de azúcares totales. Para cuantificar el almidón se hizo la extracción y suspensión de la fracción insoluble agregando 2 mL de KOH 0.2 N y se dejó en baño maría a ebullición durante 30 minutos; la muestra se dejó enfriar a temperatura ambiente, se añadieron un mL de ácido acético 1 M y un mL de amiloglucosidasa y se incubó en baño María a 37°C durante 20 horas; después se centrifugó a 3000 rpm, se tomó una alícuota de 50 µL, se agregaron 150 µL de agua destilada, 200 µL de fenol al 5% y 1 mL de ácido sulfúrico; la

muestra se homogenizó, se dejó enfriar y se tomó la lectura de absorbancia a 490 nm (Maust *et al.*, 2003).

- 2.3.4.5 Crecimiento

El crecimiento de las plantas fue evaluado a través del peso seco, la altura del tallo y la producción de hojas nuevas en cada muestreo. Los datos de peso seco se tomaron en tejido liofilizado, separando los tejidos en parte aérea (PSA) y en raíces (PSR). La altura del tallo fue medida desde su base hasta el último nudo hacia el ápice. El número de hojas nuevas producidas se contabilizó directamente en cada planta, en cada uno de los muestreos.

- 2.3.4.6. Colonización micorrízica arbuscular

Para determinar la colonización micorrízica, se procesaron las raíces siguiendo la técnica de tinción de Phillips & Hayman (1970), lo que permite destacar las estructuras típicas de esta asociación. Posteriormente se determinó el porcentaje de colonización colocando de forma paralela 20 segmentos de raíz de un cm de longitud sobre un portaobjetos, se añadió lactoglicerol sobre las raíces y se observaron al microscopio óptico a 10× (Anexo 3). Estas preparaciones se observaron recorriéndolas horizontalmente en los extremos y en parte media de los segmentos de raíz. En cada preparación se observaron al microscopio 60 campos, registrando la presencia-ausencia de estructuras micorrízicas. El cálculo del porcentaje de colonización micorrízica se obtuvo a través de la fórmula:

$$\text{Colonización (\%)} = \frac{\text{No. de campos colonizados}}{\text{Número total de campos observados}} \times 100$$

2.3.5 Diseño experimental y análisis estadístico

En el experimento se evaluaron cuatro tratamientos (Cuadro 2.1) en un diseño bifactorial con dos concentraciones de Pi (0.3 mM y 0.6 mM) en solución nutritiva de Hoagland & Arnon (1950), y dos condiciones micorrizícas, con micorriza (+Mic) y sin micorriza (−Mic). Cada tratamiento tuvo 20 réplicas con una distribución totalmente alearotizada en condiciones de invernadero. Las evaluaciones se hicieron en las semanas dos, cuatro y seis después del inicio de los tratamientos.

El análisis de los datos se hizo con el programa STATGRAPHICS PLUS 4.1. Se aplicó un ANOVA bifactorial. Cuando la interacción de factores mostró diferencias estadísticamente significativas se utilizó la prueba de comparación de medias (Tukey, α = 0.05). Los datos porcentuales fueron transformados a arcoseno antes de aplicar el análisis de varianza. Se estableció la relación entre *Pn* y g_s mediante el índice de Spearman.

2.4. RESULTADOS

2.4.1 Fotosíntesis (*Pn*) y conductancia estomática (g_s).

La interacción de los factores fue estadísticamente significativa para la *Pn* únicamente en la semana cuatro del experimento ($P \leq 0.05$), cuando el tratamiento +Mic−P indujo la mayor tasa fotosintética y cuyo valor promedio fue estadísticamente diferente del encontrado para las plantas con el tratamiento –Mic−P (Tukey α 0.05). La condición micorrízica fue el factor que afectó significativamente esta variable en las semanas cuatro y seis (Cuadro 2.3).

El análisis de la g_s indicó que en la segunda semana del experimento no hubo efecto de los factores ni de su interacción sobre la g_s. En las semanas cuatro y seis, la interacción de los factores y cada uno de ellos tuvieron efecto estadísticamente significativo ($P \leq 0.05$). Las plantas que tuvieron la mayor g_s fueron las del tratamiento +Mic−P y el tratamiento que promovió la menor g_s fue –Mic−P (Tukey $\alpha = 0.05$).

El coeficiente de correlación demostró que la *Pn* y *gs* en los distintos tratamientos estuvieron moderadamente relacionados. El valor de r^2 en el tratamiento +Mic−P fue el menos variable durante las seis semanas de duración del experimento pero no fue estadísticamente significativo (Figura 2.2).

Cuadro 2.3. Efecto de la disponibilidad de fósforo y la condición micorrízica sobre la fotosíntesis (*Pn*), la conductancia estomática (g_s), el contenido de azúcares, fósforo foliar y peso seco total (PST) en papaya Maradol (ANOVA, $P \leq 0.05$). a) semana dos, b) semana cuatro, c) semana seis. Cuando la interacción de factores no fue significativa no se asignó letra a los valores.

a)

Condición micorrízica	Disponibilidad de Fósforo (mM)	*Pn* (μmol m^{-2} s^{-1})	g_s (mmol m^{-2} s^{-1})	Azúcares		Fósforo foliar (ppm)	PST (g)
				Sacarosa (mg g^{-1} pf)	Almidón (μg g^{-1} pf)		
+Mic	0.3	12.5	0.431	977.0	150.7	1477.7a	1.25b
−Mic		10.7	0.426	920.7	159.6	1941.7b	1.01a
+Mic	0.6	10.8	0.462	834.7	140.2	1303.3a	1.46c
−Mic		10.8	0.454	870.0	148.0	2070.3b	1.61c
Significancia:							
Fósforo		0.1027	0.3529	0.0084	0.0871	0.7012	0.0000
Condición micorrizica		0.0825	0.8343	0.7491	0.1880	0.0000	0.3796
Fósforo*Cond. Mic.		0.0831	0.9606	0.1732	0.9299	0.0298	0.0013

b)

Condición micorrízica	Disponibilidad de Fósforo (mM)	*Pn* (μmol m^{-2} s^{-1})	g_s (mmol m^{-2} s^{-1})	Azúcares		Fósforo foliar (ppm)	PST (g)
				Sacarosa (mg g^{-1} pf)	Almidón (μg g^{-1} pf)		
+Mic	0.3	14.3b	0.515b	1130.7a	156.3	1351.0b	2.68
−Mic		11.1a	0.334a	1058.5ab	117.8	1282.7a	1.83
+Mic	0.6	12.6ab	0.514b	1037.2a	166.6	2343.7d	4.12
−Mic		12.5ab	0.523b	1089.7ab	140.0	2018.3c	3.29
Significancia:							
Fósforo		0.7803	0.0019	0.2012	0.0225	0.0000	0.0000
Condición micorrizica		0.0172	0.0035	0.6789	0.0001	0.0000	0.0000
Fósforo*Cond. Mic.		0.0233	0.0024	0.0168	0.3696	0.0002	0.9211

Cuadro 2.3 Cont.

c)

Condición micorrízica	Disponibilidad de Fósforo (mM)	*Pn* (µmol m^{-2} s^{-1})	g_s (mmol m^{-2} s^{-1})	Azúcares		Fósforo foliar (ppm)	PST (g)
				Sacarosa (mg g^{-1} pf)	Almidón (µg g^{-1} pf)		
+Mic	0.3	16.9	0.690b	1048.3	136.3b	1370.7a	4.07b
−Mic		12.4	0.462a	996.9	162.5c	1243.0a	2.85a
+Mic	0.6	14.1	0.505a	1038.7	124.7ab	1382.0a	7.47c
−Mic		11.8	0.462a	1056.8	120.2a	1869.7b	7.28c
Significancia:							
Fósforo		0.0395	0.0071	0.1592	0.0000	0.0000	0.0000
Condición micorrízica		0.0004	0.0002	0.3412	0.0144	0.0016	0.0055
Fósforo*Cond. Mic.		0.1850	0.0071	0.0579	0.0013	0.0000	0.0318

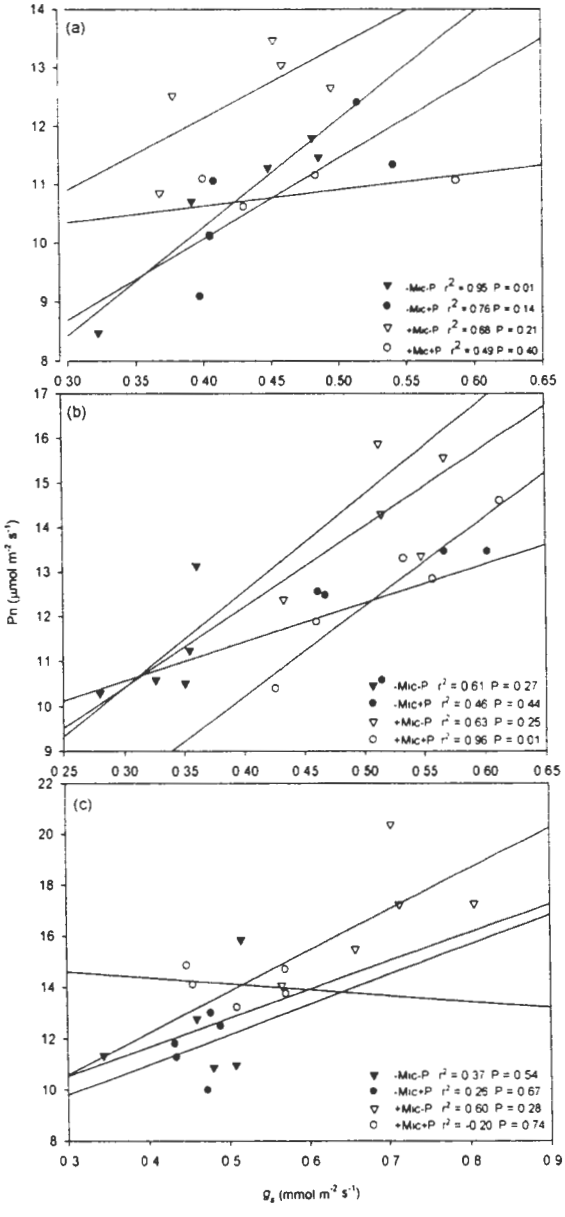


Figura 2.2. *Relación entre la fotosíntesis (Pn) y la conductancia estomática (g_s) en papaya Maradol micorrizada (+Mic) o sin micorrizar (−Mic) y fertilizada con Pi 0.3 mM (−P) o con Pi 0.6 mM (+P). Semana dos, a) semana cuatro b) y semana seis c) ($P \leq 0.05$).*

2.4.2. Contenido de clorofilas

En la segunda semana del experimento la clorofila-*a* y la clorofila total fueron favorecidas por la interacción de los factores así como por la condición micorrízica ($P \leq 0.05$). Las plantas con el tratamiento +Mic−P tuvieron mayor contenido de clorofila-*a* y clorofila total, con diferencia estadísticamente significativa de los otros tratamientos (Tukey $\alpha = 0.05$) (Figura 2.3a y c). En la cuarta semana ningún factor ni la interacción entre ellos tuvieron efecto estadísticamente significativo en el contenido de clorofila-*a*, clorofila-*b* ni clorofila total. En la sexta semana la interacción de los factores no tuvo una contribución estadísticamente significativa; la condición micorrízica influyó solo sobre el contenido de clorofila-*a* y clorofila total pero la disponibilidad de fósforo contribuyó en el contenido de los tres tipos de clorofila ($P \leq 0.05$).

2.4.3. Fluorescencia de clorofila

El ANOVA ($P \leq 0.05$) mostró que la interacción de los factores no contribuyó de forma decisiva en la fluorescencia de la clorofila en los tres muestreos del experimento. Los factores por separado tampoco tuvieron un papel determinante sobre estos resultados a excepción de la micorrización en la última semana del experimento (Tukey $\alpha = 0.05$) (Figura 2.3c).

2.4.4. Concentración de azúcares

Para el contenido de sacarosa en las hojas, la interacción de la micorriza con el fósforo fue estadísticamente significativa únicamente en la cuarta semana del experimento ($P \leq 0.05$). El efecto que ejerció cada uno de los factores no fue estadísticamente significativo para los resultados de esta variable. Las plantas con el tratamiento +Mic−P tuvieron el mayor contenido de sacarosa y las del tratamiento +Mic−P presentaron el menor contenido (Tukey $\alpha = 0.05$) (Cuadro 2.3b).

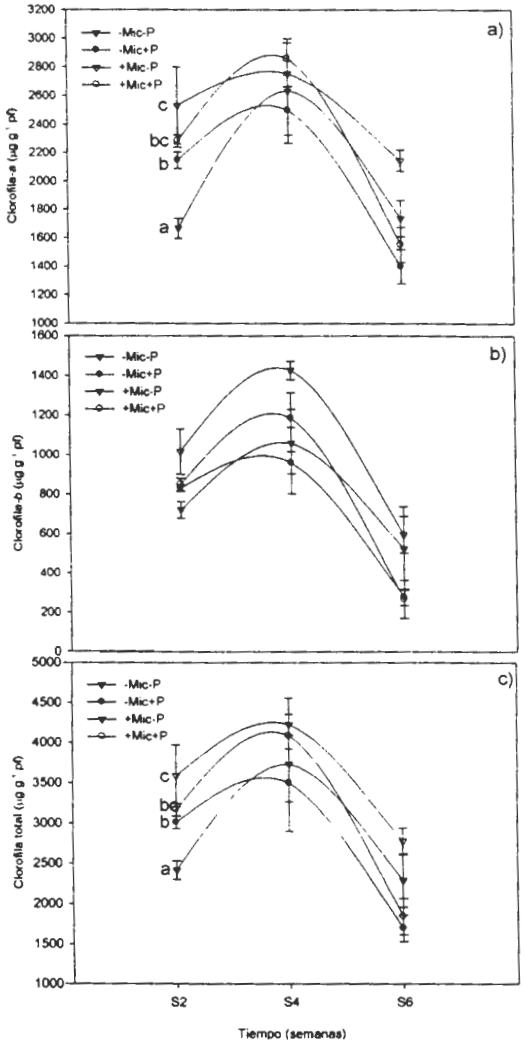


Figura 2.3. *Contenido de clorofila en papaya Maradol micorrizada (+Mic) o sin micorrizar (−Mic) y fertilizada con Pi 0.3 mM (−Mic) o con Pi 0.6 mM (+P). a) Clorofila-a, b) clorofila- y, c) clorofila total. Valores con la misma letra en cada semana no tienen diferencia estadísticamente significativa (Tukey α = 0.05). Cada valor es el promedio de 5 repeticiones ± D.E.*

En el caso del almidón el ANOVA indicó que la interacción de los factores fue determinante en el contenido de éste únicamente en la sexta semana del experimento ($P \leq 0.05$). El tratamiento que promovió el mayor contenido fue –Mic–P, en tanto que en las plantas con el tratamiento +Mic+P se encontró la menor cantidad de almidón, diferencias que fueron estadísticamente significativas (Tukey $\alpha = 0.05$). Por si misma la contribución de la micorriza en el contenido de almidón fue significativa en las semanas cuatro y seis, en tanto que la disponibilidad de fósforo tuvo efecto sólo en la semana seis del experimento (Cuadro 2.3 b y c).

2.4.5. Contenido de fósforo

El contenido de fósforo foliar fue determinado por la interacción de los factores durante todo el experimento ($P \leq 0.05$) (Cuadro 2.3). Exceptuando a la disponibilidad de Pi en la segunda semana del experimento, el efecto de los factores también fue estadísticamente significativo. Los tratamientos que promovieron el mayor contenido de fósforo en tejidos foliares fueron –Mic+P en las semanas dos y seis y +Mic+P en la cuarta semana (Tukey $\alpha = 0.05$) (Cuadro 2.3 a, b y c).

2.4.6. Crecimiento

En el peso seco total de las plantas la contribución de la interacción de los factores fue estadísticamente significativa en las semanas dos y seis del experimento ($P \leq 0.05$) (Cuadro 2.3 a y b). Los tratamientos que en tales muestreos tuvieron mayor crecimiento fueron –Mic+P en la segunda semana y +Mic+P en la sexta semana del experimento (Tukey $\alpha = 0.05$).

En cuanto al peso seco de la parte aérea de las plantas, se encontró que la interacción de los factores y el efecto del fósforo fueron estadísticamente significativos en los resultados de la semana dos. El tratamiento que promovió el mayor peso

seco en dicha semana fue +Mic−P. Por si mismos tanto el P como la micorriza contribuyeron al peso de la parte aérea en las semanas cuatro y seis del experimento (Figura 2.5 a). El peso seco de las raíces fue favorecido por la interacción de los factores al final del experimento. Los tratamientos –Mic+P y +Mic+P promovieron mayor peso seco de raíces (Tukey α = 0.05). El fósforo fue el factor que afectó el peso de las raíces en los tres muestreos (Figura 2.4b).

En cuanto a la altura desarrollada por las plantas y el número de hojas nuevas no se encontró que la contribución de la interacción fuera estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$). La disponibilidad de Pi fue el factor que durante todo el experimento influyó tanto en la altura de las plantas como en el número de hojas nuevas en las semanas dos y cuatro. La micorriza por su parte fue importante en la generación de hojas nuevas.

2.4.7 Colonización micorrízica arbuscular

No se encontró colonización micorrízica arbuscular en las plantas que no fueron inoculadas con el HMA en ninguna de las semanas en las que se muestreó. El ANOVA encontró que la diferencia entre los tratamientos fue estadísticamente significativa durante todo el experimento ($P \leq 0.05$). Las plantas inoculadas que recibieron la concentración de Pi baja (−P) superaron sustancialmente la intensidad de colonización micorrízica encontrada en las plantas a las que se aportó Pi en la concentración más alta (Figura 2.6).

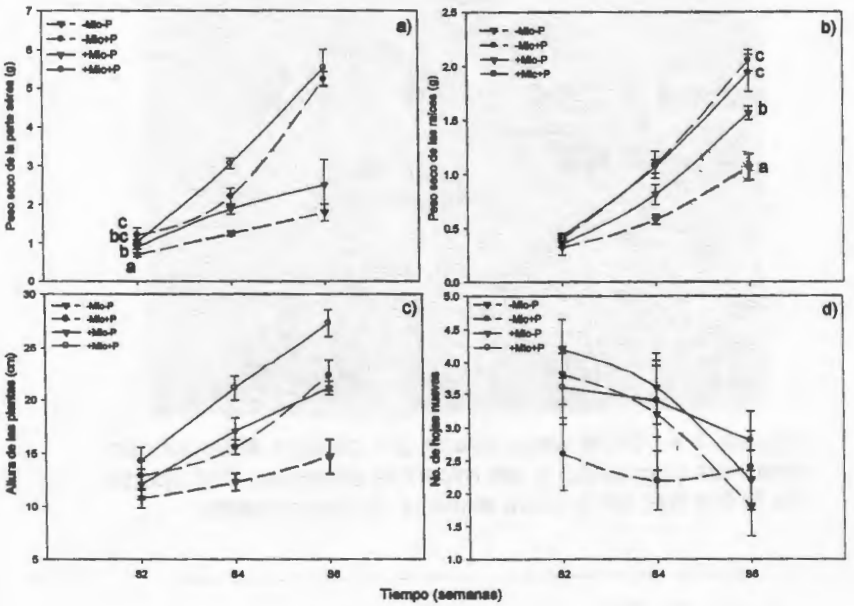


Figura 2.4. *Crecimiento de papaya Maradol micorrizada (+Mic) o sin micorrizar (−Mic) y fertilizada con Pi 0.3 mM (−Mic) o con Pi 0.6 mM (+P). Peso seco de la parte aérea a), peso seco de las raíces b), altura del tallo c) y número de hojas nuevas d). Valores con la misma letra en cada semana no tienen diferencia estadísticamente significativa (Tukey α = 0.05). Cada valor es el promedio de 5 repeticiones ± D.E.*

Figura 2.5. *Altura desarrollada por papaya Maradol con micorriza (izquierda) y sin micorriza (derecha) con aporte de Pi 0.3 mM, en la sexta semana del experimento.*

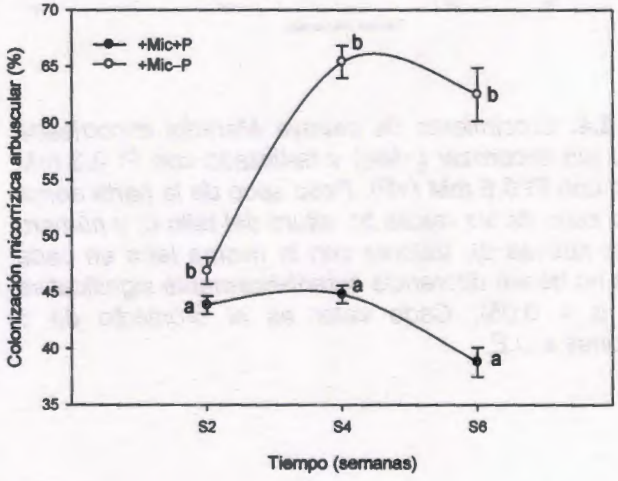


Figura 2.6. *Colonización micorrízica arbuscular en papaya Maradol con Pi 0.3 mM (−Mic) o con Pi 0.6 mM (+P). Cada valor es el promedio de 5 repeticiones ± D.E. Valores con la misma letra en cada semana no tienen diferencia estadísticamente significativa.*

2.5. DISCUSIÓN

Los factores que se evaluaron en este experimento fueron la condición micorrízica y la disponibilidad de Pi en la SH. No obstante que estos factores no mostraron afectar conjuntamente la *Pn* de las plantas de papaya Maradol, la condición micorrízica si parece influir en la capacidad fotosintética de estas plantas, ya que a excepción del primer muestreo y aunque no desde el punto de vista estadístico, en los tres muestreos las plantas con micorriza mostraron cierta tendencia de incremento en los valores de fotosíntesis, con cualquiera de las dos concentraciones de Pi evaluadas. Respecto al efecto de la micorriza sobre la *Pn* cuando las plantas crecen en condiciones de deficiencia de fósforo, ya desde hace varios años se ha sugerido que el efecto negativo de esta condición puede ser atenuado por la presencia de la micorriza (Wright *et al*., 1998).

Se ha comprobado que la disponibilidad de Pi juega un papel importante en el comportamiento fotosintético de las plantas, y en general la baja disponibilidad de este nutrimento resulta en la reducción de fotosíntesis (Jacob & Lawlor, 1992; Plesničar *et al*., 1994). Los reportes relativos al efecto de la baja disponibilidad de P sobre la capacidad fotosintética de las plantas son controvertidos, encontrándose que la escasez de fósforo disminuye mínimamente la *Pn* (Abadía *et al*., 1987) o no afecta a plantas como *Fraxinus manchurica* (Wu *et al*., 2004). Otros reportes indican que la deficiencia de fósforo en el sustrato de cultivo disminuye significativamente la capacidad de las plantas para asimilar CO_2 (Jacob & Lawlor, 1991; Plesničar *et al*., 1994).

Por otra parte, la g_s desempeña un papel relevante en el intercambio gaseoso en la hoja de las plantas, de modo que si las condiciones ambientales afectan la g_s, ésta a su vez podría modificar la capacidad de las plantas para realizar la

fotosíntesis (Hopkins, 1995). Como se mostró en la tabla 2.3, la interacción de la condición micorrízica y la disponibilidad de fósforo tuvieron efecto significativo en la g_s de la papaya Maradol bajo las condiciones de este trabajo como también lo tuvieron cada uno de estos factores evaluados, destacándose el hecho de que la g_s de plantas con micorriza y baja disponibilidad de Pi en la solución nutritiva igualaron la g_s de las plantas con la mayor disponibilidad de Pi. Algunos reportes indican que la disminución de la g_s como respuesta a la deficiencia hídrica es más rápida cuando hay también baja disponibilidad de fósforo, en plantas de algodón (Radin, 1984) y en plantas de *Helianthus annuus* L. (Jacob & Lawlor, 1991), sin que en ambos casos se haya encontrado que la menor g_s influya directamente sobre la actividad fotosintética de dichas plantas por deficiencia de fósforo. Por lo anterior, la disminución de fotosíntesis relacionada con el cierre y apertura de estomas sería más importante bajo factores de estrés como la deficiencia hídrica, alta incidencia de luz o altas temperaturas, tal como lo proponen Chaves *et al.* (2002).

El contenido de clorofila, como principal responsable de la captación de energía usada para la fotosíntesis (Hopkins, 1995), podría influir importantemente en la tasa fotosintética de papaya Maradol y aunque ha reportado que cuando las plantas crecen en condiciones de escasez de fósforo, el contenido de éstas puede no ser modificado (Marschner, 1995; Wu *et al.*, 2004) se consideró importante saber si los tratamientos a los que se sometieron las plantas de papaya Maradol modificaban el contenido de estos pigmentos. Se encontró que no hubo efecto por parte de la disponibilidad de fósforo y la presencia o ausencia de micorriza en estas plantas, determinándose así que en todos los tratamientos la cantidad de clorofilas es similar. Del mismo modo, la fluorescencia de clorofilas fue similar en las plantas con diferentes tratamientos.

Con respecto al crecimiento de las plantas, se encontró que para el peso seco total (PST) la disponibilidad de fósforo en la

SH y la micorriza fueron importantes al interactuar al inicio y al final del experimento. El factor que de acuerdo con los resultados tuvo mayor importancia para el PST de papaya Maradol fue la disponibilidad de fósforo, ya que los tratamientos que desarrollaron mayor biomasa fueron las plantas con mayor disponibilidad de fósforo con y sin micorriza. No obstante, en los tratamientos que recibieron la SH con la menor disponibilidad de Pi las plantas micorrizadas siempre desarrollaron mayor biomasa que las plantas no micorrizadas, sugiriendo que éstas tuvieron mayor capacidad de captación y aprovechamiento del fósforo aportado en la solución nutritiva. Este beneficio de la micorrización sobre el crecimiento de las plantas sugiere que cuando crece con deficiencia de fósforo, papaya Maradol es susceptible de beneficiarse de la asociación micorrizica, tal como ha sido reportado para otras especies vegetales como trébol (Gazey *et al.*, 2004), *Ocimum basilicum* (Copetta *et al.*, 2006) o *Dyera plyphylla* y *Aquilaria filaria* (Turjaman *et al.*, 2006). Dicho beneficio podría derivarse básicamente de la mayor capacidad de las plantas micorrizadas para aprovechar los nutrimentos presentes en la solución del suelo, incrementándose así en los tejidos la concentración de nutrimentos como el P y el Zn (Ortas *et al.*, 2002). En este sentido, el fósforo total cuantificado en las plantas micorrizadas con menor disponibilidad de Pi fue mayor que el encontrado en las no fueron micorrizadas, con igual disponibilidad de Pi en la solución nutritiva.

Además, la separación de resultados en parte aerea y raíz, permitió determinar que la mayor cantidad de biomasa seca se obtuvo en la parte aérea de las plantas y no en las raíces. Uno de los efectos más evidentes de la deficiencia de fósforo en el crecimiento de las plantas es la reducción de la expansión foliar (Fredeen *et al.*, 1987), la cual en este trabajo fue visiblemente menor en las plantas con menor disponibilidad de Pi (dato no mostrado), que tuvieron también menor desarrollo de la longitud de los tallos. En todo caso y a pesar de que no siempre se tuvo el apoyo del análisis estadístico, las plantas

con la menor disponibilidad de fósforo y sin micorriza tuvieron menor biomasa y menor altura con respecto a las plantas de los otros tratamientos.

Relacionado principalmente con el crecimiento y con el estatus nutricional de las plantas, existen reportes que proponen que la micorrización estimula de alguna forma la actividad fotosintética de las plantas (Johnson, 1984; Wu & Xia, 2006), modificando por ejemplo el pH en suelos ácidos con lo que se estimula la producción de mayor cantidad de fotosintatos, mismos que a su vez permiten soportar o mantener la asociación micorrízica (St. Clair & Linch, 2005). Por su parte Black *et al.* (2000) reportaron el incremento en la tasa fotosintética de hojas de calabaza colonizada con HMA, sugiriendo que dicho incremento se debe al incremento de P, mas que a la demanda de asimilados por parte del hongo MA.

En este trabajo se encontró que la baja disponibilidad de Pi en la SH también disminuyó la g_s de papaya Maradol pero tal efecto fue atenuado por la presencia de la micorriza, de manera que bajo las condiciones nutrimentales más severas (−P), las plantas +Mic tuvieron mayor g_s que las plantas –Mic. Si bien las plantas con el tratamiento +Mic−P tuvieron los valores más altos de *Pn* y g_s, estas variables no mostraron correlación sino hasta la sexta semana del experimento la cual, aunque estadísticamente significativa, fue negativa.

En cuanto a la acumulación de de azúcares, los resultados de este trabajo mostraron que las condiciones de desarrollo dada a las plantas no fueron de importancia para el caso de la sacarosa. En el caso del almidón se encontró que al final del experimento la interacción de los factores influyó sobre el contenido de almidón, encontrándose que en las plantas con menor disponibilidad de Pi en la SH hubo mayor acumulación de almidón y es que la deficiencia de Pi afecta el metabolismo del carbono induciendo la acumulación de este azucar, como se ha reportado para otras especies vegetales como *Phaseouls*

vulgaris (Bernal *et al.*, 2007). Este resultado se esperaba que las plantas con menor disponibilidad de Pi sin embargo la presencia de la micorriza arbuscular atenuó el efecto negativo, encontrándose menor acumulación de almidón en las hojas de papaya Maradol micorrizada (Cuadro 2.3). Estos resultados sugieren que a pesar del bajo aporte de Pi, en papaya Maradol micorrizada hubo cierto equilibrio entre la triosa fosfato y el Pi de manera que en estas plantas el transporte del Pi al citoplasma fue más eficiente, derivándose en menor acumulación de almidón (Dennis & Blakeley, 2000) y mayor crecimiento de las plantas micorrizadas, con respecto a sus contrapartes sin micorriza.

En síntesis, bajo las condiciones experimentales de este trabajo se encontró que a pesar de ser un cultivo usualmente sometido a manejo intensivo, papaya Maradol fue colonizada intensamente por *Glomus intraradices* (porcentajes mayores a 60%). Ante la baja disponibilidad de fósforo, la asociación micorrízica arbuscular no tuvo un papel preponderante en la actividad fotosintética pero si a incrementar la g_s. Sin embargo, derivado de los resultados obtenidos bajo las condiciones de este trabajo, se sugiere que la actividad fotosintética no dependió de la capacidad de g_s estomática que se presentó en las hojas de las plantas de papaya Maradol.

La micorriza también contribuyó al mejor aprovechamiento del fósforo disponible en la SH, resultando en la menor acumulación de almidón y el mayor crecimiento de estas plantas, con respecto al de plantas sin micorrizar. Además, se encontró que ante la deficiencia de Pi la papaya Maradol disminuyó la g_s, pero que dicho efecto fue atenuado por la presencia de la micorriza, hecho que ha sido observado principalmente en plantas estresadas por la deficiencia de agua.

2.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abadía J., I.M. Rao and N. Terry (1987). *Changes in leaf phosphate status have only small effect on the photochemical apparatus of sugar beet leaves.* Plant Science, 50, 49-55.

Alves L. da C., A.C. Magalhães and P.R. Barja (2002). *The phenomenon of photoinhibition of photosynthesis and its importance in reforestation.* Botanical Review, 68(2), 193-208.

Barradas V. and H.G. Jones (1996). *Responses of CO_2 assimilation to changes in irradiance: laboratory and field data and a model for beans (Phaseolus vulgaris L.).* Journal of Experimental Botany, 47, 639-645.

Black K.G., D.T. Mitchell and B.A. Osborne (2000). *Effect of mycorrhizal-enhanced leaf phosphate status on carbon partitioning, translocation and photosynthesis in cucumber.* Plant Cell and Environment, 23, 797-809.

Bucher, M. (2007). *Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces.* New Phytologist, 173, 11-26.

Chaves M.M., J.S. Pereira, J. Maroco, M.L. Rodrigues, C.P.P. Ricardo, M.L. Osório, I. Carvalho, T. Faria and C. Pinheiro (2002). *How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth.* Annals of .Botany, 89, 907-916.

Copetta A., G. Lingua and G. Berta (2006). *Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in Ocimum basilicum L.* var. Genovese. Mycorrhiza, 16, 485-494.

Dennis D.T. and S.D. Blakeley (2000). Carbohydrate metabolism, In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants,* Buchanan B., W. Gruissem and R. Jones (eds). American Society of Plant Physiologists. pp. 630-675.

Dubois M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith (1956). *Colorimetric method to determine sugars and related substances.* Annals of Chemistry 28(3), 350-356.

Fredeen A.L., I.M. Rao, and N. Terry (1989). *Influence of phosphorus nutrition on growth and carbon partitioning in Glycine max.* Plant Physiology, 89, 225-230.

Fitter A.H. (2006) *What is the link between carbon and phosphorus fluxes in arbuscular mycorrhizas? A null hypothesis for symbiotic function.* New Phytologist, 172, 3-6.

Gazey C., L.K. Abbott and A.D. Robson (2004). *Indigenous and introduced arbuscular mycorrhizal fungi contribute to plant growth in two agricultural soils from south-western Australia.* Mycorrhiza, 14, 355-362.

Groot C.C., R. van den Boogaard, L.F.M. Marcelis, J. Harbinson and H. Lambers (2003). *Contrasting effects of N and P deprivation on the regulation of photosynthesis in tomato plants in relation to feedback limitation.* Journal of Experimental Botany, 54(389), 1957-1967.

Hoagland D.R. and H.I. Arnon (1950). *The water-culture method for growing plants without soil.* California Experimental Agriculture Station Circular 347, Berkeley. 32 p.

Hopkins W.G. (1995). Leaves and Photosynthesis, In *Introduction to plant physiology.* Hopkins W.G. John Wiley & Sons, Inc., USA. pp 145-186.

Jacob J. and D.W. Lawlor (1991). *Stomatal and mesophyll limitations of photosynthesis in phosphate deficient sunflower, maize and wheat plants.* Journal of Experimental Botany, 42(241), 1003-1011.

Jacob J. and D.W. Lawlor (1992). *Dependence of photosynthesis of sunflower and maize leaves on phosphate supply, Ribulose- 1,5 -bisphosphate carboxylase / oxygenase activity, and Ribulose- 1,5 -bisphosphate pool size.* Plant Physiology, 98, 801-807.

Jarvis A.J. and W.J. Davies (1997). *The coupled response of stomatal conductance to photosynthesis and*

transpiration. Journal of Experimental Botany, 49, 399-409.

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

Jones H.G. (1998). *Stomatal control of photosynthesis and transpiration.* Journal of Experimental Botany, 49, 387-398.

Malkin R. and K. Niyogi (2000). Photosynthesis, in *Biochemistry & Molecular Biology of Plants.* Buchanan B.B., W. Gruissem and R.L. Jones (eds). American Society of Plant Physiologist, Rockville, Maryland. pp. 568-628.

Marschner H. (1995). Function of mineral nutrients: macronutrients, in *Mineral Nutrition of Higher Plants,* Marschner H.. 2d. Ed. Acad. Press. San Diego CA. pp. 265-277.

Maust B.E., F. Espadas, C. Talavera, M. Aguilar, J.M. Santamaría and C. Oropeza (2003). *Changes in carbohydrate metabolism in coconut palms infected with the letal yellowing phytoplasma.* Phytopatology, 93, 976-981.

Miller, G.L. (1959). *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars.* Annals of Chemistry, 31, 426-428.

Ortas I., Z. Kaya and I. Çakmak (2002). *Influence of arbuscular mycorrhizae inoculation on rowth of maize and green pepper plants in phosphorus-zinc-deficient soil.* Plant Nutrition, 92, 632-633.

Phillips J.M. and D.S Hayman (1970). *Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection.* Trans. British Mycological Society, 55, 158-161.

Pieters A.J., M.J. Paul and D.W. Lawlor (2001). *Low Sink demand limits photosynthesis under Pi deficiency.* Journal of Experimental Botany, 52(358), 1083-1091.

Plesničar M., R. Kastori, N. Petrović and D. Panković (1994). *Photosynthesis and chlorophyll fluorescence in sunflower (Helianthus annuus L.) leaves as affected by phosphorus nutrition.* Journal of Experimental Botany, 45(276), 919-924.

Radin, J. (1984). *Stomatal responses to water stress and to abscisic acid in, phosphorus-deficient cotton plants.* Plant Physiologist, 76, 392-394.

Rao M. and N. Terry (1989). *Leaf phosphate status, photosynthesis and carbon partitioning in suger beet. II Diurnal changes in sugar phosphates, adenylates and nicotinamide nucleotides.* Plant Physiologist, 90, 820-826.

Salisbury F.B. and C.W. Ross (2002). *Fisiología de las plantas 1. Células: agua, soluciones y superficies.* Thompson-Paraninfo S.A.

Sawada S., H. Usada and T. Tsukui (1992). *Participation of inorganic orthophosphate in regulation of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity in response to changes in the photosynthetic source-sink balance.* Plant and Cell Physiology, 33(7), 943-949.

Sieverding E. (1983). *Manual de métodos para la investigación de la micorriza V-A en el laboratorio.* Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali.

St. Clair S.B. and J.P. Lynch (2005). *Base cation stimulation of mycorrhization and photosynthesis of sugar maple on acid soils are coupled by foliar nutrient dynamics.* New Phytologist, 165, 581-590.

Strasser R.J., A. Srivastava, M. Tsimilli-Michael (2000). The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples, In *Probing photosynthesis: mechanism, regulation and adaptation,* Yanus M., V. Pathre, Mohanty (eds). Taylor and Francis, London. pp. 446-483.

Taiz L. and E. Zeiger (1991). *Plant Physiology.* The Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc., Redwood City. 352 p.

Turjaman M., Y. Tamai, E. Santoso, M. Osaki and K. Tawaraya (2006). *Arbuscular mycorrhizal fungi increased early growth of two nontimber forest product species Dyera polyphylla and Aquilaria filaria under greenhouse conditions.* Mycorrhiza, 16, 459-464.

Wellburn A.R. (1994). *The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution.* Journal of Plant Physiology, 144, 307-313.

Wright D.P., J.D. Scholes and D.J. Read (1998). *Effects of VA mycorrhizal colonization on photosynthesis and biomass production of Trifolium repens L.* Plant and Cell Environment, 21, 209-216.

Wu C., Z. Fan and Z. Wang (2004). *Effect of phosphorus stress on chlorophyll biosynthesis, photosynthesis and biomass partitioning pattern of Fraxinus mandchurica seedlings.* Ying Yong Sheng Tai Xue Bao, 15(6), 935-940.

Wu Q.-S. and R-X. Xia (2006). *Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions.* Journal of Plant Physioly, 163, 417-425.

Capítulo 3

Efecto de la micorriza arbuscular sobre las relaciones hídricas de papaya Maradol estresada por deficiencia de agua y fósforo

3.1 INTRODUCCIÓN

Las plantas presentan deficiencia hídrica cuando su tasa de transpiración excede su capacidad de absorción de agua. El déficit hídrico puede presentarse ante varios tipos de estrés incluyendo la sequía, la salinidad y las bajas temperaturas. Una célula que sufre déficit hídrico presenta respuestas tan diversas como el incremento de la concentración de solutos, el cambio del volumen celular, modificaciones morfológicas en la membrana, interrupción del gradiente de potencial hídrico, la pérdida de turgencia, y en los casos extremos, el rompimiento de la membrana y desnaturalización de proteínas. La pérdida total de agua produce la desecación o deshidratación de la célula. El ajuste osmótico es uno de los mecanismos de evasión a la deficiencia hídrica, por medio del que la célula reduce su potencial osmótico y mantiene el gradiente de potencial hídrico, favoreciéndose así la toma de agua y la turgencia celular (Bray, 1997). La capacidad de las plantas para responder y sobrevivir al déficit hídrico depende de la suma de mecanismos que puede integrar la respuesta celular. Dicha respuesta puede presentarse en unos segundos o en minutos e incluso horas y dependerá de diversos factores propios de la planta, como la especie y su genotipo, su edad y

etapa de desarrollo; pero también de factores externos como la duración y magnitud del estrés.

La escasez de agua es el principal factor que limita la producción de los cultivos en el mundo, debido a que causa una serie de cambios fisiológicos que se traducen en una disminución en la tasa de crecimiento (Munns, 2002). Lo anterior se agudiza ya que contrariamente a otros factores como la acidez o salinidad de los suelos, la disponibilidad de agua es altamente variable dentro de un ciclo de cultivo y de un año a otro (Kaya *et al.,* 2003).

En el contexto de la problemática de condiciones de sequía generalizada en la mayoría de las tierras cultivables, además del manejo adecuado de los sistemas agrícolas, es importante evaluar el beneficio derivado de la asociación simbiótica con organismos benéficos para las plantas, que aumenten su posibilidad de acceder al agua ante condiciones de baja disponibilidad del recurso. En este sentido, existen reportes que sostienen que la micorriza arbuscular (MA) es un mecanismo a través del cual las plantas mejoran las relaciones hídricas para incrementar así su resistencia a la sequía (Davies *et al.*, 1992; Ruíz-Lozano *et al.*, 1995).

Sin embargo, el papel de la MA en la captación de agua y por tanto en las relaciones hídricas de las plantas es hasta cierto punto controvertido. En principio, se propuso que el efecto benéfico en las relaciones hídricas podría estar relacionado principalmente con el estatus nutricional de las plantas (Smith & Read, 1997), pero en algunos estudios también se ha propuesto que el efecto benéfico podría relacionarse con el incremento de fitohormonas como las citocininas (Allen *et al.*, 1980) o del etileno (Cruz *et al.*, 2000), o bien con el mejor contacto entre el suelo y las raíces (Augé, 2001). Aún cuando no se conozca el mecanismo exacto del papel de la micorriza, bajo condiciones de escasa disponibilidad de agua, la MA

confiere a las plantas mayor capacidad de tolerancia, en términos de crecimiento (Ruíz–Lozano *et al.*, 1995; Kaya *et al.*, 2003; Al-Karaki *et al.*, 2004). Por lo anterior, en este trabajo se buscó determinar si la MA contribuye a disminuir el efecto negativo de la deficiencia de agua sobre las relaciones hídricas y el crecimiento de papaya Maradol y si tal efecto se relaciona con la disponibilidad de Pi en solución nutritiva aplicada al sustrato de crecimiento.

3.2 OBJETIVOS

- 3.2.1 General

Determinar si la asociación micorrízica arbuscular contribuye a mejorar o mantener las relaciones hídricas y el crecimiento de papaya Maradol cultivada con bajo aporte de agua y fósforo.

3.2.2 Particulares

Comparar el potencial hídrico entre papaya Maradol micorrizada y sin micorrizar.
Determinar el contenido relativo de agua en las hojas de papaya Maradol con y sin micorriza.
Comparar la conductancia estomática en las hojas de papaya Maradol micorrizada y sin micorrizar.
Comparar la fluorescencia de clorofila (F_V/F_M) de papaya Maradol con micorriza y sin micorriza.
Comparar el crecimento de papaya Maradol con micorriza y sin micorriza

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Condiciones experimentales

El experimento se llevó a cabo en el invernadero del Centro de Investigación Científica de Yucatán. La temperatura promedio fue de 35°C, la humedad relativa promedio de 70% y la intensidad luminosa de 400 µmol m^{-2} s^{-1}. A partir de la aplicación de las diferentes concentraciones de Pi y aporte de agua, el experimento se mantuvo durante seis semanas. Desde la siembra de las semillas hasta el final del experimento se utilizó agua destilada para el riego.

3.3.2 Diseño experimental

En el experimento se evaluaron ocho tratamientos (Cuadro 3.1) en un diseño factorial con dos niveles de riego, 200 mL/planta^{-1} cada tercer día (+A) y 100 mL/planta cada cinco días (−A); dos concentraciones de Pi en solución nutritiva de Hoagland, 1.0 mM (+P) y 0.1 mM (−P) en plantas micorrizadas (+Mic) y sin micorrizar (−Mic). Cada tratamiento tuvo 20 réplicas con una distribución completamente al azar en condiciones de invernadero. Después de cuatro semanas del trasplante e inoculación, se detectó el desarrollo de la colonización micorrízica en las raíces y a partir de entonces se tomaron los datos cada dos semanas, durante seis semanas.

3.3.3 Sustrato y material biológico

Con el objetivo de que el Pi disponible para las plantas fuera exclusivamente el aportado experimentalmente, se utilizó agrolita como sustrato porque es un medio inerte. Las plantas de papaya Maradol se obtuvieron a partir de semilla de papaya Maradol certificada (Carisem). Previo a la germinación, las semillas se hidrataron colocándolas en agua destilada durante

24 horas; después se decantó el agua y se mantuvieron durante 24 horas en una solución fungicida (Captán Ultra, 3 g/L^{-1}). Posteriormente se eliminó la solución fungicida y se lavaron las semillas con agua destilada.

Cuadro 3.1. Tratamientos para determinar el efecto de la micorriza arbuscular en las relaciones hídricas de papaya Maradol, en condiciones de estrés por deficiencia de agua y fósforo.

Concentración de Pi (mM)	***Micorrización***			
	***Glomus intraradices* (+Mic)**		**Sin micorriza (−Mic)**	
	Riego		**Riego**	
	200 mL (+A)	**100 mL (-A)**	**200 mL (+A)**	**100 mL (-A)**
1.0 (+P)	+Mic +P +A	+Mic +P –A	−Mic +P +A*	−Mic +P –A
0.1 (−P)	+Mic –P +A	+Mic –P –A	−Mic –P +A	−Mic –P –A

Después de la hidratación y desinfección, las semillas se colocaron en cámara húmeda (cajas de petri con discos de papel filtro saturados con agua destilada) y en oscuridad a 35°C ± 2°C para su germinación. Las semillas que germinaron se sembraron en charolas para vivero, colocando una semilla por cavidad y se regaron diariamente con agua destilada. Las plantas que se obtuvieron fueron mantenidas en estas charolas hasta que desarrollaron de cuatro a seis hojas, trasplantándolas entonces a bolsas negras para vivero de 35 × 25 cm, previamente llenas con agrolita, sustrato en que se les mantuvo durante todo el experimento.

El inoculante micorrízico fue una cepa de *Glomus intraradices*, compuesta por esporas, micelio y trozos de raíces colonizadas.

Este inóculo fue producido en el Área de Microbiología, Postgrado de Edafología del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México, utilizando sorgo como planta trampa en una mezcla de tezontle-suelo como sustrato.

3.3.4 Inoculación con hongos MA

Simultáneo al trasplante se realizó la inoculación micorrízica, para lo que se dividió el lote de plantas en dos grupos. En uno de estos lotes (80 plantas) se depositaron alrededor de 110 esporas (inóculo almacenado durante dos meses a 4°C), aplicando directamente sobre las raíces de cada planta y cubriendo inmediatamente con el sustrato (plantas denominadas +Mic). El otro grupo (80 plantas) no recibió el inoculante micorrízico (plantas denominadas –Mic) (Cuadros 3.1 y 3.2).

3.3.5 Riego

Para el riego se utilizó agua destilada durante todo el experimento. Para aplicar las diferentes dosis de agua, las plantas previamente separadas en inoculadas y no inoculadas con hongos MA fueron subdivididas en dos grupos. A uno de los grupos (40 plantas de cada lote) se les aplicaron 200 mL de agua cada tercer día (plantas denominadas +A), mientras que para el otro grupo (40 plantas) el aporte de agua fue de 100 mL cada cinco días (plantas denominadas –A) (Cuadros 3.1 y 3.2), durante las seis semanas de duración del experimento.

Cuadro 3.2. Factores de tratamiento.
Cantidad y/o frecuencia de aplicación

Micorriza	110 esporas por planta (+Mic)
	Sin inoculante (−Mic)
Riego	200 ml cada tercer día (+A)
	100 mL cada cinco días (−A)
Disponibilidad de Pi	1.0 mM 100 mL/semana (+P)
	0.1 mM 100 mL/semana (−P)

3.3.6 Fertilización

Para la fertilización se usó solución nutritiva de Hoagland (SH) (Hoagland y Arnon, 1950) aportando 100 mL de solución/semana/planta. Los grupos anteriormente separados en +A y –A fueron subdivididos en dos para ser fertilizados como se describe:
1) Con solución nutritiva sin modificación en su concentración de Pi (1.0 mM, plantas denominadas +P), y 2) solución nutritiva con baja concentración de Pi (0.1 mM, plantas denominadas –P) (Anexo 1). Con el propósito de no alterar el contenido del resto de los elementos, se ajusto la concentración de N de la SH, utilizando nitrato de amonio, NH_4NO_3.

3.3.7 Variables medidas

El efecto de la micorriza arbuscular fue evaluado en el tejido foliar a través de variables usadas para determinar la condición hídrica de las plantas y la fisiología de las hojas. Todas las mediciones y muestras se tomaron en hojas jóvenes completamente extendidas, tercera y cuarta del ápice hacia la base del tallo. La toma de datos se hizo cada dos semanas, tomando al azar 5 plantas por tratamiento. El muestreo fue realizado por las mañanas, entre las 7:00 y 7:30 horas, para evitar en lo posible la pérdida de agua por transpiración provocada naturalmente por el incremento de la temperatura.

- 3.3.7.1 Potencial hídrico

Para la determinación del potencial hídrico se cortaron discos de tejido foliar con un sacabocados de 6 mm de diámetro. Estos discos fueron envueltos rápidamente en papel aluminio y conservados en hielo hasta su uso. Posteriormente se tomaron los datos para medir tanto el potencial hídrico (Ψ), como potencial osmótico (Ψ_π). Las mediciones se realizaron utilizando una cámara psicrométrica C-52, HR-33 T Dew Point Microvoltimeter (Wescor, Inc). Con los datos de los potenciales hídrico y osmótico se calculó el porcentaje de turgencia (T) en los tejidos foliares.

- .3.3.7.2 Contenido relativo de agua (CRA)

Para estimar el CRA, con un sacabocados se cortaron discos de tejido foliar, de 9 mm de diámetro. Las muestras de tejido se envolvieron rápidamente en papel aluminio y se mantuvieron en hielo hasta su uso. Posteriormente, se registró el peso fresco (Pf) de cada muestra y se colocaron en agua destilada durante 24 horas. Al término de este lapso, las muestras se sacaron del agua, se eliminó el exceso de agua adherida a su

superficie y se registró el peso del tejido hidratado (Ph). Finalmente estos mismos tejidos se colocaron en un horno a 80ºC hasta registrar peso seco (Ps) constante (Beadle *et al.*, 1988). El cálculo del CRA se obtuvo mediante la fórmula:

$$CRA = \frac{Pf - Ps}{Ph - Ps} \times 100$$

donde Pf = peso fresco, Ps = peso seco y Ph = peso hidratado

- 3.3.7.3 Conductancia estomática

Los datos de conductancia estomática (g_s) fueron obtenidos en las hojas tres o cuatro contando del ápice hacia la base del tallo, entre las 11:00 y las 13:00 horas, usando un medidor de fotosíntesis portátil Li-Cor 6200, previamente calibrado con CO_2 estándar.

- 3.3.7.4 Fluorescencia de clorofila

Esta variable se estimó en las mismas hojas usadas para medir la g_s, utilizando los datos de la relación existente entre la fluorescencia variable y la fluorescencia máxima (F_V/F_M), indicador de la máxima eficiencia fotosintética del fotosistema II (*FII*). Estas hojas fueron adaptadas previamente a oscuridad, colocando en cada una un "clip" para hojas, durante 30 minutos (Reigosa & Weiss, 2001). Finalmente, usando un fluorímetro Hansatech (PEA MK2), se hizo pasar un rayo de luz saturante al 70% durante dos segundos.

- 3.3.7.5 Crecimiento

El crecimiento de las plantas fue evaluado a través de la determinación del peso seco y el área foliar. En cada muestreo,

después de cosechar las plantas se separaron las hojas y se registró el área foliar utilizando un medidor de área foliar. Posteriormente, las plantas se separaron en parte aérea y en raíz y se liofilizaron para obtener los datos de peso seco.

3.3.7.6 Colonización micorrízica arbuscular

Para determinar la colonización micorrízica las raíces se procesaron siguiendo la técnica de tinción de Phillips & Hayman (1970), que permite destacar las estructuras típicas de esta asociación. Posteriormente se determinó el porcentaje de colonización colocando de forma paralela 20 segmentos de raíz de un cm de longitud sobre un portaobjetos, se añadió lactoglicerol sobre las raíces y se observaron al microscopio óptico a 10×, recorriéndolas horizontalmente en los extremos y en parte media de los segmentos de raíces. En total se observaron 60 campos por cada preparación en los que se registró la presencia-ausencia de estructuras micorrízicas. El cálculo del porcentaje de colonización micorrízica se obtuvo a través de la fórmula:

$$\% \text{ Colonización} = \frac{\text{Número de campos colonizados}}{\text{Número total de campos observados}} \times 100$$

3.3.8 Análisis estadísticos

La comparación de datos se hizo con el programa STATGRAPHICS PLUS 4.1, aplicando un ANOVA trifactorial. Cuando la interacción de los factores tuvo diferencias estadísticamente significativas, se utilizó la prueba de Tukey al 95% de confianza para determinar que tratamientos eran diferentes. Cuando la interacción de los tres factores no fue estadísticamente significativa no se aplicó la prueba de Tukey y por tanto, en los cuadros y las figuras no se asignan letras a los

valores. Los datos porcentuales fueron transformados a arcoseno antes de aplicar el análisis de varianza.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Potencial hídrico

Los factores evaluados sobre las relaciones hídricas de papaya Maradol fueron la inoculación micorrízica, la disponibilidad de agua en el sustrato y la disponibilidad de fósforo en la solución nutritiva. La interacción de los tres factores no fue significativa en ninguno de los muestreos, de forma que los tratamientos no afectaron las relaciones hídricas en papaya Maradol. No obstante, en la segunda y cuarta semana se encontró que la interacción de la micorriza - fósforo fue estadísticamente significativa ($P = 0.05$) para el potencial hídrico, pero no hubo efecto sobre el potencial osmótico ni sobre la turgencia de las plantas (Cuadro 3.3).

Cuadro 3.3. Efecto de la micorriza arbuscular en el potencial hídrico (Ψ), el potencial osmótico (Ψ_π) y la turgencia (T) de hojas de papaya Maradol

Tratamientos[⊛]	Semana 2			Semana 4			Semana 6		
	Ψ (MPa)	Ψ_π (MPa)	T (MPa)	Ψ (MPa)	Ψ_π (MPa)	T (MPa)	Ψ (MPa)	Ψ_π (MPa)	T (MPa)
+Mic+P+A	-0.99	-1.19	0.20	-0.83	-1.20	0.38	-1.01	-1.75	0.73
−Mic+P+A	-0.65	-0.99	0.34	-1.04	-1.80	0.42	-0.95	-1.44	0.49
+Mic−P+A	-1.51	-1.86	0.35	-0.92	-1.60	0.66	-0.93	-1.54	0.61
−Mic−P+A	-0.83	-1.12	0.31	-0.91	-1.88	0.97	-0.92	-1.54	0.62
+Mic+P−A	-0.73	-1.00	0.28	-1.30	-1.74	0.44	-1.09	-1.69	0.61
−Mic+P−A	-0.91	-1.15	0.25	-1.04	-1.58	0.53	-0.89	-1.43	0.54
+Mic−P−A	-0.77	-1.09	0.32	-1.14	-1.72	0.58	-1.01	-1.66	0.65
−Mic−P−A	-0.71	-1.07	0.28	-1.00	-1.51	0.51	-1.26	-1.77	0.50
Significancia de los factores:									
A. Micorriza	0.21	0.08	0.81	0.53	0.34	0.29	0.96	0.17	0.22
B. Agua	0.24	0.06	0.61	0.08	0.21	0.17	0.08	0.14	0.99
C. Fósforo	0.20	0.07	0.25	0.89	0.68	0.85	0.69	0.94	0.69
Interacciones:									
AB	0.02	0.04	0.31	0.01	0.25	0.13	0.51	0.26	0.63
AC	0.42	0.18	0.26	0.58	0.09	0.04	0.12	0.18	0.97
BC	0.19	0.09	0.70	0.61	0.32	0.06	0.16	0.22	0.99
ABC	0.67	0.41	0.31	0.27	0.66	0.25	0.16	0.83	0.38

[⊛] Ver Cuadro 3.1. n = 3.

3.4.2 Contenido relativo de agua (CRA)

La contribución de los factores evaluados sobre el CRA fue estadísticamente significativa en las semanas cuatro y seis del experimento (ANOVA $P \leq 0.05$). En la figura 3.1 se muestra que en la cuarta semana los tratamientos con mayor CRA fueron aquellos que tuvieron el aporte de la solución nutritiva con mayor disponibilidad de Pi, independientemente de su estado micorrízico y de la disponibilidad de agua. En la sexta semana, la diferencia de los valores de CRA entre los tratamientos disminuyó (Figura 3.1) pero los tratamientos con mayor disponibilidad de Pi se mantuvieron por arriba de aquellos con menor disponibilidad de Pi en la solución nutritiva.

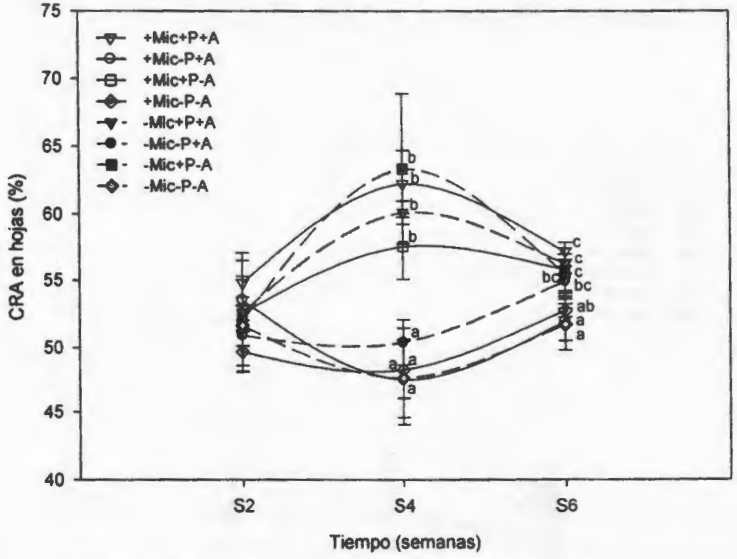


Figura 3.1. *Contenido relativo de agua (CRA) en hojas de papaya Maradol con micorriza (símbolos vacíos) o sin micorriza (símbolos llenos). Valores con la misma letra en cada tiempo de muestreo no tienen diferencia estadísticamente significativa (Tukey $p \leq 0.05$). Cada valor es el promedio de 5 repeticiones ± la D.E.*

3.4.3 Conductancia estomática (g_s)

La interacción de los factores no mostró significancia estadística sino hasta la sexta semana del experimento ($P \leq 0.05$). Los datos de este último muestreo indican que las plantas que tuvieron el aporte de solución nutritiva con mayor disponibilidad de Pi y el mayor aporte de agua fueron los que tuvieron la mayor capacidad de g_s., -Mic+P+A y +Mic+P+A. Estos tratamientos mostraron los valores de g_s más altos desde la cuarta semana (Figura 3.2), a pesar de que la interacción de los factores no fue significativa en dicho muestreo. Las plantas

con menor g_s fueron las que tuvieron los tratamientos +Mic+P−A y –Mic+P−A, (Tukey α = 0.05) (Figura 3.2).

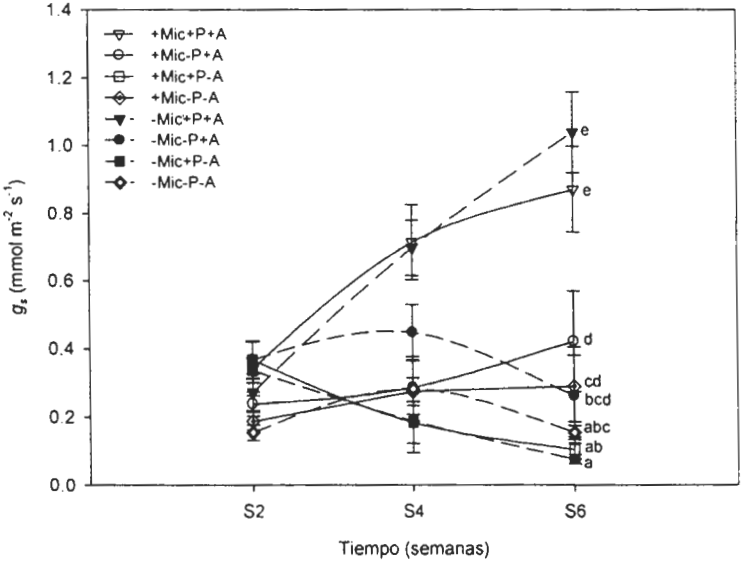


Figura 3.2. *Conductancia estomática (g_s) en hojas de papaya Maradol micorrizada (símbolos vacíos) o sin micorrizar (símbolos rellenos). Valores con la misma letra en cada tiempo de muestreo no tienen diferencia estadísticamente significativa (Tukey $p \leq 0.05$). Cada valor es el promedio de 5 repeticiones ± la D.E.*

3.4.4 Fluorescencia de clorofila

La contribución de la interacción de los tres factores en la fluorescencia de la clorofila no fue estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$) bajo las condiciones de este trabajo. Sin embargo, el ANOVA indicó una interacción significativa entre la micorriza y el agua y entre la micorriza y el fósforo en las semanas cuatro y seis. De estas interacciones, la de la

micorriza con el fósforo fue la determinante para los resultados de fluorescencia ($P \leq 0.05$); los tratamientos con valores más altos de fluorescencia en la cuarta y sexta semanas fueron aquellos con mayor disponibilidad de Pi en la solución nutritiva (Figura 3.3).

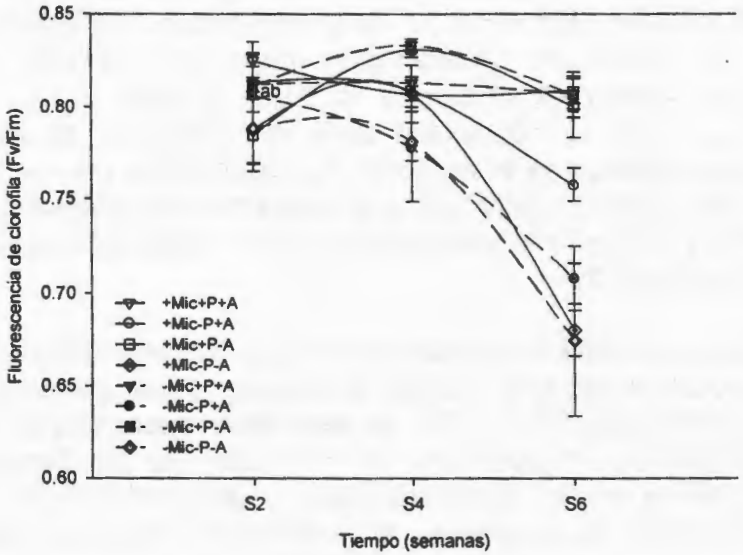


Figura 3.3. *Fluorescencia de clorofila (F_v/F_M) en papaya Maradol micorrizada (símbolos vacíos) o sin micorriza (símbolos llenos). Cada valor es el promedio de 5 repeticiones ± la D.E.*

3.4.5 Crecimiento

El análisis de varianza mostró que la contribución de la interacción de los tres factores fue muy importante para el peso seco (PS) de papaya Maradol en la segunda semana, disminuyendo su efecto en la semana cuatro ($P \leq 0.05$) hasta no tener significancia estadística en la sexta semana del

experimento (Cuadro 3.4). El tratamiento que en la segunda semana promovió más PS tanto en parte aérea como en la raíz y, por tanto, en el PS total de papaya Maradol fue +Mic+P-A en tanto que las plantas con el tratamiento –Mic+P+A tuvieron el menor PS (Cuadro 3.4). En la cuarta semana la interacción de los factores influyó en el PS de las raíces y el PS total pero no en el de los tallos. El tratamiento que produjo el mayor PS de raíz y PS total fue –Mic+P+A, en tanto que el menor PS de raíz y total se determinó nuevamente para las plantas del tratamiento –Mic–P+A (Tukey $\alpha \leq 0.05$) (Cuadro 3.4). En semana seis solo la interacción de la disponibilidad de agua con la disponibilidad de Pi en la SH fue significativa para el PS de tallo, raíz y total (cuadro 3.4), por lo que los tratamientos con +Mic+P+A y –Mic+P+A promovieron mayor peso seco en las plantas (cuadro 3.4).

Con respecto al área foliar desarrollada por la papaya Maradol, la interacción de los tres factores evaluados, estadísticamente no fue significativa ($P = 0.05$). El área foliar desarrollada fue significativamente afectada por la interacción de los factores agua y fósforo en las semanas cuatro y seis, además de la interacción entre la micorriza y el fósforo en la sexta semana. Las plantas con mayor disponibilidad de fósforo en la SH, se separaron claramente de las que tuvieron menor disponibilidad (Figura 3.4). El tratamiento que produjo la mayor área foliar durante el experimento fue –Mic+P+A, en tanto que el menor desarrollo se encontró en plantas con el tratamiento –Mic-P+A, con diferencia estadísticamente significativa (Tukey, $\alpha \leq 0.05$).

Cuadro 3.4. Efecto de la micorriza arbuscular sobre el peso seco de papaya Maradol

Tratamiento[e]	Semana 2			Semana 4			Semana 6		
	Parte aérea	Raíz	Total	Parte aérea	Raíz	Total	Parte aérea	Raíz	Total
+Mic+P+A	0.266d	0.048a	0.315bc	0.473c	0.097a	0.570bc	1.964c	1.135c	3.100c
-Mic+P+A	0.087a	0.048a	0.139a	0.411b	0.466c	0.877d	2.094c	1.092c	3.187c
+Mic-P+A	0.218cd	0.168b	0.385c	0.150a	0.090a	0.240a	0.218a	0.168a	0.385a
-Mic-P+A	0.055a	0.047a	0.102a	0.086a	0.064a	0.150a	0.137a	0.137a	0.274a
+Mic+P-A	0.595e	0.368c	0.964d	0.340b	0.130a	0.528b	0.595b	0.368ab	0.964b
-Mic+P-A	0.204c	0.088a	0.293b	0.441b	0.236b	0.677c	0.658b	0.472b	1.131b
+Mic-P-A	0.139b	0.135b	0.274b	0.102a	0.087a	0.189a	0.139a	0.135a	0.274a
-Mic-P-A	0.063a	0.057a	0.120a	0.091a	0.089a	0.181a	0.101a	0.120a	0.220a
Significancia de los factores:									
A. Micorriza	0.00	0.00	0.00	0.09	0.00	0.00	0.63	0.92	0.75
B. Agua	0.00	0.00	0.00	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C. Fósforo	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Interacciones:									
AB	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.39	0.87	0.32	0.63
AC	0.00	0.00	0.00	0.34	0.00	0.00	0.051	0.52	0.15
BC	0.00	0.00	0.00	0.96	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
ABC	0.00	0.00	0.00	0.35	0.00	0.01	0.48	0.42	0.94

[e] Ver cuadro 3.1. Valores con la misma letra en la columna no tienen diferencia estadística. s = significativo, ns = no significativo (Tukey $\alpha \leq 0.05$). n = 5. Cuando la interacción de factores no fue significativa no se asignó letra a los valores.

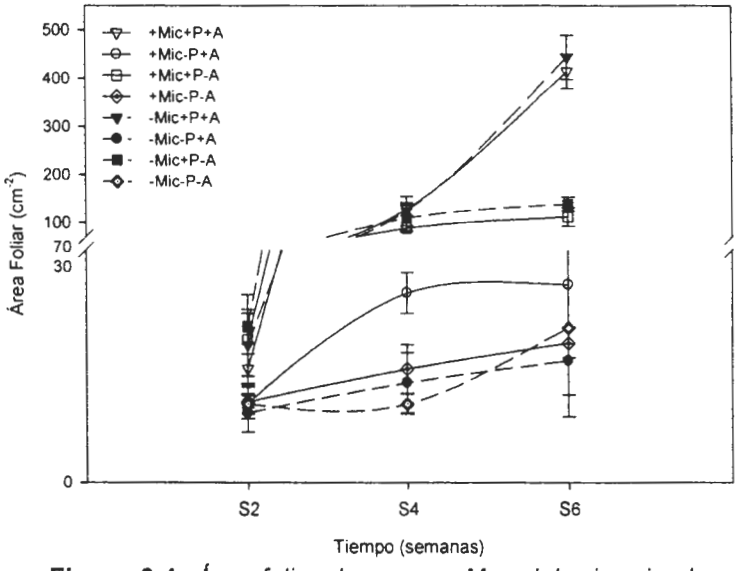


Figura 3.4. *Área foliar de papaya Maradol micorrizada (símbolos vacios) o sin micorriza (símbolos llenos). Valores con la misma letra en cada tiempo no tienen diferencia estadísticamente significativa (Tukey $p \leq 0.05$). Cada valor es el promedio de 5 repeticiones ± la D.E.*

3.4.6. Colonización micorrízica

No se encontró colonización micorrízica en las plantas que no fueron inoculadas con HMA. La contribución de la interacción de los factores fósforo-agua sobre la intensidad de colonización, fue estadísticamente significativa en las semanas dos y seis (ANOVA, $P \leq 0.05$). La colonización micorrízica arbuscular fue afectada positivamente por la menor disponibilidad de Pi en la SH, en la segunda y sexta semanas del experimento. Las plantas tratadas con −P+A presentaron los porcentajes de colonización más altos, con diferencia

estadísticamente significativa en la última semana del experimento (Tukey $\alpha = 0.05$) (Figura 3.5).

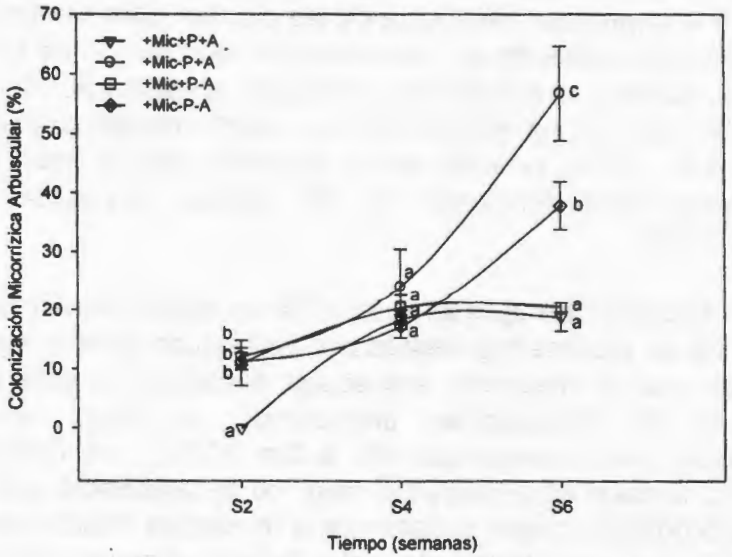


Figura 3.5. *Colonización micorrízica arbuscular en papaya Maradol. Valores con la misma letra en cada tiempo de muestreo no tienen diferencia estadísticamente significativa (Tukey $p \leq 0.05$). $n = 5$.*

3.5 DISCUSIÓN

La deficiencia de agua afecta profundamente la producción de muchos cultivos y, aunque aún no se conoce con exactitud cuál es el mecanismo por el que se lleva a cabo, las plantas son capaces de tolerar el estrés a través del ajuste osmótico (Ruiz-Lozano, 2003), aunque esto puede ir en detrimento de otros

aspectos como el crecimiento de la parte aérea (Marler & Mickelbart, 1998).

Desde hace algunos años se ha trabajado para conocer si la MA afecta la capacidad fisiológica de las plantas para mantener los niveles adecuados de g_s, transpiración, asimilación de CO_2, CRA, etc., cuando se encuentran sometidas a estrés por déficit hídrico. Si bien se ha encontrado un efecto benéfico (Ruíz-Lozano *et al.*, 1995), también se ha reportado que la micorriza no modifica estas funciones en las plantas (Syvertsen & Graham, 1990).

Entre los trabajos que apoyan la tesis de un efecto benéfico de la micorriza en plantas bajo estrés por deficiencia hídrica, se ha reportado que la micorriza arbuscular favorece el potencial hídrico de su hospedante, propiciando un mejor ajuste osmótico en *Citrus tangerinus* (Wu & Xia, 2006) y en *Ocimum basilicum*, aunque en el segundo caso no se evidenció que tal ajuste promoviera mayor resistencia a la sequía (Kubikova *et al.*, 2001). Los resultados de este trabajo difieren con los anteriores reportes ya que, exceptuando al $\Psi\pi$ en la segunda semana del experimento, las relaciones hídricas de las plantas micorrizadas no mostraron diferencias significativas con respecto a lo observado para plantas no micorrizadas, independientemente de la frecuencia y cantidad de agua recibida en cada uno de los tratamientos.

Los estomas por su parte ocupan una posición central entre el control de la pérdida de agua, y el intercambio gaseoso en las plantas (Jones, 1998). La reducción del estatus hídrico en las hojas está asociado con el cierre de estomas, con la consecuente disminución de la g_s. Referente al efecto de la micorriza sobre la g_s, por un lado se ha reportado que en frijol al inducir estrés osmótico durante un período corto, la micorriza mejoró la capacidad para mantener la g_s en niveles más altos que los observados en plantas sin micorriza (Augé *et al.*, 1992),

en tanto que al ser evaluada en cítricos, la micorriza arbuscular no tuvo efecto alguno sobre la g_s ni sobre el uso eficiente del agua, independientemente de la edad de las hojas utilizadas para las determinaciones (Syvertsen & Graham, 1990). Bajo las condiciones experimentales de este trabajo las diferencias entre los tratamientos fueron muy pequeñas y por tanto estadísticamente iguales. La diferencia en los reportes existentes puede ser motivada por las condiciones en que los experimentos se desarrollan, ya que tanto la especie hospedera como la forma de inducción y duración del estrés pueden ser determinantes en la respuesta mostrada por las plantas. Por otra parte, se ha sugerido que la funcionalidad de los estomas podría estar determinada por la humedad en el sustrato, más que por el estatus hídrico de las hojas, debido a que los estomas responden a las señales químicas de las raíces deshidratadas o con deficiencia de agua, siempre que el estatus hídrico foliar se mantenga constante (Davies & Zang, 1991 *In*: Chaves *et al.*, 2002) y aunque en este trabajo no se llevó un registro del porcentaje de humedad del sustrato, el mayor o menor aporte de agua no fue un factor que afectara la g_s de papaya Maradol.

También se ha reportado que ante condiciones de deficiencia hídrica las plantas disminuyen el CRA, lo que se corresponde con la disminución de la g_s (Estrada-Luna & Davies, 2003). En este trabajo, se encontró que los valores más altos de CRA se encontraron en plantas que mostraron también la mayor g_s, tratamientos +Mic+P+A y –Mic+P+A, resultados que se atribuyen principalmente a la mayor disponibilidad de Pi en la solución nutritiva aplicada.

Otra función afectada cuando hay deficiencia de agua es la eficiencia fotoquímica del *FII*, en donde la tasa de F_V/F_M ha sido un parámetro importante y fácilmente medible del estado fisiológico del aparato fotosintético en hojas intactas (Krause & Weis, 1991). Los valores de F_V/F_M de 0.83 mostrados por

varias especies, se toman como indicio de que los centros de reacción no han sido dañados permanentemente bajo las condiciones de deficiencia hídrica en papaya (Krause & Weis, 1991). En especies perennes bajo condiciones de sequía hay una disminución de fotosíntesis asociada con una disminución de la eficiencia fotoquímica del *FII*, (F_V/F_M), la cual es mayor durante las horas más cálidas del día. La fluorescencia de clorofila en hojas de papaya Maradol, manifestada a través de la F_V/F_M, mostró variabilidad entre los tratamientos y a través del tiempo, de forma que en la sexta semana del experimento los valores más bajos (<0.7) correspondieron con plantas con menor disponibilidad de Pi y de agua, en tanto que las plantas con mayor disponibilidad de Pi tuvieron los valores más altos (> 0.8), independientemente de su condición micorrízica. Para la variedad de papaya Red Lady se reportaron valores de F_V/F_M de 0.84 – 0.85 antes del amanecer y durante la noche; sin embargo, a la hora en que se tomaron los datos para Maradol, alrededor de las 14:00, los valores descendieron a 0.79 – 0.70 (Marler & Mickelbart, 1998), sugiriendo una mejor adaptación de Maradol a situaciones de estrés. Los datos derivados de este trabajo sugieren que de los factores evaluados, la disponibilidad de fósforo fue el factor de mayor importancia para mantener la eficiencia fotoquímica de papaya Maradol. Un aspecto importante a destacar es que a diferencia del trabajo realizado en campo con la variedad Red Lady, Maradol fue trabajada en contenedores y bajo condiciones de invernadero, lo cual, sin duda, es un factor de variación en los resultados reportados entre ambas variedades.

En cuanto al crecimiento de papaya Maradol, obteniéndose mayor peso en la parte aérea que en las raíces. Al final del experimento, se registró el mayor peso seco en los tratamientos que tuvieron mayor disponibilidad de Pi, encontrándose una correspondencia con los valores más altos de g_s y CRA, además de valores de fluorescencia que indican que el *FII* no fue dañado. Bajo las condiciones de este trabajo,

tanto el crecimiento como las otras variables evaluadas fueron afectados por la disponibilidad de Pi, más que por la condición micorrízica o la disponibilidad de agua. El hecho de que estas plantas no hayan sido afectadas por la deficiencia de agua puede deberse en parte a que tienen la capacidad de responder a la deficiencia hídrica, posponiendo la deshidratación de sus tejidos (Mahouachi *et al.*, 2006). Sin embargo, el sustrato usado mostró alta capacidad de retención de agua por lo que es posible que aún las plantas con el menor aporte de agua no estuvieran realmente estresadas por deficiencia de agua. Así, al no haber deficiencia de agua el papel de la micorriza se inhibió, y por tanto no causó efecto alguno sobre las variables evaluadas, bajo las condiciones de este experimento. Bajo estos supuestos, la deficiencia de fósforo se constituyó como el factor de mayor importancia que, en general, disminuyó las variables fisiológicas consideradas en este trabajo, además de inhibir el crecimiento de las plantas. No obstante, si bien la asociación micorrízica arbuscular no determinó por sí misma la respuesta de papaya Maradol a los factores estresantes, su interacción con los otros dos factores evaluados fue determinante, principalmente para el CRA en las semanas cuatro y seis y para la g_s al final del experimento.

El estrés hídrico y nutrimental, como muchos otros tipos de estrés, disparan diversas respuestas de las plantas, desde alteraciones en la expresión genética y metabolismo celular hasta los evidentes cambios en las tasas de crecimiento, lo cual fue visualmente corroborado en este trabajo, y producción. Tales respuestas se relacionan con la duración, severidad y tasa a la que ocurre el estrés e influyen sobre la respuesta de las plantas (Bray *et al.*, 2000), lo mismo que su tamaño y edad (Marler & Mickelbart, 1998). La evaluación del efecto de la baja disponibilidad de agua es problemática, empezando desde la cuantificación y aplicación de los tratamientos de deficiencia hídrica, espacial y temporalmente. Incluso la diferencia en el tamaño de los órganos puede ser factor de variación, aún

cuando se manejen fertilizaciones similares entre los tratamientos. En este sentido, es posible que al ser plantas jóvenes, el estrés al que papaya Maradol fue sometida no fue tan severo como para observar diferencias entre los tratamientos ni para detectar efecto alguno de la micorriza arbuscular, por lo que sería necesario probar otras formas de inducción de estrés por falta de agua, periodos de duración, edad de plantas, etc., para determinar el papel real de la micorriza en un sistema altamente tecnificado como lo es el cultivo de papaya Maradol. Por otra parte, aunque por si misma la micorriza parece no haber influido de forma importante, su interacción con otros factores puede resultar benéfica para que las plantas enfrenten la deficiencia hídrica.

En cuanto a la colonización micorrízica, se tienen reportes que refieren que bajo condiciones de estrés por deficiencia de agua se estimula la colonización micorrízica en plantas de interés agrícola como el trigo (Al-Karaki *et al.*, 2004) y hortícola como *Rosa hybrida* (Augé & Stodola, 1990). En este trabajo, la disponibilidad de agua no parece haber afectado los porcentajes de colonización micorrízica, correspondiendo más bien a la disponibilidad de Pi, como en otras variables, el mayor efecto sobre los resultados, encontrándose el mayor porcentaje de colonización micorrízica arbuscular en las plantas con menor disponibilidad de Pi en la SH.

Finalmente, es importante anotar que pocas veces se realizan los trabajos para evaluar el papel de la micorriza a nivel de campo (Al-Karaki *et al.*, 2004), siendo mucho más frecuente que se realicen en condiciones de invernadero, ya sea con plantas micropropagadas (Estrada-Luna & Davies, 2003) o con plantas producidas a partir de semilla (Augé *et al.*, 1992; Kubikova *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos en invernadero pueden distar de lo que se obtendría en las condiciones en que normalmente crecen las plantas.

3.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allen M.F., T.S. Moore. Jr. and M. Christensen (1980). *Phytohormone changes in Bouteloua gracilis infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae. I. Cytokinin increases in the host plant.* Canadian Journal of Botany, 58, 67-76.

Augé R.M. (2001). *Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal simbiosis.* Mycorrhiza, 11, 3-42.

Augé R.M. and A.J.W. Stodola (1990). *An apparent increase in symplastic water contributes to greater turgor in mycorrhizal roots of droughted Rosa plants.* New Phytologist, 115, 285-295.

Augé R.M., A.J.W. Stodola, M.S. Brown, and G.J. Bethlenfalvay (1992). *Stomatal response of mycorrhizal cowpea and soybean to short-term osmotic stress.* New Phytologist, 120, 117-125.

Al-Karaki G., B. McMichael and J. Zak (2004). *Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress.* Mycorrhiza, 14, 263-269.

Beadle C.L, M.M. Ludlow y J.L. Honeysett (1988). Relaciones Hídricas, in *Técnicas en Fotosíntesis y Bioproductividad.* Combs J., D.O. may, S.P. Long, J.M.O. Scurlock (eds). Colegio de Postgraduados. México.

Bray E.A. (1997). *Plant responses to water deficit.* Trends Plant Science, 2(2), 48-54.

Bray E.A, J. Bailey-Serres, E. Weretilnyk (2000). Responses to abiotic stresses, in *Biochemistry and Molecular Biology of Plants,* Buchanan B.B., C. Wilhelm, and R.L. Jones (eds.). pp. 1158-1203.

Chaves M.M., J.S. Pereira, J. Maroco, M.L. Rodrígues, C.P.P. Ricardo, M.L. Osorio, I. Carvalho, T. Faria and C. Pinheiro (2002). *How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth.* Annals of Botany, 89, 907-916.

Cruz A.F., T. Ishii and K. Kadoya (2000). *Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on tree growth, leaf water potencial, and levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and ethylene in the roots of papaya under water-stress conditions.* Mycorrhiza, 10, 121-123.

Davies Jr F.T., J.R. Potter and R.G. Linderman (1992). *Mycorrhiza and repeated drought exposure affect drought resistance and extraradical hyphae development of pepper plants independent of plant size and nutrient content.* Journal of Plant Physiology, 139, 289-294.

Estrada-Luna A. and F.T. Davies Jr. (2003). *Arbuscular mycorrhizal fungi influence water relations, gas exchange, abscisic acid and growth of micropropagated chile ancho pepper (Capsicum annuum) plantlets during acclimatization and post-acclimatization.* Journal of Plant Physiology, 160, 1073-1083.

Hoagland D.R. and H.I. Arnon (1950). *The water-culture method for growing plants without soil.* California Experimental Agriculture Station Circular 347. Berkeley, 32 p.

Jones H.G. (1998). *Stomatal control of photosynthesis and transpiration.* Journal of Experimental Botany, 49, 387-398.

Kaya C., D. Higgs, H. Kirnak and Tas (2003). *Mycorrhizal colonisation improves fruit yield and water use efficiency in watermelon (Citrullus lanatus Thunb.) grown under well-watered and water-stressed conditions.* Plant Soil, 253, 287-292.

Krause G.H. and E. Weis (1991). *Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics.* Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 42, 313-349.

Kubikova E., J.L. Moore, B.H, M.D. Ownley Mullen and R.M. Augé (2001). *Mycorrhizal impact on osmotic adjustment in Ocimum basilicum during a lethal drying episode.* Journal of Plant Physiology, 158, 1227-1230.

Mahouachi J., A.R. Socorro and M. Talon (2006). *Responses of papaya seedlings (Carica papaya L.) to water stress and re-hydratation: growth, photosynthesis and mineral nutrient imbalance.* Plant Soil, 281, 137-146.

Marler T.E. and M.V. Mickelbart (1998). *Drought, leaf gas exchange, and chlorophyll fluorescence of field-grown papaya.* Journal of American Society of Horticultural Science, 123(4), 714-718.

Munns R. (2002). *Comparative physiology of salt and water stress.* Plant Cell and Environment, 25, 239-250.

Phillips J.M. and D.S. Hayman (1970). *Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection.* Trans. British Mycological Society, 55, 158-161.

Porcel R. and J.M. Ruíz-Lozano (2004). *Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potencial, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress.* Journal of Experimental Botany, 55(403), 1743-1750.

Reigosa R.M.J. and O. Weiss (2001). Fluorescence techniques, in *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*, Reigosa Roger M.J. (ed). Kluwer Academic Publishers. pp 155-171.

Ruiz-Lozano J.M., R. Azcón and M. Gómez (1995). *Effects of arbuscular-mycorrhizal Glomus species on drought tolerance: physiological and nutritional plant responses.* Applied Environmental Microbiology, 61(2), 456-460.

Smith S.E. and D.J., Read (1997). *Mycorrhizal Symbiosis.* 2d. Edition. Academic Press. London. p

Syvertsen J.P. J.H. and Graham (1990). *Influence of vesicular arbuscular mycorrhizae and leaf age on net gas exchange of Citrus leaves.* Plant Physiology, 94, 1424-1428.

Wu Q.S. and R.X. Xia (2006). *Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions.* Journal of Plant Physiology, 163, 417-425.

Capítulo 4

Glomus intraradices attenuates the negative effect of low Pi supply on photosynthesis and growth of papaya Maradol plants

Este capitulo fue sometido al journal **Horticultural Science** ISSN 0862-867X.

4.1. ABSTRACT

Low inorganic phosphorus supply limits the photosynthetic process and hence plants growth and development. Contradictory reports exist in the literature on whether mycorrhyzal association can attenuate the negative effects of low Pi supply on photosynthesis and growth. In the present paper, the effect that low Pi supply may have on photosynthesis and growth of papaya Maradol plants was evaluated in intact plants and in those inoculated with two different strains of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus intraradices*. All plants were grown in a hydroponics system, with different Pi concentrations (0, 0.3 and 0.6 mM) in Hoagland's solution using agrolite as substrate.

Plant growth was significantly reduced as the Pi supply decreased. However, inoculation with any strain of *G. intraradices* was able to attenuate such effect. Without inorganic phosphorus (0 mM) in the nutrient solution, the mycorrhizal plants had on average 6.1 times and 7.5 higher photosynthesis

than non mycorrhizal plants. The chlorophyll fluorescence values were significantly higher ($P \leq 0.05$) in mycorrhizal than in non-mycorrhizal plants. These results could be associated to an increased ability to take up phosphorus from the substrate as mycorrhizal plants had higher phosphorus content than non-mycorrhizal plants.

A high correlation was found between internal P content and plant biomass. The lower correlation between phosphorus content and photosynthesis suggests that some photosynthates could had been used to maintain the symbiosis.

Key words: *Glomus intraradices*, plant nutrition, papaya Maradol

4.2. INTRODUCTION

The scarcity of nutrients is a factor that limits physiological processes in plants, including photosynthesis, their growth and development (Ripley *et al.*, 2004). Phosphorus (P) deficiency normally reduces, the root system development and plant establishment because it has an important role on cell division, growth, photosynthesis (*Pn*), respiration, energy storage and transfer (Jacob & Lawlor, 1991; Marschner, 1995; Raghothama, 1999). So that, in many agricultural systems it is necessary to supply P in order to have good productivity (Schachtman *et al.*, 1998).

When plants grow with nutrient scarcity, some of them are capable of modifying their root architecture, to exude organic acids or to establish associations with some beneficial organisms as strategies to compensate for the low concentration of nutrient in the substrate. Among the beneficial

organisms for plants, the arbuscular mycorhizal (AM) fungi have a very important role on plant nutrition (Smith & Read, 1990; Ravnskov & Jakobsen, 1995; van der Heijden *et al.*, 2006). It is through AM association that plants increase their capacity to take up organic phosphorus (Pi) from the soil solution (Burleigh *et al.*, 2002; Al-Karaki *et al.*, 2004; Mortimer *et al.*, 2005) that normally translates into better growth than that of non AM plants (Alarcón *et al.*, 2002; Bohrer *et al.*, 2003).

Nevertheless, it has been reported that AM association could be more or less beneficial to the plant growth depending on the plant specie and the AM fungi species (Burleigh *et al.*, 2002). In commercial papaya varieties Sunrise and Tainung, the inoculation with *Gigaspora margarita* induced higher production of dry matter than with *Glomus clarum*, growing under similar conditions (Trindade *et al.*, 2001).

Most of the studies on the role of the AM association on plants behavior are undertaken using soil (Trindade *et al.*, 2001) or a mix of inert materials-soil (Alarcón *et al.*, 2002; Martin & Stutz, 2004; Smith *et al.*, 2004) with different chemical properties in every case, which is a factor that can modify the Pi availability for the plants. In order to control the availability of nutrients, the present research was made in a hydroponics system under greenhouse conditions, focusing on the effect of colonisation with two strains of *Glomus intraradices* on the growth and *Pn* of papaya Maradol, growing with low availability of Pi in Hoagland's solution (HS).

4.3. MATERIALS AND METHODS

4.3.1. Plants, AM fungi and growing conditions

Seeds of papaya Maradol (*Carica papaya* var. Maradol, Carisem) were germinated in wet chambers in darkness at 35°C ±3°C. After that, they were grown in nurseries for 15-18 days until the plants had three to four leaves. Then, plants were transplanted into single pots (black nursery bags of 35 × 25 centimeters) which were previously filled with agrolite, a sterile and inert substrate, chemically stable in neutral and acid pH. At all times, the experiment was maintained under greenhouse conditions, with 35°C temperature, 55% relative humidity and a photosynthetic photon flow density of around 300 µmol $m^{-2}s^{-1}$

The inoculants used were two strains of the AM fungi *Glomus intraradices* from different origin 1) a commercial strain Endo-Rhyza (+Mic1), that consists in spores immersed in vermiculite, 2) a non-commercial strain (+Mic2), isolated and propagated at the Microbiology Department, Postgraduates College, Montecillo, Mexico, consisting of spores and little segments of colonized roots in a soil-tezontle mix used as support.

When the plants were transplanted to single pots, each plant was inoculated with approximately 160 spores of each AM fungal strain, the non-mycorrhizal and control groups, were supplied with the same carrier from the non-commercial strain inoculant, previously sterilized. After that, in order to maintain all plants with the same pre-treatment supply of Pi in solution and to stimulate AM colonization, all plants were supplemented with 200 mL of low Pi (0.3 mM) Hoagland solution (HS) (Hoagland and Arnon, 1950) twice a week and 250 mL of distilled water once a week for five weeks. At the end of these five weeks the

AM colonization was verified taking a sample from the roots of five inoculated plants.

Then, the different Pi concentration treatments were started, by supplying modified HS containing the three Pi concentrations (0, 0.3, 0.6, mM). The pH was adjusted to 6.7 and the necessary amount of ammonium nitrate (0.040 g, 0.028 g and 0.016 g respectively) was added to HS in order to maintain the N concentration in each case. The experiment included nine treatments by combining three Pi concentrations (0, 0.3 and 0.6 mM) and three AM conditions (+Mic1, +Mic2 and without inoculation, denoted as −Mic). Every treatment had five plants (as experimental units). The control was a papaya Maradol group without AM fungi supplied with HS without modification (Pi concentration of 1.0 mM).

Data from *Pn* and F_V/F_M were taken at weeks two, four and five after the treatments were initiated. Growth data, leaves P content and AM mycorrhizal percentage were taken only at week five.

4.3.2. Growth measurements

The stem diameter was measured two centimeters from the base to the apex. The plants height were measured from the base to the apex of the stem. Dry weight was determined dividing each plant into shoot and root before they were oven dried at 70°C to constant weight in order to obtain shoot, root and total dry weight (DW).

4.3.3. Photosynthesis and F_V/F_M measurements

Pn was evaluated as CO_2 assimilation, using the third and fourth leaves from the apex to the base of the stem. It was measured between 11 and 13:30 hours, with an infra red gas

analyzer (IRGA) LICOR model LI-6200. F_V/F_M data were taken on the same leaves that were used to measure photosynthesis after they were pre-acclimated to darkness for 30 minutes. A Plant Efficiency Analyzer (PEA Hansatech Instruments Ltd. Kings Lynn, UK) was used set at 70% for two seconds.

4.3.4. Phosphorus measurements

Leaves P content measurements were carried out by digesting the plant material with nitric acid at 80°C (Hoffman et al., 2004). The measurements were carried out using an optical emission spectrometer inductively coupled to plasma (OES-ICP), Perkin Elmer 400, at 253.4 nm.

4.3.5. Arbuscular mycorrhizal colonization

To estimate the AM colonization, the roots were stained with tripan blue (Phillips and Hayman, 1970). A total of 20 fragments of stained roots (about 1 cm long) for each treatment were mounted on slides in lactic acid and examined with an optical microscope (10×) to ascertain the presence of AM structures. Colonization percentage was calculated by

$$\% \text{ Colonization} = \frac{\text{Number of colonized segments}}{\text{Number of total segments viewed}} \times 100$$

Data are presented as the means of five replicates ± standard deviation (SD) and were analyzed by ANOVA test using the Statgraphics 4.1 Plus program. Differences between the treatments were tested using the Tukey test at 95% of confidence ($P \leq 0.05$).

4.4. RESULTS

4.4.1. Plant growth

Most of the growth parameters measured decreased significantly when the Pi supply in HS decreased. However, this effect was attenuated by the AM association. Stem diameter decreased as the Pi supply was reduced. However, this drop was attenuated by the AM association. When Pi was reduced from 1.0 to 0.6 and 0.3 mM, a similar reduction in stem diameter occurred in both –Mic and +Mic plants. However, when HS had no added Pi (0 mM), stem diameter was reduced 91% in –Mic, while only 74% in +Mic1 and +Mic2 plants compared to control plants (1.0 mM) (Fig. 4.1).

Shoots, roots and total plant DW also decreased as the Pi supply was reduced and again the drop was attenuated in +Mic plants. With Pi 0.3 mM in HS total DW was reduced by 20% in –Mic, while only 13% and 7% in +Mic1 and +Mic2, respectively (Fig. 4.2b). When grew in HS solution with no added Pi, +Mic plants maintained 10 times higher biomass than –MR plants (Fig. 4.2a).

4.4.2. Photosynthesis and F_V/F_M

Pn also decreased drastically as the Pi supply was reduced but MA not only was able to attenuate this effect but in some cases *Pn* in +Mic plants grown at low Pi showed higher Pn than control plants grown without Pi limitation. With Pi 0.3 mM −Mic plants reduced their *Pn* by 63.6% while +Mic plants showed *Pn*, values that were in fact higher than those in control plants grown with 1.0 mM (Fig. 4.3b). Even when no Pi was added to the HS (0 mM), +Mic plants maintained significantly higher *Pn*

than –Mic plants (Fig 4.3a). F_V/F_M also decreased as the Pi supply was reduced. However at week 5, F_V/F_M values remained significantly higher in +Mic plants than in −Mic plants treated with both 0.3 mM and 0 mM Pi (Fig. 4.4a, b).

4.4.3. Phosphorus content

The foliar P content decreased as the Pi supply was reduced and again AM was able to attenuate this drop. In the case of total absence of added Pi through the HS (0mM), +Mic plants had significantly higher leaf P content than –Mic plants (Fig. 4.5). Also, mycorrhizal plants inoculated with +Mic2 had significantly higher P content than the –Mic plants at P1 0.6 mM, in fact this treatment was the only one that showed laef P contents similar to the control plants grown with full HS containing 1 mM Pi.

4.4.4. Arbuscular Mycorrhizal colonization

No AM colonization was observed in roots of −Mic plants throughout the fertilization gradient. The higher AM colonization occurred in +Mic1 without Pi supply (Table 4.1). For both strains, AM colonization decreased as the Pi supply in HS increased. Nevertheless, this reduction was lower in AM plants inoculated with +Mic2, whose AM colonization remained two and tree times higher (with Pi 0.3 mM and 0.6 mM, respectively) than those inoculated with +Mic1 (Table 4.1).

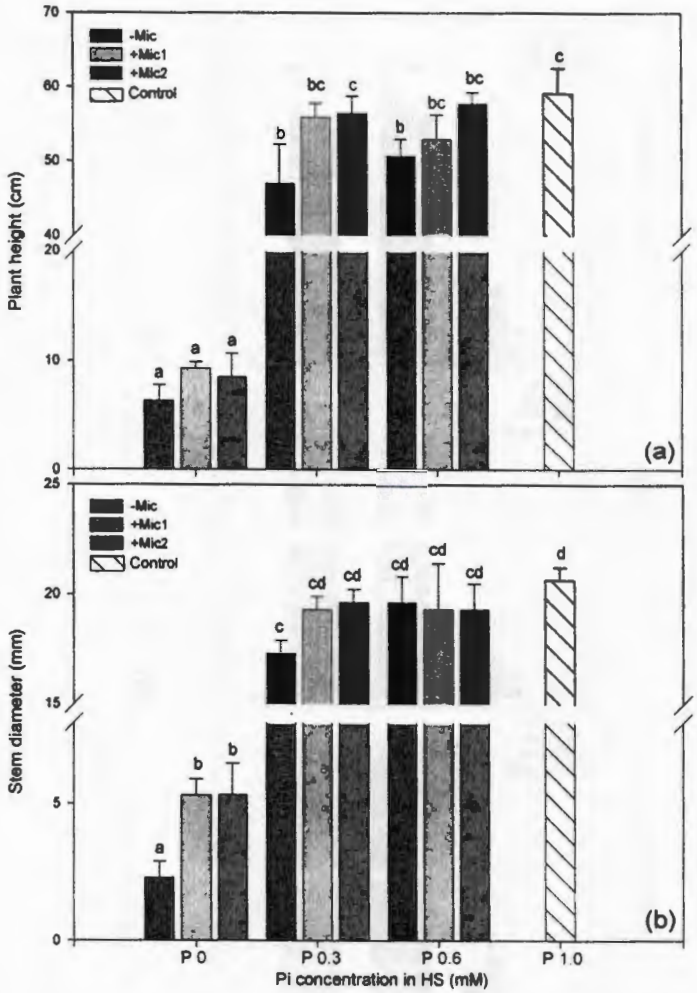


Figure 4.1. *Growth of papaya Maradol plants with or without mycorrhiza five weeks after AM association with the two strains of AM fungus* G. intraradices *began. A) plant height, b) stem diameter. Data are means ± standard deviation (n=5). Values with the same letter had no statistical difference (Tukey 95%).*

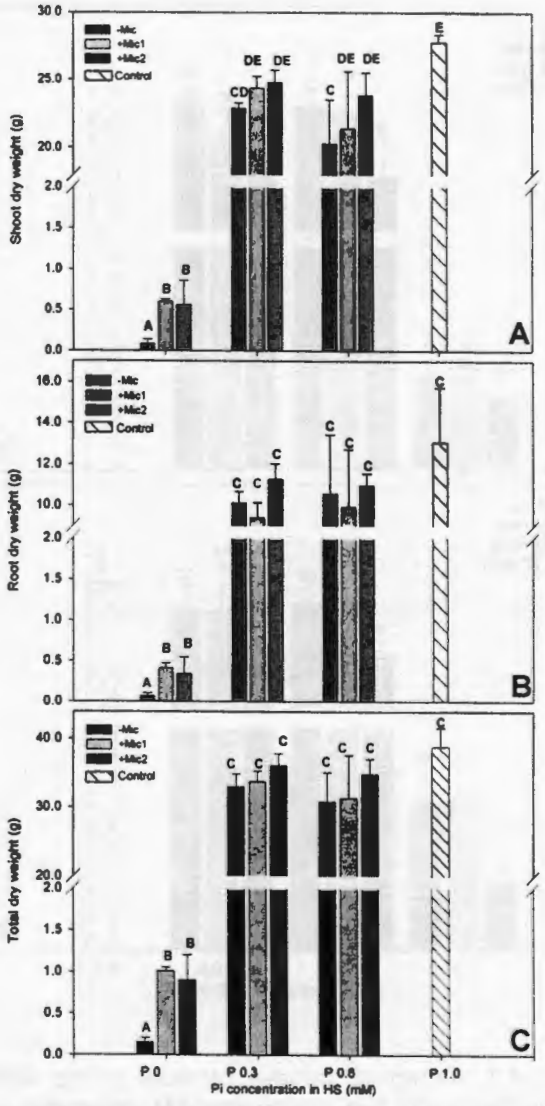


Figure 4.2. *Dry weight of papaya Maradol plants with or without mycorrhiza five weeks after AM association with the two strains of AM fungus* G. intraradices *began. A) shoots, b) roots and c) total dry weight. Data are means ± standard deviation (n=5). Values with the same letter had no statistical difference (Tukey 95%).*

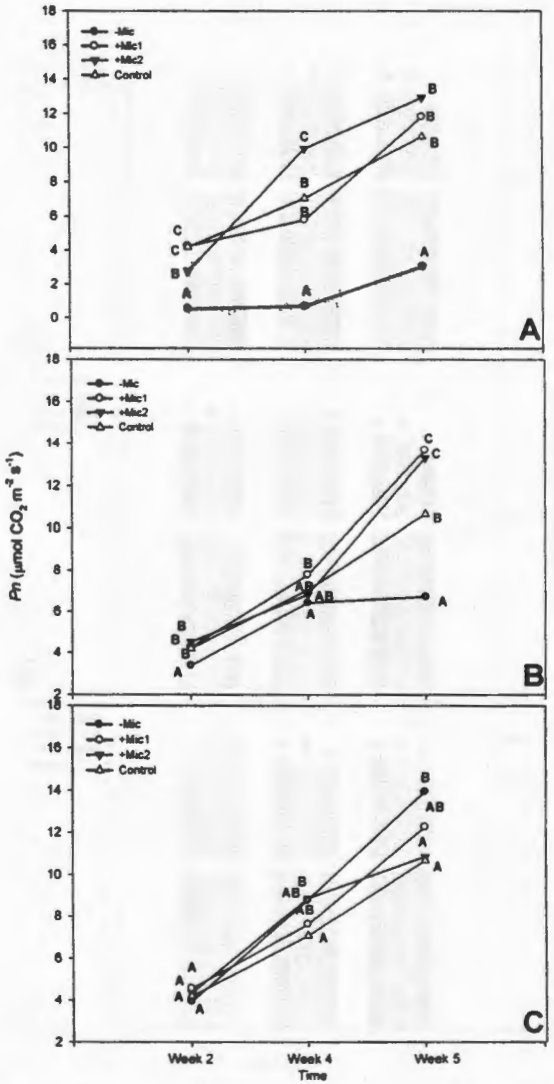


Figure 4.3. *Pn changes in papaya Maradol plants with or without mycorrhiza five weeks after AM association with the two strains of AM fungus* G. intraradices *began. a) Pi 0 mM, b) Pi 0.3 mM, c) Pi 0.6 mM. Data are means ± standard deviation (n=5). Values with the same letter in each time had no statistical difference (Tukey 95%).*

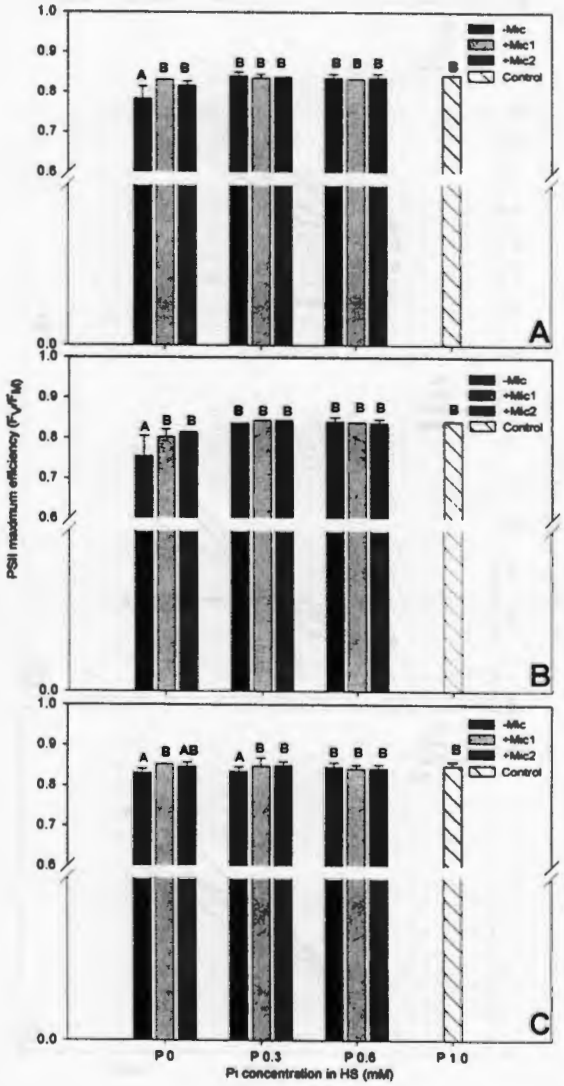


Figure 4.4. *PSII maximum efficiency (Fv/Fm) in papaya Maradol plants with or without mycorrhiza or associated with two strains of AM fungus* G. intraradices. *a) two weeks, b) four weeks, c) five weeks after AM association began. Data are means ± standard deviation (n=5). Values with the same letter had no statistical difference (Tukey 95%).*

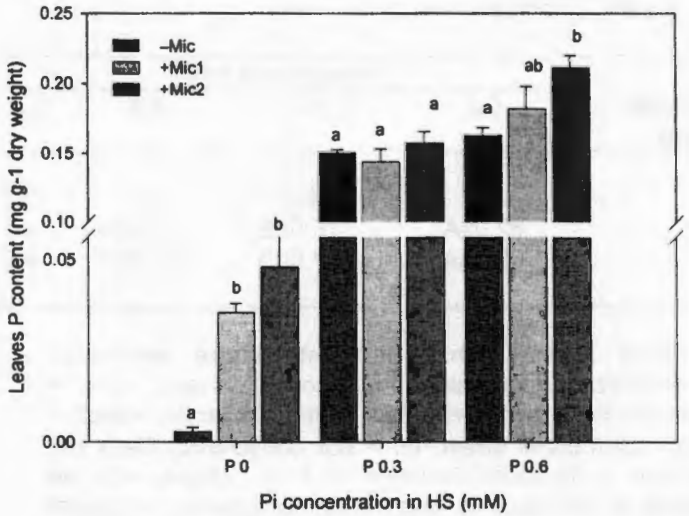


Figure 4.5. *Total leaves P content in papaya Maradol plants with or without mycorrhiza five weeks after AM association with the two strains of AM fungus* G. intraradices *began. Data are means ± standard deviation (n=5). Values with the same letter in each Pi concentration had no statistical difference (Tukey 95%).*

Table 4.1. Arbuscular mycorrhizal colonization (%) in roots of papaya Maradol plants five weeks after the AM colonization began

Mycorrhizal condition	Phosphorus (mM)			
	0.0	0.3	0.6	1.0 *
-Mic	0.0	0.0	0.0	0.0
+Mic 1	82.0aA	16.0aB	10.0aB	nc
+Mic 2	76.0aA	37.0bB	32.0Bb	Nc

* Total control with Pi 1.0 mM where arbuscular mycorrhizal colonization was not observed. –Mic = without mycorrhiza, +Mic1= commercial strain, +Mic2 = non-commercial strain, nc = not considered. Data are means ± standard deviation (n = 5). Values with the same small letter in each Pi concentration or capital letter in each mycorrhizal treatment had no statistical difference (Tukey 95%).

4.5. DISCUSSION

Our results indicate that both strains of *G. intraradices* were able to attenuate-the negative effect caused by low Pi supply on the growth (total DW) of papaya Maradol plants. One possible explanation for that could be the fact that mycorrhizal papaya Maradol plants kept more leaves than non mycorrhizal plants (data not shown) and that surely contributed to the larger shoot DW. With low Pi supply (0.3 mM) the AM association allowed that DW and plant height to remain similar to those at plants grown with higher Pi supply (0.6 mM) or even those at control plants. In other study models like strawberry (Sharma &

Adholeya, 2004) or *Medicago truncatula* (Smith *et al.*, 2004) it has also been reported that AM association reduces the stress due to the low Pi availability on plant growth. Some commercial papaya varieties like Baixinco, Tainung, Sunrise and Improved, also had greater dry matter production in association with AM fungi *G. clarum* and *Gigaspora margarita* (Trindade *et al.*, 2001). The fact that the growth response of papaya Maradol to the AM inoculation was greater, particularly at lower concentration of Pi, and that this response decreased at higher Pi concentration in HS, places papaya Maradol in the facultative arbuscular mycorrhizal species group.

The beneficial effect of AM association on papaya Maradol CO_2 assimilation is important because it indicates that somehow the mycorrhizal plants are capable of reducing the stress on the photosynthetic apparatus caused by the low availability of Pi.

It has been reported that the negative effect of the nutrient scarcity on the development of many crops is associated with the reduction of *Pn*, F_V/F_M and g_s, in corn (Lau *et al.*, 2006) while in sugar beet, the low Pi reduced CO_2 assimilation by 33% (Rao & Terry, 1995). This negative effect of low Pi supply can be related to many aspects such as reduction of chlorophyll *a* and *b*, affecting also, the PSI and PSII efficiency (Lau *et al.*, 2006). Furthermore, Pi is necessary to couple photosynthetic reactions in the dark and light phases, because of its structural and regulatory role in energy conservation and CO_2 assimilation (Epstein & Bloom, 2004).

The ratio variable fluorescence over maximum fluorescence (F_V/F_M) has been used as an important and easily measurable parameter of the physiological status of the photosynthetic apparatus in intact plant leaves. When plants grow in good conditions, the photosynthetic efficiency has values about 0.83 but when an environmental factor is stressing them, the PSII efficiency is affected and the F_V/F_M values fall (Krause & Weis, 1991). In the present work, the F_V/F_M values suggest that AM

association reduced the damage of Pi stress on the maximum efficiency of PSII.

On the other hand, it has been reported that AM colonization improves *Pn* in young leaves but this is not necessarily translated into an increased dry weight (Wright *et al.*, 1998a) as the gained carbon could be used to maintain the symbiosis in addition to growth (Wright *et al.*, 1998b). In the present work, the AM colonization benefit was reduced when papaya Maradol was fertilized with Pi 0.6 mM. This may be because, as it has been proposed by Olsson *et al.* (2002), under conditions of sufficient P the root reduced the carbon flow to the fungus, therefore the response of AM association to P sufficient conditions would depend on the P status of the colonized root.

Our results show that even without supply of added Pi in HS (0 mM), papaya Maradol plants associated with the AM fungus *G. intraradices* had higher leaf P content than their –Mic counterparts. It has been shown that the Pi taken up by AM fungus *G. intraradices* is delivered almost totally to the plant, contributing significantly to the plants P take up capacity from the soil (Smith *et al.*, 2004).

The higher P content reported in the present work in +Mic plants compared to those at –Mic plants in the absence of supplied Pi through the HS (Pi=0 mM), may be explained by the fact that the mycorrhizal association enabled plants to take up more Pi from that still present in the substrate from the pre-treatment Pi supply (see materials and methods).

The P foliar concentrations found in our experiments are in agreement with other reports (Rao & Terry, 1995). The total P reported here is on the range of those reported for other plant species (Ravnskov & Jakobsen, 1995; Cruz-Flores *et al.*, 1998; Burleigh *et al.*, 2002). The ranges of P content reported through the literature may be the result of the fact that in every case the Pi availability of the substrate is different, or because the P

uptake is different not as a result of the AM colonization intensity but perhaps because of differences in the expression of genes involved in Pi transport in the different species (Ravnskov & Jakobsen, 1995).

The AM colonization intensity in a plant is different depending on which AM fungi species is associated to (Smith *et al.*, 2004). Although, it has been reported that some times the mineral fertilization is not decreasing the AM colonization (Sharma & Adholeya, 2004; Gryndler *et al.*, 2006), in most cases it has been suggested that increased supply of Pi decreases the AM colonization in crops like wheat or pea (Ryan & Angus, 2003), *Zea mays* & *Cucurbita pepo* (Schroeder & Janos, 2005). In the present work, colonization decreased as the Pi concentration was reduced but at concentrations as high as 0.6mM Pi, AM colonization was not totally inhibited, particularly with +Mic2 (Table 4.1).

It is suggested that under the experimental conditions of this work, the papaya Maradol efficiency to take up Pi was increased when it was associated with *G. intraradices* resulting in higher *Pn* and dry weight than their non inoculated counterparts grown at the same Pi condition. Further more, Pn and F_V/F_M values found in +MIC plants at low Pi levels were closer to those of control plants grown without Pi limitation. However, the Pearson's coefficient shows low correlation between *Pn* and leaves P content (r=0.52 and 0.6 for +Mic1 and +Mic2, respectively) while the correlation coefficient between dry weight and leaves P content was high (r = 0.96) with the two strains of *G. intraradices* suggesting that AM association allowed more plant growth but part of photosynthates resulting from the increased *Pn,* were used to maintain the association.

From our results, it can be concluded that growth and *Pn* in papaya Maradol plants decreased strongly under low Pi supply. However, the AM association with *G. intraradices* contributed to

reduce the impact of the Pi scarcity on these parameters. On the other hand, it is suggested that the larger dry weight of AM plants, especially when Pi was not added in HS, was related to a better efficiency to take up Pi from their substrate. Finally, and despite the fact that AM association enhanced uptake of Pi and increased *Pn*, the lower correlation between them suggests that some photosynthates could had been used to maintain the symbiosis.

4.6. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Dra. Laura Hernández-Terrones and Melina Soto (CICY- CEA Quintana Roo, México) for performing the leaf P content evaluations and providing expert advise and to Dr. Alejandro Alarcón (Colegio de Postgraduados, Montecillo, México) for revising the manuscript.

4.7. REFERENCES

Alarcón A., F.T: Davies Jr, J.N., Egilla, T.C. Fox, A. Estrada-Luna and R. Ferrera-Cerrato (2002). *Short term effects of Glomus claroideum and Azospirillum brasilense on growth and root acid phosphatase activity of Carica papaya L. under phosphorus stress.* Revista Latinoamericana de Micología, 44(1), 31-37.

Al-Karaki G., B. McMichael and J. Zak (2004). *Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress.* Mycorrhiza, 14, 263-269.

Bohrer V., G. Kagan-Zur, N. Roth-Bejerano, D. Ward, G. Beck and E. Bonifacio (2003). *Effect of different Kalahari-desert VA mycorrhizal communities on mineral acquisition and depletion from the soil by host plants.* Journal of Arid Environments, 55, 193-208.

Burleigh S.H., T. Cavagnaro and I. Jakobsen (2002). *Functional diversity of arbuscular mycorrhizas extends to the expression of plant genes involved in P nutrition.* Journal of Experimental Botany, 53, 1593-1601.

Cruz-Flores G., S. Avilés Marín and J.C. Cortés Castelán (1998). *Estudio de adaptabilidad del triticale a diferentes dosis de calcio y fósforo en andisoles.* Terra, 16(1), 63-69.

Epstein E. and A.J. Bloom (2004). *Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives.* Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA. p.

Gryndler M., J. Larsen, H. Hršelová, V. Řezáčová, H. Gryndlerová and J. Kubát (2006). *Organic and mineral fertilization, respectively, increase and decrease the development of external mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in a long-term field experiment.* Mycorrhiza, 16, 159-166.

Hoagland D.R. and H.I. Arnon (1950). The water-culture method for growing plants without soil. California Experimental Agriculture Station Circular 347. Berkeley, 32 p.

Hoffman T., C. Kutter and J.M. Santamaría (2004). *Capacity of Salvinia minima Baker to tolerate and accumulate As and Pb.* Enginering Life Science, 4(1), 61-65.

Jacob J. and D.W. Lawlor (1991). *Stomatal and mesophyll limitations of photosynthesis in phosphate deficient sunflower, maize and wheat plants.* Journal of Experimental Botany, 42(241), 1003-1011.

Krause G.H. and E. Weis (1991). *Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics.* Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 42, 313-349.

Lau T.S.L., E. Eno, G. Goldstein, C. Smith and D.A. Christopher (2006). *Ambient levels of UV-B in Hawaii combined with nutrient deficiency decrease photosynthesis in near-isogenic maize lines varying in leaf flavonoids: Flavonoids decrease photoinhibition in plants exposed to UV-B.* Photosynthetica, 44(3), 394-403.

Marschner H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants.* Academic Press. San Diego, C.A. 889 p.

Martin CA and J.C. Stutz (2004). *Interactive effects of temperature and arbuscular mycorrhizal fungi on growth, P uptake and root respiration of Capsicum annuum L.* Mycorrhiza, 14, 241-244.

Mortimer PE, E. Archer and A.J. Valentine (2005). *Mycorrhizal C costs and nutritional benefits in developing grapevines.* Mycorrhiza, 15, 159-165.

Olsson P.A., I.M. Van Aarle, W.G. Allaway, A.E. Ashford and H. Rouhier (2002). *Phosphorus effects on metabolic processes in monoxenic arbuscular mycorrhiza cultures.* Plant Physiology, 130, 1162-1171.

Phillips J.M. and D.S. Hayman (1970). *Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of*

infection. Trans. British Mycological Society, 55, 158-161.

Raghothama K.G. (1999). *Phosphate acquisition.* Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 50, 665-693.

Ravnskov S. and I. Jakobsen (1995). *Functional compatibility in arbuscular mycorrhizas measured as hyphal P transport to the plant.* New Phytologist, 129, 611-618.

Rao I.M. and N. Terry (1995). *Leaf phosphate status, photosynthesis, and carbon partitioning in sugar beet. IV. Changes with time following increased supply of phosphate to low-phosphate plants.* Plant Physiology, 107, 1313-1321.

Ripley B.S., S.P. Redfern and J. Dames (2004). *Quantification of the photosynthetic performance of phosphorus-deficient Sorghum by means of chlorophyll-a fluorescence kinetics.* South African Journal Scientific, 100, 615-618.

Ryan M.H. and J.F. Angus (2003). *Arbuscular mycorrhizae in wheat and field pea crops on a low P soil: increased Zn-uptake but no increase in P-uptake or yield.* Plant Soil, 250, 225-239.

Sharma M.P. and A. Adholeya (2004). *Effect of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus fertilization on the post vitro growth and yield of micropropagated strawberry grown in a sandy loam soil.* Canadian Journal of Botany, 82, 322-328.

Schachtman D.P., R.J. Reid and S.M. Ayling (1998). *Phosphorus uptake by plants: from soil to cell.* Plant Physiology, 116, 447-453.

Smith S.E. and D.J. Read (1990). Uptake, translocation and transfer of nutrients in mycorrhizal symbioses, in *Mycorrhizal Symbiosis*, Smith, S.E.and J.D. Read (eds). Academic Press. pp. 379-308.

Smith S.E., F.A. Smith and I. Jakobsen (2004). *Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not*

correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. New Phytologist, 162, 511-524.

Schroeder M.S. and D.P. Janos (2005). *Plant growth, phosphorus nutrition, and root morphological responses to arbuscular mycorrhizas, phosphorus fertilization, and intraspecific density.* Mycorrhiza, 15, 203-216.

Trindade A.V., J.O. Siquiera and F. Pinto de Almeida (2001). *Dependencia micorrízica de variedades comerciais de mamoeiro.* Pesquisa Agropecuaria. Brasileira, Brasilia, 36, 1485-1494.

Van der Heijden M.G.A., R. Streitwolf-Engel, R. Riedl, S. Siegrist, A. Neudecker, K. Ineichen, T. Boller, A. Wiemken and I.R. Sanders (2006). *The mycorrhizal contribution to plant productivity, plant nutrition and soil structure in experimental grassland.* New Phytologist, 172, 739-752.

Wright D.P., J.D. Scholes and D.J. Read (1998a). *Effects of VA mycorrhizal colonization on photosynthesis and biomass production of Trifolium repens L.* Plant Cell and Environment, 21, 209-216.

Wright D.P., D.J. Read and J.D. Scholes (1998b). M*ycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of Trifolium repens L.* Plant Cell and Environment, 21, 881 - 891.

Capítulo 5

Discusión general y conclusiones generales

5.1. DISCUSIÓN GENERAL

La simbiosis micorrízica puede ser encontrada en diversos ambientes a través del mundo, afectando la biodiversidad vegetal y el funcionamiento de los ecosistemas. Aunque los mecanismos aún no son comprendidos del todo, se ha constatado que los hongos micorrízicos tienen una contribución importante en la nutrición fosforada de las plantas y el consecuente impacto sobre su adecuado desarrollo. Además de ser importante para los ecosistemas naturales, los atributos de la asociación micorrízica hacen que sea un componente esencial también de los sistema agrícolas sustentables (Harrison *et al.*, 2002). Debido a que se ha reportado que la asociación micorrízica arbuscular afecta positivamente una gran cantidad de plantas de interés económico, en este estudio se evaluó el efecto de la simbiosis micorrízica sobre el desarrollo de una planta que no crece en ambientes naturales, sino que ha sido producida para su cultivo en agrosistemas altamente tecnificados en aras de alcanzar altos niveles de producción.

Aunque el papel benéfico de la simbiosis micorrízica ha sido observado con frecuencia, también se ha reportado que la inoculación micorrízica induce el detrimento de la productividad de las plantas (Schroeder & Janos, 2004). La fotosíntesis puede ser afectada negativamente por la micorriza arbuscular, hecho que puede ser transitorio, recuperándose posteriormente de forma que las plantas alcanzan niveles fotosintéticos

mayores a los de las plantas sin micorrizar (Calantziz, 2002, citado por Correa *et al.*, 2006), En el presente trabajo los resultados sugieren que la fotosíntesis en papaya Maradol fue estimulada por la micorriza arbuscular en plantas fertilizadas con solución nutritiva con Pi en baja concentración, obteniéndose valores estadísticamente semejantes a los de las plantas micorrizadas con mayor disponibilidad de Pi, y mayores a los de las plantas sin micorrizar.

La micorriza arbuscular favoreció el crecimiento de la papaya Maradol, especialmente de aquellas plantas que tuvieron aporte de Pi en concentraciones menores a la concentración de la solución nutritiva sin modificar. En las plantas que recibieron SH con las concentraciones de fósforo mas altas tanto la colonización micorrízica como el efecto benéfico sobre las plantas fueron generalmente deprimidos. Los datos obtenidos confirman que en estas plantas, como en otras plantas tanto de sistemas naturales como en plantas de sistemas agrícolas que suelen recibir aporte continuos y suficientes para su crecimiento, la micorriza arbuscular tuvo comportamientos similares, es decir, que la baja disponibilidad de Pi promovió generalmente porcentajes altos de colonización micorrízica e indujo un mayor efecto benéfico sobre el crecimiento de las plantas. Al incrementarse la disponibilidad de Pi, tanto la intensidad de colonización como su efecto sobre las plantas disminuyeron en función del incremento de la disponibilidad de Pi. Es importante, sin embargo, aclarar que la intensidad de colonización no se correlaciona con el grado de beneficio de la micorriza.

En este trabajo de investigación, se comprobó que en términos de crecimiento hubo un beneficio de la micorriza para papaya Maradol particularmente notoria ante la baja disponibilidad de Pi. Aunque siempre por arriba de lo cuantificado para las plantas sin micorrización, el peso seco de las plantas micorrizadas presentó variaciones de un experimento a otro, lo cual puede explicarse porque el volumen y frecuencia del

aporte de solución nutritiva no fueron iguales para todos los experimento.

El impacto de la colonización micorrízica sobre la fotosíntesis y el consecuente crecimiento de papaya Maradol puede ser atribuido a una mejor capacidad de absorción de Pi, lo cual se sugiere a partir de que ante igual deficiencia en la disponibilidad de Pi, las plantas micorrizadas tuvieron mayor capacidad de fotosíntesis, estimada en términos de asimilación de CO_2.

En cuanto al efecto de la micorriza arbuscular sobre las relaciones hídricas de papaya Maradol, en este trabajo no se observó con claridad si hay o no efecto alguno debido a que no se detectaron diferencias significativas entre los resultados de los diferentes tratamientos. Al respecto, si bien se tienen referencias que evidencian al efecto benéfico de la MA como factor de protección para las plantas, los resultados obtenidos en este trabajo no permiten concluir que la micorriza arbuscular beneficia a papaya Maradol debido a que ciertos factores pueden haber enmascarado el efecto real. Si bien las plantas con bajo aporte de agua en general mostraron una reducción de su crecimiento, no se encontró que las relaciones hídricas y el estado de hidratación de las hojas de papaya Maradol fuera diferente entre plantas micorrizadas y no micorrizadas, como tampoco entre plantas con bajo y alto aporte agua. Esto puede ser básicamente por dos razones, 1) que la diferencia entre lo que denominamos bajo aporte y alto aporte de agua no haya sido suficiente para causar efectos notorios en estas variables, 2) que el uso de agrolita como sustrato no haya sido adecuado debido a que es capaz de retener de 40% a 50% de agua en volumen (http://www.agrolita.com.mx/agrolita.htm) de manera que aún las plantas etiquetadas como con bajo aporte de agua, tanto por el volumen como por la frecuencia de aplicación, en realidad no hayan sido sometidas a estrés por deficiencia hídrica. De acuerdo con estos resultados, se considera necesario diseñar nuevos experimentos utilizando otros

sustratos que aseguren un efecto mínimo en la disponibilidad de Pi pero que, al mismo tiempo, garanticen que las plantas estarán efectivamente sometidas a estrés por baja disponibilidad de agua.

Finalmente y dado que la papaya Maradol es un cultivo de gran interés agronómico, el traslado de los experimentos a campo permitiría valorar si la micorrización inducida en invernadero es capaz, por un lado, de mantenerse bajo las condiciones de cultivo de este frutal y por el otro lado, de brindar a las plantas un beneficio que se traduzca finalmente en crecimiento y productividad adecuados.

5.2. CONCLUSIONES GENERALES

Con base en los resultados obtenidos en esta investigación se concluye que:

1. El crecimiento y la fotosíntesis en papaya Maradol fueron fuertemente deprimidas ante el aporte de solución nutritiva con baja concentración de Pi. Sin embargo, su asociación con el hongo micorrizógeno *Glomus intraradices*, le permitió atenuar el impacto de la escasez de Pi sobre estas dos variables.

2. En las plantas micorrizadas y fertilizadas con deficiencia de Pi se encontró mayor contenido de P en las hojas que en sus contraparte no micorrizadas, por lo que se sugiere que el mayor peso seco de las plantas, se relacionó con el incremento en la eficiencia de las plantas micorrizadas para tomar el Pi contenido en el sustrato.

3. Los datos de potencial hídrico y contenido relativo de agua fueron prácticamente iguales entre los tratamientos de manera que con los resultados obtenidos, bajo las condiciones experimentales de esta investigación, no es posible aseverar si hay o no hay efecto de la micorriza arbuscular sobre las relaciones hídricas ni sobre el estado hídrico de papaya Maradol.

4. Con base en el contenido de sacarosa y almidón en las hojas de papaya Maradol micorrizada con bajo aporte de Pi, se sugiere que hacia el final del experimento en las plantas micorrizadas hubo suficiente Pi para realizar el intercambio con triosa fosfato, por lo que la acumulación de almidón fue menor, y que la sacarosa podría haberse movilizado hacia las raíces para cubrir la demanda de la simbiosis.

5. Se corroboró que al igual que sucede en otros modelos de estudio, la disponibilidad de Pi impactó sobre el grado de colonización micorrízica. Se determinó que la menor concentración de fósforo promovió mayor colonización micorrízica y ésta, a su vez, mayor beneficio para las plantas.

5.3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Harrison M.J., G.R. Dewbre and J. Liu (2002). *A phosphate transporter from Medicago truncatula involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi*. Plant Cell, 14, 2413-2429.

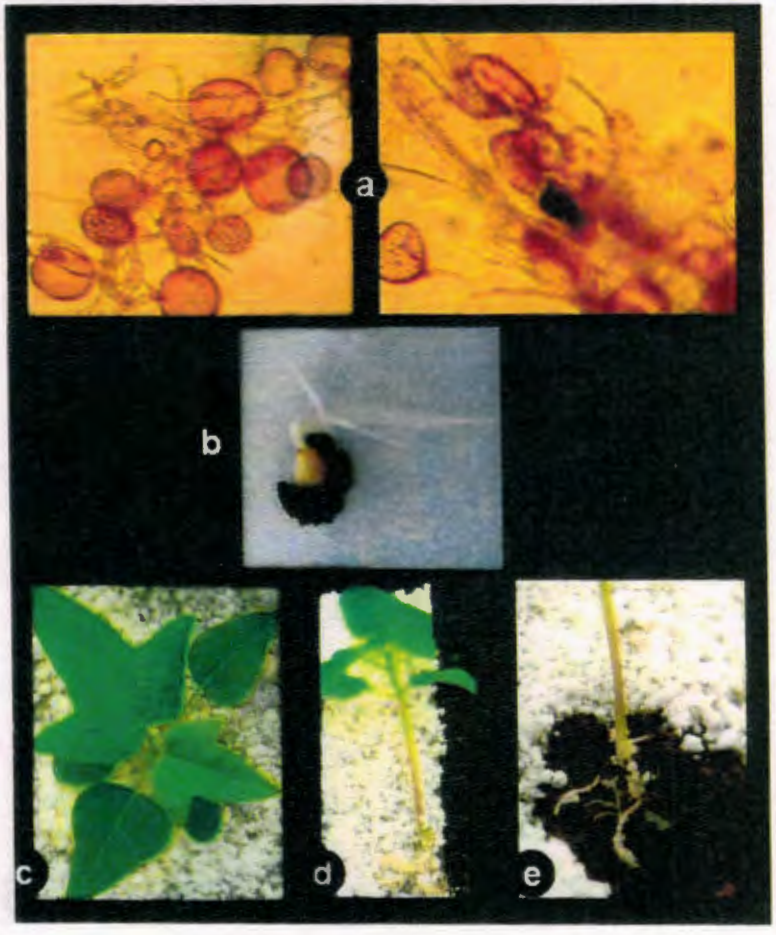
Calantziz C. (2002). *Rôle de la mycorrhize dans la modulation du stress chez les plantes: evaluation par de approaches de biophysique*. Ph D thesis, Universitè de Genéve.

Correa A., R.J. Strasser and M.A. Martins-Loução (2006). *Are mycorrhiza always beneficial?*. Plant Soil, 279, 65-73.

ANEXOS

ANEXO 1

Material biológico utilizado en la evaluación del efecto de la asociación micorrízica arbuscular sobre la papaya Maradol. a) *Glomus intraradices*, b) semilla de papaya Maradol germinada, c) fronda, d) altura de las plantas al trasplante y, e) aplicación del inóculo micorrízico sobre las raíces.

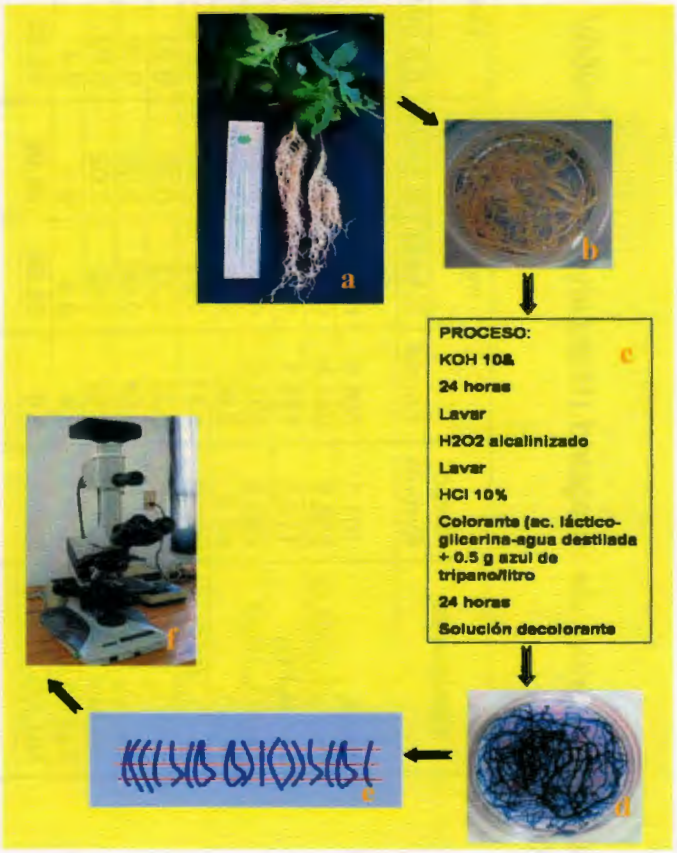


ANEXO 2

Solución nutritiva de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950)* modificada en su contenido de fósforo.

Compuesto	Peso fórmula	mg/L			Concentración por elemento		
		1.0mM	0.1mM	0.3 mM	0.6 mM	Elemento	Concentración
KNO_3	101.1	606.6	606.6	606.6	606.6	N	15.0 mM
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	236.2	944.8	944.8	944.8	944.8	P	1.0 mM
$NH_4H_2PO_4$	**115.1**	**115.1**	**11.51**	**34.53**	**69.06**	K	2.32 mM
$MgSO_4.7H_2O$	246.5	493.0	493.0	493.0	493.0	Ca	4.0 mM
H_3BO_3	61.8	2.86	2.86	2.86	2.86	Mg	2.0 mM
$MnCl_2.4H_2O$	200.0	1.81	1.81	1.81	1.81	S	0.784 mM
$ZnSO_4.7H_2O$	287.5	0.22	0.22	0.22	0.22	Mn	9.05 µM
$CuSO_4.5H_2O$	249.5	0.08	0.08	0.08	0.08	Zn	0.765 µM
$Na_2MoO_4.2H_2O$	241.96	0.02	0.02	0.02	0.02	Cu	0.321 µM
FeEDTA	376	9.4	9.4	9.4	9.4	B	46.3 µM
NH_4NO_3	**80.04**	**0.0**	**35.00**	**28.00**	**16.00**	Mo	0.083 µM
						Fe	25 µM

*Fuente: http://users.ipfw.edu/BoselaM/HORT101-B/PLANT%MINERAL%20NUTRITION.doc

ANEXO 3

Aclaramiento y tinción de raíces. a) raíz limpia, b) segmentos de raíces listas para la tinción, c) proceso de aclaración y tinción de raíces, d) raíces teñidas, e) portaobjetos con segmentos de raíces teñidas (1 cm), f) colocación del portaobjetos en el microscopio óptico para observar (10X) y g) observación y registro de la presencia ausencia de estructuras micorrízicas arbusculares.