



RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

Lizardo Maradiaga, Karla Giannina

Hongos micorrícicos arbusculares en el cultivo de frutilla : efectos en el rendimiento, defensa oxidativa y nutrición en condiciones de estrés hídrico



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Lizardo Maradiaga, K. G. (2023). *Hongos micorrícicos arbusculares en el cultivo de frutilla: efectos en el rendimiento, defensa oxidativa y nutrición en condiciones de estrés hídrico. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/5249>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Hongos micorrícicos arbusculares en el cultivo de frutilla: efectos en el rendimiento, defensa oxidativa y nutrición en condiciones de estrés hídrico.

TESIS DE MAESTRÍA

Karla Giannina Lizardo Maradiaga

kaliza230726@gmail.com

Resumen

Los hongos micorrícicos arbusculares (MA) son simbioses de raíces que colonizan la mayoría de las plantas existentes y que han demostrado que otorgan beneficios a sus huéspedes orientados a la mejora de crecimiento y adquisición de nutrientes lo que tiene mucha importancia desde el punto de vista agrícola. El objetivo general de este trabajo consistió en la evaluación de los efectos benéficos que los hongos MA son capaces de aportar al cultivo de frutilla en sustrato hidropónico, como se viene produciendo en el periurbano dentro cinturón hortícola del AMBA. Se busca promover el uso de hongos MA en este tipo de cultivo para optimizar su manejo disminuyendo el impacto ambiental y a la salud que provocan los agroquímicos. Se analizaron las correlaciones entre los parámetros de rendimiento y bioquímicos con el desempeño frente al estrés hídrico de las plantas de frutilla inoculadas con tres cepas de hongos MA en comparación con las plantas no inoculadas analizando el crecimiento, la defensa al estrés oxidativo y absorción de nutrientes de las plantas creciendo en un sistema hidropónico bajo condiciones déficit hídrico. Según lo observado se determinó que la inoculación con la Cepa B1 de *Rhizophagus irregularis*, aislada del ambiente de Bosque Ribereño de la Provincia de Buenos Aires, en condiciones de riego óptimo sin limitaciones de agua para las plantas de frutilla (100% CC), y la Cepa F36 de *Claroideoglomus etunicatum*, aislada de la región del Monte de la Provincia de La Rioja, en condiciones de deficiencia hídrica moderada a grave (30-40% CC), generaron mejoras en el rendimiento de los parámetros de crecimiento en las plantas inoculadas, y esto no se correlacionó con los porcentajes de micorrización que para ambas cepas no fueron los más altos. Mientras que la cepa F37 de *Rhizophagus intraradices*, aislada de la región del Monte de la Provincia de La Rioja mostró los porcentajes de colonización más altos, pero esto no se correlacionó con el rendimiento de las plantas, aunque sí lo hizo con la actividad de la enzima detoxificante catalasa en raíz que bajo condición limitante de riego

moderado a severo mostró los valores más altos, lo que indica que la protección oxidativa se centró en la raíz.

Palabras claves: microorganismos fúngicos beneficiosos, frutilla, promoción del crecimiento, estrés hídrico.



MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA CON ORIENTACIÓN EN AGROALIMENTOS

Universidad Nacional de Quilmes

Tesis de Maestría

**HONGOS MICORRÍDICOS ARBUSCULARES EN EL CULTIVO DE
FRUTILLA: EFECTOS EN EL RENDIMIENTO, DEFENSA OXIDATIVA Y
NUTRICIÓN EN CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO.**

Aspirante

Karla Giannina Lizardo Maradiaga

Directora

Laura Fernández Bidondo¹

Codirectora

María Josefina Bompadre¹

Bernal, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Mayo, 2023

¹ Laboratorio Micología molecular. Departamento de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Quilmes.

DEDICATORIA

Para mi papi, de tu siempre niña.

Esto es para usted.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por escuchar mis oraciones.

Hay tantas personas que me acompañaron en este camino, tantas manos que me ayudaron y de corazón les agradezco; A mis hijas, Isa y Sol por aceptarme y amarme, con lágrimas en sus ojos me dejaron venir a la Argentina creyendo en mí, ustedes son las personitas más importantes en mi vida. A mi mami Feli y mi hermanita Ally por ser nuestro hogar, mi madre que me ama y de la que siempre he recibido el apoyo más grande, la mujer que me da alas para crecer y creer en mí. A mi tía Ceci que nunca nos dejó, que a pesar de las dificultades se quedó con nosotras cuidándonos, no tengo cómo agradecer tanto amor y a Carmen mi hermana de corazón que su amor y apoyo lo he tenido desde que nos conocimos.

Al programa de becas LATAM Study in BA del Gobierno de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y la Universidad Nacional de Quilmes por abrirme las puertas, por darme la oportunidad y apoyo económico para realizar mis estudios de posgrado. A Lau, Jose y Beti, ha sido una bendición conocerlas, por su disposición en adoptarme y el cariño al enseñarme, he aprendido tanto de ustedes en lo científico y como persona, sin ustedes no lo habría logrado he hice amigas para toda la vida. Así también agradezco a todos los investigadores del laboratorio de Micología Molecular-UNQ por recibirme y a todos mis docentes que cada uno aportó tanto en mi formación que hizo que me enamorara aún más de la biotecnología.

A mi familia hondureña, mis hermanos, tíos, sobrinos, amigos que sus palabras, apoyo y ayuda incondicional me impulsaron en todo momento. A la familia argentina que me hizo sentir en casa a pesar de estar a miles de kilómetros de la mía, Graciela y su familia por recibirme y cuidarme tanto, Eri y Noe que nos escogimos como amigas y mis compañeros de cursada que han sido unos lindos y juntitos logramos la meta. Fueron tantas vivencias, gente y lugares increíbles los que conocí en este hermoso país, donde el compartir y el cariño es parte del vivir.

Para mí esto es un sueño cumplido, uno que por mucho tiempo creí que no lograría, pero Dios lo hizo posible y en el tiempo perfecto. No tengo palabras para describir el sinnúmero de emociones que siento, solo puedo decir un enorme **GRACIAS**.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Portada	
Resumen y palabras claves.....	1
Dedicatoria.....	2
Agradecimientos.....	3
Abreviaturas.....	10
Introducción	
- Producción de frutilla en Argentina: cultivo periurbano.....	13
- Hongos formadores de micorrizas arbusculares: su importancia en la biodiversidad de los agroecosistemas.....	18
- Hongos formadores de micorrizas arbusculares como promotores de crecimiento en los cultivos.....	20
- Estrés abiótico y su relación con los hongos formadores de micorrizas arbusculares.....	21
- Parámetros bioquímicos relacionados con la defensa antioxidante en plantas.....	23
Objetivos e hipótesis.....	26
Metodología	
Parte 1: Análisis preliminar de los hongos micorrícicos arbusculares en el cultivo de frutilla.....	28
- 1.1 Caracterización de hongos micorrícicos arbusculares en suelos y sustratos para el cultivo de frutilla en el AMBA.....	28
- 1.2 Evaluación en condiciones de invernadero del cultivo de frutillas en sistema sin suelo y su interacción con los hongos micorrícicos arbusculares.....	30
- 1.2.1 Preparación del material vegetal.....	31
- 1.2.2 Detección molecular de hongos MA.....	32
- 1.2.3 Preparación de inóculos de hongos micorrícicos arbusculares.....	33

- 1.2.4 Determinación de la capacidad de contenedor del sustrato.....	34
Parte 2: Evaluación de la resistencia al estrés abiótico del cultivo: ensayo de estrés hídrico en plantas de frutilla.....	35
- 2.1 Parámetros de rendimiento del huésped vegetal.....	36
- 2.2 Parámetros bioquímicos y enzimáticos.....	36
2.2.1 Extracción enzimática.....	33
2.2.2 Proteínas totales.....	37
2.2.3 Catalasa.....	37
2.2.4 Glutamina sintetasa.....	38
2.2.5 Guaiacol peroxidasa.....	38
2.2.6 Fósforo inorgánico.....	39
2.2.7 Análisis estadístico de los datos obtenidos.....	39
Resultados	
Parte 1: Análisis preliminar de los hongos micorrícicos arbusculares en el cultivo de frutilla.....	41
- 1.1 Caracterización de hongos micorrícicos arbusculares en suelos y sustratos para el cultivo de frutilla en el AMBA.....	41
- 1.2 Evaluación en condiciones de invernadero del cultivo de frutillas en sistema sin suelo y su interacción con los hongos micorrícicos arbusculares.....	45
1.2.1 Determinación de marchitez incipiente y la capacidad de contenedor del sustrato.....	47
1.2.2 Evaluación de la colonización micorrícica.....	49
Parte 2: Evaluación de la resistencia al estrés abiótico del cultivo de frutilla: ensayo de estrés hídrico en plantas micorrizadas.....	58
- 2.1 Determinación de parámetros de rendimiento.....	59
2.1.1 Peso fresco.....	60

2.1.2	Peso Seco.....	62
2.1.3	Contenido de agua.....	64
2.1.4	Relación Vástago:Raíz.....	65
2.1.5	Dependencia Micorrícica Relativa.....	66
- 2.2	Determinación de parámetros bioquímicos.....	67
2.2.1	Proteínas Totales.....	68
2.2.2	Catalasa.....	70
2.2.3	Glutamina sintetasa,.....	72
2.2.4	Guaiacol peroxidasa.....	74
2.2.5	Fósforo inorgánico.....	76
2.2.7	Análisis de componentes principales.....	78
Discusión		
-	Conclusiones del manejo del cultivo de frutilla en sistema hidropónico.....	83
-	Conclusiones sobre el efecto de las inoculaciones sobre el cultivo de frutilla en sistema hidropónico.....	86
-	Conclusiones finales.....	88
Referencias bibliográficas.....		91
Anexos.....		99

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura. 1: Esquema de una planta de frutilla.....	14
Figura 2. Producción de frutilla a campo en zona periurbana del partido de Escobar, AMBA norte, y preparación de los camellones en el suelo previos a la implantación del cultivo.....	17
Figura 3. Esquema de la colonización endomicorrícica en las raíces de una planta hospedadora.....	19
Figura 4. a: Variabilidad en el tamaño de los plantines de frutilla al momento de su recepción.....	32
Figura 5. Hallazgos en el establecimiento de producción de frutillas en suelo LH.....	43
Figura 6. Hallazgos en el establecimiento de producción de frutillas en hidroponía con sustrato EC.....	44
Figura 7. Productos de amplificación de ADN genómico de la cepa nativa originaria de los suelos de rustificación de los plantines de frutilla.....	46
Figura 8. Valores de CE y pH del sustrato de las plantas de frutilla inoculadas.....	47
Figura 9. Porcentajes de CC en el sustrato de plantas de frutilla inoculadas con las cepas F36, F37, B1 y planta de frutilla con signos de marchitez incipiente.....	48
Figura 10. Control de infectividad de inóculos en maíz.....	49
Figura 11. Colonización de las plantas de frutilla a los 30 días de la inoculación.....	50
Figura 12. Colonización de las plantas de frutilla a los 60 días de la inoculación.....	51
Figura 13. Colonización de las plantas de frutilla a 90 días de la inoculación.....	52
Figura 14. Colonización de las plantas de frutilla a 120 días de la inoculación.....	54
Figura 15. Comparación de porcentaje de arbuscúlos y vesículas de las plantas inoculadas a los 30, 60, 90 y 120 días de la inoculación.....	56

Figura 16. Estructuras de hongos MA observadas en raíces de plantas de frutilla.....	57
Figura 17. Material vegetal del tratamiento ES al momento de ser cosechado para su procesamiento.....	58
Figura 18. Valores de peso fresco de vástagos.....	60
Figura 19. Valores de peso fresco de raíz.....	61
Figura 20. Valores de peso seco de vástagos.....	62
Figura 21. Valores de peso seco de raíz.....	63
Figura 22. Relación Vástago:Raíz.....	65
Figura 23. Porcentaje de DMR.....	66
Figura 24. Concentración de proteínas totales del extracto de vástago y raíz.....	69
Figura 25. Actividad de la enzima catalasa del extracto de vástago y raíz.....	71
Figura 26. Actividad de la enzima glutamina sintetasa del extracto de vástago y raíz.....	73
Figura 27. Actividad de la enzima guaiacol peroxidasa del extracto de vástago y raíz.....	75
Figura 28. Concentración de fósforo inorgánico del extracto de vástago y raíz.....	77
Figura 29. Análisis de componentes principales de las variables de rendimiento.....	79
Figura 30. Análisis de componentes principales de las variables de rendimiento y bioquímicas medidas en vástago.....	80
Figura 31. Análisis de componentes principales de las variables de rendimiento y bioquímicas medidas en raíz.....	81

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Producción de frutilla en la Argentina en los años 2016-2020.....	15
Tabla 2. Valores obtenidos del análisis de las muestras de suelo medidos en establecimientos de producción en sustrato (EC) y producción en suelo directo (LH).....	41
Tabla 3. Significancia de los tratamientos y sus interacciones basadas en el ANOVA factorial, realizado sobre las variables de rendimiento.....	59
Tabla 4. Valores de contenido de agua de vástago y raíz de los tratamientos ES y BR.....	64
Tabla 5. Significancia de los tratamientos y sus interacciones basadas en el ANOVA factorial, realizado sobre las variables bioquímicas.....	67

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

atm: atmósferas

°C: grados Centígrados

CAT: catalasa

CE: Conductividad eléctrica

cm: centímetro

dS/m: decisiemens por centímetro

g: gramo

GS: glutamina sintetasa

GPX: guaiacol peroxidasa

ha: hectáreas

K: potasio

KDa: Kilodaltons

L: litros

MA: micorrízico arbusculares

MER: micelio extra radical

M: molar

mM: milimolar

MA: micorrízico arbusculares

MER: micelio extra radical

mm: milímetro

ml: mililitro

mg: miligramo

min: minuto

N: nitrógeno

nm: nanómetro

P: fósforo

Pcia: provincia

Pi: fósforo inorgánico

PF: peso fresco

PO₄-P: ortofosfato inorgánico

PS: peso seco

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PROT: proteínas totales

r.p.m: revoluciones por minuto

µm: micrómetro

µL: microlitro

µg: microgramo

INTRODUCCIÓN



Producción de frutilla en Argentina: cultivo periurbano

La frutilla (*Fragaria sp.*) es una planta que pertenece a la familia de las Rosáceas, desarrolla un fruto agregado, botánicamente un eterio, formado por un receptáculo floral muy desarrollado, el cual la parte comestible o fruta es la que sostiene a los verdaderos frutos que son aquenios (Navarro-Aranda y Muñoz-Garmendia, 1998). Junto a otras frutas, conforma los llamados “frutos del bosque” o “*berries*” y como tal, se destaca por sus cualidades hipocalóricas, antioxidantes y nutritivas. Por su buen sabor y aroma, tradicionalmente se utiliza para el consumo fresco, y congelada se procesa para dulces y mermeladas e integra un número importante de productos como yogures, confituras y conservas (SENASA, 2012)

Las plantas de frutilla (Figura 1) son de hábito rastrero, presentan un tallo central o corona al ras del suelo del que se originan estolones en cuyos extremos se forman plántulas idénticas a la planta madre. La corona lleva las yemas tanto vegetativas como florales y de ellas nacen las hojas, las inflorescencias y los estolones. Sus hojas dispuestas de forma arrosetada, son trifoliadas, fuertemente aserradas, de pecíolo largo y lámina de color verde intenso en su cara superior y pseudo pubescentes en su cara inferior, con una gran cantidad de estomas. Las flores son de color blanco, ubicadas en inflorescencias largas, pero generalmente más cortas que las hojas, siendo polinizadas por insectos y por el viento (Navarro-Aranda y Muñoz-Garmendia, 1998).

Desde el punto de vista agronómico, la frutilla es un cultivar octoploide ($2n = 8 \times = 56$) originado hace aproximadamente 300 años (*Fragaria* × *ananassa* Duchesne ex Rozier) a partir de híbridos espontáneos entre eco tipos no simpátricos de las especies silvestres: *Fragaria chiloensis* (L.) Mill. subsp. *chiloensis* de América del Sur y *Fragaria virginiana* subsp. *virginiana* de América del Norte. (Whitaker et al., 2020).

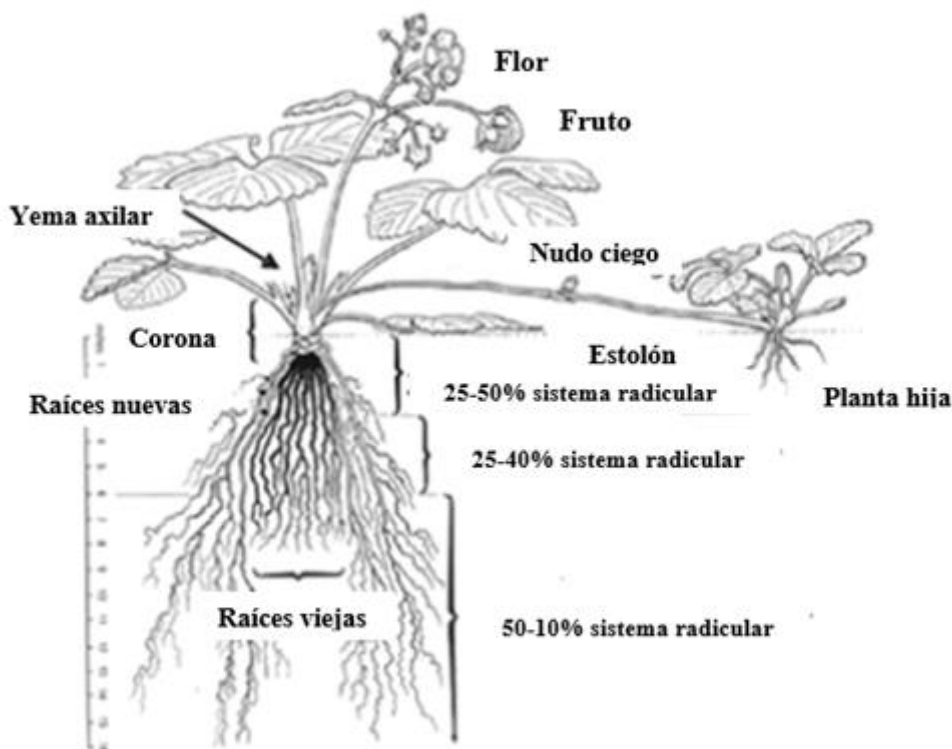


Figura 1: Esquema de una planta de frutilla. Modificado de Miserendino (2012)

Desde entonces el mejoramiento genético ha generado variedades, de las cuales se destacan por su preponderancia en la producción argentina: San Andreas, Albión, Fortuna y Aromas. (INTA-CMCBA 2019). Estos cultivares poseen mejoras en sus características fenotípicas que ofrecen mayores rendimientos, mejorando el tamaño de fruta, sabor y aroma y aumentando la calidad y conservación postcosecha. En Argentina el consumo de frutillas se concentra en los meses de septiembre y octubre, dependiendo del precio relativo de la fruta disponible en cada estación, rondando 1kg/año/habitante. (Dirección de Cadenas Alimentarias, 2019). Los establecimientos de producción de frutilla en el Área Metropolitana de Buenos Aires (AMBA) plantan estolones arraigados de plantas madre híbridas, estos reciben distinta clasificación según su época de cosecha: El *plantín Fresco*, es un plantín más precoz en la floración ya que recibe las horas de frío y acortamiento del día necesarias para guardar reservas y desacelerar su fisiología y comenzar la floración a los 50-60 días después de plantado, y el *plantín Frigo* es de cosecha tardía y es almacenado en cámaras frigoríficas a temperaturas de -1,1-2,2 °C

hasta su comercialización y poder asegurar una producción de fruta durante mayor período de tiempo. Estos plantines son comercializados a raíz desnuda por viveros certificados para utilizar este material vegetal patentado, esta forma de producción asegura la sanidad del cultivo, variedad y calidad de fruto, y las labores y manejo permiten el éxito de la cosecha (Caminiti, 2015).

Según las estadísticas de Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO de sus siglas en inglés *Food and Agriculture Organisation*), el área cultivada de frutilla en hectáreas (ha), rendimiento y toneladas producidas en Argentina han mostrado un comportamiento estacionario en relación con el crecimiento productivo en el periodo de 2016-2020 (FAO, 2022) (Tabla 1).

Tabla 1. Producción de frutilla en la Argentina en los años 2016-2020.

Cultivo de Frutilla en Argentina	2016	2017	2018	2019	2020
ha cultivadas	1080	1108	1112	1115	1117
Toneladas	13434	13502	13568	13501	13524
Rendimiento por ha	124389	121859	122014	121085	121074

La producción primaria de frutilla en Argentina está distribuida en diferentes regiones, liderando Santa Fe, Buenos Aires y en menor medida Corrientes, Neuquén, Jujuy, Salta y Tucumán. En el AMBA norte: Pilar, Exaltación de la Cruz, Escobar, Campana y Zárate, y sur: La Plata, Florencio Varela y Berazategui, son los partidos de producción periurbana donde se asientan los productores de frutilla que están incursionando en hidroponía, plantaciones de primavera y cultivo anual produciendo el 26,9% del cultivo de frutilla a nivel nacional (INTA-CMCBA, 2019) (Figura 2a).

El periurbano está conformado por zonas de transición productiva en cuyo espacio se desarrollan actividades propias tanto de territorios rurales como urbanos, lo que ocasiona tensiones en los modos del uso del suelo. En estos espacios se realiza la agricultura, principalmente familiar, que aporta productos flori-fruti-hortícolas frescos en áreas

urbanas. La cercanía geográfica con el mercado inmediato y las ventajas logísticas que esto representa promueve el cultivo en estas zonas, aunque situaciones complejas asociadas por la tenencia de la tierra, disponibilidad de agua de buena calidad para el riego y la competencia por recursos humanos son algunos de los retos que enfrentan los productores de estas zonas (Feito, 2018).

La implantación de este cultivo en el periurbano del AMBA comienza generalmente en otoño en el que se inicia con la preparación de los camellones directamente en el suelo, el cual debe ser idealmente franco arenoso para optimizar el crecimiento de las raíces de las plantas (Figura 2b). En este momento se colocan cintas para el fertirriego por goteo y a su vez se cubre el suelo con un mulch de polietileno negro y túnel de tela anti helada. La plantación se realiza en primavera preferiblemente con plantines Frigo ya que estos se adaptan mejor a la estacionalidad de la zona, y según las horas luz disponibles en el período se escoge la variedad a plantar; reflorescientes cuando los días se alargan en la temporada estival y los no reflorescientes que fructifican en días cortos (Miserendino, 2012).



Figura 2. a: Producción de frutilla a campo en zona periurbana del partido de Escobar, AMBA norte, b: preparación de los camellones en el suelo previos a la implantación del cultivo.

Hongos formadores de micorrizas arbusculares: su importancia en la biodiversidad de los agroecosistemas

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares (MA) son organismos pertenecientes al filo Glomeromycota, que establecen una relación simbiótica mutualista denominada micorriza arbuscular con las raíces de las plantas (Cabello, 2013). Se consideran biotrofos obligados ya que no pueden completar su ciclo vital sin la interacción con una planta, por lo que la mayoría de las especies no son cultivables en condiciones *in vitro*. Colonizan de manera intra radical a la planta hospedadora, que pueden ser briofitas, pteridofitas, angiospermas y gimnospermas, ingresando a la raíz y produciendo micelio no septado, arbuscúlos y vesículas y posterior a esto la producción de la red de micelio extra radical del hongo. La colonización inicial se da cuando el hongo entra en contacto con la raíz de la planta, formando un punto de ingreso o apresorio a partir del que comienza a propagarse en la rizodermis y exodermis. Dentro de la corteza se comienzan a producir los arbuscúlos, los que se consideran estructuras de intercambio bidireccional entre el hongo y la planta (Cuenca, 2015).

Según la especie de hongo MA también se observa la formación de vesículas que son estructuras de almacenamiento. Luego de colonizar el interior de las raíces, el micelio del hongo comienza a crecer de manera extra radical con el desarrollo de esporas, las estructuras reproductivas de los hongos MA. La red de micelio en el suelo establece un intercambio benéfico de agua, nutrientes minerales y fotosintatos entre los simbioses y el ambiente rizosférico (Cuenca, 2015; Nazareno, et al., 2020).

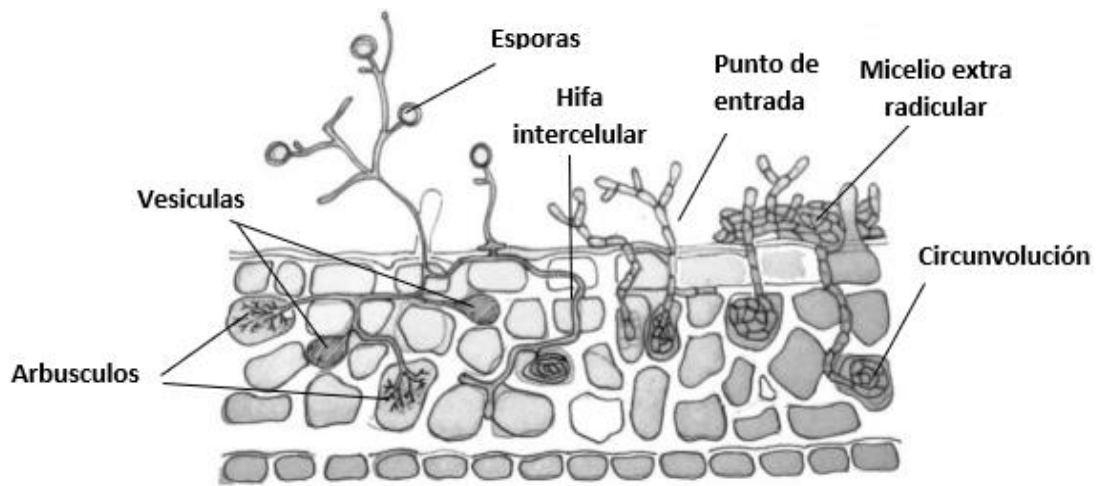


Figura 3. Esquema de la colonización endomicorrícica en las raíces de una planta hospedadora. Modificado de Nazareno y colaboradores (2020).

Los hongos MA forman parte de la biodiversidad de los suelos y junto con millones de microorganismos más aportan recursos genéticos y ecológicos necesarios para la funcionalidad de los ecosistemas naturales y de los agroecosistemas. Los agroecosistemas son sistemas transformados para producir bienes y servicios de interés agropecuario (Sarandon, 2020). La importancia ecológica de los hongos MA involucra diversos aspectos en la evolución de las plantas, hay datos que confirman la presencia de esta asociación desde el periodo Ordovícico (hace 460 millones de años aproximadamente), por lo que se cree que la colonización y evolución de las plantas en la Tierra fue favorecida por la coevolución entre estas y los hongos MA (Ferrera-Cerrato, 2007). Tienen la función de movilizar los nutrientes e influyen en la estabilidad de los suelos de los ecosistemas, aún más cuando las condiciones edáficas son extremas (Restrepo, 2019). Mejoran el aprovechamiento de agua y nutrientes limitantes como el fósforo por absorción desde el micelio hacia la raíz, así como la red de micelio externo (extramatricial) que prolonga la capacidad de exploración de volumen de suelo por las raíces, lo que provee a la planta una mejor capacidad de adaptación, establecimiento y crecimiento (Ferrera-Cerrato, 2007).

Hongos formadores de micorrizas arbusculares como promotores de crecimiento en los cultivos.

Son muchos los mecanismos descritos que se asocian con la promoción del crecimiento de las plantas y en los que está involucrada la microbiota del suelo principalmente aquellos microorganismos promotores del crecimiento en plantas (PGPM en sus siglas del inglés *Plant Growth Promoting Microorganism*): fijación de nitrógeno, solubilización de fósforo, producción de sideróforos, producción de fitohormonas y ácidos orgánicos, así como protección por enzimas (Por ej. 1-aminociclopropano-1-carboxilato - desaminasa, quitinasa y glucanasa) y mecanismo de antagonismo, mejoras en la nutrición de macro y micro nutrientes y modificación de la arquitectura radicular son parte de la dinámica de crecimiento de las plantas (Berg, 2009). Estos microorganismos pueden promover el crecimiento de las plantas al regular el equilibrio nutricional y hormonal, produciendo reguladores del crecimiento, solubilizando nutrientes e induciendo resistencia contra patógenos vegetales. Además de sus interacciones con las plantas, también muestran interacciones sinérgicas y antagónicas con otros microorganismos en el suelo (Nadeem et al, 2014).

Los hongos MA están involucrados en el metabolismo del agua y absorción de nutrientes como nitrógeno y fósforo por las plantas a través de la acción directa de hifas del MER, aumentando la longitud y profundidad de las raíces, y así mejorando la nutrición de las plantas y la resistencia a la sequía (Gou et al., 2021). El fosfato inorgánico (Pi) es un macronutriente esencial con roles estructurales y metabólicos en cada compartimento de la célula vegetal, una serie de transportadores intracelulares de Pi han sido descritos y estos llevan a cada compartimiento celular el P requerido y controlan su intercambio para la ejecución de procesos metabólicos como glucólisis, fotosíntesis y respiración celular (Versaw y García, 2017). Por los procesos en los que es necesario, el fósforo es requerido por la planta en cantidades relativamente altas y es el que menos disponible está, su absorción a partir del suelo se realiza por las raíces y los pelos radicales. Cuando la planta desarrolla su raíz se forma una zona de deficiencia de P por la rápida absorción del circundante y los pelos radicales aumentan el alcance, y aquí el MER de los hongos MA se ve involucrado cuando sus hifas ramificadas ayudan a la absorción de P (Cuenca, 2015).

El uso de los hongos MA como agentes bioinoculantes se ha explorado principalmente mediante consorcios de diferentes especies de estos o con otros PGPM, de este modo se simulan las condiciones de biodiversidad de los suelos y la coevolución de las plantas con estos microorganismos, hay estudios que indican que la formación de nichos ecológicos es más exitosa en la interacción con el hospedante vegetal (Eke et al., 2016). En la mejora de la estructura del suelo y de las propiedades químicas de este, la formación del MER por los hongos MA ayuda a generar suelos estructuralmente adecuados; por otra parte, la disrupción de agregados y poros en suelos estructuralmente degradados limita el desarrollo de la red raíz-micelio y reduce los flujos de agua y oxígeno (Hartmann y Six, 2022). La colonización de estos endófitos en plantines hortícolas es beneficioso por la diversidad de funciones para promover el crecimiento y desarrollo al formar micorrizas con las raíces y mejorar su supervivencia en la plantación a campo (Gou et al., 2021).

Estrés abiótico y su relación con los hongos formadores de micorrizas arbusculares

El estrés ambiental o abiótico promueve cambios que disminuyen el rendimiento en los cultivos, causando restricciones durante la etapa de crecimiento de estos, de manera que la productividad final expresa sólo una fracción de su potencial genético (Monteoliva et al., 2019). Por ejemplo, el estrés salino que se ocasiona por la acumulación de sales en los suelos y el estrés hídrico por la carencia de agua disponible, limitan la productividad de los cultivos, y se ha reportado que los hongos MA favorecen a la resistencia al estrés abiótico por la distribución de hifas extra radicales en el suelo, que incrementan nutrientes y agua que están ligados en el suelo y son transportando a las raíces (Koç, 2015). La colonización por hongos MA en estas condiciones limitantes puede también aumentar la concentración de varios macro y micronutrientes significativamente, lo que conduce a una mayor producción de fotosintatos y, por lo tanto, a un aumento de biomasa (Begum et al., 2019). El fósforo puede ser un nutriente mineral limitante de la productividad primaria en los agroecosistemas, especialmente en los tropicales, por lo que el ciclo microbiano del fósforo afecta significativamente el crecimiento de las plantas (Hartmann y Six, 2022). Los hongos MA mediante la red de micelio externo (MER) ayudan a la absorción del fósforo principalmente y de otros nutrientes como nitrógeno, hierro, zinc y cobre (Ortiz-Acevedo et al., 2015).

Las interacciones de los cultivos con los hongos MA son útiles para el rendimiento y la producción sostenible especialmente bajo condiciones de temperaturas extremas (Bunn et al, 2009). En altas temperaturas los efectos como la pérdida del vigor, retraso en la germinación y crecimiento, marchitez, daños en el aparato reproductivo y caída de las hojas de las plantas se ven mejorados cuando estas son colonizadas por hongos MA. Durante el estrés por frío también se ha informado que se altera el contenido de proteínas en plantas micorrizadas (Wahid et al, 2007).

Investigaciones previas estudian las relaciones del agua entre los hongos MA y la planta huésped como mejoras en el crecimiento (biomasa) y nutrición fosforada. Bajo condiciones de estrés por inundación se ha demostrado que la colonización por hongos MA se mantiene y puede incrementarse en las raíces de estas plantas (Fougnyes et al., 2007). En relación con la cantidad de agua en la hoja y variables vinculadas, se demostró que los hongos MA favorecen al mantenimiento de la turgencia a pesar de las condiciones de sequedad, y lo mismo sucede en las raíces. Ha sido propuesto que, por el aumento en la absorción, el acceso a nutrientes y agua por la red micelial y la estimulación del desarrollo de la raíz, se incrementa la conductividad hidráulica gracias a la modulación de la expresión de acuaporinas radiculares. Esto mejora la turgencia celular mediante ajuste osmótico en las células vegetales y la neutralización enzimática de las formas reactivas del oxígeno (ROS de sus siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*) en el tejido de la planta (Augé, 2001). Hongos MA como los del género *Rhizophagus*, absorben y transloca el fósforo solubilizado a la planta huésped por medio de la raíz, por lo que mejoran el crecimiento y la tolerancia a estrés bióticos y abióticos (Hartmann y Six, 2022).

En términos generales, la resistencia que aportan los hongos MA frente al estrés abiótico es brindada por un sistema en el que intervienen la sobre regulación del metabolismo antioxidante y la desregulación de las lipooxigenasas. Lo que a su vez desencadena respuestas genéticas, enzimáticas y de producción de metabolitos que protegen a la planta de los efectos del estrés ambiental (Begum et al., 2019).

Parámetros bioquímicos relacionados con la defensa antioxidante en plantas

La respuesta de una planta al estrés oxidativo y los compuestos proteicos que intervienen conforman un sistema de defensa frente a los daños producidos en eventos de estrés celular en seres aerobios. La oxidación incompleta del oxígeno (O_2) da lugar a formas de ROS de alta toxicidad por las reacciones de oxidorreducción que producen en la célula; en condición limitante se sobre producen, causan peroxidación de lípidos y esto daña el ADN, las proteínas, los lípidos y al aparato fotosintético de la planta. El sistema antioxidante de las plantas está compuesto por metabolitos como fenoles, ascorbato, glutatión, tocoferol, entre otros y eliminadores enzimáticos de ROS como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), guayacol peroxidasa (GPX), ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa (Michalak, 2006; Janeeshma y Puthur, 2020).

La catalasa es una enzima con actividad oxidorreductasa esencial en el mecanismo de defensa antioxidante de las plantas mediante dos funciones principales; descomponiendo el H_2O_2 en H_2O y O_2 (actividad catalítica) y la oxidación de donadores de H^+ como etanol, metanol, fenoles, ácido fórmico, con el consumo de 1 mol de peróxido (actividad peroxidasa) (Aebi, 1984). El peróxido de hidrógeno se produce por la dismutación de radicales superóxidos en una reacción catalizada principalmente por la enzima SOD, en las células vegetales, la CAT se localiza exclusivamente en los peroxisomas. El peróxido de hidrógeno en los cloroplastos es eliminado por una reacción peroxidasa usando foto-reductores producidos en el tilacoide como donante de electrones (Arora et al., 2002).

La enzima GPX pertenece al grupo de peroxidasas secretoras unida a membrana plasmática de clase III con un peso molecular de 28-60 KDa, en plantas estas proteínas suelen contener un grupo prostético de ferriprotoporfirina IX que mediante oxidorreductasas oxidan sustratos en presencia de H_2O_2 (Hiraga, 2001; Mika, 2003). Se han descrito hasta 73 genes codificantes de peroxidasas de clase III en plantas involucradas en distintas funciones, desde lignificación de paredes celulares, entrecruzamiento de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina y polisacáridos, metabolismo de fitohormonas, senescencia y en varias rutas biosintéticas, así como en la formación de ROS y en la degradación del H_2O_2 (Mika et al., 2008). GPX es estable a temperaturas altas y por sus características su actividad es fácilmente mensurable por reacciones cromogénicas de oxidación y ha sido utilizada como modelo para el estudio estructural

proteico, funcionamiento enzimático enfocado a múltiples aplicaciones (Hiraga et al., 2001).

El papel de la enzima GS en la protección de las plantas radica en la mejora de la absorción del N y en la formación de glutatión, un potente agente antioxidante celular, lo que se traduce en plantas más resistentes a los daños producidos por el estrés (Zeng, et al, 2014). La GS es una proteína octamérica con un peso molecular entre 350-400 KDa involucrada en la asimilación de nitrógeno en forma de amonio combinándolo con glutamato, esta reacción requiere la hidrólisis de un ATP e involucra cationes divalentes como el Mg^{2+} , Mn^{2+} o Co^{2+} como cofactores, la GS tiene alta afinidad con el amonio e interviene en la asimilación de este mediante diversas vías metabólicas como la descrita anteriormente, fotorrespiración, desaminación de fenilalanina por catabolismo del amonio durante la senescencia (Cooper y Clarkson, 1989). Esta enzima ha sido encontrada en tejidos vegetales fotosintéticos y no fotosintéticos como isoenzimas oligoméricas en citoplasma (GS1) y cloroplastos (GS2). Ambas formas de GS tienen funciones específicas, las formas citosólicas son expresadas durante la germinación de las semillas o en las células vasculares de raíces y tallos y producen glutamina para el transporte intracelular de nitrógeno y la GS2 en raíces genera nitrógeno amínico para su consumo; mientras que la GS2 de los cloroplastos de los tallos asimilan nuevamente el NH_4^+ producido por fotorrespiración (Kayumov et al., 2014).

OBJETIVOS E HIPOTESIS



Objetivos e hipótesis generales

El objetivo general de la presente Tesis de Maestría en Biotecnología consistió en la evaluación de los efectos benéficos que los hongos formadores de micorrizas arbusculares son capaces de aportar al cultivo de frutilla en sustrato hidropónico como se viene produciendo en el AMBA. La metodología de estudio y los resultados aquí expuestos buscan promover el uso de hongos MA en este tipo de cultivo periurbano dentro del cinturón hortícola del AMBA para optimizar su manejo.

Como parte de los objetivos específicos se buscó demostrar las correlaciones entre los parámetros de rendimiento y bioquímicos con la mejora frente al estrés hídrico de las plantas de frutilla inoculadas con tres cepas de hongos MA en comparación con las plantas no inoculadas.

Hipótesis: La inoculación con cepas de hongos MA al momento del plantado son capaces de mejorar los parámetros de rendimiento, la defensa al estrés oxidativo y absorción de nutrientes en plantas de frutilla en condiciones de estrés hídrico.

METODOLOGIA



Parte 1: Análisis preliminar de los hongos MA en el cultivo de frutilla.

1.1 Análisis de presencia de hongos MA en suelos y sustratos para el cultivo de frutilla en el AMBA.

Con el fin de conocer las condiciones predominantes bajo las cuales se realiza el cultivo de frutilla del cinturón fruti-flori-hortícola del AMBA se realizaron muestreos preliminares en el mes de agosto 2022 en dos establecimientos que producen frutilla de la variedad San Andreas, ubicadas en el AMBA norte. Se consideró como criterio de selección la producción en suelo directo (LH) (34°19'16, 9"S; 58°51'50, 2"O) y en sistema hidropónico sin suelo (EC) (34°22'07, 3"S; 59°00'55,1"O). Para esto se contó con la colaboración del Ingeniero Pedro Aboitiz, del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Agencia Escobar - Estación Experimental Agropecuaria (EEA AMBA).

Las muestras rizosféricas, 10 cm de profundidad desde la corona de la planta se tomaron en diferentes sectores de los establecimientos y constan de aproximadamente 30 a 40 g. de suelo y raíces. Se colocaron en bolsas plásticas y se mantuvieron en heladera (4-7 °C) hasta su procesamiento.

Las muestras se procesaron para analizar características fisicoquímicas relacionadas con las labores y manejo de cultivo. Se evaluaron: conductividad eléctrica (CE), pH, porcentaje de humedad, contenido de fósforo (PO₄-P) y presencia de hongos MA en las raíces de frutilla colectadas (Bárbaro et al., 2011).

Para la medición de la concentración de las sales solubles presentes mediante la CE, se realizó una solución de suelo o sustrato: agua destilada (pH 7) 1:1 v/v de cada muestra, se dejó decantar y se realizó la medida sumergiendo el electrodo del conductímetro SOIL TEST Tester CE/Temp de Hanna Instruments ® en la pasta. Para la medición de pH se procedió de igual manera, en este caso se empleó un pH-metro Groline Soil Tester de Hanna Instruments®. Para el cálculo del porcentaje de humedad las muestras se pesaron utilizando balanza digital de laboratorio Ohaus®, obteniendo el peso fresco de la muestra, y luego se colocaron en estufa en placas de Petri de vidrio a 70 °C hasta peso constante.

Luego se pesaron obteniendo el peso seco y se realizó el cálculo de porcentaje de humedad de cada muestra mediante la fórmula:

$$\frac{\text{Peso inicial muestra húmeda (g)} - \text{peso muestra seca (g)}}{\text{Peso inicial muestra húmeda (g)}} \times 100$$

El contenido de fósforo se midió usando el kit de análisis de suelo VISOCOLOR®; las muestras de suelo seco y tamizadas a luz de malla de 2 mm, se pesó 1 g. de muestra y se colocó en 20 ml de buffer de extracción, se agitó por 5 minutos, usando filtro MN 616 ¼ se filtró, se dispensaron 1,6 ml en tubo de ensayo libres de fósforo y 23,4 ml de agua destilada estéril, se agregó 6 gotas de reactivo P1 y P2 y para el control negativo reactivo PK, según las instrucciones del fabricante.

Para evaluar de presencia de hongos MA, las muestras fueron tamizadas a diferentes luces de malla, se recuperaron las raíces retenidas en el tamiz de mayor diámetro de luz de malla, y se realizó análisis bajo lupa del material retenido en los tamices número 30, 60 y 100 µm para la búsqueda y cuantificación de esporas de hongos MA según Gerdemann y Nicholson (1963).

Para la observación microscópica de las estructuras intra radicales se utilizó la técnica con modificaciones descrita por Phillips y Hayman (1970) para clarificar y teñir raíces; las muestras se calientan a 95 °C por 15 minutos en KOH al 10%, las raíces clarificadas se tiñen por sumersión en 1 ml de azul de tripán en lactofenol al 0,05% y siguiendo la metodología propuesta por Giovannetti y Mosse (1980) para realizar la cuantificación de la colonización por HMA; los fragmentos de raíz teñidos de aproximadamente 1 cm de longitud en un montaje semi permanente con resina de polivinil alcohol lactoglicerol (PVLG). Se realizó la observación con microscopio Nikon® Eclipse E200 evaluando cada campo microscópico útil de la preparación, registrando las estructuras observadas por campo.

1.2 Evaluación en condiciones de invernadero del cultivo de frutillas en sistema sin suelo y su interacción con los hongos MA.

Según los datos y la información sobre el manejo del cultivo recopilados en los muestreos realizados, se diseñó el experimento en condiciones de invernadero ubicado en las instalaciones de la Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Provincia de Buenos Aires (34,71°S; 58,28°O).

Con el objetivo de evaluar la interacción de las cepas de hongos MA utilizadas en el huésped vegetal (frutilla) producidas en sistema sin suelo. Se adquirieron 100 plantines frescos de la variedad San Andreas a un vivero productor de la localidad de Tandil, Provincia de Buenos Aires (37,33°S; 59,14°O).

Se emplearon 3 cepas de hongos MA comúnmente usadas en la formulación de bioinsumos para la agricultura, que forman parte de la colección del Laboratorio de Micología Molecular (IMBA-UNQ), las mismas se mantienen de forma rutinaria en cultivo continuo con distintos hospedantes vegetales.

Las cepas de hongos MA empleadas fueron:

Cepa F36: *Claroideoglossum etunicatum* (W.N. Becker & Gerd.) C. Walker & A. Schüssler. Aislado de ambiente natural del Monte de la Provincia de La Rioja (28°40 °S; 66°58 °O). Con un clima semiárido continental y árido de montaña con precipitaciones anuales que no superan los 400 mm.

Cepa F37: *Rizhophagus intraradices* (N.C. Schenck & G.S. Sm.) C. Walker & A. Schüssler 2010. Aislado de ambiente natural de la Provincia de La Rioja (28,79 °S; 66,99 °O). Con un clima semiárido continental y árido de montaña con precipitaciones anuales que no superan los 400 mm.

Cepa B1: *Rizhophagus irregularis* (Błaszk., Wubet, Renker & Buscot) C. Walker & A. Schüssler. Genbank accession number OP454867.1. Aislado de ambiente natural del Bosque Ribereño de la Provincia de Buenos Aires (34,69 °S; 58,27 °O). con un clima templado pampeano con un promedio precipitaciones anuales de 800 mm.

En pos de facilitar la lectura del texto se referirá en adelante a cada cepa utilizada según la nomenclatura que la identifica en la colección del laboratorio de Micología Molecular.

En el sistema de producción sin suelo, también conocido como hidroponía, se utiliza un sustrato sólido estéril, en este caso fibra de coco y perlita en proporción 1:1, que presenta una alta absorción de agua. Para la preparación del sustrato, se hidrataron 4 bloques de fibra de coco, y se empacaron para la esterilización (121 °C, 1-2 atm por 20 minutos) al igual que la perlita, un volumen aproximado de 200 L de sustrato fue esterilizados para el ensayo.

1.2.1 Preparación del material vegetal.

Para la preparación del material vegetal los plantines de frutilla a raíz desnuda (Figura 4a), fueron lavados con agua corriente para retirar restos de materia orgánica y partículas de suelo, luego se lavaron con agua destilada estéril y se desinfectaron superficialmente utilizando una solución de NaOCl al 1% (v/v) por 3 minutos. Se seleccionaron 30 plantines al azar para los cuales se obtuvo el peso fresco, el largo de raíz y se realizó una muestra compuesta de segmentos de raíces para el análisis de la colonización preexistente por hongos MA según los protocolos descritos en la parte 1.1 y detección de secuencias específicas de hongos MA.

Los plantines de frutilla fueron dispuestos en 4 bandejas forrajeras (30 plantines en cada una) llenadas en $\frac{3}{4}$ partes con la mezcla de sustrato estéril de fibra de coco y perlita (1:1 v/v) (Figura 4b), y fueron regadas con agua corriente de red en sistema de micro goteo por un periodo de 7 días.



Figura 4 a: Variabilidad en el tamaño de los plantines de frutilla al momento de su recepción, b: plantines en bandejas forrajeras con riego a micro goteo, c1: plantas en contenedores individuales, nótese en c2: el sistema de riego por goteo.

1.2.2 Detección molecular de hongos MA.

Se realizó la obtención de ADN genómico a partir de las raíces de frutilla, realizando una ruptura física previa del material con nitrógeno líquido y empleando el kit DNeasy Plant Mini Kit (USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se efectuó una PCR anidada, utilizando mezclas de cebadores específicos del gen del ARN ribosomal de HMA. Una primera reacción de PCR se realizó utilizando como molde 2 μ L del extracto de ADN y una mezcla de cebadores compuesta por SSUmAf1, SSUmAf2, LSUmAr1, LSUmAr2, LSUmAr3 y LSUmAr4. Luego se empleó 1 μ L de esa reacción como molde para la segunda ronda de PCR, esta vez empleando los cebadores SSUmCf1, SSUmCf2, SSUmCf3, LSUmBr1, LSUmBr2, LSUmBr3, LSUmBr4 y LSUmBr5 (Krüger et al., 2009). El gen SSU rRNA parcial se amplificó también usando cebadores específicos de hongos MA: AML1/AML2 (Lee, et al., 2008). La totalidad de los productos obtenidos

se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (0,8% p/v) y tinción mediante bromuro de etidio. Las bandas correspondientes a los tamaños esperados para los amplicones específicos (aprox. 800 pb) se recuperarán del gel y se utilizarán para posteriores análisis moleculares, que permitan la identificación a un nivel específico de los hongos presentes (Stephan et al., 2019).

1.2.3 Preparación de inóculos de HMA.

Las cepas de hongos empleadas forman parte de la colección del Laboratorio de Micología Molecular (IMBA-UNQ) y se multiplicaron de manera rutinaria durante 6 meses en cultivo in vivo en macetas, empleando como hospedantes vegetales lino (*Linum usitatissimum*), maíz (*Zea mays*) y zanahoria (*Daucus carota*). Las macetas fueron secadas y procesadas, retirando la parte aérea completamente, la mitad del contenido de la maceta (raíces y sustrato) fue separado, molido en molino de alta velocidad Damai® y homogeneizado para emplear como inóculo del ensayo.

Después de 7 días de rustificación de los plantines las bandejas forrajeras, se asignaron en 4 pre-tratamientos, uno para cada cepa (F36, F37 y B1) y el control sin inocular (CN), mediante el agregado de 150 g. de inóculo de cada cepa e igual cantidad de suelo estéril en la bandeja del control no inoculado. Se mantuvo el riego por goteo dos veces a la semana y se comenzó la fertilización con solución nutritiva de Hewitt (1952) empobrecida en fósforo, aplicando 5-7 ml por planta una vez por semana. Para la determinación del potencial infectivo del inóculo preparado de cada cepa empleada, se realizaron macetas con una mezcla de suelo estéril y perlita (1:1 v/v), y 50 gramos de cada inóculo (F36, F37 y B1) y 50 g. de suelo estéril para el control CN y semillas de maíz como planta hospedante, a las cuales se les realizó el control de colonización mensual en paralelo a los pretratamientos de las plantas de frutilla.

Luego de un mes en las bandejas forrajeras, 12 plantas de cada pretratamiento fueron trasplantadas individualmente, manteniendo una homogeneidad en las réplicas, a macetas de 5 L (Figura 4c1 y c2) previamente rotuladas manteniendo la distribución de los pretratamientos, utilizando 3 L de una mezcla del mismo sustrato de las bandejas más 50 g. aproximadamente del sustrato de la bandeja forrajera. Se mantuvo la fertilización con

solución nutritiva (modificado de Hewitt, 1952), aplicando 10 ml por planta y riego por goteo (150 ml de caudal aproximadamente) una vez por semana durante el mes de octubre. A partir de noviembre y diciembre se mantuvieron sin riego solo con la solución nutritiva, a CC de 40-50%. Durante toda la realización del ensayo se controlaron los valores de pH y CE de las macetas, manteniendo la temperatura ambiental de invernáculo de 25-30 °C y monitoreando posibles signos de marchitez incipiente y deficiencias nutricionales. El porcentaje de colonización fue controlado cada 30 días.

1.2.4 Determinación de la capacidad de contenedor del sustrato.

Se utilizaron 24 plantas de frutillas en maceta de 500 ml para la determinación de capacidad de contenedor (CC) del sustrato. Las plantas previamente inoculadas con las cepas F36, F37 y B1 fueron distribuidas en 3 grupos de 8 unidades experimentales, estas plantas, el contenedor y el sustrato seco se pesaron, fueron regadas hasta saturarse, luego de drenar completamente el exceso de agua se pesaron nuevamente para registrar el peso a 100% de CC. Este se expresó como porcentaje en base a masa (gramos de agua por gramos de sustrato seco) utilizando la fórmula (Ojeda, et al, 2018):

$$CC = \frac{(Peso Fresco a CC - Peso Suelo Seco)}{Peso Suelo Seco} \times 100$$

Las plantas se mantuvieron sin riego y en intervalos de 3, 6 y 12 días se obtuvo el peso en gramos de cada maceta para determinar el porcentaje de humedad retenida por el sustrato en el contenedor.

Parte 2: Evaluación de la resistencia al estrés abiótico del cultivo: ensayo de estrés hídrico en plantas de frutilla.

Con el objetivo de valorar el mejoramiento que la inoculación con cepas de hongos MA proveerían a las plantas huésped contra el estrés abiótico, se planteó un ensayo de estrés hídrico en las plantas de frutilla inoculadas y no inoculadas. Debido al hallazgo de presencia de micorrización con cepas nativas, provenientes del suelo en el cual pasan el período de rustificación, en los plantines de frutilla al momento de su recepción tomamos a bien evaluar esa cepa nativa aún no identificada. Después de tres meses de crecimiento post inoculación en macetas, las plantas de los pre-tratamientos fueron evaluadas en su porcentaje de micorrización y al menos 6 réplicas para cada cepa y plantas CN fueron destinadas a ambos tratamientos del ensayo.

Diseño del ensayo en invernadero: con la finalidad de evaluar la correlación entre el grado de colonización de hongos MA y la resistencia a las condiciones de deficiencia de agua de la planta huésped se plantearon 2 tratamientos con 4 niveles cada uno:

Tratamiento estrés por sequía (ES): capacidad de contenedor 30-40%

Niveles: control nativo, cepa F36, cepa F37 y cepa B1

Tratamiento bien regado (BR): capacidad de contenedor 100%

Niveles: control nativo, cepa F36, cepa F37 y cepa B1

Para minimizar la variabilidad del material experimental, las réplicas fueron seleccionadas según el porcentaje de micorrización de raíz y la similitud en el tamaño de la planta, se mantuvo la maceta utilizada en el pretratamiento. Se establecieron dos esquemas de riego a capacidades de contenedor diferentes, tratamiento ES capacidad de contenedor moderada-severa (30-40%) y en el tratamiento BR a capacidad de contenedor 100%, temperatura ambiental de 20-30 °C y fertilización con 30 ml. de solución nutritiva Hewitt con agregado de P. Las réplicas de cada tratamiento se mantuvieron durante 10 días del mes de enero en estas condiciones antes de la cosecha del material vegetal, se seleccionaron 3 réplicas de cada nivel en ambos tratamientos.

2.1 Parámetros de rendimiento del huésped vegetal.

De las plantas cosechadas se hicieron mediciones de peso fresco (PF) y peso seco (PS) de la parte aérea (vástago) y radical (raíz) completas. Para PS las muestras se colocaron en estufa a 70 °C hasta peso constante y después fueron pesadas en balanza analítica. Se calculó el contenido de agua por diferencia entre PF y PS. Para el cálculo de la relación vástago:raíz se utilizó el cociente entre sus pesos secos. También se calculó el porcentaje de dependencia micorrícica relativa (DMR) (Bagyaraj, 1992) de cada uno de los datos obtenidos anteriormente usando la fórmula:

$$\%DMR = \frac{PS \text{ planta inoculada}}{PS \text{ planta no inoculada}} \times 100$$

2.2 Parámetros bioquímicos y enzimáticos.

2.2.1 Extracción enzimática.

Siguiendo el protocolo propuesto por Gogorcena y colaboradores (1995), se pesaron 500 mg. de peso fresco de cada una de las réplicas (por separado vástago y raíz) y se congelaron a -20°C para mantener la integridad del tejido. Usando mortero en frío se maceraron las muestras añadiendo 0,05 g. de PVPP (poli vinil poli pirrolidona) y 5 ml de solución amortiguadora de extracción (KH₂PO₄ – K₂HPO₄ 50 mM pH 7,8 + 0,1 mM EDTA) para precipitar fenoles. Se filtraron los extractos empleando tela tipo gasa y se centrifugaron a 13000 r.p.m a 4 °C por 20 minutos, el sobrenadante se fraccionó en cuatro tubos Eppendorf® previamente rotulados según las determinaciones a medir, y todas las fracciones fueron guardadas a una temperatura de -80°C para su posterior análisis. Los resultados fueron estandarizados usando la concentración de PROT según el protocolo de Bradford (1976) y las determinaciones enzimáticas que se midieron fueron: CAT siguiendo el protocolo de Aebi (1984), GPX aplicando la metodología propuesta por Mika y Lüthje (2003), GS según Kayumov et al. (2014) y Pi se determinó siguiendo el protocolo de Lanzetta et al. (1979).

2.2.2 Proteínas totales.

Siguiendo el protocolo planteado por Bradford (1976) se preparó una curva patrón de proteínas a partir de una solución madre de 1 mg ml⁻¹ de albúmina de suero bovino (BSA), utilizando diferentes cantidades de esta y midiendo la longitud de onda de 595 nm cada una para obtener la concentración en µg/ml. Para la medición de las muestras se tomaron 100 µL de extracto de vástago y 200 µL de extracto de raíz, se añadieron entre 700 µL y 600 µL de agua destilada respectivamente y 200 µL del reactivo de Bradford. La concentración se expresó en µg/ml.

2.2.3 Catalasa.

Se realizaron las determinaciones de enzimas CAT mediante el protocolo modificado de Aebi (1984) para la medición de la disminución de la absorbancia a 240 nm ocasionada por la desaparición del H₂O₂. Se prepararon las soluciones por separado y la reacción se realizó mezclándolas directamente en la cubeta del espectrofotómetro. Se añadieron entre 25 µL de extracto de vástago y 50 µL de raíz a una mezcla de reacción de 3ml final que contenía H₂O₂ 10,6 mM en solución amortiguadora fosfato potásico (KH₂PO₄ – K₂HPO₄) 50 mM a pH 7. Se agitó enérgicamente para promover la formación de burbujas de oxígeno y se colocó la mezcla en el espectrofotómetro. El registro se efectuó frente a un blanco compuesto por buffer PK 50 mM. La actividad enzimática, expresada en µmoles de H₂O₂ min⁻¹ ml⁻¹, se calculó a partir de la velocidad de la reacción por minuto y del coeficiente de extinción molar para el H₂O₂ (E = 39,58 M⁻¹ cm⁻¹) (del Río et al., 1977) como se muestra a continuación:

$$\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ ml}^{-1} = \frac{\Delta 240 \text{ nm} \times V_r}{V_m \times 39,38}$$

2.2.4 Glutamina sintetasa.

Se midió esta enzima empleando el protocolo modificado de Kayumov y colaboradores (2014) por cuantificación del fosfato liberado como consecuencia de la hidrólisis de ATP durante la formación de glutamina. La mezcla de reacción consistió en 250 μ L de solución amortiguadora Tris-HCl 100 mM pH 7,5, glutamato de sodio 100 mM, $MgCl_2$ 50 mM, NH_4Cl 100 mM y 1,5 μ L ATP 10 mM. La reacción se inició con el agregado de 250 μ L del extracto de vástago y la raíz se incubó durante 15 min a 37 °C. Después de ese tiempo se agregó 1 ml de verde malaquita 0,3 mM y se estabilizó el color con 100 μ L de citrato trisódico 1,2 M. El complejo formado como producto de la reacción se midió espectrofotométricamente a 660 nm. Como blanco se usó la mezcla de reacción sin glutamato. La actividad específica de GS se calculó en unidad enzimática (U) como la cantidad de enzima capaz de formar 1 mg de fosfato y la actividad se expresó en $U\ mg^{-1}$ de proteína.

2.2.5 Guaiacol peroxidasa.

La enzima GPX se cuantificó aplicando la metodología propuesta por Mika y Lüthje (2008) mediante la oxidación del guaiacol en presencia de H_2O_2 por acción enzimática siguiendo el aumento de la absorbancia a 470 nm. La mezcla de reacción con volumen final de 1 ml estuvo compuesta por solución amortiguadora de acetato de sodio + ácido clorhídrico ($NaCH_3OOH-HCL$) 25 mM a pH 5, guaiacol ($C_7H_8O_2$) 8,26 mM, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 8,8mM y 200 μ L de extracto de vástago y raíz, dispensados directamente a la cubeta de cuarzo de 1 ml. La actividad enzimática fue valorada según la linealidad de la dependencia del tiempo. La actividad peroxidasa específica fue calculada en nmol de guaicol oxidado min^{-1} por miligramo de proteína, tomando en cuenta el coeficiente de extinción del guaiacol de 26,6.

2.2.6 Fósforo inorgánico.

El fósforo inorgánico (Pi) se cuantificó utilizando el protocolo modificado de Lanzetta y colaboradores (1979) por cuantificación del fosfato liberado como consecuencia de la hidrólisis de ATP durante la formación de glutamina. La mezcla de reacción consistió en 250 µL de solución amortiguadora Tris-HCl 100 mM pH 7,5, MgCl₂ 50 mM, NH₄Cl 100 mM y 1,5 µL ATP 10 mM. La reacción se inició con el agregado de 250 µL del extracto de vástago y raíz se incubó durante 15 min a 37 °C en baño maría. Después de ese tiempo se agregó 1 mL de verde malaquita 0,3 mM y se estabilizó el color con 100 µL de citrato trisódico 1,2 M. El complejo formado como producto de la reacción se midió espectrofotométricamente a 660 nm. Como blanco se usó la mezcla de reacción sin glutamato. Para cuantificar el fosfato se construyó una curva patrón con KH₂PO₄ a concentraciones entre 2 y 50 nmol/ml La actividad se expresó en U /mg⁻¹ de proteína.

2.2.7 Análisis estadístico de los datos obtenidos.

Se diseñó el ensayo con dos grupos de plantas separadas por medio metro cada uno con un nivel de riego y con cuatro niveles del tratamiento de inoculación, con igual número de réplicas por tratamiento. El análisis estadístico de las características de los datos obtenidos se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de uno y dos factores de las variables. Cuando se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$) como consecuencias de los tratamientos aplicados, se realizaron comparaciones *post hoc* para separar las diferencias entre medias de cada tratamiento mediante la prueba de LSD Fisher para comparaciones múltiples (Saville, 1990). Se realizó un ordenamiento de los datos mediante el análisis de componentes principales (ACP). Todos los análisis se realizaron usando el programa estadístico InfoStat.

RESULTADOS



Parte 1: Análisis preliminar de los hongos MA en el cultivo de frutilla.

1.1 Análisis de la presencia de hongos MA en suelos y sustratos para el cultivo de frutilla en el AMBA.

Los resultados de las mediciones relacionadas con labores de manejo del cultivo se muestran en la Tabla 2. Las muestras obtenidas en el establecimiento bajo producción en hidroponía EC presentaron los valores más altos en el contenido de humedad del sustrato al momento del muestreo, en comparación con los valores obtenidos para LH, donde la producción del cultivo de frutilla se realiza en suelo. Respecto a conductividad eléctrica, en EC los valores fueron 3 veces mayores a los de LH, mientras que el pH fue alcalino en LH y neutro en EC. En lo referente al fósforo disponible para el cultivo, en EC los valores fueron tres veces más altos que los encontrados en LH.

Tabla 2. Valores obtenidos del análisis de las muestras de suelo y sustrato.

	Humedad del sustrato (%)	PO ₄ -P (mg/kg)	CE (dS/m)	pH
EC	52,65 $\pm$ 13,74	50,0 $\pm$ 25,1	0,72 $\pm$ 0,17	7,05 $\pm$ 0,36
LH	21,64 $\pm$ 0,33	22,5 $\pm$ 2,5	0,18 $\pm$ 0,17	8,04 $\pm$ 0,36

Parámetros medidos en establecimientos de producción en sustrato (EC) y producción en suelo directo (LH). Los valores representan la media de las réplicas +/- el error estándar.

La presencia de hongos MA en las raíces de frutilla colectadas solamente fue observada en las muestras de LH (Figura 5a), el porcentaje de micorrización de micelio interno (MI) 50,82%, arbúsculos (A) 12,94% y vesículas (V) 7,28%, (Figura 5c1 y 5c2) asimismo, la presencia de esporas de Glomeromycota también fue detectada sólo en las muestras de LH, aunque su densidad (1,74 esporas/ g de suelo) fue baja y se encontraban mayormente degradadas (Figura 5b). En las muestras de raíces de frutilla colectadas en EC no se detectó colonización micorrícica.

El tiempo de establecimiento del cultivo de EC fue de 7 meses en cultivo hidropónico mientras que para LH fue de 7 y 10 meses según el sector de LH. En el momento del muestreo, al inicio del período de floración del cultivo, se observaron signos de deficiencia nutricional en las plantas de frutilla de EC, en la Figura 6b se observa la coloración rojiza en los folíolos de las hojas más viejas que indica deficiencia de P y la infestación de estas con un insecto plaga (Figura 6c y 6d), mientras que las plantas de LH se observaron creciendo vigorosamente sin signos de deficiencias.

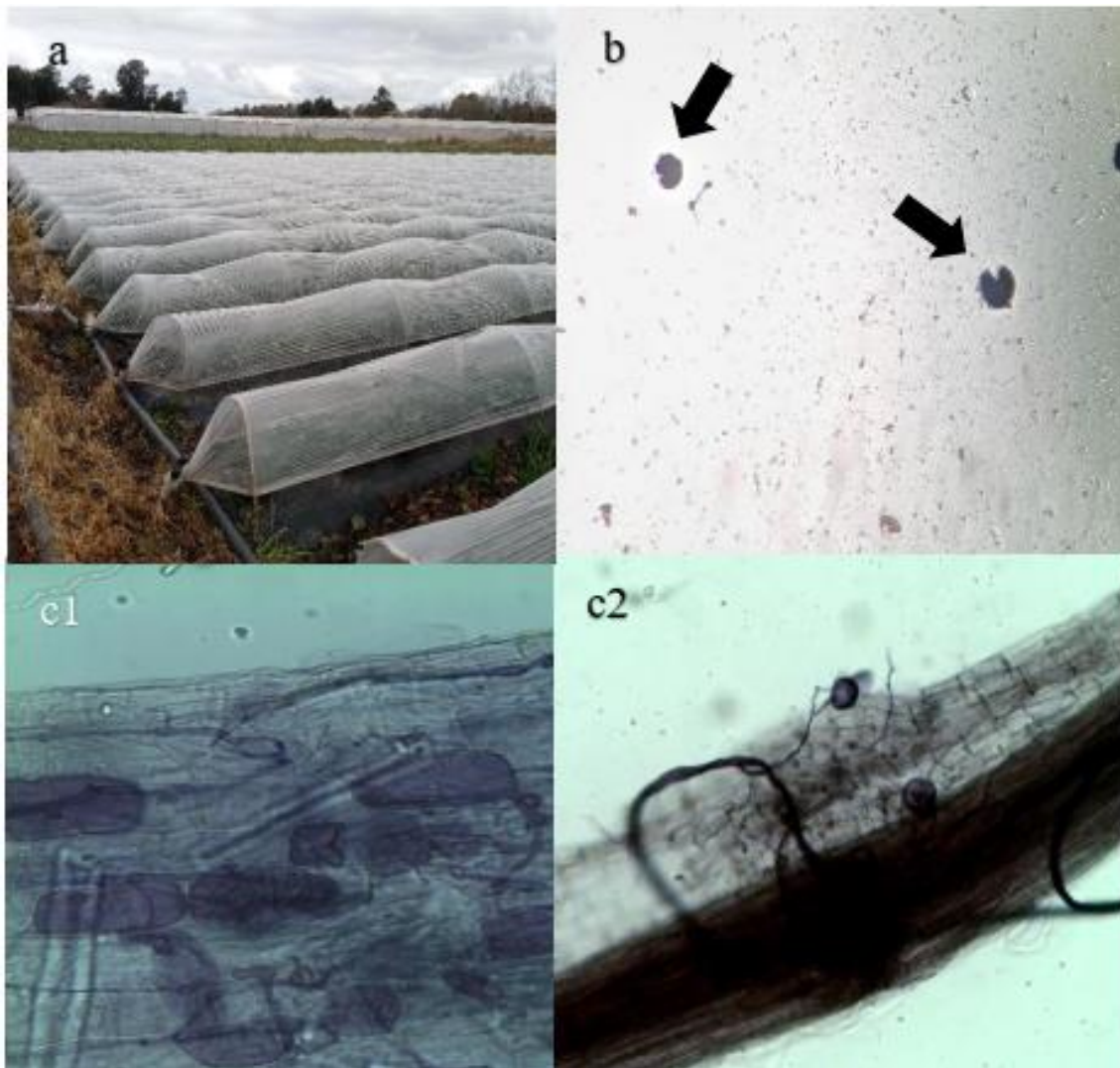


Figura 5. Hallazgos en el establecimiento de producción de frutillas en suelo LH. a: camellones de cultivo con mulching de polietileno, fertirriego por goteo y túneles de protección contra vientos y heladas a campo. b: esporas encontradas en las muestras de suelo colectadas. c: 1; vesículas y 2, micelio interno y espора de hongos MA en raíces de frutilla muestreadas (aumento 400X).



Figura 6. Hallazgos en el establecimiento de producción de frutillas en hidroponía con sustrato EC. a: cultivo en sacos de sustrato hidropónico y en caballetes abiertos con fertirriego por goteo en condiciones de invernadero. b: planta con signos de deficiencia de fósforo en los folíolos viejos. c: cara superior y, d: inferior de los folíolos de plantas de frutilla con insectos plaga.

1.2 Evaluación en condiciones de invernadero del cultivo de frutillas en sistema sin suelo y su interacción con los hongos micorrícicos arbusculares.

Previamente al inicio del ensayo se obtuvo el peso fresco (PF) de 100 plantines de frutilla adquiridos dando un promedio de $7,836 \pm 0,83$ g, con un largo de raíz promedio de $9,8 \pm 0,50$ cm, los plantines mostraban raíces oscuras (de almacenamiento) en su mayoría sin signos de necrosis ni pudriciones. El análisis de estas raíces en cuanto a la presencia de hongos MA reveló un 9,33% de micorrización por una cepa originaria del lugar de procedencia de los plantines se observaron vesículas (6,7%) y no se observaron arbusculos.

Del ADN genómico extraído de las raíces de los plantines adquiridos para el ensayo se realizó la detección molecular de hongos MA originarios de los suelos de rustificación a campo. Mediante una PCR anidada, utilizando mezclas de cebadores específicos del gen del ARN ribosomal de hongos MA, se observó la amplificación de secuencias del tamaño de banda esperado aproximado de 1550 pb con la mezcla Cf/Br (Figura 7a). También se logró amplificar un segundo producto con la mezcla AML1/AML2 con un tamaño de banda aproximadamente de 800 pb (Figura 7b), ambos fueron visualizados mediante gel de agarosa al 0,8% y tinción con bromuro de etidio. El objetivo a futuro es hacer más rondas de amplificación para obtener la cantidad de producto suficiente para clonar, digerir con enzimas de restricción y secuenciar los fragmentos de ADN de hongos MA obtenidos y caracterizarlos genéticamente.

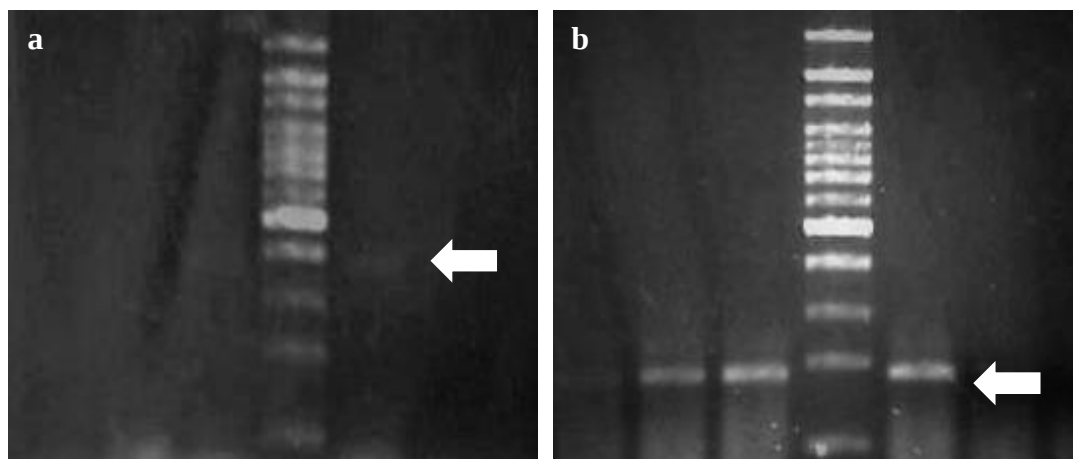


Figura 7. Geles de agarosa (0,8%) donde se observan los productos de amplificación (flecha blanca) de ADN genómico de los hongos MA originarias de los suelos de rustificación de los plantines de frutilla, marcador molecular (Marker 400 pb). a: producto obtenido con mezcla de cebadores Cf/Br. b: producto obtenido con mezcla de cebadores AML1/AML2.

Los valores de pH y CE del sustrato utilizado fueron monitoreados cada 15 días desde el inicio del ensayo, las condiciones de invernadero propiciaron una temperatura ambiental entre 25-30 °C durante los meses de septiembre a diciembre. Los datos obtenidos de CE y pH para cada pretratamiento permanecieron constantes y sin una marcada variabilidad entre sí. En el pretratamiento CN la CE osciló entre los 0,02 a los 0,10 dS/m y el pH de 5,86 a 6,79, el pretratamiento F36 mostró valores de CE de 0,01 a 0,15 dS/m y mediciones de pH entre los 6,20 a 7,45, el F37 valores de CE entre 0,02 a 0,14 dS/m y pH de 6,17 a 7,45 y el B1 valores de CE entre 0,01 a 0,14 dS/m y pH de 5,74 a 7,47.

En la Figura 8 se muestra la variación de CE y pH a lo largo de todo el ensayo de los pretratamientos, también se muestran los valores promedio obtenidos en los establecimientos de producción (EC y LH).

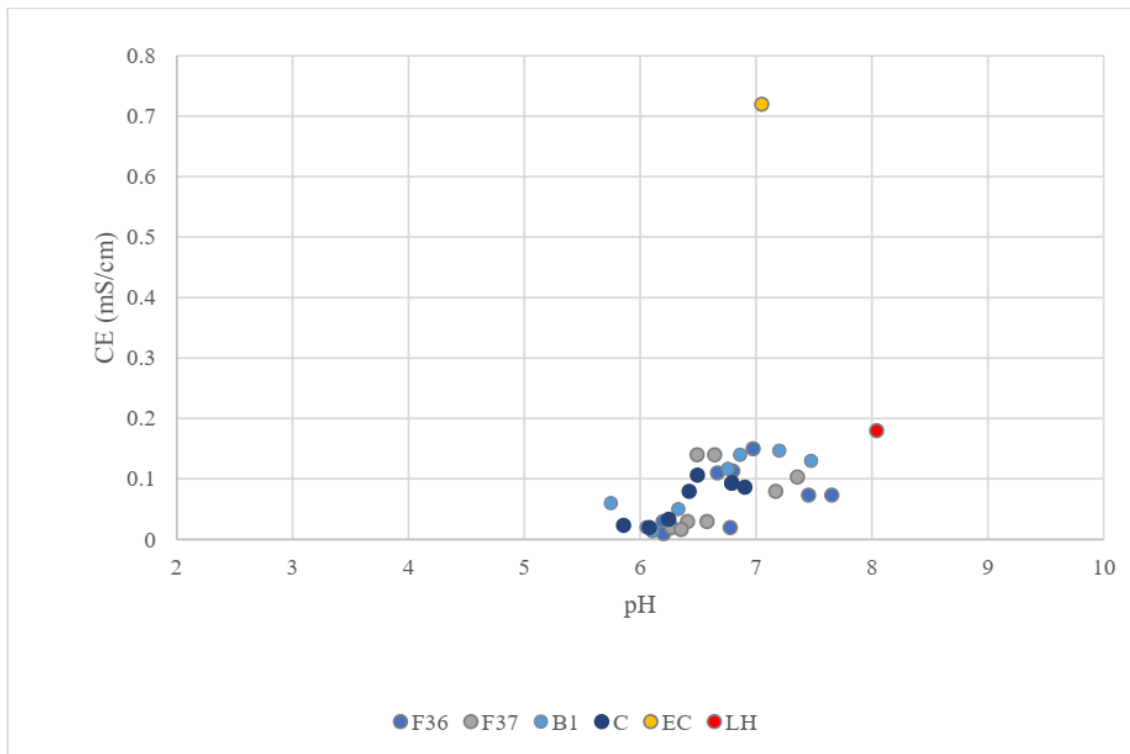


Figura 8. Valores de CE y pH del sustrato de las plantas de frutilla inoculadas con las cepas de hongos MA F36, F37, B1 y tratamiento sin inocular (CN) y los valores promedio obtenidos en los establecimientos productivos EC y LH.

1.2.1 Determinación de marchitez incipiente y la capacidad de contenedor del sustrato.

Las variaciones en la capacidad de contenedor del sustrato (CC) evaluada en las plantas inoculadas con las cepas F36, F37 y B1, se utilizaron para determinar los valores en los que las plantas alcanzaban el umbral de marchitez incipiente, mostrando signos de pérdida de turgencia en las hojas (Figura 9b). Estas determinaciones se realizaron para establecer las condiciones de estrés por sequía impuestas a las plantas de frutilla en el ensayo siguiente. En la Figura 9a se observa la tendencia descendente del porcentaje de CC del sustrato al transcurrir los intervalos de tiempo sin riego, la cepa no fue un parámetro discriminatorio en esta medida, sin embargo, cuando se evaluó la CC a la que las plantas mostraron signos de marchitez incipiente se observaron diferencias entre plantas inoculadas con las diferentes cepas.

Los primeros signos de marchitez incipiente fueron reportados tras 9 días sin riego (1 planta por cada tratamiento), el porcentaje de CC en promedio para cada grupo de plantas inoculadas fue: F36 (33,8 $\pm$ 1,01%), F37 (39,01 $\pm$ 1,24%) y B1 (33,52 $\pm$ 2,03%). A los 12 días sin riego, el número de plantas con marchitez incipiente se incrementó considerablemente en la cepa F36 5/8, en la cepa F37 2/8 y en la cepa B1 4/8, el promedio de CC para cada cepa correspondiente a esta evaluación fue de F36 (24,57 $\pm$ 0,82%), F37 (29,02 $\pm$ 1,58%) y B1 (23,73 $\pm$ 1,05%).

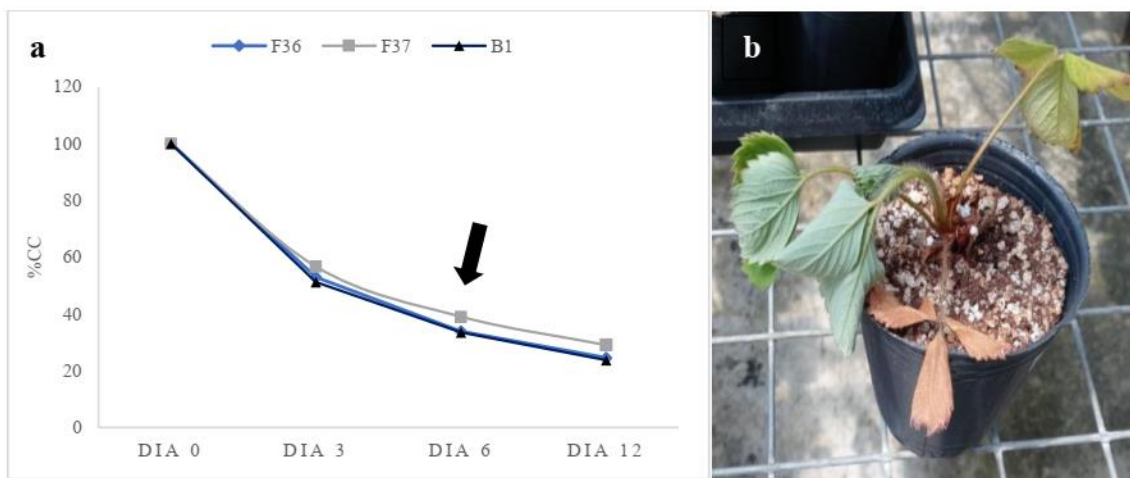


Figura 9. a: Porcentajes de CC en el sustrato de plantas de frutilla inoculadas con las cepas F36, F37, B1 en relación con el tiempo sin riego, la flecha señala la aparición de signos de marchitez en las plantas. b: planta de frutilla con signos de marchitez incipiente.

1.2.2 Evaluación de la colonización micorrícica

Al inicio del ensayo (septiembre) se efectuaron controles de infectividad del inóculo utilizado en plantas micotróficas (maíz) de las cepas. A los 30 días luego de la inoculación (octubre) se observó el establecimiento de la simbiosis para las 3 cepas de hongos MA, siendo la cepa B1 la más infectiva para este hospedante ($60,6 \pm 17,4\%$), seguida de la cepa F37 ($57,1 \pm 32,1\%$) y por último la cepa F36 ($40,9 \pm 9,3\%$), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre estos valores. Al momento de la toma de muestras el porcentaje de arbuscúlos fue mayor que el de vesículas en todas las cepas lo que evidencia el establecimiento activo de estas en las raíces del hospedante (Figura 10). En el control sin inocular no se encontró presencia de hongos MA (MI: 0,0%).

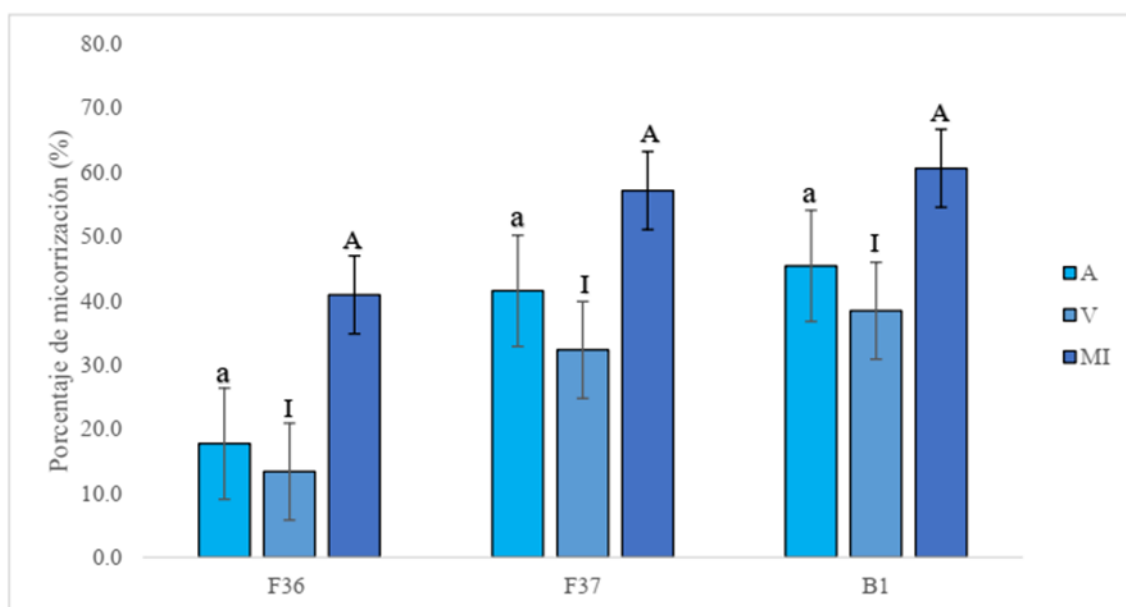


Figura 10. Control de infectividad de inóculos en maíz. MI: micelio interno, A: arbuscúlos, V: vesículas. Las barras corresponden a las medias $\pm$ el error estándar. Las letras diferentes corresponden a diferencias significativas ($p < 0,05$).

En las plantas de frutilla creciendo en bandejas forrajeras a 100% CC se tomaron muestras de raíces en 3 momentos desde el inicio del ensayo con 30 días de diferencia entre cada uno. Como se muestra en la Figura 11 a los 30 días de inoculación (octubre), se observó micorrización en las réplicas dispuestas en el pretratamiento sin inocular CN (8,3 $\pm$ 6,8%), el porcentaje de micelio interno de la cepa F37 (56,4 $\pm$ 10,3%) fue significativamente mayor que las cepas F36 (MI 8,1 $\pm$ 0,2%) y B1 (MI 7,6 $\pm$ 2,8%). La presencia de arbuscúlos fue baja en este muestreo y no mostró diferencias significativas entre las cepas F36 (1,0 $\pm$ 1,0%) y B1 (1,0 $\pm$ 1,0%), mientras que en las plantas de F37 y CN no reportaron presencia de estas estructuras. El porcentaje de vesículas de la cepa F37 (26,6 $\pm$ 2,0%) fue significativamente mayor en comparación con las de la cepa F36 (2,1 $\pm$ 2,1%), las de la cepa B1 (1,0 $\pm$ 1,0%) y las de CN (4,2 $\pm$ 4,2%),

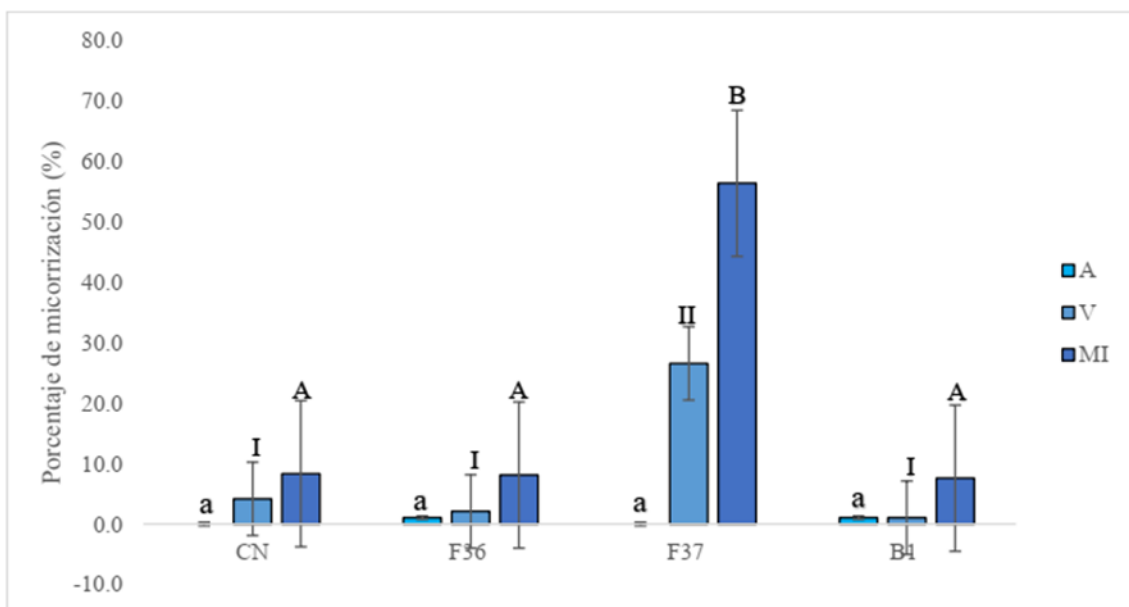


Figura 11. Colonización de las plantas de frutilla a los 30 días de la inoculación. MI: micelio interno, A: arbuscúlos, V: vesículas. Las barras corresponden a las medias $\pm$ el error estándar. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ($p < 0,05$).

A los 60 días de inoculación, luego del trasplante a contenedores individuales (noviembre), manteniendo la distribución establecida en los pre-tratamientos, se observó un incremento de la colonización de las cepas F36 (MI: 21,2+/-14,0%) y B1 (MI: 36,6+/-10,7%). La cepa F37 mantuvo los valores de colonización (MI: 55,7+/-6,3%), mientras que en las plantas no inoculadas CN no se observó la presencia de hongos MA (C: 0,0%). La proporción de las estructuras intra radicales, arbuscúlos de la cepa F36 (6,3+/-6,3%), cepa F37 (20,0+/-2,0%), cepa B1 (25,0+/-7,9%) y vesículas de la cepa F36 (8,5+/-5,6%), cepa F37 (23,9+/-6,1%) y la cepa B1 (7,4+/-7,4%) fue variable aunque no se observaron diferencias significativas para estos valores (Figura 12).

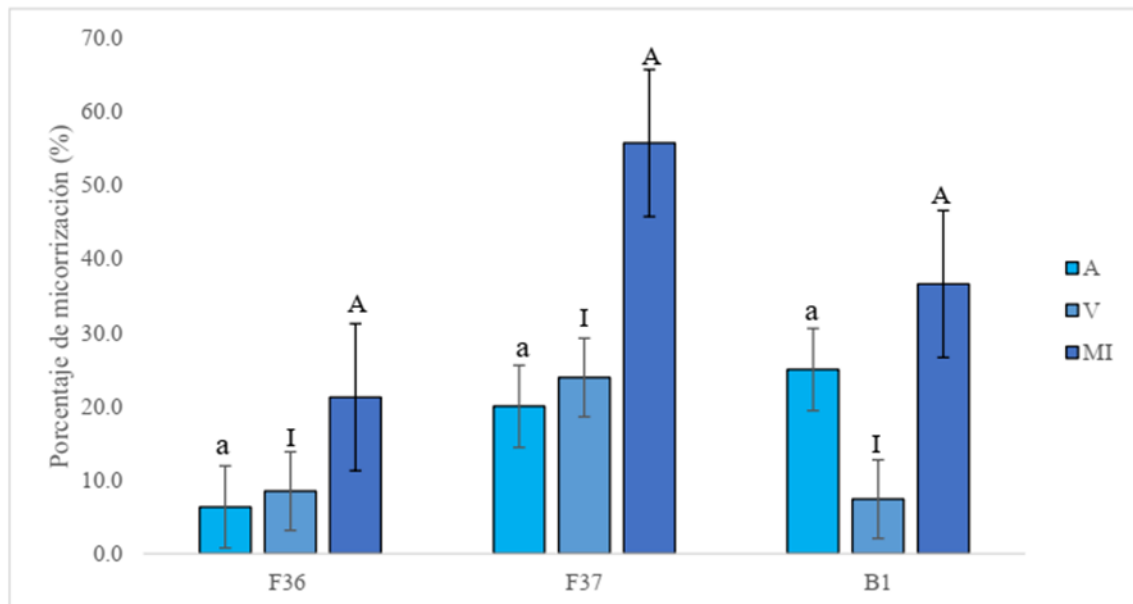


Figura 12. Colonización de las plantas de frutilla a los 60 días de la inoculación. MI: micelio interno, A: arbuscúlos, V: vesículas. Las barras corresponden a las medias +/- el error estándar. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ($p < 0,05$).

A los 90 días de la inoculación (diciembre), se analizaron las raíces de las plantas de los pre-tratamientos previo al inicio del ensayo de estrés hídrico para determinar el porcentaje de micorrización de cada una. Las plantas inoculadas con la cepa F36 mostraron un porcentaje de micorrización significativamente más alto (MI: 53,5 $\pm$ 4,7%) que las inoculadas con la cepa B1 (25,2 $\pm$ 5,9%), estas diferencias no fueron significativas en comparación con las plantas inoculadas con la cepa F37 (MI: 32,1 $\pm$ 5,5%) y las plantas no inoculadas CN (MI: 40,4 $\pm$ 15,1%).

No hubo diferencias significativas entre los valores de porcentaje de arbuscúlos entre los tratamientos (F36: 15,0 $\pm$ 6,9%, CN: 12,0 $\pm$ 6,3%, F37: 6,6 $\pm$ 3,0%, B1: 3,1 $\pm$ 1,5%), a diferencia del porcentaje de vesículas donde la cepa F36 (30,2 $\pm$ 2,6%) y CN (27,4 $\pm$ 10,5%) fueron significativamente más altos que los valores de la cepa B1 (6,4 $\pm$ 1,4%), mientras que la cepa F37 (13,0 $\pm$ 4,9%) mostró valores intermedios (Figura 13).

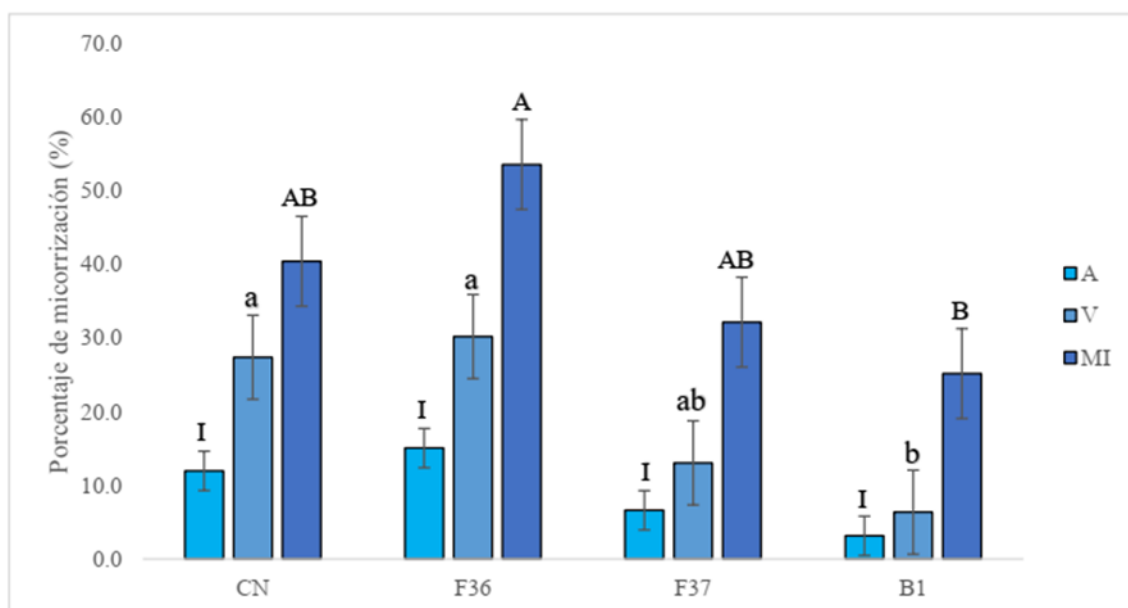


Figura 13. Colonización de las plantas de frutilla a 90 días de la inoculación. MI: micelio interno, A: arbuscúlos, V: vesículas. Las barras corresponden a las medias $\pm$ el error estándar. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ($p < 0,05$).

Al momento de la finalización del ensayo, 120 días (enero) después de la inoculación, no se observó una interacción significativa entre las cepas inoculadas y las condiciones de riego (BR/ES) para el porcentaje de micorrización. Sin embargo, se observaron diferencias significativas para la micorrización con las distintas cepas entre plantas en ambos tratamientos de riego (efectos simples significativos).

En el tratamiento BR, el porcentaje de arbuscúlos reportado fue muy bajo en todas las cepas y el CN y las diferencias entre estos no fueron estadísticamente significativas. El porcentaje de vesículas observado para la cepa F37 (43,452 $\pm$ 4,967%) fue significativamente mayor que el observado en las plantas CN (15,452 $\pm$ 6,714%) y similar al de las plantas inoculadas con la cepa F36 (33,268 $\pm$ 8,002%) y la cepa B1 (27,899 $\pm$ 8,534%). El porcentaje de micelio interno observado en las plantas inoculadas con las cepas F37 (85,397 $\pm$ 4,290%) y F36 (75,607 $\pm$ 4,257%) fue significativamente mayor que el de las plantas CN (44,009 $\pm$ 11,334%) y similar al de las plantas inoculadas con la cepa B1 (68,219 $\pm$ 13,224%) (Figura 14.1).

En condiciones de ES, el porcentaje de arbuscúlos también fue muy bajo para todas las cepas y el CN y las diferencias entre estos tampoco fueron estadísticamente significativas. La proporción de vesículas observadas para las plantas inoculadas con la cepa B1 (39,743 $\pm$ 8,866%) fue significativamente mayor que la observada para las plantas inoculadas con la cepa F36 (15,066 $\pm$ 3,518%) y similar a las inoculadas con la cepa F37 (25,888 $\pm$ 7,911%) y las plantas CN (15,066 $\pm$ 3,518%). El porcentaje de micelio interno en las cepas B1 (78,577 $\pm$ 4,841%) y F37 (75,361 $\pm$ 5,893%) fue significativamente mayor que el observado en las plantas CN (44,244 $\pm$ 11,318%) y similar al de las plantas inoculadas con la cepa F36 (49,402 $\pm$ 12,121%) (Figura 14.2).

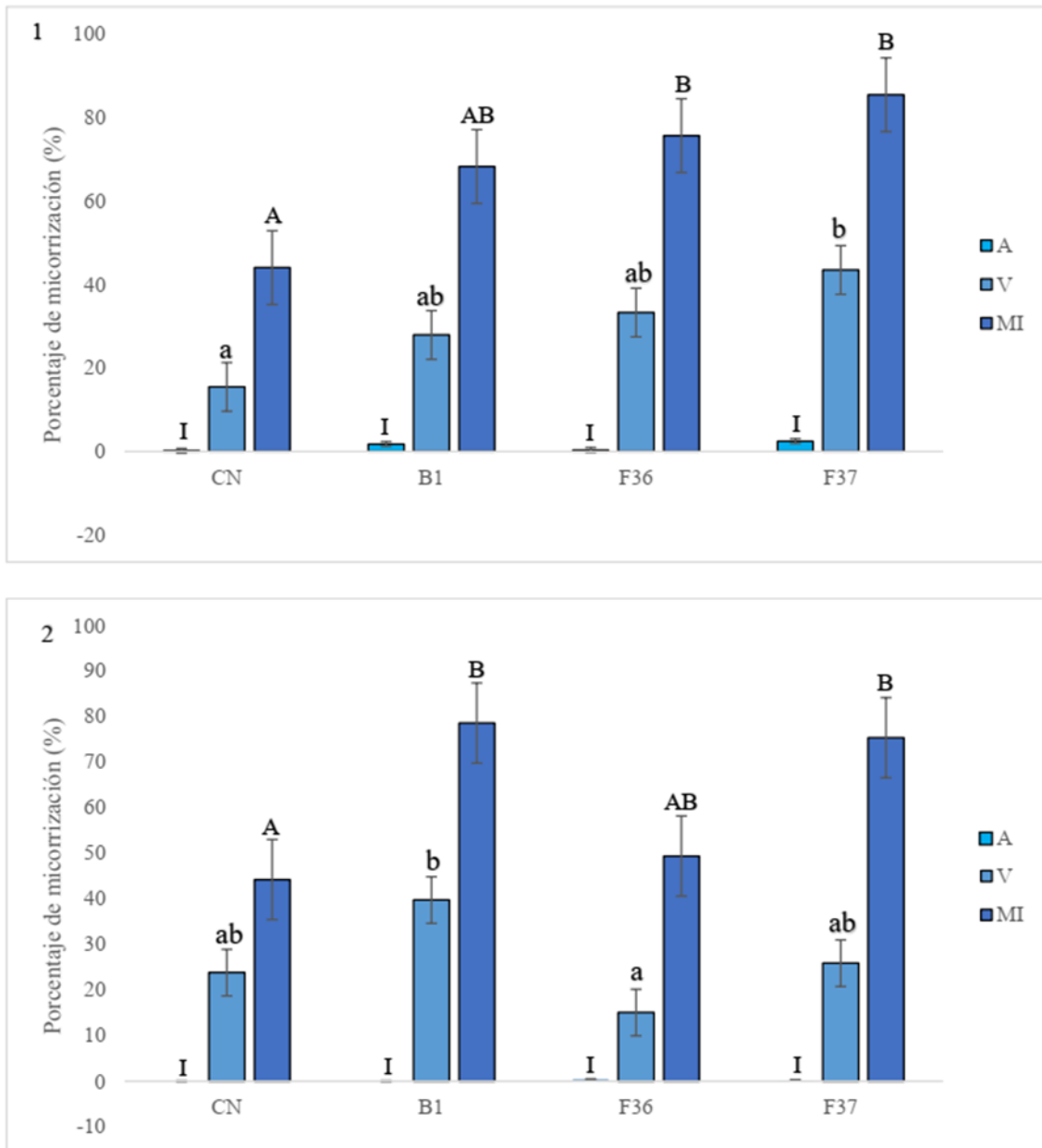
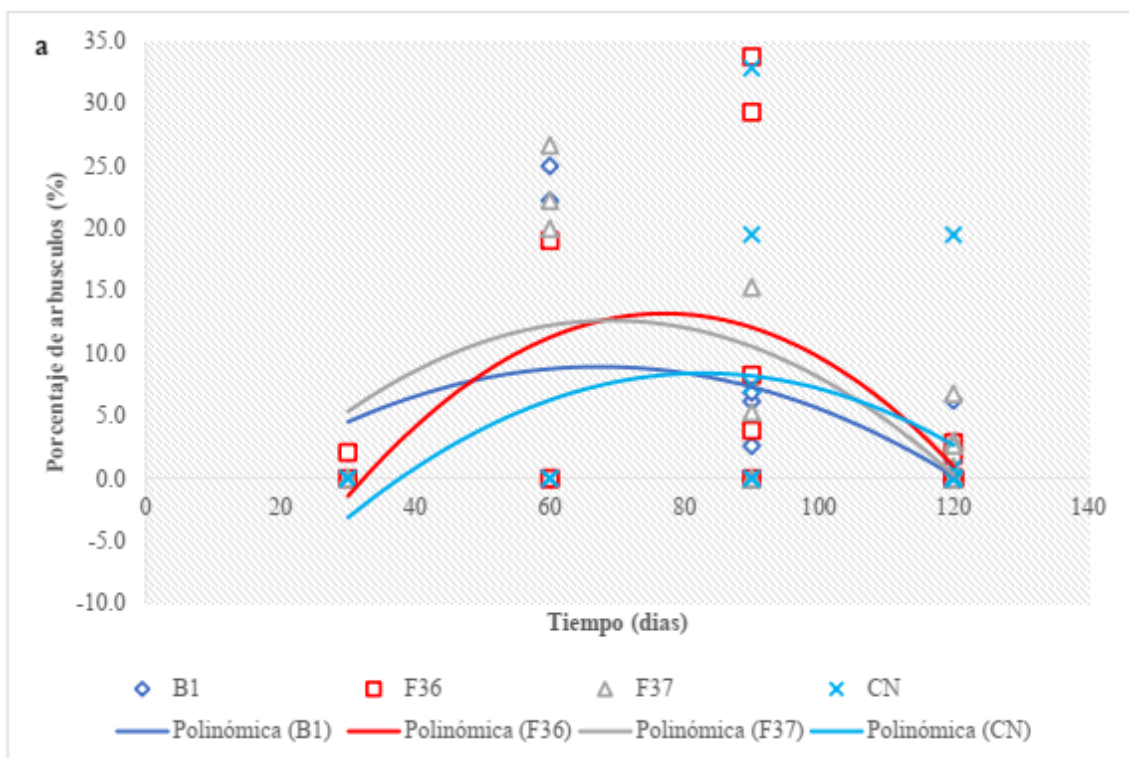


Figura 14. Colonización de las plantas de frutilla a 120 días de la inoculación en condición de riego; 1: BR, 2: ES. MI: micelio interno, A: arbusculos, V: vesículas. Las barras corresponden a las medias $\pm$ el error estándar. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ($p < 0,05$).

Se comparó el desarrollo de la colonización de las diferentes cepas (F36, F37 y B1) y la cepa nativa (CN) en las raíces de las plantas de frutilla según los testeos realizados a los 30, 60 y 90 días previos al ensayo de estrés, y a los 120 días luego de la aplicación del tratamiento de estrés hídrico. Se observó que la producción de arbusculos mostró un comportamiento similar entre las cepas inoculadas y la cepa nativa, mostrando los mayores valores a los 60 y 90 días y disminuyendo a los 120 días de colonización (Figura 15a). Respecto al porcentaje de vesículas se observó una tendencia diferente, las cepas F36, B1 y la cepa nativa (CN) tuvieron una tendencia ascendente en cada muestreo y la cepa F37, al contrario, disminuyó (Figura 15b). El comportamiento del porcentaje de micelio interno se mostró ascendente para las cepas F36, B1 y la cepa nativa (CN) desde los 30 hasta los 120 días de inoculado, en cambio la cepa F37 mostró alta colonización al día 30, una baja en el muestreo a los 60 días y el repunte a los 90 y 120 días (Figura 15c).



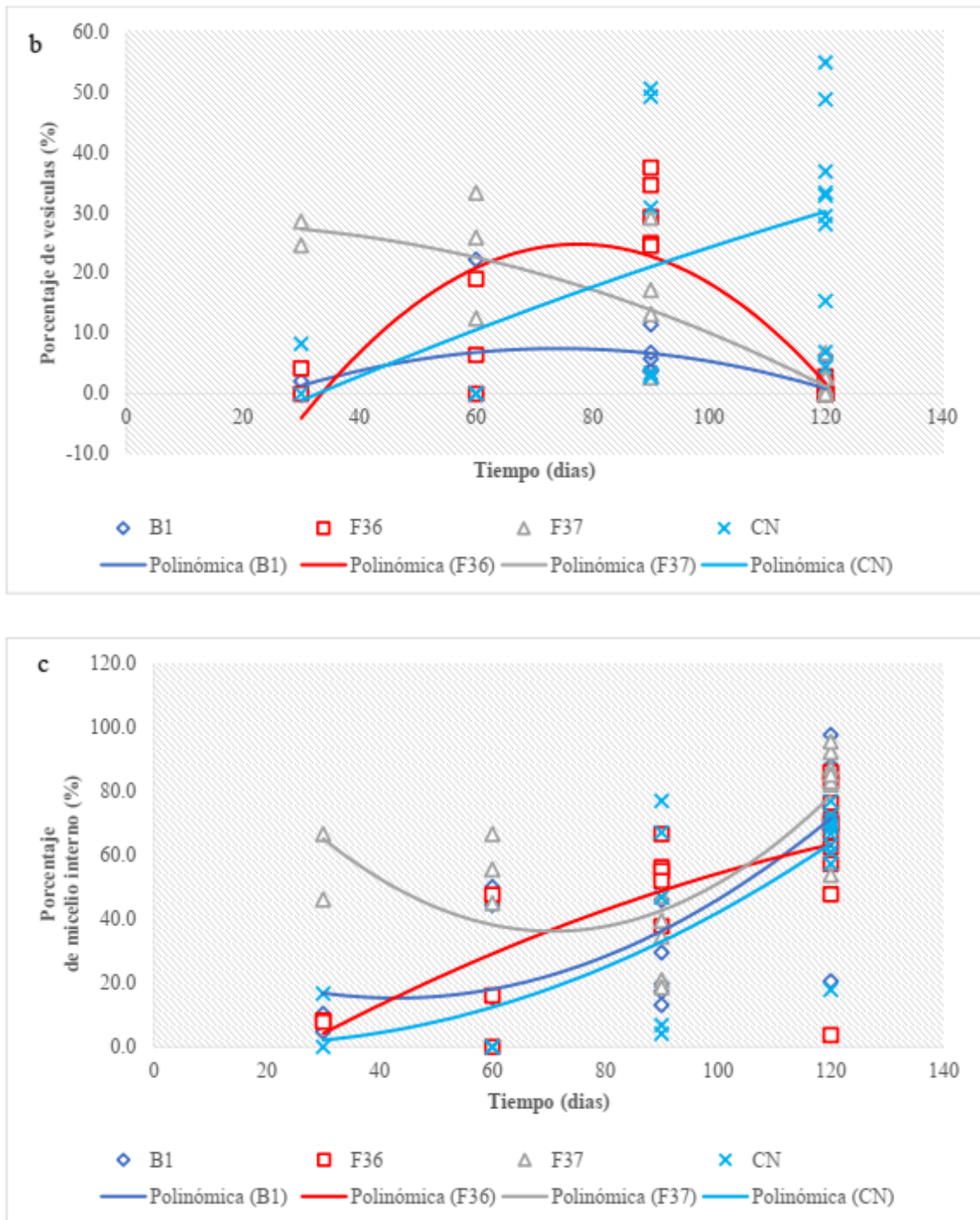


Figura 15. Comparación de porcentaje de; a: arbúsculos, b: vesículas y, c: micelio interno de las cepas F36, F37, B1 y la cepa nativa (CN) a los 30, 60, 90 y 120 días posteriores a la inoculación.

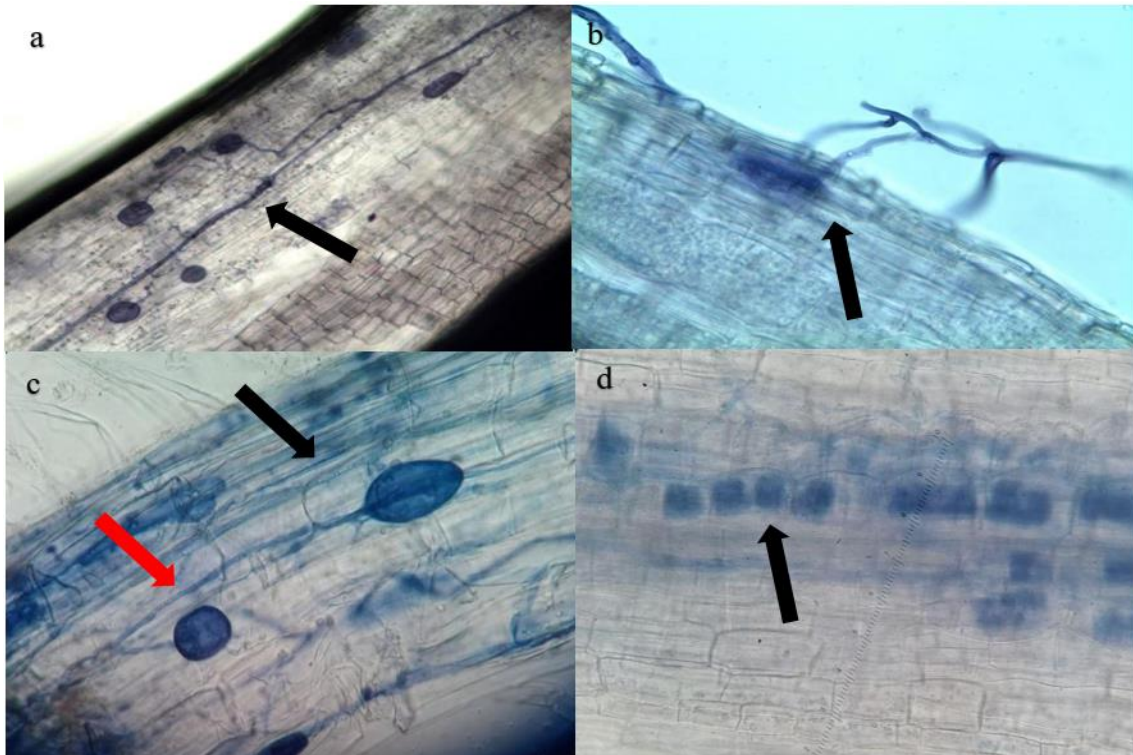


Figura 16. Estructuras de hongos MA observadas en raíces de plantas de frutilla a: hifas intercelulares asociadas a vesículas de la cepa nativa (CN) (aumento 100x). b: punto de infección primaria (apresorio) de la cepa B1 *Rhizophagus irregularis* entrando a la raíz (aumento 400x). c: vesícula (flecha negra), espora (flecha roja) de la cepa F36 *Claroideroglomus etunicatum* (aumento 100x). d: arbúsculos, se pueden observar ocupando todo el interior de la célula cortical de la cepa F37 *Rhizophagus intraradices* (aumento 100x).

Parte 2: Evaluación de la resistencia al estrés abiótico del cultivo de frutilla: ensayo de estrés hídrico en plantas micorrizadas.

A los 120 días posteriores (enero) a la inoculación con las cepas fúngicas, a la mitad de las réplicas se les suspendió el riego y se mantuvieron durante 10 días creciendo con el sustrato a CC entre 30-40% (Tratamiento: Estrés por Sequía. ES), mientras que el resto se mantuvo a 100% de CC (Tratamiento: Bien Regado. BR). Luego de este período se cosechó el material vegetal completo, discriminando entre vástago y raíz, de ambos tratamientos (Figura 17). Se obtuvieron parámetros de rendimiento; peso fresco (PF), peso seco (PS), contenido de agua, relación vástago: raíz y porcentaje de dependencia micorrícica relativa (%DMR). Al momento de la cosecha, se extrajeron las muestras de tejido de vástago y raíz de cada réplica para obtener los extractos y hacer las mediciones de los parámetros bioquímicos.



Figura 17. Material vegetal del tratamiento ES al momento de ser cosechado para su procesamiento.

2.1 Determinación de parámetros de rendimiento

Como se observa en la tabla X no hubo interacción significativa entre los dos factores testeados para el peso fresco, el peso seco y el contenido de agua en el vástago de las plantas de frutilla, pero sí se observó una interacción significativa entre las condiciones de riego de los tratamientos (BR/ES) y las cepas utilizadas para el peso fresco, peso seco y contenido de agua para las raíces de frutilla, la relación vástago:raíz relativa y DMR (Tabla 3). Se describe el análisis de cada variable a continuación:

Tabla 3. Significancia estadística de los parámetros de rendimiento.

Variables	Valores de <i>F</i>		
	Tratamiento	Cepas	Tx x Cepa
PF V	0,58 NS	1,55 NS	0,71 NS
PF R	6,02*	3,23*	3,81*
PS V	0,03 NS	4,13*	0,44 NS
PS R	0,28 NS	5,24*	4,85*
H ₂ O V	1,07 NS	0,74 NS	0,96 NS
H ₂ O R	8,40*	2,67*	3,43*
V:R	0,67 NS	1,88 NS	4,30*
DMR	2,63 NS	5,26*	3,47*

Significancia de los tratamientos y sus interacciones basadas en el ANOVA factorial, realizado sobre las variables de rendimiento; peso fresco (PF), peso seco (PS), contenido de agua (H₂O) de vástago (V) y raíz (R), relación vástago:raíz y dependencia micorrícica relativa (DMR) de las plantas de frutilla al momento de la cosecha y el tratamiento con la condición de riego (BR/ES) y la cepa utilizada (F36, F37, B1, y CN)

*: Significativo, $p < 0,05$

NS: No significativo

2.1.1 Peso fresco (PF)

Como se muestra en la Figura 18, el PF obtenido de los vástagos de plantas de frutilla inoculadas no mostró diferencias significativas bajo ninguna de las condiciones de riego testeadas. Sin embargo, se observó un menor desarrollo del vástago en las plantas inoculadas con la cepa F37 en ambas condiciones de riego; BR (6,59 $\pm$ 0,618 gr) y ES (5,748 $\pm$ 0,527 gr).

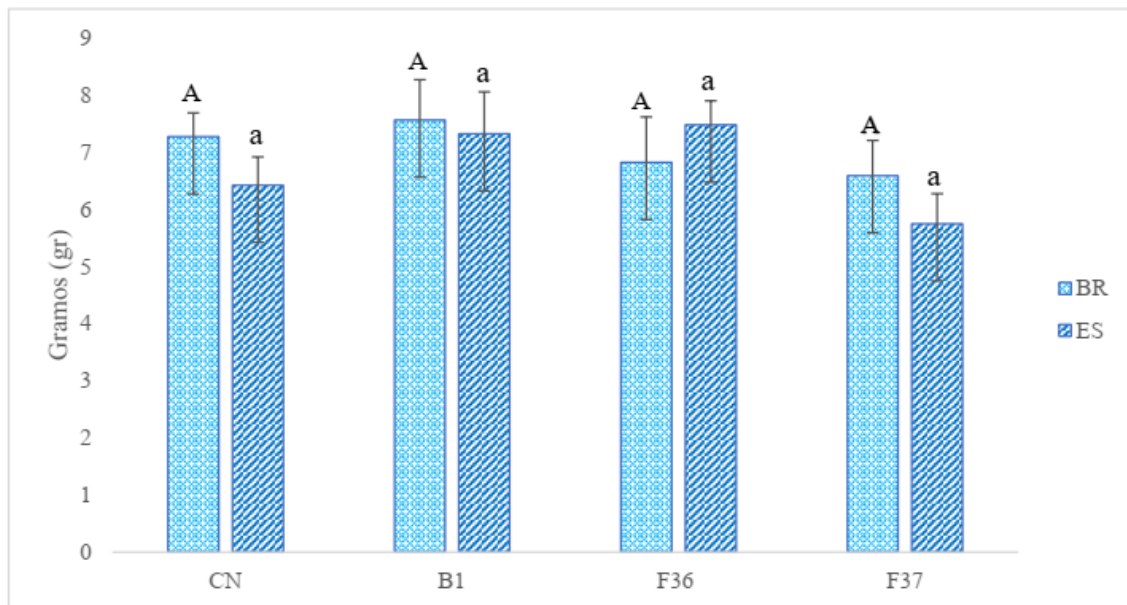


Figura 18. Valores de peso fresco (PF) de vástagos de los tratamientos ES y BR. Las barras corresponden a las medias $\pm$ el error estándar. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ($p < 0,05$)

El PF de las raíces de plantas inoculadas con la cepa B1 (22,358 $\pm$ 5,003 gr) en la condición BR fue significativamente mayor que el resto de las raíces de las plantas con la excepción de las inoculadas con la cepa F37 (7,85 $\pm$ 1,697 gr) en condiciones de ES como se observa en la Figura 19.

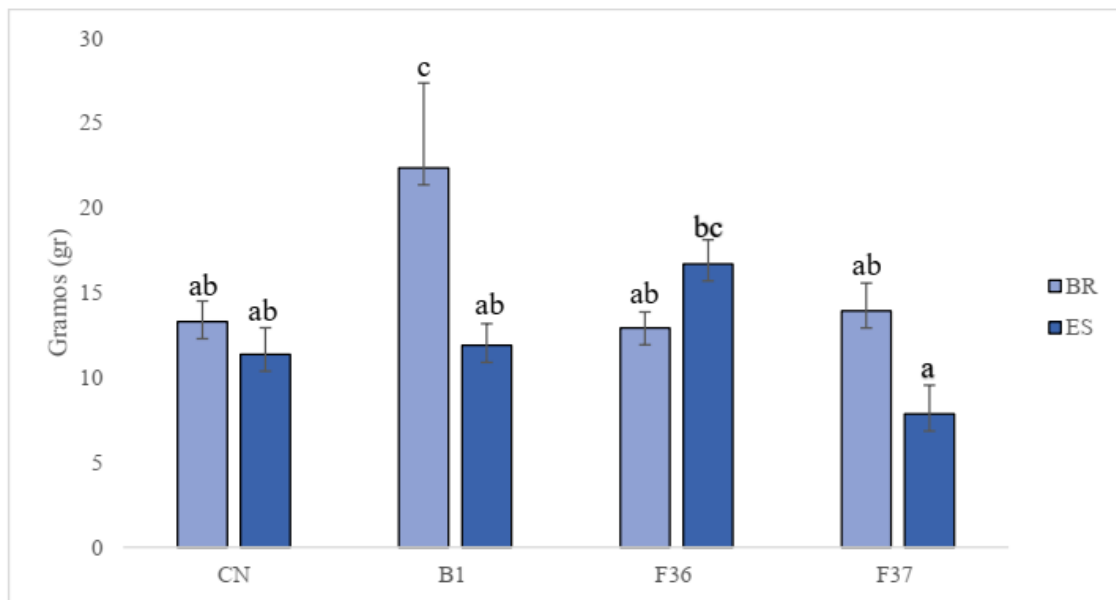


Figura 19. Valores de peso fresco (PF) de raíz de los tratamientos ES y BR. Las barras corresponden a las medias $\pm$ el error estándar. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ($p < 0,05$)

2.1.2 Peso seco (PS)

El PS de los vástagos de las plantas de frutilla no fue significativamente diferente en las plantas de frutilla bajo la condición de riego óptimo (BR). Sin embargo, en el tratamiento ES se observó que las plantas inoculadas con las cepas F36 (2,224 $\pm$ 0,180 gr) y B1 (2,127 $\pm$ 0,197 gr) tuvieron un PS significativamente mayor, mientras que las plantas inoculadas con la cepa F37 (1,448 $\pm$ 0,197 gr) tuvieron significativamente menos PS, pero ninguno de los tratamientos mostró diferencias con el CN (1,852 $\pm$ 0,141 gr) (Figura 20).

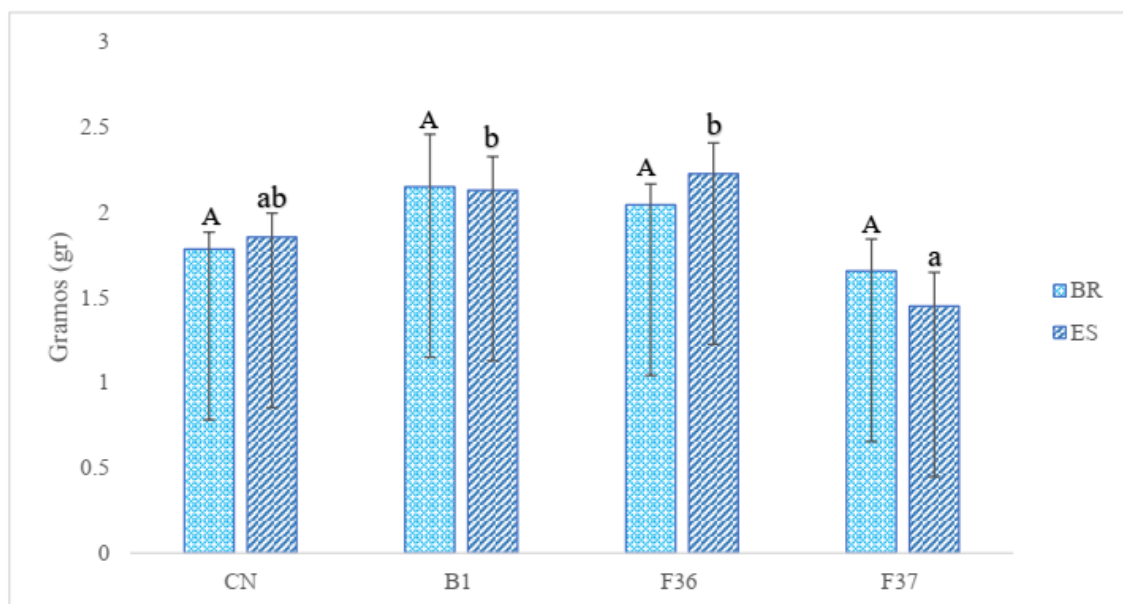


Figura 20. Valores de peso seco (PS) de vástagos de los tratamientos ES y BR. Las barras corresponden a las medias $\pm$ el error estándar. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ($p < 0,05$)

El valor de PS de las raíces de las plantas inoculadas con la cepa B1 (4,430 $\pm$ 1,083 gr) en condiciones BR fue significativamente mayor al resto de las raíces analizadas en este tratamiento. Mientras que el PS de las raíces de las plantas inoculadas con la cepa F36 (4,032 $\pm$ 0,364 gr) en condiciones de ES fue significativamente mayor que las de los demás tratamientos con excepción de las raíces de las plantas inoculadas con la cepa B1 (2,887 $\pm$ 0,182 gr) en estas condiciones (Figura 21).

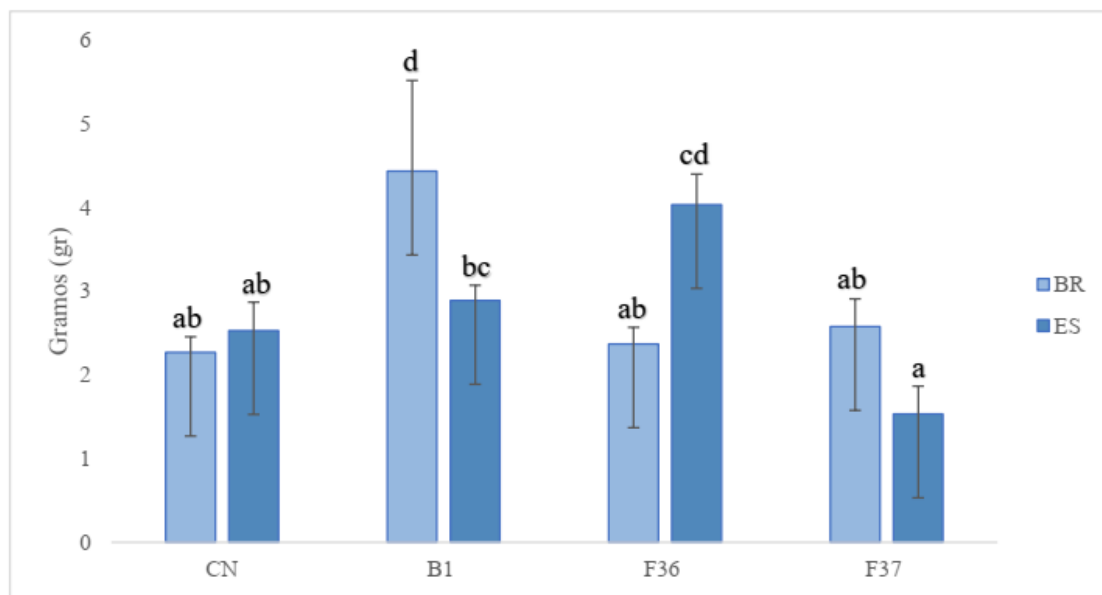


Figura 21. Valores de peso seco (PS) de raíz de los tratamientos ES y BR. Las barras corresponden a las medias $\pm$ el error estándar. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ($p < 0,05$)

2.1.3 Contenido de agua

El contenido de agua fue calculado por la diferencia de pesos fresco y seco en ambos tratamientos tanto para vástago como raíz. En los resultados presentados en la tabla X, se observa que el contenido de agua de la parte aérea de las plantas de frutilla inoculadas y CN no mostraron diferencias significativas entre los valores para ambos tratamientos de riego.

Por otra parte, el contenido de agua en las raíces de las plantas de frutilla inoculadas con la cepa B1 (17,927 $\pm$ 3,929 gr) en condiciones BR fue significativamente mayor al del resto de las plantas. Mientras que el contenido de agua en las raíces de plantas colonizadas con la cepa F36 (12,659 $\pm$ 1,140 g.) en condiciones de ES fue significativamente mayor que el de las raíces de las plantas inoculadas con la de cepa F37 (6,318 $\pm$ 1,369 g.), mientras que los valores del contenido de agua en las raíces de las plantas CN y las inoculadas con la cepa B1 mostraron valores intermedios (Tabla 4).

Tabla 4. Valores de contenido de agua

Tratamiento	Nivel	Contenido de agua (g)	
		Vástago	Raíz
Ensayo Estrés por sequía ES	CN	4,570 $\pm$ 0,380 a	8,845 $\pm$ 1,243 AB
	F36	5,253 $\pm$ 0,248 a	12,659 $\pm$ 1,140 B
	F37	4,299 $\pm$ 0,411 a	6,318 $\pm$ 1,369 A
	B1	5,194 $\pm$ 0,549 a	9,006 $\pm$ 1,136 AB
Ensayo bien regado BR	CN	5,491 $\pm$ 0,325 i	11,018 $\pm$ 1,155 AB
	F36	4,780 $\pm$ 0,403 i	10,563 $\pm$ 0,794 AB
	F37	4,936 $\pm$ 0,436 i	11,344 $\pm$ 1,355 AB
	B1	5,415 $\pm$ 0,409 i	17,927 $\pm$ 3,929 C

Valores de contenido de agua de vástago y raíz de los tratamientos ES y BR. Los valores representan la media de las réplicas $\pm$ el error estándar. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ($p < 0,05$)

2.1.4 Relación Vástago:Raíz

La relación vástago:raíz en base al peso seco de las plantas de frutilla inoculadas (cepas F36, F37 y B1) fue calculada entre los niveles de cada tratamiento. Se observó una interacción significativa entre las condiciones de riego de BR/ES y las cepas inoculadas sobre esta variable. Las plantas de frutilla inoculadas con la cepa B1 en BR (0.4561 $\pm$ 0.0671) y las inoculadas con la cepa F36 (0,5215 $\pm$ 0,0472) en condiciones de ES mostraron mayor relación orientada a la raíz de este cociente en comparación con el resto de los grupos de plantas con y sin inocular en ambas condiciones de riego, con excepción de las inoculadas con la cepa F37 en condición ES (1,1469 $\pm$ 0,1368) en las cuales el cociente supera la unidad (Figura 22).

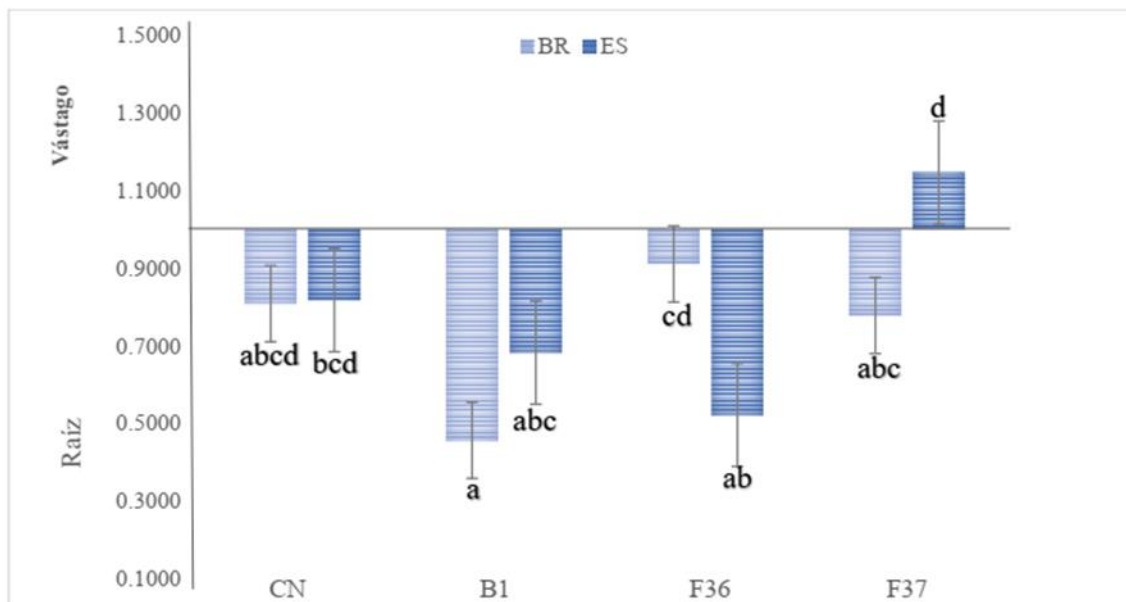


Figura 22. Relación Vástago:Raíz de los tratamientos ES y BR. Las barras corresponden a la media de las réplicas $\pm$ el error estándar. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ($p < 0,05$).

2.1.5 Dependencia Micorrícica Relativa (DMR)

El DMR fue calculado en base al peso seco de plantas inoculadas de ambos tratamientos de riego. Se observó una interacción significativa entre las condiciones de riego de BR/ES y las cepas inoculadas sobre esta variable. El porcentaje de DMR de las plantas de frutilla colonizadas con la cepa B1 ($162,4379 \pm 1,3763\%$) en el tratamiento BR fue significativamente mayor que el de las otras cepas con la excepción de la DMR de las plantas de frutilla inoculadas con la cepa F36 ($142,8718 \pm 0,4664\%$) en condiciones ES. Solo las plantas inoculadas con la cepa F37 ($68,0348 \pm 0,5247\%$) en la condición ES mostraron un porcentaje de DMR menor a 100 (figura 23).

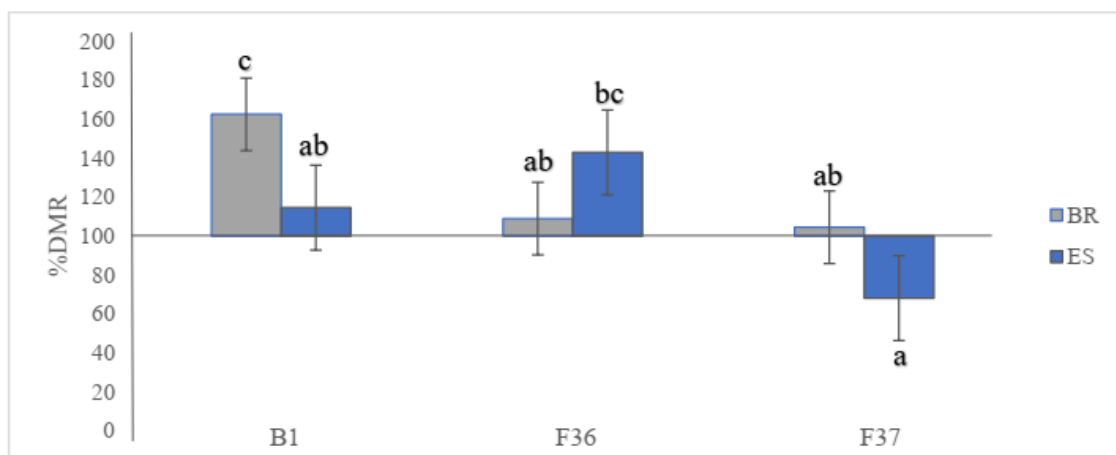


Figura 23. Porcentaje de DMR de los tratamientos ES y BR. Las barras corresponden a la media de las réplicas $\pm$ el error estándar. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ($p < 0,05$).

2.2 Determinación de parámetros bioquímicos

Como se observa en la tabla 5 sólo se observaron interacciones significativas entre los dos tratamientos sobre la cantidad de proteínas totales en el vástago y la actividad de la enzima catalasa en la raíz de las plantas de frutilla inoculadas en ambas condiciones de riego. Se describe el análisis de cada variable a continuación:

Tabla 5. Significancia estadística de los parámetros bioquímicos.

Variables	Valores de <i>F</i>		
	Tratamiento (ES/BR)	Cepas utilizadas (F36, F37, B1 y CN)	Tratamiento x Cepa
PROT V	0,67 NS	3,68*	4,26*
PROT R	1,55 NS	1,67 NS	0,13 NS
CAT V	1,63 NS	2,37 NS	1,80 NS
CAT R	5,88*	21,82*	11,07*
GS V	0,13 NS	4,03 NS	1,34 NS
GS R	0,86 NS	4,60*	0,09 NS
GPX V	1,20 NS	5,58*	1,07 NS
GPX R	2,31 NS	0,29 NS	1,34 NS
Pi V	2,35 NS	2,78 NS	2,05 NS
Pi R	8,26*	3,31*	1,43 NS

Significancia de los tratamientos y sus interacciones basadas en el ANOVA factorial, realizado sobre las variables bioquímicas; catalasa (CAT), glutamina sintetasa (GS), guaiacol peroxidasa (GPX), fósforo inorgánico (Pi) y proteínas totales (PROT) de vástago (V) y raíz (R) de las plantas de frutilla al momento de la cosecha y el tratamiento con la condición de riego (BR/ES) y la cepa utilizada (F36, F37, B1, y CN)

*: Significativo, $p < 0,05$

NS: No significativo

2.2.1 Proteínas Totales (PROT)

Los valores obtenidos para la determinación de PROT mostraron valores más altos en los extractos de vástago que en los de raíz. En el vástago las plantas inoculadas con las cepas B1 ($33,05 \pm 3,18 \mu\text{g/ml}$) y F36 ($33,848 \pm 1,77 \mu\text{g/ml}$) en condiciones BR y en ES ($35,266 \pm 0,266 \mu\text{g/ml}$) y ($33,759 \pm 2,55 \mu\text{g/ml}$) respectivamente, en el vástago de las plantas inoculadas con la cepa F37 en el tratamiento BR se observaron los valores de PROT significativamente mayores, respecto a las plantas sin inocular (CN) en condiciones BR, para las cuales se obtuvieron los menores valores de PROT ($25,691 \pm 1,598 \mu\text{g/ml}$). Sin embargo, estas plantas sometidas a la condición de ES no variaron significativamente sus valores de PROT ($32,799 \pm 1,574 \mu\text{g/ml}$). El comportamiento inverso se observó para el contenido de PROT en el vástago de las plantas inoculadas con la cepa F37, las cuales disminuyeron el contenido de PROT en la condición de ES ($27,730 \pm 1,240 \mu\text{g/ml}$) (Figura 24.1).

En los extractos de las raíces de frutilla los valores obtenidos de PROT fueron muy similares para todas las cepas y el CN en ambos niveles de riego ES y BR. Los valores variaron entre 18,000 y 20,000 $\mu\text{g/ml}$ y no mostraron diferencias significativas entre sí (Figura 24.2).

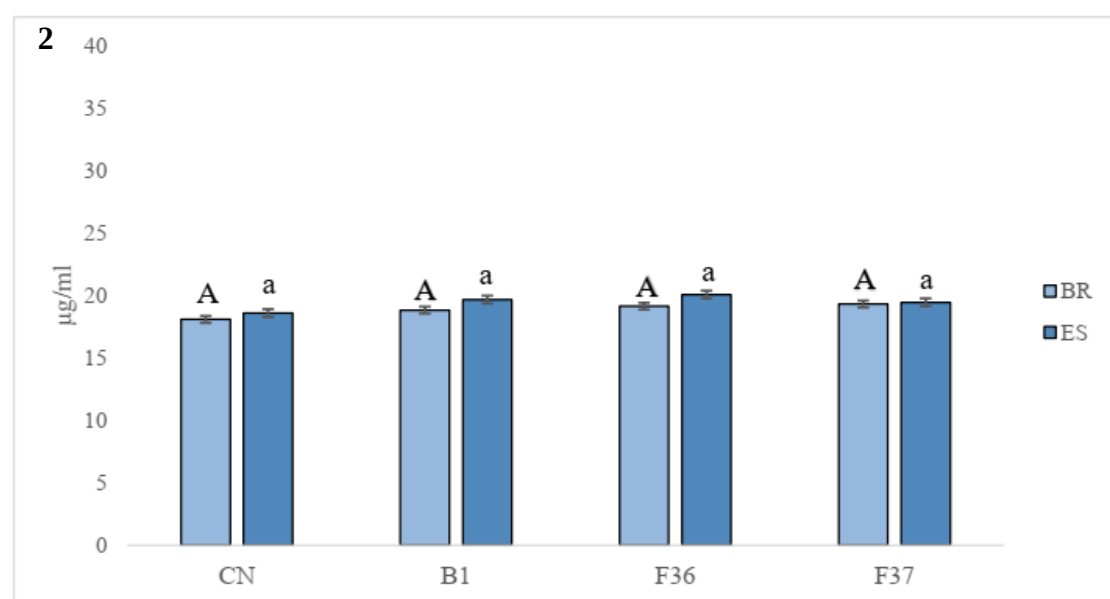
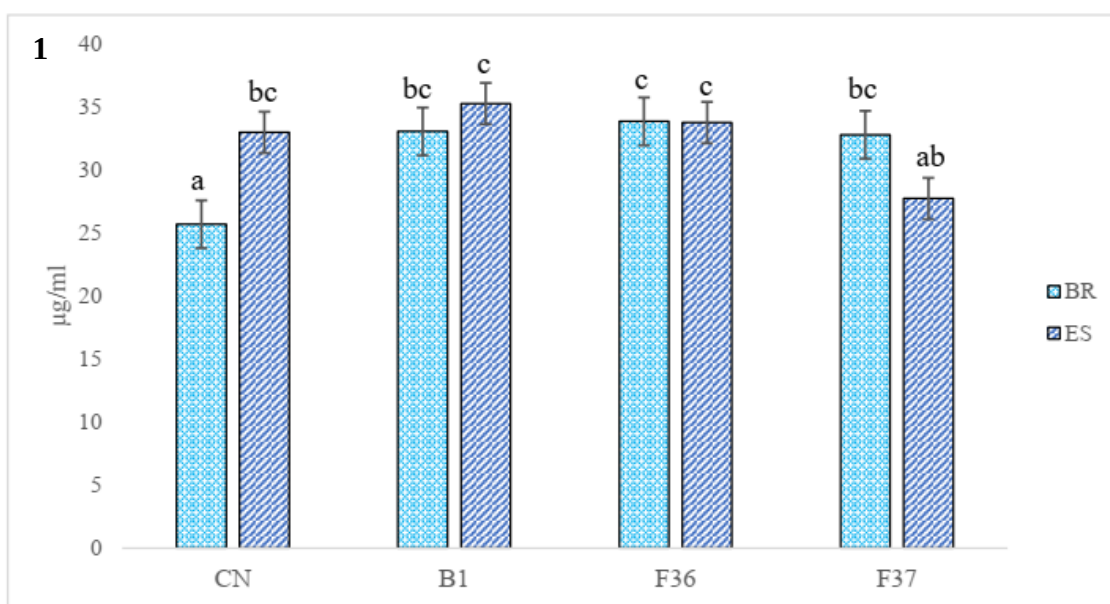


Figura 24. Concentración de proteínas totales (PROT) del extracto de: 1: vástago y, 2: raíz de cada tratamiento, ES: estrés por sequía, BR: bien regado. Las barras corresponden a la media de las réplicas +/- el error estándar. Distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

2.2.2 Catalasa (CAT)

La determinación de la actividad enzimática CAT de los extractos de vástago y raíz se realizó en ambos tratamientos de riego. En el tratamiento BR, el cálculo de CAT en vástago no mostró diferencias significativas entre las plantas inoculadas con las distintas cepas, aunque se observó que las plantas del tratamiento CN ($0,2689 \pm 0,0897 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PROT}$) mostraron los mayores valores para CAT en estas condiciones de riego. Las determinaciones realizadas para CAT en condiciones de ES no difirieron significativamente entre las plantas inoculadas y el control CN, sin embargo, los valores de CAT obtenidos de los vástagos de plantas inoculadas con la cepa B1 ($0,0453 \pm 0,0078 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PROT}$) fueron los más bajos reportados (Figura 25.1).

Los valores de CAT medidos de los extractos de raíces mostraron interacciones significativas entre los tratamientos. Las plantas de frutilla inoculadas con la cepa F37 ($0,204 \pm 0,012 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PROT}$) en condición ES expresaron valores significativamente más altos de CAT que el resto de las plantas. Los valores de CAT en las raíces de estas plantas, pero en condiciones BR ($0,1007 \pm 0,0041 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PROT}$) también fueron significativamente más altos que los que expresaron las raíces inoculadas con la cepa B1 en BR ($0,0524 \pm 0,0119 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PROT}$) y las inoculadas con la cepa F36 ($0,0455 \pm 0,0158 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PROT}$) y las plantas no inoculadas CN ($0,0371 \pm 0,0072 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PROT}$) en ES (Figura 25.2).

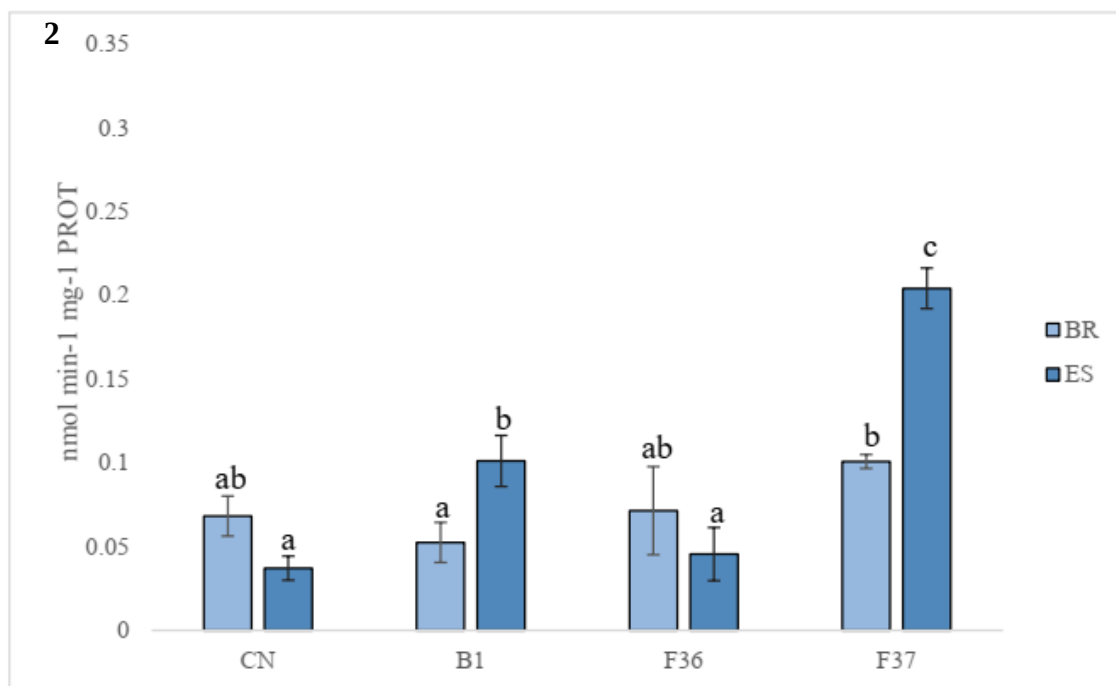
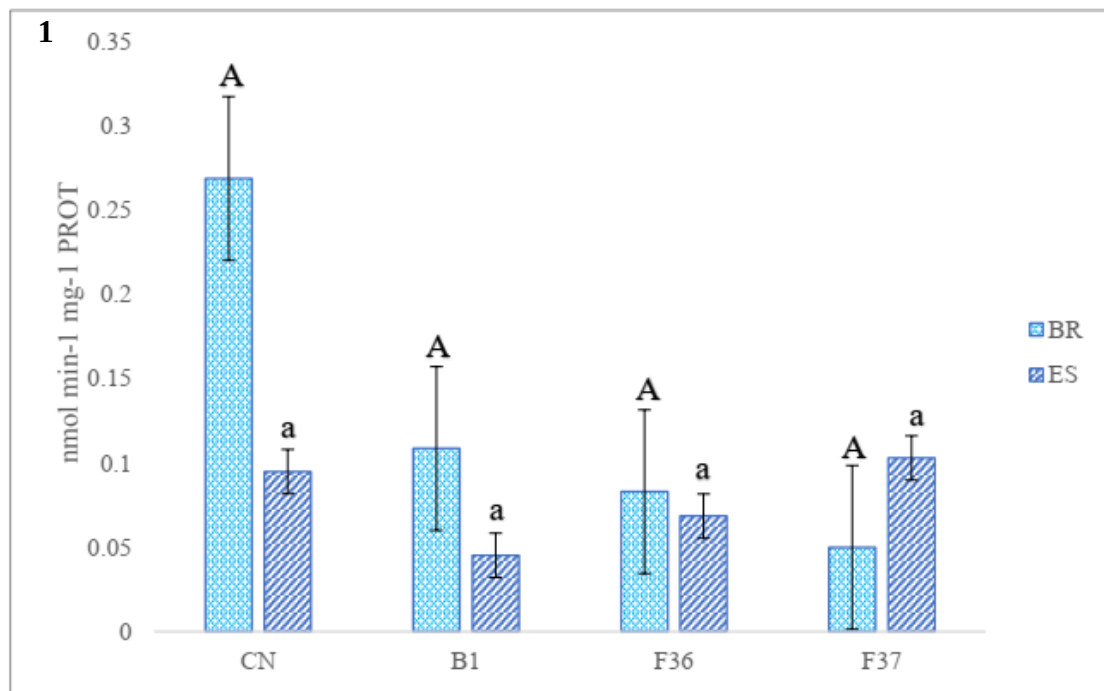


Figura 25. Actividad de la enzima catalasa (CAT) del extracto de: 1: vástago y, 2: raíz de cada tratamiento, ES: estrés por sequía, BR: bien regado. Las barras corresponden a la media de las réplicas $\pm$ el error estándar. Distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

2.2.3 Glutamina sintetasa (GS)

En la medición de la enzima GS bajo las condiciones del tratamiento BR se observó que la actividad GS en el vástago de las plantas de frutilla no inoculado CN ($0,0018 \pm 0,0005$ U/mg⁻¹ PROT) fue significativamente menor que la medida en el vástago de las plantas inoculadas con las cepas F36 ($0,0033 \pm 0,0002$ U/ mg⁻¹ PROT) y F37 ($0,0032 \pm 0,0001$ U/ mg⁻¹ PROT), aunque no difirió significativamente de la medida en el vástago de las plantas inoculadas con la cepa B1 ($0,0030 \pm 0,0004$ U/ mg⁻¹ PROT). En el tratamiento ES no se observaron diferencias significativas entre los niveles de actividad GS en vástago de las plantas inoculadas y sin inocular. La cepa F37 ($0,0037 \pm 0,0004$ U/ mg⁻¹ PROT) mostró una actividad GS mayor en comparación con las demás determinaciones realizadas en esta condición de riego, como se puede observar en la figura 26.1.

Por el contrario, en las raíces de las plantas de frutilla CN sin inocular la actividad enzimática de GS en los extractos del tratamiento BR ($0,0064 \pm 0,00034$ U/ mg⁻¹ PROT) fue significativamente mayor que la medida en las raíces de las plantas inoculadas con las cepas F36 ($0,0056 \pm 0,0001$ U/ mg⁻¹ PROT) y F37 ($0,0058 \pm 0,0001$ U/ mg⁻¹ PROT), nuevamente no difirió significativamente de la medida en las raíces de las plantas inoculadas con la cepa B1 ($0,0061 \pm 0,0001$ U/ mg⁻¹ PROT).

Bajo las condiciones de tratamiento ES no hubo diferencias significativas entre los niveles de tratamiento. Las raíces de las plantas sin inocular CN ($0,0063 \pm 0,0003$ U/ mg⁻¹ PROT) mostraron la mayor actividad GS comparado con las otras determinaciones que se hicieron a los extractos de raíces en esta condición de riego (Figura 26.2).

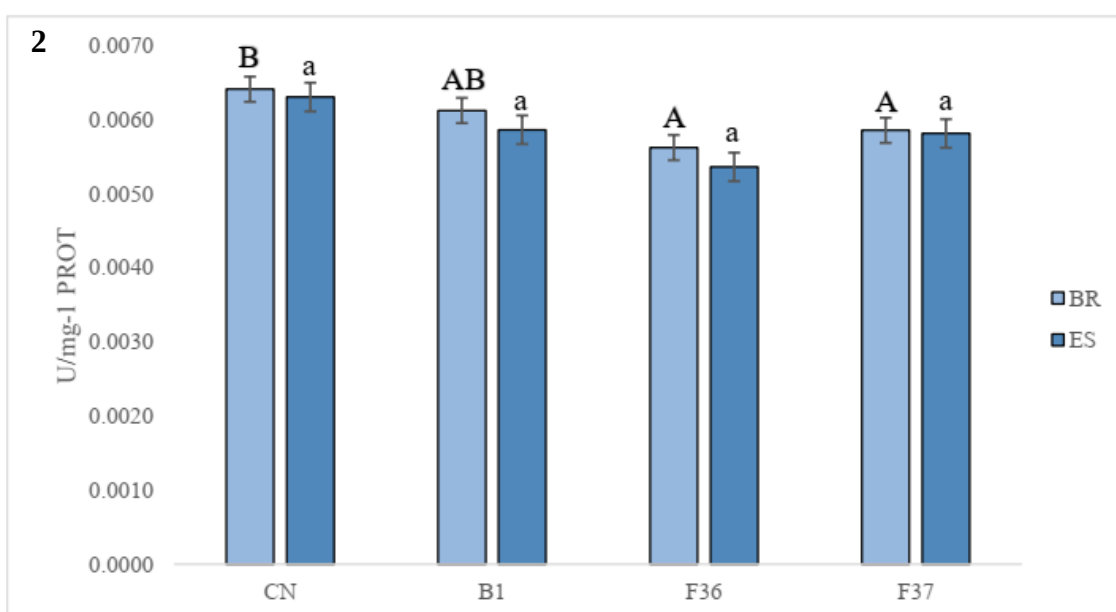
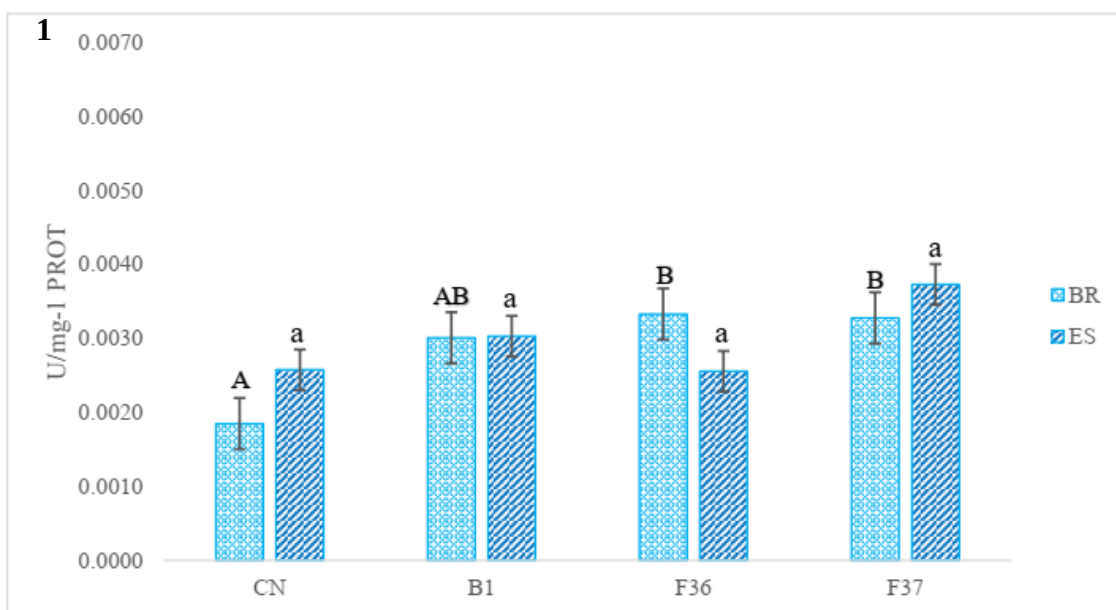


Figura 26. Actividad de la enzima glutamina sintetasa (GS) del extracto de: 1: vástago y, 2: raíz de cada tratamiento, ES: estrés por sequía, BR: bien regado. Las barras corresponden a la media de las réplicas +/- el error estándar. Distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

2.2.4 Guaiacol peroxidasa (GPX)

La determinación de la actividad GPX se realizó en los extractos de vástago y raíz en ambos tratamientos. Bajo condiciones BR la actividad GPS medida en el vástago de las plantas no inoculadas CN ($0,0811 \pm 0,0182 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PROT}$) fue significativamente mayor que la actividad medida en los vástagos de las plantas inoculadas con la cepa B1 ($0,0257 \pm 0,019 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PROT}$) y la cepa F36 ($0,0146 \pm 0,001 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PROT}$). Bajo las condiciones del tratamiento ES la actividad GPS medida en el de vástago de las plantas sin inocular CN ($0,0485 \pm 0,0100 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PROT}$) fue significativamente mayor que la actividad medida en los vástagos de las plantas inoculadas con la cepa B1 ($0,017 \pm 0,005 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PROT}$) (Figura 27.1).

Los valores de la actividad GPX bajo condiciones BR medida en los extractos de raíz de las plantas no inoculadas CN ($0,3205 \pm 0,0249 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PROT}$) fue significativamente mayor que los valores obtenidos para las plantas inoculadas con la cepa B1 ($0,1846 \pm 0,068 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PROT}$). Bajo las condiciones del tratamiento ES no se observaron diferencias significativas entre los valores obtenidos para la actividad GPX. Las raíces de las plantas inoculadas con la cepa B1 ($0,2367 \pm 0,0192 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PROT}$) fueron las que mostraron el mayor valor de actividad de GPX en estas condiciones de riego como se puede observar en la figura 27.2.

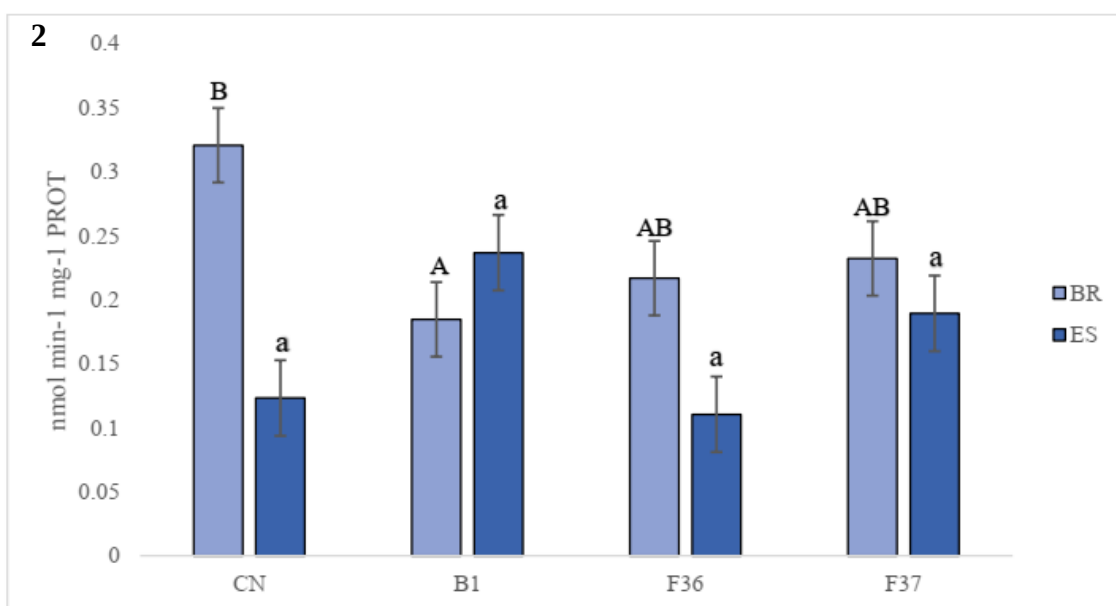
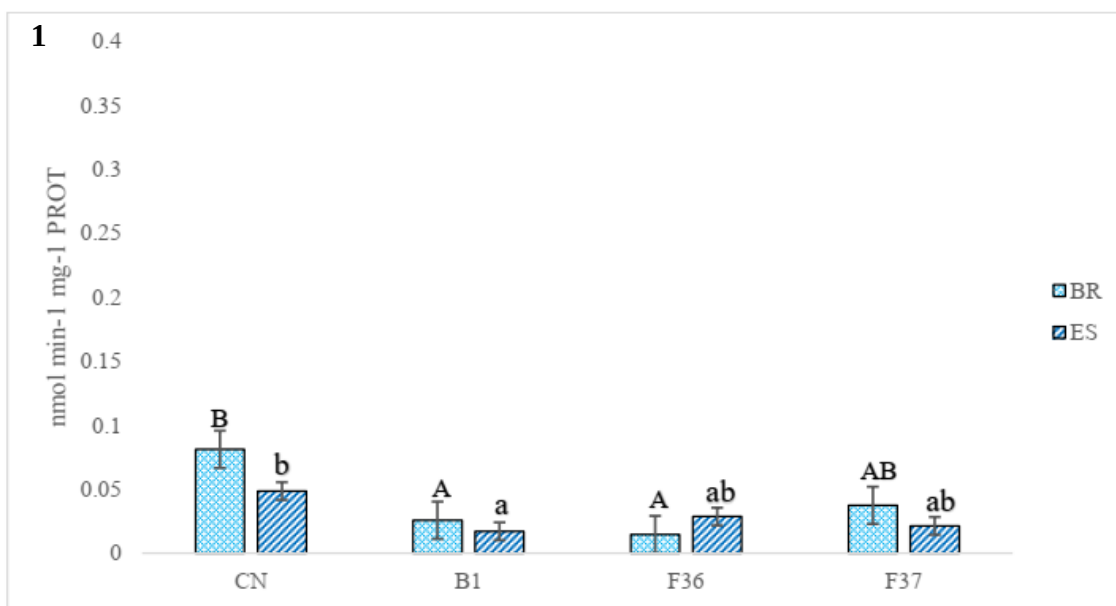


Figura 27. Actividad de la enzima guaiacol peroxidasa (GPX) del extracto de: 1: vástago y, 2: raíz de cada tratamiento, ES: estrés por sequía, BR: bien regado. Las barras corresponden a la media de las réplicas $\pm$ el error estándar. Distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

2.2.5 Fósforo inorgánico (Pi)

La determinación de Pi en los extractos de vástago y raíz de ambos tratamientos del ensayo se detalla a continuación. En los vástagos de las plantas no inoculadas CN bajo las condiciones del tratamiento BR, la concentración de Pi fue significativamente mayor ($0,0283 \pm 0,0053 \text{ mg}^{-1} \text{ PROT}$) que, para el resto de las plantas inoculadas, en las que se observaron valores de aproximadamente la mitad de Pi; con la inoculación de la cepa F36 ($0,0154 \pm 0,0010 \text{ mg}^{-1} \text{ PROT}$), de la cepa B1 ($0,0144 \pm 0,0020 \text{ mg}^{-1} \text{ PROT}$) y de la cepa F37 ($0,0141 \pm 0,0012 \text{ mg}^{-1} \text{ PROT}$). Bajo las condiciones del tratamiento ES no se observaron diferencias significativas entre los valores de concentración de Pi obtenidos, aunque nuevamente los valores de Pi para los vástagos de las plantas no inoculadas CN ($0,0149 \pm 0,0025 \text{ mg}^{-1} \text{ PROT}$) fueron los más elevados en comparación con las demás determinaciones realizadas en estas condiciones de riego (Figura 28.1).

Para el contenido de Pi en las raíces de las plantas bajo condiciones del tratamiento BR no se observaron diferencias significativas entre los niveles de inoculación. Las raíces de las plantas sin inocular CN ($0,0306 \pm 0,0011 \text{ mg}^{-1} \text{ PROT}$) mostraron nuevamente los mayores valores de Pi, similares a los obtenidos para el vástago de estas plantas en estas condiciones de riego. Bajo las condiciones del tratamiento ES las raíces de las plantas no inoculadas CN ($0,0153 \pm 0,0006 \text{ mg}^{-1} \text{ PROT}$) mostraron significativamente mayor concentración de Pi que las raíces de las plantas inoculadas con la cepa F36 ($0,0145 \pm 0,0033 \text{ mg}^{-1} \text{ PROT}$) que mostró los valores más bajos como se observa en la Figura 28.2.

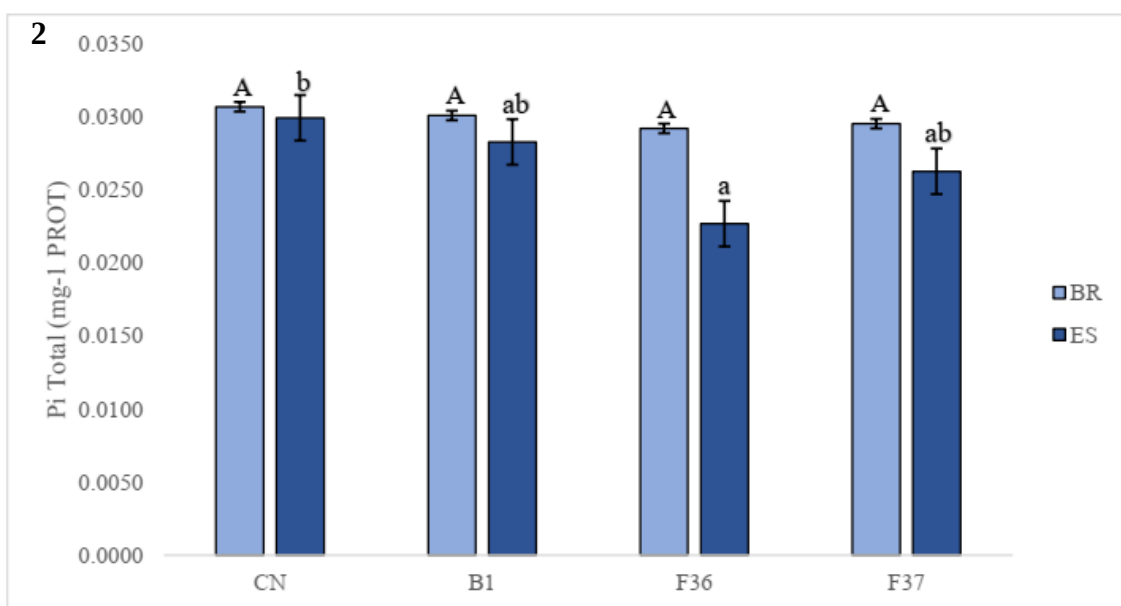
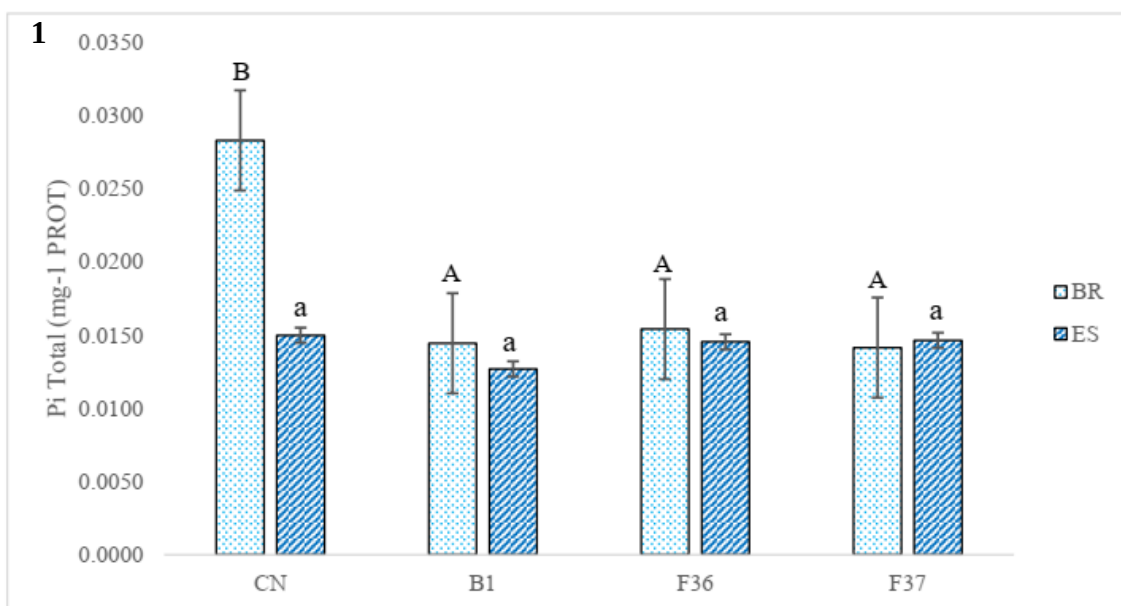


Figura 28. Concentración de fósforo inorgánico (Pi) del extracto de: 1: vástago y, 2: raíz de cada tratamiento, ES: estrés por sequía, BR: bien regado. Las barras corresponden a la media de las réplicas +/- el error estándar. Distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

2.2.6 Análisis de componentes principales (ACP)

Con el fin de visualizar la disposición de las variables analizadas, de rendimiento, bioquímicas y enzimáticas, en un plano bidimensional al comparar los diferentes tratamientos de inoculación con hongos AM, y los niveles de riego se realizó un ACP.

Parámetros de rendimiento

En la Figura 29 se muestra las relaciones entre los parámetros de crecimiento medidos, peso fresco y seco de vástago y raíz de los grupos de plantas y el porcentaje de colonización por estructuras de las cepas de hongos MA (F36, F37 y B1) y las plantas no inoculadas (CN), en ambas condiciones de riego (BR/ES). El ACP para estos datos mostró el 81,91% (50,0% y 31,91% el primer y segundo componente respectivamente) de la variabilidad. El primer componente separó las variables que determinan biomasa y los porcentajes de micorrización de las cepas utilizadas (F36, F37 y B1) y las no inoculadas CN en condición BR y ES.

Según el coeficiente de correlación, las variables PS y PF tanto en vástago como en raíz están positivamente relacionadas ($p < 0,05$) en ambas condiciones de riego (BR y ES). Mientras que el porcentaje de micelio interno y el de vesículas están relacionados de forma positiva ($p < 0,05$). Según estos resultados el primer componente separó más claramente al grupo de plantas inoculadas con la cepa F37 en ambas condiciones de riego, las cuales mostraron un mayor desarrollo de colonización intrarradical. Por otra parte, se evidencia la interacción del riego con la cepa inoculada ya que las plantas inoculadas con la cepa F36 en ES y las inoculadas con B1 en BR son separadas por su mayor rendimiento de biomasa en cada condición. El resto de los grupos de plantas con y sin inocular no mostraron estar positivamente relacionadas con ninguno de los componentes principales analizados.

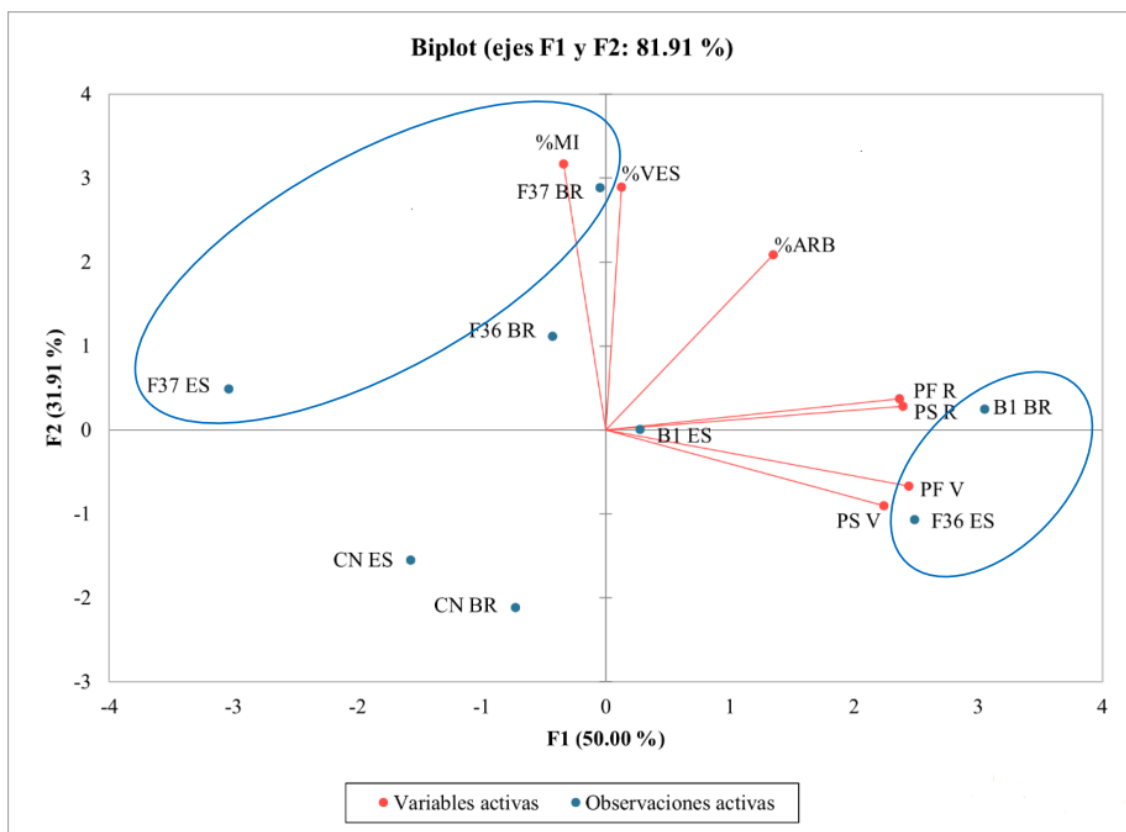


Figura 29. Análisis de componentes principales de las variables medidas en plantas de frutilla inoculadas con las cepas F36, F37, B1 y el control nativo CN en condiciones de estrés por sequía (ES) y bien regado (BR); peso fresco (PF), peso seco (PS) de vástago (V) y raíz (R), porcentaje de arbúsculos (%ARB), porcentaje de vesículas (%VES), porcentaje de micelio interno (%MI). Los círculos azules señalan los agrupamientos analizados.

Parámetros de rendimiento y bioquímicos medidos en vástago

Sumando al análisis anterior, las variables bioquímicas medidas en los vástagos de las plantas de frutilla, se observa que el ACP entre estos parámetros mostró el 65,02% (36,43% y 28,59% el primer y segundo componente) de la variabilidad de los datos. Aquí se evidencia que el primer componente separa las variables CAT, GPX y Pi de los parámetros de rendimiento, y de GS con los porcentajes de micorrización. Según el coeficiente de correlación, la variable GS se correlaciona inversamente con GPX, CAT y Pi y positivamente ($p < 0,05$) con los porcentajes de ARB, VES y MI. Nuevamente estos

resultados separan al grupo de plantas inoculadas con la cepa F37 en ambas condiciones de riego, de las plantas sin inocular CN (Figura 30).

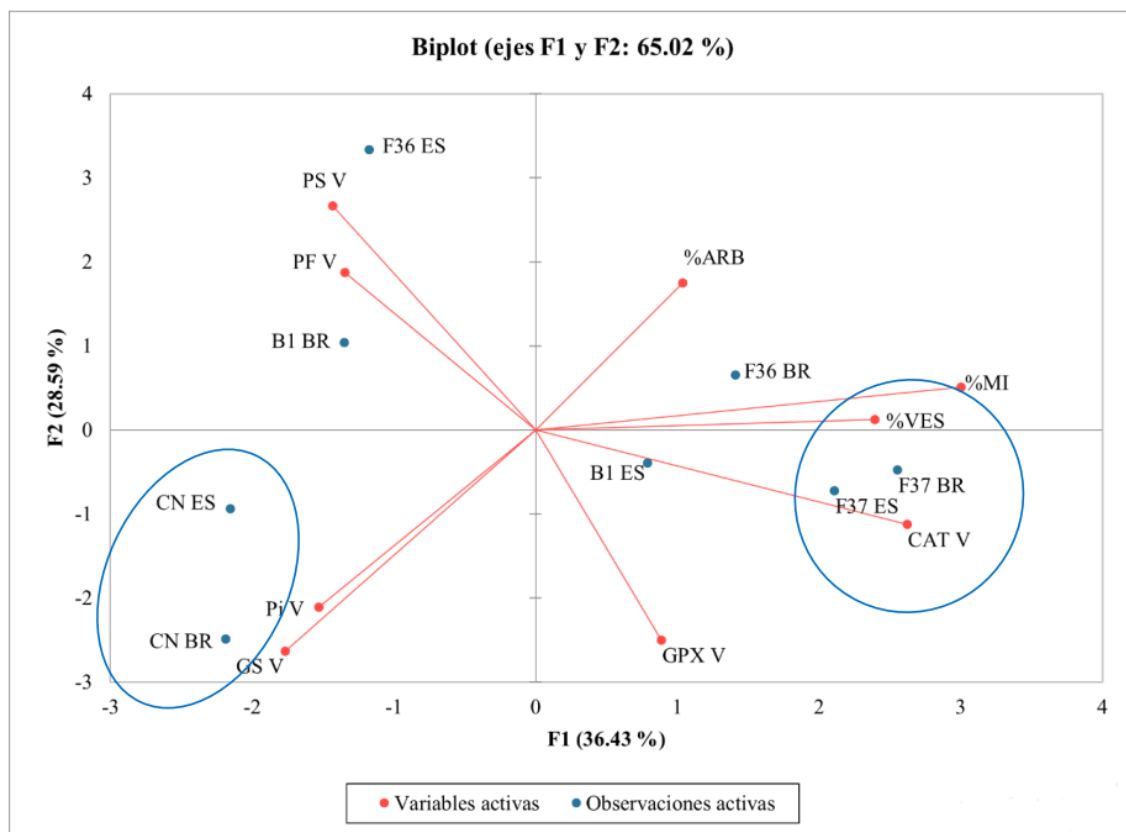


Figura 30. Análisis de componentes principales de las variables medidas en el vástago de las plantas de frutilla inoculadas con las cepas F36, F37, B1 y el control nativo CN en condiciones de estrés por sequía (ES) y bien regado (BR); peso fresco (PF), peso seco (PS), porcentaje de arbuscúlos (%ARB), porcentaje de vesículas (%VES), porcentaje de micelio interno (%MI), Catalasa (CAT), Glutamina sintetasa (GS), guaiacol peroxidasa (GPX) y fósforo inorgánico (Pi). Los círculos azules señalan los agrupamientos analizados.

Parámetros de rendimiento y bioquímicos medidos en raíz

En el caso de las variables bioquímicas analizadas en las raíces de las plantas de frutilla, se observa que el ACP entre estos parámetros mostró el 73,31% (44,86% y 28,45% el

primer y segundo componente) de la variabilidad de los datos. Se observa según el coeficiente de correlación que solo la variable CAT se correlaciona positivamente ($p<0,05$) con el %MI agrupando a las plantas inoculadas con la cepa F37 en ambas condiciones de riego y la cepa B1 en ES. La variable GS se correlaciona positivamente ($p<0,05$) con el Pi (Figura 31).

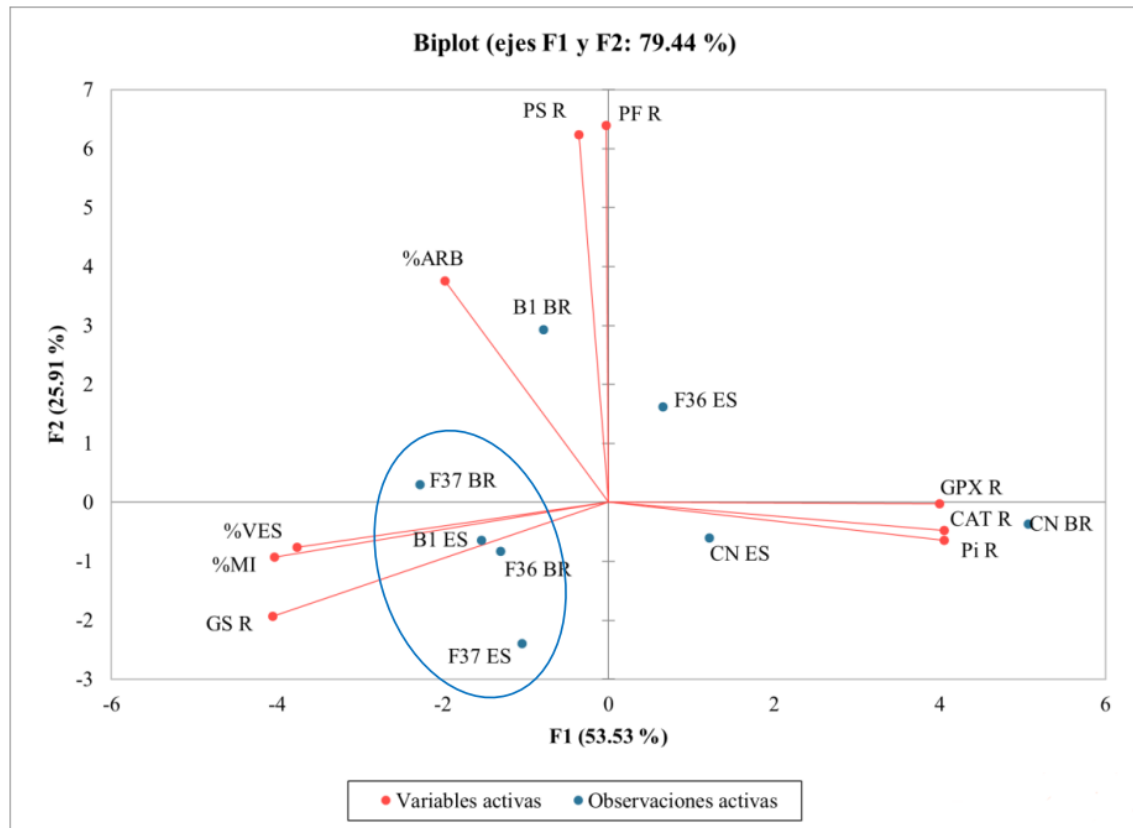


Figura 31. Análisis de componentes principales de las variables medidas en la raíz de las plantas de frutilla inoculadas con las cepas F36, F37, B1 y el control nativo CN en condiciones de estrés por sequía (ES) y bien regado (BR); peso fresco (PF), peso seco (PS), porcentaje de arbuscúlos (%ARB), porcentaje de vesículas (%VES), porcentaje de micelio interno (%MI), Catalasa (CAT), Glutamina sintetasa (GS), guaiacol peroxidasa (GPX) y fósforo inorgánico (Pi). Los círculos rojos señalan los agrupamientos analizados.

DISCUSSION



Conclusiones del manejo del cultivo de frutilla en sistema hidropónico.

De los parámetros fisicoquímicos relacionados con las labores del cultivo de frutilla, medidos en los predios productivos del AMBA norte, pH, CE, porcentaje de humedad y contenido de ortofosfato ($\text{PO}_4\text{-P}$), se evidencian las diferencias del manejo en ambos sistemas. En el establecimiento EC donde la producción de frutilla se realiza en sustrato hidropónico, los valores de pH, CE y humedad fueron los esperados para este tipo de material inerte e hidrofílico.

En LH, el valor de CE es bajo y pH es alto comparado con EC, esto es causado probablemente por la calidad del agua de riego (fuente subterránea) y las dosis de fertilizante aplicados. La alcalinidad en LH podría representar un problema para este cultivo que requiere un cierto grado de acidez para su desarrollo óptimo, este parámetro en EC es cercano a la neutralidad lo que, de igual forma, sumado a una CE elevada no favorece a las condiciones óptimas para el desarrollo de las plantas de frutilla. Los valores de pH óptimos para el cultivo de frutilla oscilan entre 5,8-7,2 y la medida de CE inferior a los 0,8 dS/m. (Undurraga y Vargas, 2013)

La concentración de $\text{PO}_4\text{-P}$ en EC que fue del doble en comparación con LH, puede estar relacionada a las dosis de fertilización química que recibe el sistema de producción hidropónico. A pesar de esto, las plantas que mostraron posibles signos de deficiencia de P fueron las de EC. La composición de las soluciones de fertirrigación en etapa vegetativa del cultivo tiene cantidades elevadas de N, P, K y micronutrientes, por lo que la absorción de estos por la planta podría estar comprometida si los valores de pH y la CE no son óptimos (Undurraga y Vargas, 2013).

Si bien el tiempo de establecimiento del cultivo al momento del muestreo en ambas fincas fue mayor de 7 meses, y el sustrato hidropónico en EC no es procesado en esterilidad para iniciar el cultivo, la presencia de hongos MA en las raíces de frutilla colectadas solo fue observada en las plantas a campo de LH, donde la presencia de hongos MA podría establecerse a partir del inóculo brindado por la vegetación espontánea adyacente a los camellones de cultivo. En el suelo del camellón donde se encontraban creciendo las plantas de frutilla en LH se recuperaron esporas de hongos MA, pero en una densidad muy baja y en su mayoría se observaron degradadas. Como ha sido mencionado por

Schalamuk y colaboradores (2003) las labores intensivas de labranza en el suelo previas a la implantación de cultivos pueden afectar el desarrollo del MER y la dinámica de colonización micorrícica en las plantas. En EC el modo de cultivo no permite una interacción con la biota del suelo por lo que la micorrización fue nula. Dentro de las prácticas comúnmente realizadas para el cultivo de frutilla está la aplicación de antifúngicos a las raíces de los plantines antes de plantarlos, lo que podría inhibir la colonización previa de los hongos MA presentes en el suelo de origen, así como también la elevada fertilización fosforada que se aplica es inhibidora del desarrollo de estos microorganismos simbioses (Kirschbaum, 2010).

Las condiciones experimentales bajo las cuales se llevó a cabo esta tesis buscaron emular la producción del cultivo de frutilla tal como la realizan los productores en el periurbano del AMBA, iniciando con el mismo material vegetal de partida y realizando el mismo manejo agronómico (Kirschbaum, 2010, comunicación personal de los Ing. Agr. Alfonso Ottaviano; INTA AMBA AER Escobar y José Luis Castañares; Universidad de Luján). Los plantines de frutilla adquiridos para el ensayo mostraron una amplia variabilidad de tamaños y vigor entre ellos, y se detectó en sus raíces la presencia de hongos MA tanto por métodos moleculares, mediante amplificación de secuencias específicas por PCR, como morfológicos, por la observación directa de estructuras en las raíces, aunque en un porcentaje bajo (9,33%). Se asumió que la colonización observada fue debida posiblemente a una, o más de una, cepa originaria del suelo de rustificación a campo.

Los valores de pH y CE a lo largo del ensayo se mantuvieron más o menos constantes en el sustrato de crecimiento durante los meses de septiembre a enero, oscilando en el rango de pH 5,8-7,8 y CE de 0,01-0,15 dS/m, con pocos eventos de deficiencia nutricional corregidos con la solución nutritiva Hewitt aplicada y monitoreando posibles signos de marchitez incipiente en las plantas.

El sustrato utilizado para llevar a cabo el ensayo (fibra de coco y perlita 1:1) adquiere al iniciar el riego un porcentaje de humedad elevado por su alta absorción de agua, es por esto que los signos de marchitez incipiente en las plantas de frutilla se apreciaron recién a los 6 días de supresión del riego, cuando el sustrato había alcanzado un porcentaje de CC promedio de 31,8%, lo que demuestra la alta capacidad de retención de agua del

sustrato y la tolerancia del cultivar de frutilla a la falta de agua. La determinación del porcentaje de CC para el ensayo de estrés por sequía (ES: 30-40% CC) mantuvo las plantas en un estado basal, no obstante, esto no asegura que la planta sea productiva en estas condiciones de disponibilidad hídrica. Según Adak y colaboradores (2018), las condiciones de estrés hídrico en distintos grados afectan fuertemente la productividad de las plantas de frutilla y esto difiere entre varietales por lo que el desarrollo de variedades resistentes a la sequía mejoraría la producción de este cultivo.

En pos de asegurar la capacidad infectiva de los inóculos empleados en el ensayo, se realizaron controles de colonización en una planta probadamente micotrófica. Las raíces de las plantas de maíz a los 30 días mostraron que la infectividad de los inóculos, especialmente de la cepa B1, fue notoriamente más alta para este hospedante que para la frutilla, lo que evidencia la especificidad por el hospedante de estos hongos (Cuenca, 2015).

En las raíces de las plantas de frutilla, sin embargo, a los 30 días se observó que la cepa F37 presentó el porcentaje de micorrización más alto en comparación con el resto, así como también la producción de vesículas, mientras que el porcentaje de arbuscúlos reportado fue bajo en todas las cepas. En el muestreo a los 60 días, llamativamente no se observó colonización de hongos MA en las raíces muestreadas del pretratamiento CN, aunque 30 días antes se había observado una incipiente colonización de menos del 10%, esto podría deberse a la distribución heterogénea de estos hongos en las raíces de las plantas de partida. La presencia de arbuscúlos en las raíces se observó en mayores valores entre los 60 y 90 días posteriores a la inoculación de las cepas, lo que se correspondió a los meses de septiembre a noviembre en los que las plantas de frutilla se encontraban en crecimiento vegetativo activo. Los arbuscúlos se consideran estructuras de intercambio bidireccional entre el hongo y la planta (Cuenca, 2015).

Por otra parte, el porcentaje de vesículas fue más elevado al inicio del ensayo para la cepa F37 pero esta tendencia se equilibró con el resto hacia el final del ensayo, para las cepas F36 y B1 el momento de mayor producción de vesículas también coincidió con la producción de arbuscúlos, esta producción de vesículas podría considerarse como etapa de almacenamiento del hongo MA (Cuenca, 2015).

Respecto a las diferentes condiciones de riego a los 120 días posteriores a la inoculación, las plantas no inoculadas CN mostraron siempre un menor desarrollo de la colonización micorrícica que las cepas B1 y F37, que en ambas condiciones se mantuvieron constantes. La cepa F36 que mostró valores altos de micorrización en condiciones BR disminuyó su presencia en las raíces en condiciones de ES. Boyer y colaboradores en su estudio de plantas de frutilla inoculadas con *Funneliformis geosporus* y *Funneliformis mosseae* en 40% de irrigación disminuida encontraron diferencias en la colonización tanto en bien regado como en déficit hídrico (Boyer, et al., 2014).

Conclusiones sobre el efecto de las inoculaciones sobre el cultivo de frutilla en sistema hidropónico.

En la dependencia micorrícica relativa es una medida que relaciona al peso seco de las plantas inoculadas respecto al de las no inoculadas (Bagyaraj, 1992), y permite evaluar si el efecto de la colonización por hongos MA es positiva, neutra o negativa para la planta. Así con el método de cálculo efectuado, el valor de la dependencia de la formación de micorrizas es 100% cuando la planta no crece sin micorrizas y 0% si la diferencia entre el peso seco de la planta micorrizada y de la no micorrizada es nulo (Plenchette et al., 1983).

En condiciones BR, sin limitación de la disponibilidad de agua, las plantas de frutilla inoculadas con la cepa B1 mostraron los mayores valores de contenido de agua en sus tejidos radicales y la mayor DMR respecto de las plantas de frutilla no inoculadas CN. El desarrollo intrarradical de la cepa B1 no se modificó notoriamente (Micorrización entre 78,57 y 68,22%) al variar las condiciones de riego, y estas diferencias en DMR y contenido de agua no fueron significativas, respecto a las plantas CN en condiciones de limitación del riego ES. Por otra parte, las plantas inoculadas con la cepa F36 bajo las condiciones de limitación del riego ES, mostraron los mayores valores de contenido de agua en las raíces y de DMR respecto a las plantas de frutilla sin inocular CN. Como se mencionó anteriormente en estas condiciones la cepa F36 disminuyó notoriamente su desarrollo intrarradical en condiciones de ES (Micorrización disminuyó del 75,60% al 49,40%). El desarrollo intrarradical de la cepa 37 fue alto (Micorrización de 85,39 en BR

y 75,36% en ES) en ambas condiciones de riego, sin embargo, las plantas inoculadas con esta cepa bajo limitación hídrica disminuyeron notoriamente el contenido de agua en sus raíces y fueron las únicas que evidenciaron un efecto en detrimento en cuanto a DMR.

La relación relativa de vástago:raíz es útil como una medida de la respuesta al estrés hídrico y a la cepa de hongo MA con la cuales fueron inoculadas las plantas de frutilla en el ensayo. Las plantas inoculadas con la cepa B1 en condiciones de BR y la cepa F36 en condiciones ES mostraron el mayor desarrollo del sistema radical relativo al vástago en comparación a las plantas no inoculadas. Esto podría considerarse una respuesta fisiológica compensatoria, aumento del volumen exploratorio de las raíces, para enfrentar la situación de estrés por la planta. Ha sido propuesto que la variación en la relación vástago:raíz es una respuesta al estrés impulsado por diferentes estrategias de la planta para hacerle frente (Agathokleous et al., 2019), y está relacionada a la dosis-respuesta al estímulo que podrían generar la colonización micorrícica.

La variabilidad de los valores obtenidos en las mediciones bioquímicas realizadas mostró algunas correlaciones significativas tanto de las cepas utilizadas como la condición frente a la disponibilidad de agua. Aunque no se detectaron diferencias significativas, se observó que las plantas no inoculadas CN mostraron la mayor actividad CAT en el tratamiento BR comparadas con el resto de los grupos de plantas inoculadas (F36, F37 y B1). Mientras que en las condiciones de ES la actividad de CAT del vástago fue semejante entre todos los grupos de plantas inoculadas. Otros autores han reportado que la colonización por el hongo MA *Glomus mosseae* aumenta la actividad enzimática CAT en el vástago plantas de frutilla, obtenidas a partir de estolones, bajo estrés por sequía severa y mejoran la conductividad de membrana citoplasmática en comparación con controles sin hongos MA (Yin et al., 2010).

La determinación de CAT en las raíces mostró una interacción entre las cepas utilizadas y las condiciones de riego a las que fueron sometidas las plantas. En las condiciones de ES las raíces de las plantas inoculadas tanto con la cepa F37 como con la cepa B1, las cuales mostraron los mayores valores de colonización intrarradical, se observó mayor actividad de CAT, concluyendo que estas plantas respondieron activamente frente al estrés oxidativo. Zahedi y colaboradores (2023) en un estudio del comportamiento fisiológico frente al estrés hídrico de dos varietales de frutilla, demostraron que el estrés

por sequía severa provocó un aumento en los contenidos de CAT en plantas de frutilla en ambos varietales. La sobreexpresión de enzimas antioxidantes como la catalasa, que disminuye el contenido de H₂O₂, constituye la primera defensa de las plantas frente al daño oxidativo. Ha sido reportado por varios autores que los hongos MA estimularían diferentes mecanismos antioxidantes que contribuyen a la tolerancia al estrés aumentando las actividades de las enzimas que eliminan las ROS (Chaturvedi et al., 2018; Hsu y Kao, 2004).

Los valores de GS en las raíces de las plantas disminuyeron significativamente en condiciones de BR cuando fueron inoculadas con las cepas F36 y F37, sin embargo, no se encontraron diferencias entre las condiciones de riego, concordando con Zeng y colaboradores (2014) los cuales no encontraron relación entre la GS y el estrés oxidativo por acumulación de cromo. La GS es una enzima relacionada en la asimilación primaria del N, esta aumenta cuando las plantas se encuentran en estado vegetativo (Bernard y Habash, 2009). Las plantas de frutilla se mantuvieron en etapa vegetativa durante todo el ensayo, si bien fueron fertilizadas, la inoculación con las cepas F36 y F37 podría estar provocando un mayor requerimiento de nutrición nitrogenada (o generando un estrés por deficiencia nutricional) al observarse una disminución significativa en la actividad GS en condiciones de BR.

Por el contrario, en las raíces de las plantas no inoculadas CN se observó la mayor actividad de GS en ambas condiciones de riego (BR/ES), aunque estos valores no muestran diferencias significativas con los demás grupos de plantas. Xu y colaboradores (2019), estudiaron que la inoculación de *F. mosseae* promovió significativamente los contenidos de N, P, incrementó las actividades de SOD, CAT y POD en plantines de caña de azúcar inoculados sometidos a estrés por metales pesados.

CONCLUSIONES GENERALES

- Bajo condiciones de riego óptimo sin limitaciones de agua para las plantas de frutilla, la inoculación con la Cepa B1 de *Rhizophagus irregularis* mejoró parámetros de desarrollo de las plantas,

- En condiciones de deficiencia hídrica moderada a grave la inoculación con la Cepa F36 de *Claroideoglomus etunicatum* generó mejoras de los parámetros de crecimiento,
- Estas mejoras en el rendimiento no se correlacionaron con el desarrollo intrarradical de estas dos cepas, ya que los porcentajes de micorrización para ambas no fueron los más altos,
- Las plantas inoculadas con la cepa F37 de *Rhizophagus intraradices* tuvieron mayor porcentaje de colonización, sin embargo, resultaron ser las plantas de menor crecimiento,
- La protección frente al estrés causado por la deficiencia hídrica en las plantas de frutilla se evidenció más fuertemente en la raíz principalmente en las plantas inoculadas con la Cepa F37 de *Rhizophagus intraradices*,
- Las manifestaciones de signos de estrés por sequía que podrían presentar las plantas de frutilla micorrizadas en sus vástagos, representados por las hojas, podrían haberse visto disminuidos debido a que la corona de la planta, que aquí fue considerada como una zona transicional entre la parte aérea y las raíces, funcionaría como un órgano de amortiguación que conforma la estrategia biológica de la planta,
- Al carecer de plantas control completamente libres de hongos MA en sus raíces, no se pudo investigar con mayor detalle el efecto causado por la inoculación con las cepas usadas en el ensayo. Sin embargo, sí se observó que la colonización en las plantas no inoculadas no fue homogénea en todas las réplicas, y el desarrollo intrarradical de los hongos MA en estas plantas fue heterogéneo en su distribución,
- A futuro se pretende evaluar las condiciones de nutrición, en lo que respecta a los macronutrientes N y P, para compatibilizar la inoculación de distintas cepas de hongos MA, así como también evaluar la toxicidad que el uso de fungicidas, como método de desinfección previo a la plantación, podría tener sobre las cepas que conformen un inoculante para este cultivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS



- Adak, N., Gubbuk, H., Tetik, N. (2018). Yield, quality and biochemical properties of various strawberry cultivars under water stress. *J Sci Food Agric.* 98(1):304-311. DOI: 10.1002/jsfa.8471
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105 (C), 121–126. DOI:10.1016/S0076-6879(84)05016-3
- Bagyaraj, D. J. (1992). Vesicular-arbuscular Mycorrhiza: Application in Agriculture. *Methods in Microbiology*, 359–373. DOI:10.1016/s0580-9517(08)70102-8
- Bernard, S., Habash, D. (2009). The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *The new phytologist* 182: 608–620. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.02823.x
- Arora, A., Sairam, R. K., Srivastava, G. C. (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, 82 (10), 1227–1238.
- Augé, R. M. (2001): Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11 (1), pág. 3–42. DOI: 10.1007/s005720100097
- Barbaro, L., Karlanian, M., Mata, D. (2011): Importancia del pH y la Conductividad Eléctrica (CE) en los sustratos para plantas. Ediciones INTA-CIRN-Instituto de Floricultura.
- Begum, N., Qin, C., Ahanger, M.A., Raza, S., Khan, M.I., Ashraf, M., Ahmed, N., Zhang L. (2019). Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Plant Growth Regulation: Implications in Abiotic Stress Tolerance. *Front Plant Sci.* (Sep) 19;10:1068. DOI: 10.3389/fpls.2019.01068.
- Berg, G. (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1), 11–18. DOI:10.1007/s00253-009-2092-7
- Boyer, L.R., Brain, P., Xu, XM., Jeffries, P. (2014). Inoculation of drought-stressed strawberry with a mixed inoculum of two arbuscular mycorrhizal fungi: effects on

population dynamics of fungal species in roots and consequential plant tolerance to water deficiency. *Mycorrhiza* (3) 215-27. DOI: 10.1007/s00572-014-0603-6

Bunn, R., Lekberg, Y., Zabinski, C. (2009): Arbuscular mycorrhizal fungi ameliorate temperature stress in thermophilic plants. *Ecology* 90 (5), pág. 1378–1388. DOI: 10.1890/07-2080.1.

Cabello, M. (ed.) (2013). Biodiversidad de los hongos formadores de micorrizas arbusculares reportadas para Argentina. Segunda. Argentina: Ediciones Magna.

Caminiti, A. (2015). Cultivo de frutilla en la provincia de Neuquén. Estación experimental agropecuaria Bariloche. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). ISSN: 1667-4014

Chaturvedi, R., Favas, P., Pratas, J., Varun, M., & Paul, M. S. (2018). Assessment of edibility and effect of arbuscular mycorrhizal fungi on *Solanum melongena* L. grown under heavy metal(loid) contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148, 318–326. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.10.048

Cooper, H. D., Clarkson, D. T. (1989). Cycling of Amino-Nitrogen and other Nutrients between Shoots and Roots in Cereals—A Possible Mechanism Integrating Shoot and Root in the Regulation of Nutrient Uptake. *Journal of Experimental Botany*, 40(7), 753–762. DOI:10.1093/jxb/40.7.753

Cuenca, G. (2015) Las micorrizas arbusculares: aspectos teóricos y aplicados. Ediciones IVIC, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas.

del Río, L.A., Ortega, M.G., López, A.L., Gorgé, J.L. (1977). A more sensitive modification of the catalase assay with the Clark oxygen electrode: application to the kinetic study of the pea leaf enzyme. *Analytical Biochemistry* 80,409–415.

Dirección de Cadenas Alimentarias (DCA) (2019): Resumen Cadena de frutilla noviembre. Ministerio de agricultura, ganadería y pesca, Argentina. Disponible en: <https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar>.

Dirección Nacional de Mercados de la Subsecretaría de Política Agropecuaria y Alimentos (2008): Perfil del Mercado de Frutilla. Gacetilla Informativa del Sector

Agroalimentario. Disponible en línea en magyp.gob.ar. Última actualización el febrero 2008.

Eke, P., Chatue, G., Wakam, L. N., Kouipou, R. M. T., Fokou, P. T., Boyom, F.F. (2016). Mycorrhiza consortia suppress the fusarium root rot. *Biological Control*, (103), 240–250. DOI:10.1016/j.biocontrol.2016.10.001

FAO (2022): Estadísticas. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Disponible en línea en <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>. Última actualización el 17 de febrero de 2022.

Feito, M. C. (2018): Problems and challenges of peri-urban Buenos Aires. *Estudios Socio territoriales-Revista de Geografía 2* (No. 24 julio-diciembre 2018).

Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A. (ed.) (2007): *Microbiología Agrícola*. 1ra. México: Trillas.

Fougnyes, L., Renciot, S., Muller, F., Plenchette, C., Prin, Y., Faria, S. M. (2007). Arbuscular mycorrhizal colonization and nodulation improve flooding tolerance in *Pterocarpus officinalis* Jacq. seedlings. *Mycorrhiza* 17 (3), pág. 159–166. DOI: 10.1007/s00572-006-0085-2.

Gerdemann, J. W., Nicolson, T. H. (1963). Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, 46(2), 235–244. DOI:10.1016/s0007-1536(63)80079-0

Giovannetti, M., Mosse, B. (1980): An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *The New phytologist*.

Gogorcena, Y., Iturbe-Ormaetxe, I., Escuredo, P. R., Becana, M. (1995). Antioxidant Defenses against Activated Oxygen in Pea Nodules Subjected to Water Stress. *Plant Physiology*, 108(2), 753–759. DOI:10.1104/pp.108.2.753

Guo, X., Yuan, L., Shakeel, M., Wan, Y., Song, Z., Wang, D. (2021). Screening of the plant growth-promoting mycorrhizal fungi in Guizhou blueberry. *Rhizosphere*, 19, 100389. DOI:10.1016/j.rhisph.2021.100389

Hartmann, Martin; Six, Johan (2022). Soil structure and microbiome functions in agroecosystems. *Nat Rev Earth Environ*. DOI: 10.1038/s43017-022-00366-w.

Hewitt E. J. (1952): *Sand and Water Culture Methods used in the Study of Plant Nutrition*.

Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H. (2001). A Large Family of Class III Plant Peroxidases. *Plant and Cell Physiology*, 42(5), 462–468. DOI:10.1093/pcp/pce061

Hsu, Y. T., & Kao, C. H. (2004). Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *Plant Growth Regulation*, 42(3), 227–238. DOI: 10.1023/B:GROW.0000026514.98385.5c

INTA-CMCBA (2019): Boletín de frutas y hortalizas frutilla. 99. Disponible en: <http://www.mercadocentral.gob.ar>

Janeeshma, E., Puthur, J.T. (2020). "Direct and indirect influence of arbuscular mycorrhizae on enhancing metal tolerance of plants. *Arch Microbiol* 202, 1–16 DOI:10.1007/s00203-019-01730-z

Kayumov, A. R., Ratushnyak, A. Y., Ratushnyak, A. A., Gabdelkhadeeva, A., Andreeva, M. G., & Trushin, M. V. (2014). Glutamine Synthetase, Peroxidase and Protease as Indicators of the Ecological State of Higher Aquatic Plants. *Middle East Journal of Scientific Research*, 19(2), 139–143. DOI:10.5829/idosi.mejsr.2014.19.2.13585

Koç, Aysen (2015): Effect of plant growth-promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on lipid peroxidation and total phenolics of strawberry (*Fragaria × ananassa* ‘San Andreas’) under salt stress. *Turk J Agric For* 39, pág. 992–998. DOI: 10.3906/tar-1503-57.

Kirschbaum, D. (2010). *Manual de buenas prácticas agrícolas para la producción de frutilla*. Ediciones INTA. Disponible en: alimentosargentinos.magyp.gob.ar.

Krüger, M., Stockinger, H., Krüger, C., Schüßler, A. (2009). DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *The New phytologist* 183 (1), 212–223. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.02835.x.

- Lanzetta, P. A., Alvarez, L. J., Reinach, P. S., & Candia, O. A. (1979). An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Analytical Biochemistry*, 100(1), 95–97. DOI:10.1016/0003-2697(79)90115-5
- Lee, J., Lee, S., Young, J.P.W. (2008). Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi, *FEMS Microbiology Ecology*, Volume 65, Issue 2, 339–349. DOI:10.1111/j.1574-6941.2008.00531.x
- Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies* 15, 523–530.
- Mika, A. (2003). Properties of Guaiacol Peroxidase Activities Isolated from Corn Root Plasma Membranes. *Plant physiology*, 132(3), 1489–1498. doi:10.1104/pp.103.020396
- Mika, A., Buck, F., & Lühje, S. (2008). Membrane-bound class III peroxidases: Identification, biochemical properties and sequence analysis of isoenzymes purified from maize (*Zea mays* L.) roots. *Journal of Proteomics*, 71(4), 412–424. DOI:10.1016/j.jprot.2008.06.006
- Miserendino, E. (2012). *Frutillas Implantación del cultivo en Patagonia*. Ediciones INTA. Disponible en: www.inta.gob.ar/altovalle
- Monteoliva, M. I., Bustos, D., Luna, C. (2019). *Abordajes fisiológicos para el estudio del estrés abiótico en plantas: disertaciones y protocolos*. Ediciones INTA. Disponible en: <https://repositorio.inta.gob.ar>
- Nadeem, S. M., Ahmad, M., Zahir, Z. A., Javaid, A., & Ashraf, M. (2014). The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology Advances*, 32(2), 429–448. DOI:10.1016/j.biotechadv.2013.12
- Navarro-Aranda, C., Muñoz-Garmendia, F. (1998). *Fragaria* L. En *Flora ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*. (pp. 88-93). Vol. 6. Rosaceae. Madrid, España: Real Jardín Botánico, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
- Nazareno Saparrat, M.C., Ruscitti, M.F., Arango, M.C. (2020): *Micorrizas arbusculares: biología y aplicaciones en el sector agroforestal 1ra edición* (Libros de cátedra).

Ojeda, A., Mc Leod, C., Águila, K., Pino, M.T. (2018). Bases para la determinación de las necesidades hídricas del cultivo del calafate in situ, para su adaptación al manejo agronómico. Boletín INIA Informativo 79°.

Ortiz-Acevedo, A., Osorio-Vega, N.W., Echeverri-Gómez, J. (2015). Fisiología de los hongos formadores de micorrizas. Repositorio institucional de la Universidad de Antioquia.

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

Plenchette, C., Fortin, J. A., Furlan, V. (1983). Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. Plant and Soil, 70(2), 199–209. DOI:10.1007/bf02374780

Ramírez-Viga, T., Guadarrama, P., Castillo-Argüero, S. (2020). Relationship between Arbuscular Mycorrhizal Association and Edaphic Variables in Mangroves of the Coast of Yucatán, Mexico. Wetlands 40, 539–549. DOI:10.1007/s13157-019-01196-1

Restrepo, K.J., Montoya Correa, M.I., Henao, P., Gutiérrez, L.A., Molina Guzmán, L.P. (2019). Caracterización de hongos micorrícicos arbusculares de suelos ganaderos del trópico alto y trópico bajo en Antioquia, Colombia. Idesia (Arica), 37(1), 35-44. DOI:10.4067/S0718-34292019005000301

Sarandón, S. (2020): Biodiversidad, agroecología y agricultura sustentable. Libros de catedra. Facultad de Ciencias Agrarias Editorial de la UNLP.

Saville, D. J. 1990. Multiple comparison procedures: the practical solution. The American Statistician, Vol 44(2): 174-180.

SENASA. (2012). Protocolo de calidad para frutilla fresca y congelada. Resolución-866-2012-Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Disponible en: <https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar>

Stephan, B.I., Colombo, R.P., Silvani, V.A., Pérgola, M., Godeas, A.M., Pardo, A.G., Fernández Bidondo, L. (2019). Short-Term Effects of Genetically Modified Potato on

Arbuscular Mycorrhizal Fungal Communities. *J Soil Sci Plant Nutr* 19 (2), pág. 352–356. DOI: 10.1007/s42729-019-00035-w.

Whitaker, V.M., Knapp, S.J., Hardigan, M.A., Edger, P., Slovin, J.P., Bassil, N.V., et al. (2020). A roadmap for research in octoploid strawberry. *Horticulture research* 7, pág. 33. DOI: 10.1038/s41438-020-0252-1.

Versaw, W.K., García, L.R. (2017). Intracellular transport and compartmentation of phosphate in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 39, 25–30. DOI:10.1016/j.pbi.2017.04.015

Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., Foolad, M.D. (2007). Heat tolerance in plants: An overview 61(3), 199–223. DOI:10.1016/j.envexpbot.2007.05.011

Zahedi, S.M., Hosseini, M.S., Fahadi Hoveizeh, N., Kadkhodaei, S., Vaculík, M. (2023). Physiological and Biochemical Responses of Commercial Strawberry Cultivars under Optimal and Drought Stress Conditions. *Plants (Basel)* 12(3):496. DOI: 10.3390/plants12030496

Zhang, W., Zhang, T., Zhang, J., Lei, W., Zhao, L., Wang, S., Shi, M., Wei, M. (2023). Low Nitrogen Stress Promotes Root Nitrogen Uptake and Assimilation in Strawberry: Contribution of Hormone Networks. *Horticulturae*. 9. 249. DOI:10.3390/horticulturae9020249

ANEXOS



ANEXOS

Solución de Hewitt empobrecida en fósforo

Compuesto	Solución Madre 10X (g/100ml)	ml solución 10X
NO ₃ K	3,03	5
(NO ₃) ₂ Ca	7,08	10
SO ₄ Mg 7H ₂ O	1,84	10
EDTA Fe	0,25	5
SO ₄ Mn 7H ₂ O	0,22	0,5
SO ₄ Cu 5H ₂ O	0,24	0,05
SO ₄ Zn 2H ₂ O	0,29	0,05
BO ₃ H ₃	1,86	0,05
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4 H ₂ O	0,03 (opcional)	0,05
Agua Destilada		970
pH (NaOH 10%)		7

Composición basada en volumen final de 1 L.

Solución nutritiva (Hewitt modificado)

Compuesto	Solución Madre 10X (g/100ml)	ml solución 10X
NO ₃ K	3,03	5
(NO ₃) ₂ Ca	7,08	10
SO ₄ Mg 7H ₂ O	1,84	10
EDTA Fe	0,25	5
SO ₄ Mn 7H ₂ O	0,22	0,5
SO ₄ Cu 5H ₂ O	0,24	0,05
SO ₄ Zn 2H ₂ O	0,29	0,05
BO ₃ H ₃	1,86	0,05
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4 H ₂ O	0,03 (opcional)	0,05
KH ₂ PO ₄	0,9	10
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,9	10
Agua Destilada		950
pH (NaOH 10%)		7

Composición basada en volumen final de 1 L.

Solución tampón madre de extracción enzimática

Disolución buffer PK 1 M pH 7,8

Solución 1: 43,5 gr. de K₂HPO₄ + 250 ml de agua destilada

Solución 2: 6.8 gr. KH_2PO_4 + 50 ml de agua destilada

Mezclar la solución 1 con la solución 2 hasta llegar a pH 7,8. Volumen final 300 ml.

Solución tampón final PK 50 mM pH 7,8

Componentes	100 ml buffer 50 mM	300 ml buffer 50mM	500 ml buffer 50 mM
Sol. buffer 1 M pH 7,8	5 ml + 95 ml de agua destilada	15 ml + 285 ml de agua destilada	25 ml + 475 ml de agua destilada
EDTA 0,1 M	0,0034 g.	0,01 g.	0,017 g.

Solución tampón determinación de Catalasa

Disolución buffer 50 mM pH 7.

1,02 gr. KH_2PO_4 + 0,87 gr. K_2HPO_4 + 250 ml de agua destilada. Ajustar a pH 7.

Soluciones para determinación de glutamina sintetasa (GS) y fósforo inorgánico (Pi)

- Disolución buffer TRIS 100 mM pH 7,5 (P/Pi)

0,12 g. TRIS + 0,101 g. MgCl + 0,053 g. NH_4Cl + 10 ml de agua destilada

- Disolución amortiguadora con glutamato: (P/GS) 100 mM

5 ml solución buffer TRIS + 0,093 g. glutamato de sodio. Preparar al momento de la reacción.

- ATP 100 mM stock

0,01 gr. ATP + 200 μL de agua destilada. Preparar al momento de la reacción.

- Citrato 1,2 M

4,75 g. citrato trisódico + 15 ml de agua destilada. Preparar al momento de la reacción.

- Verde de malaquita

Solución 1: 0,051 gr. verde de malaquita + 112,5 ml de agua destilada: volumen final 113 ml

Solución 2: 22,7 ml de agua destilada + 14,8 ml de HCL + 1,57 g. molibdato de amonio: volumen final 37,5 ml

Mezclar la solución 1 con la solución 2, dejar reposar por 20 minutos, filtrar con papel filtro, bajo campana. Preparar al momento de la reacción. Volumen final 150 ml

Soluciones para la determinación de guaiacol peroxidasa (GPX)

- Solución tampón acetato de sodio + ácido clorhídrico ($\text{NaCH}_3\text{OOH-HCL}$) 25 mM
pH 5

1,25 g. de NaCH_3OOH + 500 ml de agua destilada, ajustar a pH 5 con HCL 33% (aproximadamente 400 μL)

- Solución de guaiacol ($\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$) 8.26 mM

108 μL $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$ 98% pureza + 9,9 ml de agua destilada. Volumen final 10 ml.

- Solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 8.8mM

95.52 μL de H_2O_2 98% pureza + 9,9 ml de agua destilada. Volumen final 10 ml

Solución de KOH al 10%

Diluir 30 g de KOH en 100 mL de agua destilada.

Poli vinil lactoglicerol (PVLG)

100 mL de agua destilada, 100 mL de ácido láctico, 10 mL de glicerina en un vidrio oscuro, 16,6 g. de alcohol polivinílico, y calentar a 70-80 °C por 4 a 6 horas.

Solución amortiguadora TE

Solución TRIS-HCL (1 M) pH 7,5	10 mL
Solución EDTA (0,5 M) pH 8	2 mL
Agua bi-destilada	1000 mL
pH	7,7

Solución amortiguadora TAE 50X

TRIS	242 g.
Ácido acético glacial	57,1 mL
Solución EDTA (0,5 M)	100 mL
pH	7,7

Disolver el TRIS y el EDTA en 400 mL de agua bi-destilada, ajustar el pH y completar el volumen a 1000 mL con el agua. Para la preparación de la solución amortiguadora TAE 1X, tomar 20 mL de esta solución y llevar a 1000 mL con agua bi-destilada.