

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL (ETSIAMN)



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Evaluación del efecto de la micorrización en plantas de berenjena y pimiento crecidas en condiciones de estrés abiótico

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

CURSO ACADÉMICO 2019-2020

AUTOR: JAVIER BELINCHÓN MORENO

TUTOR: JOSÉ MARÍA SEGUÍ SIMARRO

DIRECTOR EXPERIMENTAL: ROSA CARIDAD PORCEL ROLDÁN

VALENCIA, 8 DE JUNIO DE 2020



RESUMEN

TÍTULO: Evaluación del efecto de la micorrización en plantas de berenjena y pimiento crecidas en condiciones de estrés abiótico.

ABSTRACT:

In nature, plants are continuously exposed to environmental conditions that may have negative effects on their survival, development and productivity.

Drought is considered the most important abiotic factor limiting plant growth and productivity in many areas of the world. The severity of drought is unpredictable, because it depends on many factors such as the occurrence and distribution of rains, evaporation demands and the capacity of soils to retain water. In addition, climate change is contributing to water deficits in regions where drought has not been a problem in the past. These difficulties are particularly important in semi-arid agricultural regions and/or with irrigation conditions that often stimulate soil salinization.

Although plants show different sensitivity and response to water deficit, they are all capable of perceiving it, triggering signaling pathways, and responding to it. Mechanisms developed include morphological, physiological and molecular adaptations. Apart from the intrinsic protection mechanisms, plants grow in association with a large number of soil microorganisms that can improve the symptoms caused by stress.

Arbuscular mycorrhizal fungi (AM) are widely distributed and are able to establish a symbiotic association with the roots of most land plants. This symbiosis provides a nutritional benefit to the plant and gives it protection against biotic and abiotic stress. The beneficial effects of mycorrhizas are most visible when there are factors that negatively affect plant growth and development. Many studies have shown that the contribution of AM symbiosis to abiotic stress tolerance is due to a combination of nutritional, physiological and molecular effects. However, there is little scientific information available that jointly evaluates the inoculation with AM fungi and the presence of an abiotic stress in Solanaceae of high agro-food importance such as pepper and eggplant.

In this work, it is proposed to study the protective role of AM symbiosis against abiotic stress. For this purpose, pepper and eggplant plants not inoculated and inoculated with the fungus *Rhizophagus irregularis* will grow under optimal irrigation conditions or will be subjected either to water stress by stopping the water supply, or to saline stress by adding 150 or 200 mM NaCl.

Physiological, biochemical and molecular parameters will be determined, and both the response of the plant and the possible mechanisms involved in its greater tolerance to stress will be evaluated.

RESUMEN:

En la naturaleza las plantas están continuamente expuestas a condiciones ambientales que pueden ejercer un efecto negativo en su supervivencia, desarrollo y productividad.

La sequía está considerada el factor abiótico más importante que limita el crecimiento de las plantas y su productividad en muchas áreas del mundo. La severidad de la sequía es impredecible, ya que depende de muchos factores como la ocurrencia y distribución de las lluvias, demandas de evaporación y capacidad de los suelos de retener agua. Además, el cambio climático está contribuyendo al déficit hídrico en regiones donde la sequía no ha supuesto un problema en el pasado. Estas dificultades son especialmente importantes en regiones agrícolas semiáridas y/o con unas condiciones de riego que a menudo favorecen la salinización de los suelos.

Aunque las plantas muestran distinta sensibilidad y respuesta al déficit hídrico, todas son capaces de percibirlo, desencadenar rutas de señalización, y responder al mismo. Entre los mecanismos desarrollados se incluyen adaptaciones morfológicas, fisiológicas y moleculares. Aparte de los

mecanismos intrínsecos de protección, las plantas crecen asociadas a un gran número de microorganismos del suelo que pueden mejorar los síntomas ocasionados por el estrés.

Los hongos micorrízico-arbusculares (MA) están ampliamente distribuidos y son capaces de establecer una asociación simbiótica con las raíces de la mayoría de las plantas terrestres. Esta simbiosis proporciona un beneficio nutricional a la planta y le confiere protección frente a estreses de tipo biótico y abiótico. Los efectos beneficiosos de las micorrizas son más visibles cuando hay algún factor que afecta negativamente al crecimiento y desarrollo de la planta. Muchos estudios han demostrado que la contribución de la simbiosis MA a la tolerancia al estrés abiótico se debe a una combinación de efectos nutricionales, fisiológicos y moleculares. Sin embargo, la información científica disponible donde se evalúe de forma conjunta la inoculación con hongos MA y estrés abiótico en solanáceas de gran importancia agroalimentaria como el pimiento y la berenjena, es escasa.

En este trabajo, se propone estudiar el papel protector que ejerce la simbiosis MA frente a estrés abiótico. Para ello, plantas de pimiento y berenjena no inoculadas e inoculadas con el hongo *Rhizophagus irregularis* crecerán en condiciones óptimas de riego o serán sometidas bien a un estrés hídrico cesando el aporte de agua, o bien a un estrés salino mediante la adición de 150 o 200 mM NaCl.

Se determinarán parámetros fisiológicos, bioquímicos y moleculares, y se evaluará tanto la respuesta de la planta como los posibles mecanismos implicados en su mayor tolerancia al estrés.

KEYWORDS: Pepper, eggplant, *Capsicum*, *Solanum*, fungus, mycorrhiza, abiotic stress, symbiosis, drought, salinity, stress.

PALABRAS CLAVE: Pimiento, berenjena, *Capsicum*, *Solanum*, hongo, micorriza, estrés abiótico, simbiosis, sequía, salinidad, estrés.

ALUMNO: D. Javier Belinchón Moreno.

TUTOR ACADÉMICO: Dr. José María Seguí Simarro.

DIRECTOR EXPERIMENTAL: Dra. Rosa Caridad Porcel Roldán.

LOCALIDAD Y FECHA: Valencia, 8 de junio de 2020.

AGRADECIMIENTOS

Son varias las personas que, ya sea académica o moralmente, me han proporcionado su apoyo en la realización de este trabajo y, como es debido, debo expresarles mi gratitud.

En primer lugar, me gustaría agradecer a Rosa Porcel por todo su esfuerzo y dedicación para ayudarme a realizar un buen proyecto, por aportar su experiencia en el tema del que trata este estudio, y por estar siempre disponible para resolver todas mis dudas, especialmente en esta difícil situación de emergencia sanitaria en la que todos nos hemos visto inmersos en los últimos meses, y que nos ha impedido a muchos llevar a cabo nuestros proyectos de la forma previamente programada. Siguiendo esta línea, también quiero agradecer a mi tutor, José María Seguí, por confiar en mí y abrirme las puertas de su laboratorio cuando todavía no sabía casi nada de este mundo en el que estoy entrando, y por solventarme mis problemas y dudas siempre que lo he necesitado, al igual que el resto de los integrantes de su laboratorio.

En segundo lugar, desearía agradecer a todas las personas que sin ser mi familia más próxima me han ayudado y animado durante el periodo de la realización de este trabajo y durante el grado. Ellos son mis amigos del pueblo o todos los amigos que he conocido durante estos años en Valencia. Siempre han estado cuando se les ha necesitado.

Por último, también quiero agradecer y dedicar este trabajo a mi familia, a mis padres y mi hermano que son los que siempre están a mi lado en lo bueno y en lo malo, a mis abuelas de las que por suerte todavía puedo disfrutar, y a mis abuelos, que ya no están, y que me enseñaron que independientemente de los conocimientos que poseas, para ser respetado por todos lo más importante es la capacidad de resolver aquello que te propones con humildad y sencillez.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Una problemática en la agricultura actual: sequía y salinización de suelos	1
1.2. La biotecnología y su enfoque vegetal como posible solución	1
1.3. Sistemas implicados en la tolerancia a estrés hídrico y salino en plantas	2
1.3.1. Generalidades	2
1.3.2. Sistemas de tolerancia a estrés hídrico y salino	2
1.3.2.1. Ajuste osmótico y osmolitos	3
1.3.2.2. Proteínas LEA	3
1.3.2.3. Sistemas antioxidantes	3
1.3.2.4. Acuaporinas	3
1.3.2.5. Rutas dependientes e independientes de ABA	4
1.3.2.6. Otros mecanismos	4
1.4. Las micorrizas	4
1.4.1. Origen y generalidades	4
1.4.2. Micorrizas arbusculares (MA)	5
1.4.2.1. Taxonomía	5
1.4.2.2. Formación y señalización	6
1.4.2.3. Fisiología	7
1.4.3. Importancia ecológica y aplicaciones biotecnológicas	7
1.5. Contribución de la simbiosis micorrízico-arbuscular a la tolerancia al estrés abiótico	8
1.5.1. Tolerancia a estrés salino	8
1.5.2. Tolerancia a estrés hídrico	8
1.6. Los dobles haploides y la posible influencia de la simbiosis micorrízico-arbuscular en su eficacia de producción	10
1.6.1. Importancia y utilidad principal de los dobles haploides	10
1.6.2. Métodos de obtención de haploides y dobles haploides	10
1.6.3. El mecanismo de androgénesis	11
1.6.3.1. Fundamentos y generalidades	11
1.6.3.2. Inducción de androgénesis a partir del cultivo de anteras	12
1.6.3.3. Inducción de androgénesis a partir del cultivo de microsporas	12
1.6.3.4. Efecto de la micorrización y el estrés en el mecanismo de androgénesis	12
2. Objetivos	13
3. Materiales y métodos	14
3.1. Diseño experimental general	14
3.2. Material biológico	15
3.2.1. Cultivos utilizados	15
3.2.1.1. Berenjena	15
3.2.1.2. Pimiento	15
3.2.2. Material fúngico utilizado	15
3.3. Método de cultivo y condiciones de crecimiento	15
3.3.1. Cultivo y crecimiento en cámara de cultivo	15
3.3.2. Crecimiento en invernadero	15
3.4. Aplicación del estrés	16
3.4.1. Aplicación del estrés salino	16
3.4.2. Aplicación del déficit hídrico	16
3.5. Evaluación del grado de micorrización	16
3.5.1. Tinción de las raíces	16
3.5.2. Cálculo del porcentaje de micorrización	16
3.6. Determinaciones fisiológicas	17

3.6.1.	Producción de biomasa	17
3.6.2.	Producción de frutos	18
3.6.3.	Observaciones macroscópicas	18
3.7.	Determinaciones bioquímicas	18
3.7.1.	Daño oxidativo a lípidos	18
3.7.2.	Peróxido de hidrógeno	18
3.7.3.	Prolina y azúcares totales	19
3.7.4.	Contenido de pigmentos	19
3.8.	Determinaciones moleculares	19
3.8.1.	Aislamiento del ARN	19
3.8.2.	Síntesis de ADNc	19
3.8.3.	PCR cuantitativa con transcripción reversa (RT-qPCR)	19
3.9.	Determinaciones con relación a la respuesta androgénica	20
3.9.1.	Recuento de la viabilidad de microsporas	20
3.9.2.	Cultivo de anteras y microsporas aisladas	20
3.9.2.1.	Medios de cultivo	20
3.9.2.2.	Procedimiento de cultivo de anteras	21
3.9.2.3.	Procedimiento de cultivo de microsporas aisladas	22
3.9.3.	Recuento del porcentaje de respuesta androgénica	23
3.10.	Análisis estadístico	23
4.	Resultados y discusión	24
4.1.	Porcentaje de colonización micorrízica	24
4.2.	Efecto de la micorrización y el estrés abiótico en la producción de biomasa en plantas juveniles	25
4.2.1.	Condiciones óptimas de riego	25
4.2.2.	Condiciones de estrés hídrico	27
4.2.3.	Condiciones de estrés salino	31
4.3.	Efecto de la micorrización y el estrés abiótico en las características agronómicas de plantas adultas	31
4.3.1.	Condiciones óptimas de riego	31
4.3.1.1.	Altura de las plantas	31
4.3.1.2.	Perímetro del tallo	33
4.3.1.3.	Número de flores	34
4.3.1.4.	Producción de frutos	34
4.3.2.	Condiciones de estrés hídrico	36
4.3.3.	Condiciones de estrés salino	36
4.4.	Efecto de la micorrización y el estrés abiótico en los mecanismos bioquímicos y moleculares desencadenados	37
4.5.	Efecto de la micorrización y el estrés abiótico en la respuesta androgénica	38
4.5.1.	Condiciones óptimas de riego	38
4.5.2.	Condiciones de estrés abiótico	39
5.	Conclusiones	40
6.	Referencias bibliográficas	41
7.	Anexo I	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Rutas dependientes e independientes de ABA en la respuesta al estrés hídrico y salino	4
Figura 2. Ilustración de las estructuras colonizadoras de raíces en las asociaciones ectomicorrícicas y micorrícicas-arbusculares	5
Figura 3. Ciclo de vida de los hongos micorrícico-arbusculares	6
Figura 4. Representación de la vía de desarrollo embriogénico o callogénico de la microspora	11
Figura 5. Distribución de los experimentos realizados	14
Figura 6. Proceso de determinación del porcentaje de micorrización	17
Figura 7. Proceso de cultivo de anteras en pimiento o berenjena	21
Figura 8. Algunos pasos del proceso de cultivo de microsporas aisladas de berenjena ,.....	23
Figura 9. Formación de algunas estructuras características de la simbiosis micorrícico-arbuscular, en este caso en el primer experimento con berenjena	24
Figura 10. Desarrollo radicular de pimiento en estadio adulto sometido a estrés salino	25
Figura 11. Influencia de la inoculación con hongos micorrícico-arbusculares (MA) o la no inoculación (control) en la producción de biomasa de distintos órganos (parte aérea y raíz), así como de la planta completa, en plantas juveniles	26
Figura 12. Influencia de la inoculación con hongos micorrícico-arbusculares (MA) o la no inoculación (control) en la producción de biomasa y la longitud de distintos órganos (parte aérea y raíz), así como de la planta completa, en plantas juveniles, previa a la aplicación de un estrés hídrico	27
Figura 13. Estado fisiológico de las plantas sobrantes del segundo experimento tras su paso al invernadero, privadas de agua durante aproximadamente dos semanas	28
Figura 14. Influencia del estrés hídrico y la inoculación con hongos micorrícico-arbusculares en la producción de biomasa de distintos órganos (parte aérea y raíz), así como de la planta completa, en plantas juveniles	29
Figura 15. Influencia del estrés hídrico y la inoculación con hongos micorrícico-arbusculares en la longitud de distintos órganos (parte aérea y raíz), así como de la planta completa, en plantas juveniles	30
Figura 16. Influencia del estrés hídrico y la inoculación con hongos micorrícico-arbusculares en el contenido hídrico (%) de la hoja en plantas juveniles	31
Figura 17. Influencia de la inoculación previa con el hongo micorrícico-arbuscular (MA) o la no inoculación (control) sobre la longitud de las plantas en estadio adulto	32
Figura 18. Influencia de la inoculación previa con el hongo micorrícico-arbuscular (MA) o la no inoculación (control) sobre el perímetro del tallo de las plantas en estadio adulto	33
Figura 19. Influencia de la inoculación previa con el hongo micorrícico-arbuscular (MA) o la no inoculación (control) sobre el número de frutos producidos por planta de las plantas en estadio adulto	34
Figura 20. Influencia de la inoculación previa con el hongo micorrícico-arbuscular (MA) o la no inoculación (control) sobre la producción de fruto por planta de las plantas en estadio adulto	35
Figura 21. Estado fisiológico general de las plantas de pimiento del segundo experimento bajo condiciones de estrés salino	36

Figura 22. Influencia del estrés hídrico y la inoculación con hongos micorrízico-arbusculares en el contenido hídrico relativo (%) de plantas adultas	37
Figura 23. Influencia de la inoculación previa con el hongo micorrízico-arbuscular (MA) o la no inoculación (control) sobre el porcentaje de viabilidad de las microsporas producidas por las plantas evaluadas	38
Figura 24. Influencia de la inoculación previa con el hongo micorrízico-arbuscular (MA) o la no inoculación (control) sobre el porcentaje de respuesta a la formación de callo de los cultivos de anteras de las plantas evaluadas en cada caso	38
Figura 25. Influencia de la inoculación previa con el hongo micorrízico-arbuscular (MA) o la no inoculación (control) sobre el porcentaje de viabilidad de las microsporas de plantas sometidas a estrés salino (ES) o riego óptimo (RO) durante un periodo de tiempo de 11 días, con monitoreos al inicio del estrés, una semana tras su comienzo, y al finalizar el mismo	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes del medio de inducción y regeneración para el cultivo de anteras en pimiento y berenjena	20
Tabla 2. Componentes del medio de cultivo de microsporas aisladas de berenjena	21
Tabla 3. Porcentaje de colonización micorrízica de las plantas previamente inoculadas en los distintos experimentos	24

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

MA: Micorrízico-arbuscular.

RO: Riego óptimo.

CH: Contenido hídrico.

CHR: Contenido hídrico relativo.

EH: Estrés hídrico.

ES: Estrés salino.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. UNA PROBLEMÁTICA EN LA AGRICULTURA ACTUAL: SEQUÍA Y SALINIZACIÓN DE SUELOS

Los estreses de tipo abiótico son la causa principal de la reducción en la productividad de los cultivos en todo el mundo, estimándose como promedio esta reducción en más de un 50% en la mayoría de los cultivos afectados. Dentro de los estreses abióticos, son la sequía y la salinidad los que más intensamente contribuyen a estas pérdidas, con el problema añadido de su progresiva extensión y agravamiento en muchas regiones cultivables del planeta (Denby y Gehring, 2005; Wang et al., 2003).

Respecto a la sequía, esta se puede definir como “un fenómeno hidrológico que supone una disminución temporal significativa de los recursos hídricos durante un periodo suficientemente prolongado que afecta a un área extensa con consecuencias socioeconómicas adversas” (Monreal, 2006). La sequía afecta a gran parte de la agricultura mundial, provocando graves daños económicos en países desarrollados, y agravando el problema del hambre en países en vías de desarrollo (Kogan et al., 2019). Entre 2001 y 2016, cerca del 20 % de las tierras cultivables a nivel mundial sufrieron el problema de la sequía al menos durante 2-3 años, siendo este porcentaje mucho más alto en algunos países (Kogan et al., 2015). Centrándonos en España, es bien sabido que han ocurrido numerosos episodios de sequía severa a lo largo del primer tercio del siglo XX, así como en los años 40, 70 y 80, comenzando en 2004 un nuevo periodo de sequía que, con alguna excepción temporal, se extiende hasta la actualidad (Mestre y Moreno, 2020).

Por otro lado, la salinidad engloba distintos procesos. Se puede distinguir la salinidad primaria o natural, debida a cambios climáticos, cambios geomorfológicos de sedimentación o erosión, o cambios en la hidrología superficial y subterránea; y la salinidad secundaria, debida principalmente al exceso de riego sin la instalación de sistemas de drenaje adecuados, o la sobreexplotación de los acuíferos. Por tanto, la salinidad como término global podría definirse como el resultado de procesos naturales o antrópicos que conducen en menor o mayor grado a la acumulación de sales en los suelos, pudiendo afectar a su fertilidad (Díaz, 1996). La salinización del suelo es un fenómeno generalizado a nivel mundial, con más de 940 Mha afectadas por este problema. Las zonas más críticas incluyen Pakistán, China, Estados Unidos, India, Argentina, y muchos otros países de Asia Central y Occidental, destacando a nivel europeo la costa mediterránea (Daliakopoulos et al., 2016), donde se encuentra nuestro país.

Ambos problemas, sequía y salinidad, producen alteraciones en los procesos fisiológicos y metabólicos de las plantas cultivadas, como son la reducción del crecimiento y productividad, la reducción de las tasas fotosintéticas, o la disminución en la síntesis de proteínas totales (Moreno, 2009). Por lo tanto, la seguridad alimentaria y nutricional a nivel mundial va de la mano con el desarrollo de cultivos resistentes a estos estreses, o sistemas que contribuyan a su reducción.

1.2. LA BIOTECNOLOGÍA Y SU ENFOQUE VEGETAL COMO POSIBLE SOLUCIÓN

De acuerdo al Convenio sobre la Diversidad Biológica del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), la biotecnología se define como el conjunto de técnicas que utilizan sistemas biológicos, organismos vivos o derivados de los mismos con el objetivo fabricar o modificar productos o procesos para un uso específico (PNUMA, 1992).

Dentro de lo que se conoce como biotecnología vegetal o agraria, destaca la mejora genética vegetal, que tiene como objetivo obtener cultivos que garanticen rendimientos de producción altos, estables y con la calidad demandada. Una de las técnicas que toman relevancia en este ámbito es el desarrollo de doble haploides, para la obtención de líneas híbridas, como se explicará en el último apartado de esta introducción.

Sin embargo, hay otra gran diversidad de aplicaciones no menos importantes de la biotecnología vegetal, como es el tema de la simbiosis micorrízico-arbuscular que se aborda en este trabajo. Así, los programas de mejora clásicos desarrollados con el objetivo de incrementar la tolerancia al estrés hídrico se han visto obstaculizados por la naturaleza multigénica del rasgo y la variabilidad genética estrecha de los cultivos de interés agronómico (Pardo, 2010), de forma que a pesar de que ha habido avances en el conocimiento básico en los últimos años, todavía no se han conseguido resultados relevantes a nivel práctico. Debido a esto, la utilización de micorrizas en este campo se plantea como una solución real y eficiente.

1.3. SISTEMAS IMPLICADOS EN LA TOLERANCIA A ESTRÉS HÍDRICO Y SALINO EN PLANTAS

1.3.1. Generalidades

El déficit hídrico no sólo aparece en situaciones de escasez de agua, sino también por bajas temperaturas y por una elevada salinidad en el suelo. Estas condiciones disminuyen el agua disponible en las células (Levitt, 1980). El agua se desplaza de forma espontánea desde zonas donde el potencial hídrico es mayor (menos negativo) hacia las zonas donde este es menor (más negativo). El potencial hídrico se puede simplificar a la ecuación siguiente (Nilsen y Orcutt, 1996).

$$\Psi_w = \Psi_p + \Psi_o \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde 'Ψ_w' es el potencial hídrico, 'Ψ_p' es el potencial de presión hidrostática ejercida en la célula vegetal contra la pared celular (en células vegetales siempre tiene valor positivo), y 'Ψ_o' es el potencial osmótico, determinado por la interacción del agua con los solutos disueltos (en células vegetales siempre tiene valor negativo, porque disminuye el agua libre en la célula).

Por tanto, resulta evidente que la regulación final de la osmolaridad, la tensión de la membrana y la presión hidrostática es crítica para el funcionamiento celular adecuado.

Además de esto, la sequía y también la salinidad conducen a un estrés oxidativo en las plantas, debido a la mayor generación de especies reactivas del oxígeno (ROS). Esto es causado porque estos estreses producen una ralentización del ciclo de Calvin, lo que se traduce en la falta de generación de aceptores de electrones (NADP⁺, ADP), y una mayor aceptación de electrones procedentes de la cadena de transporte electrónico del cloroplasto por parte del O₂ (Asada, 1999). Estas ROS, como son el radical hidroxilo (OH⁻), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) o el radical superóxido (O₂⁻), en ausencia de mecanismos protectores pueden causar daños irreversibles en las células, por oxidación de membrana, desnaturalización de proteínas, y daño al ADN (Luis et al., 2006).

En el caso de la salinidad, además del componente osmótico y oxidativo, también aparece un componente de toxicidad iónica, debida a la elevada concentración de elementos (Na⁺, Cl⁻), que pueden interferir con el metabolismo celular (Amini et al., 2007). Así, el aumento de Na⁺ inhibe la absorción de otros nutrientes al interferir con varios transportadores de membrana, como los canales selectivos de iones K⁺ (Wild, 1988). En consecuencia, estos estreses abióticos producen diversos efectos, desde la reducción del crecimiento y la turgencia, hasta la pérdida de la estructura celular por inhibición de la actividad enzimática y el desequilibrio de las membranas (Vijayan, 2009).

1.3.2. Sistemas de tolerancia a estrés hídrico y salino

Ante situaciones de déficit hídrico las plantas pueden presentar respuestas de adaptación a nivel morfológico, fisiológico y molecular que tienen efectos sobre el crecimiento, como el aumento del crecimiento radicular para encontrar agua a grandes profundidades, la disminución de la expansión foliar (Potters et al., 2007), el cierre de estomas, regulado por la hormona ácido abscísico (ABA)

(Moreno, 2009), o el mantenimiento de la homeostasis mediante la exclusión de iones en las hojas, y la expulsión de sal o el impedimento de su absorción a través de la raíz (Ríos, 2004) en el caso de la salinidad.

Sin embargo, posiblemente la mayor respuesta de las plantas se da a nivel molecular y celular, siendo una de las principales respuestas la modificación en la expresión génica, con el objetivo de producir enzimas responsables de la síntesis de osmolitos, proteínas protectoras, enzimas antioxidantes, factores de transcripción y otros (Bray, 1997) como a continuación se detalla.

1.3.2.1. Ajuste osmótico y osmolitos

A nivel celular una de las respuestas más importantes es el ajuste del componente osmótico, para compensar el potencial hídrico, lo que tiene como consecuencia la entrada de agua en la célula y la recuperación de la turgencia (Moreno, 2009). Este ajuste osmótico tiene lugar mediante la síntesis de solutos compatibles (osmolitos) entre los que destaca la prolina, glicina betaína, o manitol entre otros, que son moléculas orgánicas de bajo peso molecular y muy solubles; y mediante la acumulación de iones, fundamentalmente K^+ (Cushman, 2001). En general, la acumulación de iones durante el ajuste osmótico ocurre en la vacuola, mientras que en el citoplasma se acumulan osmolitos que no intervienen en el metabolismo celular (Moreno, 2009).

1.3.2.2. Proteínas LEA

Las proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant Protein), son codificadas por un grupo grande de genes inducidos por estrés osmótico, y se acumulan en altas concentraciones durante la fase más avanzada de la embriogénesis, justo antes de la desecación de la semilla, aunque también se acumulan en ocasiones en tejidos vegetativos como consecuencia del estrés hídrico (Galau et al., 1986; Baker et al., 1988). Se ha comprobado que la sobreexpresión de estas proteínas desempeña un papel importante en la protección de proteínas y membranas celulares (Wang et al., 2006).

1.3.2.3. Sistemas antioxidantes

Además de los compuestos no enzimáticos (agentes reductores) como el tocoferol, ascorbato o glutatión, y la producción de osmolitos, las enzimas antioxidantes son fundamentales para eliminar las especies reactivas del oxígeno (ROS), que se generan debido a un aumento en la tasa de fotorreducción del O_2 en los cloroplastos (Robinson y Bunce, 2000). Entre las principales enzimas implicadas se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la ascorbato peroxidasa (APX), la guayacol peroxidasa, la glutatión reductasa (GR), y la monodehidroascorbato reductasa (MHAR) (Porcel, 2006).

1.3.2.4. Acuaporinas

El movimiento de agua a través de la membrana plasmática no solo depende de los potenciales hidrostáticos y osmóticos, sino también de la presencia de acuaporinas, que son proteínas transmembrana encargadas de transportar agua (Carvajal et al., 2000) aunque también se ha visto que pueden transportar otras moléculas de pequeño tamaño como glicerol, urea, CO_2 o incluso iones como el boro (B) (Porcel et al., 2018).

Las acuaporinas pertenecen a la familia de las proteínas intrínsecas mayores (MIP), fueron descritas por primera vez en ovocitos de *Xenopus*, y posteriormente se ha visto que constituyen un 5-10% de las proteínas de membrana, localizadas en la membrana plasmática y el tonoplasto principalmente (Ríos, 2004). En plantas se clasifican en cinco grupos y a su vez se han dividido en subgrupos evolutivos más pequeños y estos en isoformas, haciendo un total de más de 150 isoformas de acuaporinas.

1.3.2.5. Rutas dependientes e independientes de ABA

El ácido abscísico (ABA) es una hormona vegetal con un papel muy importante en la respuesta a estreses abióticos. Así, existen numerosas rutas dependientes de ABA (Figura 1), entre las que se incluyen las rutas de síntesis de muchos de los metabolitos y proteínas mencionadas anteriormente. Por ejemplo, existen numerosos genes que controlan la expresión de bombas iónicas cuya expresión depende del ABA, al igual que ocurre con secuencias que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de prolina, glicina betaína, pinitol, y otros muchos compuestos y factores de transcripción (Chávez y González, 2009).



Figura 1. Rutas dependientes e independientes de ABA en la respuesta al estrés hídrico y salino. Puede observarse la gran variedad de rutas de señalización en las que interviene el ABA, aunque no todas ellas aparecen aquí representadas. Recuperado de Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki (2007) y adaptado al estudio aquí realizado por elaboración propia.

1.3.2.6. Otros mecanismos

Además de los mecanismos citados, existen otros muchos sistemas implicados en el mantenimiento de la homeostasis celular, como son las proteínas de choque térmico, las proteínas transportadoras de iones que intervienen en la eliminación de la toxicidad iónica, las proteasas, las proteínas kinasas, las fosfatasa, las proteínas involucradas en el metabolismo de fosfolípidos, o los factores de transcripción (Moreno, 2009).

1.4. LAS MICORRIZAS

1.4.1. Origen y generalidades

La asociación micorrícica es una simbiosis mutualista existente entre ciertos hongos del suelo y las raíces de la mayoría de las plantas, y que parecen haber evolucionado como un mecanismo de supervivencia para ambos, permitiéndoles sobrevivir en condiciones y ambientes desfavorables (Björkman, 1970). De hecho, se estima que más del 90% de las plantas terrestres se encuentran micorrizadas. Solo las familias crucíferas y quenopodiáceas contienen especies que no se micorrizan.

El término “simbiosis” fue introducido por primera vez por Albert Bernhard Frank a finales del siglo XIX (Frank, 1877), como un término que no implicaba parasitismo, pero que estaba basado en la coexistencia entre organismos bastante distintos, en la cual aparentemente ambos organismos se ayudaban entre sí. Además, Frank fue el que introdujo la palabra “micorriza” (Frank, 1885), discutiendo que “toda la estructura no es ni raíz de árbol ni hongo, sino que se asemeja al líquen, una unión de dos organismos diferentes en un solo órgano morfológico. Puede designarse adecuadamente como ‘raíz de hongo’ o ‘micorriza’”. Se habla de universalidad de esta simbiosis porque es muy

extendida, estando presente en cualquier tipo de suelo y latitud. Es tan universal que se dice que las plantas no tienen raíces sino micorrizas.

La principal función de esta simbiosis es la transferencia de nutrientes, de manera que la planta facilita al hongo compuestos carbonados mientras que el hongo es capaz de suministrar agua y nutrientes, principalmente fósforo que capta de zonas del suelo donde las raíces más finas de las plantas son incapaces de acceder. Además, el hongo aporta una serie de beneficios al suelo y a la planta como la tolerancia a estreses tanto de tipo biótico como abiótico.

En cuanto a su origen, la filogenética molecular, junto con el estudio de fósiles ha proporcionado información sobre la evolución de los distintos tipos de asociación micorrícica a lo largo de la historia, mostrando las primeras evidencias de la existencia de micorrizas en el Ordovícico medio (hace unos 460 millones de años), coincidiendo con las primeras esporas que evidencian la existencia de plantas terrestres (Strullu-Derrien et al., 2016).

De forma general, podemos encontrar dos clases de micorrizas (Figura 2). Las ectomicorrizas son las que conocemos comúnmente como setas o trufas. Son una minoría dentro de todas las micorrizas, abarcando únicamente un 3% de estas, aunque casi todas las plantas forestales suponen este tipo de micorrización. Se caracterizan por ser visibles a simple vista, y no colonizar la raíz intracelularmente, sino que las hifas se desarrollan por los espacios intercelulares constituyendo lo que se llama red de Hartig. El micelio se desarrolla rodeando la raíz y se le denomina manto, motivo por el que a estas micorrizas también se les denomina micorrizas formadoras de manto. El otro gran grupo lo constituyen las endomicorrizas o micorrizas arbusculares y supone el 97% de las plantas micorrizadas. A diferencia de las ectomicorrizas, estas no son visibles a simple vista y colonizan la raíz atravesando las células y desarrollando en ellas una estructura especializada llamada arbusculo, que le da nombre al grupo. Estos arbusculos cuya morfología recuerda a un pequeño árbol muy ramificado, es el lugar exacto donde tiene lugar el intercambio de nutrientes entre la planta y el hongo (Requena et al., 2007).

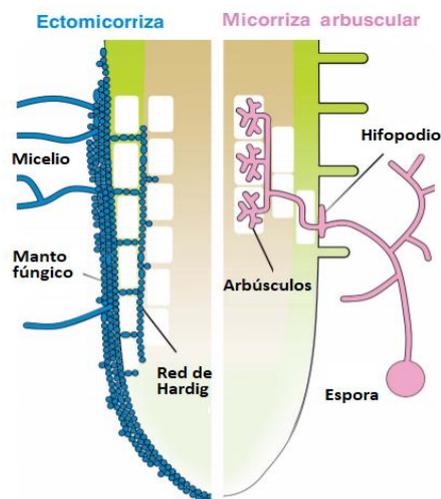


Figura 2. Ilustración de las estructuras colonizadoras de raíces en las asociaciones ectomicorrícicas y micorrícicas arbusculares. Adaptado de Bonfante y Genre (2010), y traducido al castellano.

1.4.2. Micorrizas arbusculares (MA)

1.4.2.1 Taxonomía

Las micorrizas arbusculares (MA) se han incluido en el taxón Glomeromycota, que, según la clasificación más aceptada en la actualidad, presenta 3 clases (*Glomeromycetes*, *Archaeosporomycetes* y *Paraglomeromycetes*). Dentro de estas clases se han identificado 5 órdenes (*Glomerales*, *Diversisporales*, *Gigasporales*, *Archaeosporales* y *Paraglomerales*) y 15 familias, con 38 géneros en total (Aguilera et al., 2015). Esta clasificación tan amplia hace pensar que, a pesar de la

uniformidad morfológica de estos hongos, existe una gran diversidad genética y posiblemente funcional en estos hongos (Porcel, 2006).

Además, algunos autores sostienen que el número de especies totales puede estar entre 300 - 1600 (Pagano et al., 2016).

1.4.2.2 Formación y señalización

Los hongos micorrícicos-arbusculares son biótrofos obligados, incapaces de completar su ciclo de vida de forma independiente a la planta (Bonfante y Perotto, 1995). El inicio de la simbiosis micorrícico-arbuscular comienza con la colonización de una raíz por los propágulos fúngicos presentes en el suelo, que pueden ser esporas, raíces micorrícicas de plantas existentes previamente, o fragmentos de hifas que sobreviven en el suelo (Requena et al., 1996). Las esporas son la única fase del ciclo de vida de los hongos MA independiente de la planta. Son de forma redonda con una pared celular gruesa, y son capaces de germinar en condiciones apropiadas de agua y temperatura, y detener su crecimiento si faltan señales de las plantas (Koske, 1981).

Una vez una hifa alcanza la superficie de una raíz, se adhiere a la misma por medio de un **apresorio**, y el hongo penetra al interior de la raíz, formando estructuras especializadas: hifas intra e intercelulares, y **arbúsculos**. Estos arbúsculos, que como se ha comentado anteriormente son el principal sitio de intercambio de nutrientes, tienen una vida media de 7 a 14 días, y una vez desaparecen la célula vegetal vuelve a una situación previa a la de partida, o puede volver a ser colonizada (Porcel, 2006). A continuación, tras la colonización del huésped, el hongo sufre un desarrollo que conlleva la formación de hifas en el suelo que rodea la raíz, formando el micelio externo, que se encarga de buscar agua y nutrientes minerales y también puede colonizar otras raíces cercanas (Requena et al., 2007; Barea, 2000). Por último, el ciclo de vida fúngico se completa con la formación de clamidosporas en el micelio externo (Requena et al., 2007). También se han visto algunas especies de hongos que pueden formar unas **vesículas** con alto contenido en lípidos y que parecen ser una reserva de nutrientes. Al contrario que los arbúsculos, no son estructuras efímeras, sino que pueden llegar a convertirse en esporas del hongo (Barea et al., 1991; Porcel, 2006).

Debido a todo lo comentado, se pueden identificar distintas etapas morfológicas durante el ciclo de vida de los hongos MA (Figura 3).

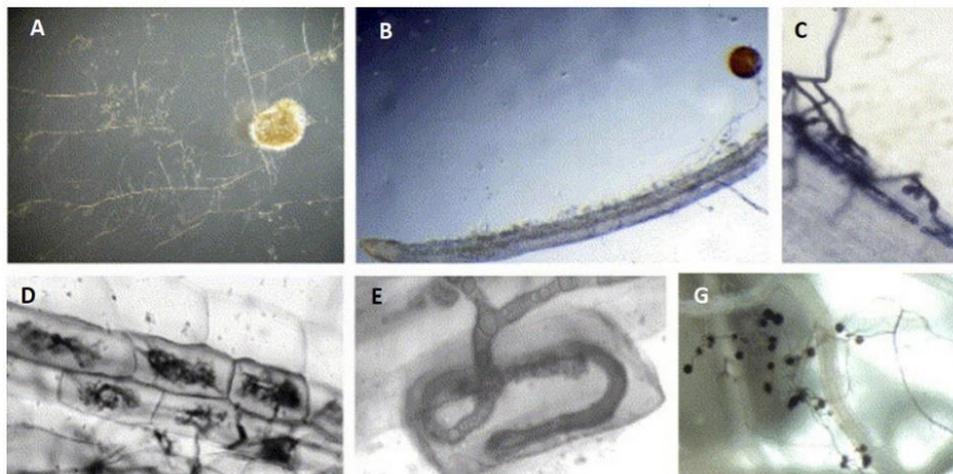


Figura 3. Ciclo de vida de los hongos micorrícico-arbusculares. (A) Espora en germinación. (B) Reconocimiento de una raíz del huésped. (C) Formación de apresorios en la superficie de la raíz, y comienzo de la colonización de esta. (D) Arbúsculos en las células vegetales. (E) Hifa intracelular en detalle. (F) Micelio externo comenzando a producir nuevas esporas. Adaptado de Requena et al. (2007).

Es importante destacar que en todo el proceso de formación de la micorriza arbuscular comentado anteriormente tiene lugar un diálogo molecular, un intercambio de señales entre la planta y el hongo, que en la actualidad todavía no se conoce completamente, aunque las investigaciones más recientes apuntan a la estrigolactona como molécula clave en la atracción y reconocimiento del hongo MA (Nagahashi y Douds, 2000). Sin embargo, queda mucho por hacer en la identificación y clonación de los genes implicados en el proceso simbiótico, así como los sistemas implicados en el mismo, y es de gran interés en la actualidad (Porcel, 2006).

1.4.2.3 Fisiología

En la simbiosis MA, ambos organismos resultan beneficiados. La planta va a proporcionar al hongo compuestos carbonados que no puede obtener de otra forma (Porcel, 2006). Aunque el principal beneficio de la simbiosis es la transferencia de agua y nutrientes, los hongos MA aportan una serie de ventajas tanto para la planta como para las condiciones del suelo, que veremos a continuación.

1.4.3. Importancia ecológica y aplicaciones biotecnológicas

Como se ha comentado previamente, las micorrizas contribuyen al desarrollo de las plantas con las que establecen la simbiosis, así como al mantenimiento del suelo en las mejores condiciones. Por tanto, las micorrizas poseen una gran importancia ecológica, pues permiten el ahorro de fertilizantes y productos fitosanitarios, y además permiten el desarrollo de especies vegetales en terrenos degradados o sometidos a estreses abióticos, que estarían condenados a su desertificación.

Entre los beneficios que aportan destacan:

- Incremento de la absorción de nutrientes y agua, gracias a la extensa red de hifas que pueden desarrollar, más allá del volumen ocupado por las raíces y sus pelos radiculares. Además, como los principales nutrientes captados son nitrógeno y fósforo, se ha comprobado que los efectos de esta simbiosis sobre el crecimiento de las plantas, y posiblemente sobre su producción, son mucho más acentuados cuando estas se encuentran en suelos con déficit de fósforo (Alarcón y Cerrato, 1999). También son capaces de captar y transferir iones NO_3^- , NH_4^+ o Zn.

- Incremento de la tolerancia a estreses abióticos como pueden ser el estrés hídrico (Porcel y Ruiz-Lozano, 2004), estrés salino (Porcel et al., 2012), estrés por temperaturas (Aroca et al., 2007) contaminación del suelo (Chibuike, 2013; Ferrol et al., 2016) u otros.

Dentro de su aplicación en la contaminación del suelo, se ha visto que la remediación asistida por micorrizas (MAR) es una técnica que permite eliminar contaminantes del suelo, tanto orgánicos como inorgánicos (como los metales pesados), además de mejorar su estructura y ayudar a la adquisición de nutrientes para las plantas (Chibuike, 2013).

- Control de patógenos. Los hongos MA son capaces de proteger al tejido radicular del ataque de microorganismos patógenos, utilizando estrategias como la secreción de antibióticos (Tsantrizos et al., 1991). Sin embargo, un condicionante esencial para esto es que el hongo haya colonizado ya la raíz antes del ataque del patógeno (Azcón-Aguilar y Barea, 1997).

- Contribución al mantenimiento del suelo, pues la biomasa micótica de hongos MA puede representar hasta el 15% de la biomasa neta, además de que algunos de estos hongos son capaces de degradar sustancias orgánicas y minerales del suelo, aumentando su disponibilidad para las plantas (Gupta et al., 2000). También los hongos MA contribuyen a la formación de agregados del suelo, contribuyendo a su estabilización (Porcel, 2006).

- Aportación a las plantas de hormonas de crecimiento como son las auxinas, citoquininas, giberelinas o vitamina B (Chibuike, 2013).

- Incremento de la actividad fotosintética de la planta, como indican numerosos estudios en especies de interés agronómico como el pimiento (Angulo-Castro et al., 2018), el naranjo (Wu y Xia, 2006) o maíz (Zhu et al., 2010). Esto lo llevan a cabo mediante la protección de los centros de reacción del fotosistema o haciendo la transpiración más efectiva, mejorando la conductancia estomática, por ejemplo.

Sin embargo, es importante remarcar que todos estos beneficios dependen de la gran variabilidad existente en los dos componentes de la simbiosis, ya que, según numerosos estudios, el grado de beneficios obtenidos depende de las especies vegetal y fúngica implicadas (Fester y Sawers, 2011), por lo que hace falta un estudio más profundo en cada caso.

Además, parece que las aplicaciones biotecnológicas más inmediatas y potentes derivan del uso de estos hongos MA en sistemas agrícolas ecológicos que tanto están de moda en los últimos años, en los que se evita el uso de fertilizantes o la labranza excesiva, como son la agricultura orgánica, o la labranza de conservación (Fester y Sawers, 2011). El uso de inóculo de micorriza en los cultivos podría reducir el aporte de agua, fertilizante y productos fitosanitarios, a la vez que permitiría una mayor calidad del suelo y un mejor desarrollo de las plantas incluso en condiciones no favorables, lo que se traduciría en cultivos más productivos y eficientes.

1.5. CONTRIBUCIÓN DE LA SIMBIOSIS MICORRÍFICO-ARBUSCULAR A LA TOLERANCIA AL ESTRÉS ABIÓTICO

1.5.1. Tolerancia a estrés salino.

El principal aporte de la simbiosis MA a la tolerancia al estrés salino es su **participación en la disminución de la toxicidad iónica**. En este sentido, la existencia de transportadores que previenen la entrada de Na^+ en la raíz, su exportación al exterior celular, y su compartimentación en la vacuola son esenciales (Chávez y González, 2009; Zhu, 2003).

Dado que el estrés salino posee un componente osmótico, la simbiosis MA también contribuye a la tolerancia a este estrés mediante la sobreexpresión mayoría de los **mecanismos implicados en la tolerancia al estrés hídrico**, que se comentan en detalle a continuación, en su correspondiente apartado. Así, existen diversos estudios que han demostrado que la simbiosis MA en plantas sometidas a estrés salino participa en una mayor absorción de nutrientes, cambios en la acumulación de compuestos osmorreguladores, una mejora en las relaciones hídricas, o un aumento en la tasa fotosintética (Porcel et al., 2012).

Por ejemplo, en estudios con pimiento, se ha visto que el contenido en prolina fue distinto en condiciones de estrés salino entre plantas inoculadas y no inoculadas (Beltrano et al., 2013; Kaya et al., 2009). Lo mismo ocurre en el caso de la acumulación de proteínas antioxidantes, donde existen numerosos estudios que sugieren que la simbiosis MA ayuda a las plantas a eliminar las ROS mediante la síntesis de enzimas antioxidantes (He et al., 2007), o en el caso del control de la expresión de acuaporinas (Aroca et al., 2007; Ouziad et al., 2006).

Además, hay estudios que demuestran tanto en *Solanum melongena* L. (berenjena) (Mohammad y Mittra, 2013) como en *Capsicum annuum* L. (pimiento) (Beltrano et al., 2013; Kaya et al., 2009; Hegazi et al., 2017), ambas especies en este trabajo estudiadas, que las plantas sometidas a estrés salino e inoculadas con hongos MA presentan un incremento significativo en la cantidad de biomasa y producción de fruto.

1.5.2. Tolerancia a estrés hídrico

En los primeros estudios sobre el tema, ya se indicó que la simbiosis MA contribuía a la tolerancia a la sequía de forma indirecta, incrementando los aportes de fósforo (Safir et al., 1972). Sin embargo, en los últimos años han aparecido numerosos estudios que indican que esta tolerancia podría estar

producida por otros muchos cambios y mejoras tanto en la planta como en el suelo. Por tanto, en la actualidad se acepta que el incremento de tolerancia a la sequía en plantas micorrizadas es una combinación de efectos físicos, nutricionales, fisiológicos y celulares (Ruiz-Lozano, 2003).

Así, hay estudios que demuestran tanto en berenjena como en pimiento que las plantas sometidas a déficit hídrico e inoculadas con hongos MA presentan un incremento significativo en la cantidad de biomasa y la producción de fruto respecto a las plantas no inoculadas (Swetha y Padmavathi, 2019; Tallapragada et al., 2016). A continuación, se destacan los principales mecanismos de tolerancia a estrés hídrico que hasta la fecha se han visto influenciados por la simbiosis MA:

- Mejora de la transpiración estomática y las relaciones hídricas. Muchos estudios, algunos de ellos en pimiento, han demostrado que existen diferencias significativas en la apertura estomática y la transpiración entre plantas micorrizadas y controles, cuando están sometidas a un estrés hídrico (Augé, 2000; Davies Jr et al., 1993b).

- Incremento de la tasa fotosintética. Las plantas micorrizadas a menudo muestran un ratio fotosintético mayor que las plantas controles, tanto en situaciones de riego adecuado como en situaciones de estrés hídrico, lo que se relaciona directamente con la mejora de la transpiración estomática (Dixon et al., 1994).

- Mejora de la conductividad hidráulica y transporte de agua a través de las hifas. Como el micelio extrarradical o micelio externo incrementa sustancialmente el volumen abarcado por las raíces de la planta, y además las hifas del hongo, de diámetro 2-5 μm , pueden penetrar en poros del suelo inaccesibles para las raíces más delgadas, de diámetro 10-20 μm (Porcel, 2006), queda claro que esta simbiosis permite una mayor captación de agua. Además, la implicación del micelio externo en la captación de agua quedó demostrada en experimentos en los que se cultivaron plantas micorrizadas, y se aplicó agua sólo en compartimentos a los que llegaban las hifas del hongo MA, y no las raíces (Ruiz-Lozano y Azcón, 1995).

- Contribución al ajuste osmótico. Aunque se sabe que las plantas tienden a equilibrar su potencial hídrico ante situaciones de sequía mediante la síntesis de solutos compatibles (osmolitos) y la acumulación de iones (fundamentalmente K^+), en la actualidad no se disponen de muchos estudios que demuestren un aumento en la síntesis de estos compuestos en plantas micorrizadas sometidas a estrés hídrico, y la mayoría de los disponibles hacen referencia a la acumulación de prolina. De esta forma, atendiendo a investigaciones con berenjena, en el estudio de Swetha y Padmavathi (2019), el contenido de prolina prácticamente se duplicó en las plantas inoculadas con el hongo MA, en comparación con las plantas controles.

También hay estudios que indican un incremento en la síntesis de azúcares solubles en plantas micorrizadas sometidas a estrés hídrico frente a las plantas controles no micorrizadas, con el propósito de producir ese ajuste osmótico (Porcel y Ruiz-Lozano, 2004).

- Protección frente al daño oxidativo. Las actividades antioxidantes asociadas a la simbiosis MA, entendidas como su contribución a la desaparición de ROS, son un mecanismo que hace unos años era muy desconocido, pero en el que se ha avanzado significativamente en la última década. De esta forma, centrándonos en las especies aquí tratadas, tanto en berenjena como en pimiento ya existe información publicada sobre el aumento en la actividad de varias enzimas antioxidantes tras la inoculación con hongos MA (Swetha y Padmavathi, 2019).

- Mejora de la captación de nutrientes. Atendiendo a la captación de fósforo, ya se ha comentado al principio de este apartado que en los primeros estudios sobre simbiosis MA ya se indicó que una de las funciones más importantes de esta simbiosis era el incremento en el aporte de fósforo (Safir et al., 1972). Pero, además, la simbiosis MA también tiene un papel importante en la captación de nitrógeno, un nutriente esencial para el crecimiento de las plantas que es captado en forma de NO_3^- (Frey y Schüepp, 1993). Sin embargo, no existe demasiada información sobre cómo afecta la simbiosis MA a la captación de micronutrientes como el cobre y el zinc, por

lo que esto sería interesante de desarrollar en futuros estudios debido a que se ha visto que, bajo condiciones de estrés hídrico, la disponibilidad de estos nutrientes todavía se reduce más, a causa de la nula movilidad de los iones minerales (Porcel, 2006).

- Cambios en las propiedades del suelo y la capacidad de retener agua. Al igual que los hongos MA contribuyen a la formación de agregados del suelo, incrementando su estabilización (Porcel, 2006), también se ha demostrado en el estudio de Augé et al. (2001) que, en este sentido, la simbiosis MA contribuye a la retención de humedad en el suelo, disminuyendo la magnitud en los daños causados por el déficit hídrico.

1.6. LOS DOBLES HAPLOIDES Y LA POSIBLE INFLUENCIA DE LA SIMBIOSIS MICORRÍFICO-ARBUSCULAR EN SU EFICACIA DE PRODUCCIÓN

Debido a que, como se ha comentado hasta ahora, existen diversos estudios en varias especies que demuestran que la simbiosis MA contribuye a incrementar la biomasa de la planta, su longitud, e incluso su producción de frutos, parece interesante estudiar la posibilidad de que esta simbiosis MA también contribuya a incrementar la viabilidad de las microsporas de la planta colonizada, así como su respuesta en la obtención de haploides y doble haploides. A pesar de ello, no existe bibliografía publicada sobre este tema hasta la fecha.

Sin embargo, si se consiguiera demostrar que esta simbiosis MA contribuye a la mejora de la eficiencia en la productividad de doble haploides, esto sería un avance interesante en el campo de la mejora genética vegetal, ya que estos dobles haploides, como se explica a continuación, son muy utilizados en la producción de líneas híbridas, de gran homogeneidad, rendimiento y valor para las empresas productoras de semillas.

1.6.1. Importancia y utilidad principal de los dobles haploides

Los haploides son plantas esporófitas que tienen un número cromosómico correspondiente al gameto de la especie. Cuando se produce la duplicación cromosómica, de un haploide, se genera un individuo denominado doble haploide (Germanà, 2011b). Estos dobles haploides son homocigotos para todos sus loci (son líneas puras), y son autoperpetuables, ya que si se autofecundan, su descendencia es idéntica genéticamente al parental (Seguí-Simarro, 2010a).

Aunque poseen muchas más aplicaciones, la principal aplicación de los dobles haploides es su utilización en la producción de líneas híbridas, reduciendo considerablemente el tiempo de generación de estas en comparación con la mejora clásica (Seguí-Simarro, 2010a). Estos híbridos son líneas que se obtienen por fecundación de dos líneas puras, y que presentan varias ventajas. Por una parte, tienen una gran homogeneidad. Por otro lado, tienen un rendimiento muy alto, debido al fenómeno de vigor híbrido o heterosis, según el cual, la descendencia híbrida obtenida a partir de dos líneas puras con buena aptitud combinatoria presenta características superiores a los parentales (Cubero, 2003). Sin embargo, desde el punto de vista del agricultor, los híbridos presentan la desventaja de que si se utiliza la semilla que producen para la siembra del año siguiente, la población obtenida será una F2 segregante, que no mantiene las características ideales de la F1 (híbridos comerciales) en cuanto a su homogeneidad y producción. Esto a su vez es una ventaja para las empresas productoras de semillas, ya que se aseguran de que el agricultor debe comprar la semilla cada año (Cubero, 2003).

1.6.2. Métodos de obtención de haploides y dobles haploides

Los haploides y doble haploides se pueden obtener a partir de gametos masculinos o femeninos, aunque normalmente, especialmente en dicotiledóneas, la elección se limita solo a una de estas vías (Wedzony et al., 2009). Así, aunque los principales métodos de obtención de haploides y doble haploides son la ginogénesis, el cruzamiento interespecífico y la androgénesis, este estudio se centra

en este último. Además, es importante destacar que en estas técnicas a veces se producen individuos dobles haploides de forma espontánea, pero otras veces se generan haploides. En este caso, los individuos haploides se suelen tratar con agentes antimitóticos como la colchicina para que se pueda duplicar su genoma y generar así dobles haploides (Hassawi y Liang, 1991).

1.6.3. El mecanismo de androgénesis.

1.6.3.1. Fundamentos y generalidades.

La androgénesis es una técnica que se basa en la reprogramación de la ruta normal del desarrollo del gametofito masculino hacia una vía de desarrollo esporofítico (Seguí-Simarro, 2010a). Esta es la técnica más profundamente estudiada en este campo, y la más efectiva para la obtención de doble haploides (Wedzony et al., 2009). Aunque existen varias vías para la generación de un individuo androgénico, como son la inactivación del núcleo femenino en el cigoto tras la fecundación o la obtención de callos haploides a partir de meiocitos, la vía más eficaz y la más estudiada es la embriogénesis o callogénesis derivada de microsporas (Seguí-Simarro, 2010b).

En esta vía, la microspora se desvía de su ruta normal de desarrollo (microsporogénesis o microgametogénesis), y es inducida *in vitro* para la formación de un embrión o un callo haploide (Figura 4). Sin embargo, el proceso no es tan sencillo ni eficaz, ya que muchas microsporas al desviarse de su ruta normal de desarrollo detienen su crecimiento o siguen un desarrollo similar a la maduración del polen y mueren (Seguí-Simarro, 2010b).

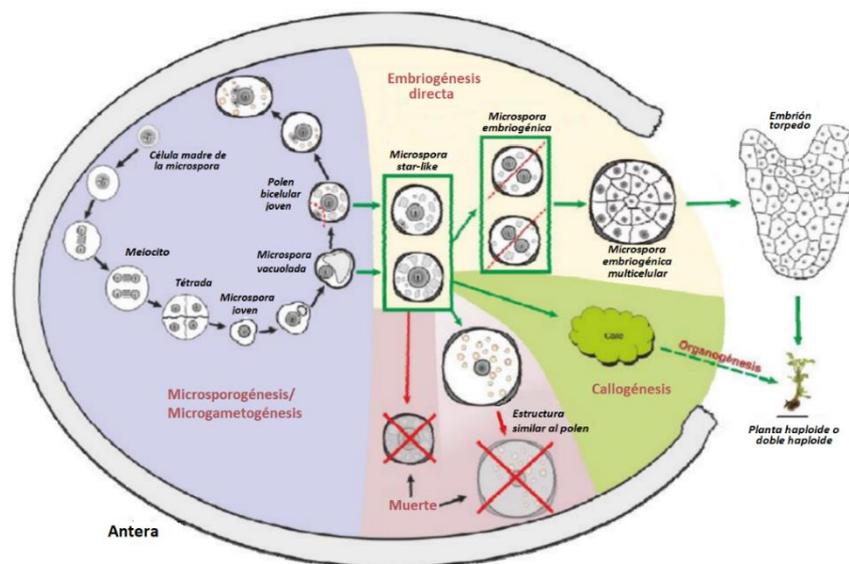


Figura 4. Representación de la vía de desarrollo embriogénico o callogénico de la microspora. Azul: Ruta normal del desarrollo del polen (microsporogénesis o microgametogénesis); Amarillo: Desviación del proceso de desarrollo de la microspora hacia la embriogénesis, generando un embrión que dará lugar a una planta haploide o doble haploide; Verde: Desviación del proceso de desarrollo de la microspora hacia la formación de callos, que a través del proceso organogénico son capaces de generar individuos haploides o dobles haploides; Rojo: Microsporas que al desviarse de su ruta normal de desarrollo detienen su crecimiento o generan una estructura similar al polen y mueren. Recuperado y adaptado de Seguí-Simarro y Nuez (2008).

La desviación de la microspora de su vía normal de desarrollo se puede inducir mediante la aplicación de un estrés, lo cual puede tener lugar mediante dos técnicas distintas: el cultivo de anteras (que contienen las microsporas) o el cultivo de microsporas aisladas (Seguí-Simarro, 2010b).

Sin embargo, el éxito del proceso depende de muchos factores, como son el genotipo de la especie, el estado fisiológico de la planta, la composición del medio de cultivo, el pretratamiento

realizado (normalmente el más efectivo es el choque térmico), o la etapa de desarrollo del polen (Germanà, 2011a). Por todos estos factores, existen algunas especies de interés agronómico donde la eficiencia de obtención de haploides es baja (Touraev et al., 2001), como pueden ser el pimiento, y en menor medida, la berenjena.

1.6.3.2. Inducción de androgénesis a partir del cultivo de anteras.

A pesar de que el protocolo del cultivo de anteras suele ser diferente entre especies, se pueden distinguir varios pasos comunes a todas ellas, como son la selección de yemas que contengan anteras con el polen en su estadio de desarrollo adecuado, su esterilización, la extracción de anteras a partir de esas yemas, y su cultivo *in vitro* en un medio adecuado (Germanà, 2011a).

El cultivo de anteras ofrece una serie de ventajas, como la mayor sencillez en las especies en las que está puesto a punto, o la contribución de la pared de la antera en el aporte de nutrientes y la protección de las microsporas (Seguí-Simarro y Nuez, 2008). Sin embargo, también presenta ciertos inconvenientes como la regeneración de individuos a partir de la pared de la antera en lugar de a partir de las microsporas, la dificultad de manipular anteras en especies donde su tamaño es muy reducido, o la falta de control sobre la composición del medio de cultivo (Ferrie y Caswell, 2011).

1.6.3.3. Inducción de androgénesis a partir del cultivo de microsporas.

Debido a los inconvenientes planteados del cultivo de anteras, en ocasiones se prefiere la inducción de la androgénesis a partir del cultivo de microsporas aisladas, aunque no es un método puesto a punto en demasiadas especies. Aquí, al igual que en el caso anterior, también existen unos pasos básicos en el procedimiento, que se podrían resumir en la recolección de yemas con el tamaño adecuado, el aislamiento de microsporas a partir de ellas, su cultivo en medio líquido, la regeneración de embriones a partir de ellas, y su duplicación cromosómica si fuese necesario (Ferrie y Caswell, 2011).

En este caso, el protocolo es bastante más tedioso que en el cultivo de anteras, pero consigue superar los inconvenientes planteados de esta técnica. Además, el cultivo de microsporas cuando está puesto a punto presenta una eficiencia bastante superior en la obtención de regenerantes, permite que todas las microsporas se desarrollen de forma sincronizada, y es más adecuado para el estudio del proceso de embriogénesis y otras investigaciones básicas (Forster et al., 2007).

1.6.3.4. Efecto de la micorrización y el estrés en el mecanismo de androgénesis

Es lógico pensar que la presencia de estreses abióticos, debido a todos los daños fisiológicos que provocan en las plantas, disminuya su respuesta androgénica, aunque sobre esto tan solo existe un número reducido de publicaciones que evidencian la pérdida de viabilidad del polen en situaciones de estrés hídrico en trigo (Ji et al., 2011) o garbanzo (Fang et al., 2010), o de estrés salino en trigo (Abdullah et al., 1978) o colza (Gul y Ahmad, 2006).

En cuanto al efecto de la simbiosis MA, como se menciona al principio de este apartado, parece razonable plantear la hipótesis de que también puedan contribuir a incrementar la viabilidad de las microsporas formadas por la planta, y que lo haga más todavía en situaciones de estrés abiótico, lo que conduciría a una mayor capacidad reproductiva, y también a una mayor respuesta androgénica. Sin embargo, como en el caso anterior, la bibliografía disponible sobre esto es escasa, existiendo tan solo algunos estudios que demuestran un incremento de la viabilidad del polen en ciertas especies tras su colonización micorrízica en tomate o calabacín (Poulton et al., 2001; Lau et al., 1995).

2. OBJETIVOS

Dado el gran potencial que se atribuye a los hongos MA sobre la mejora en el desarrollo y la adaptación a estreses abióticos de las plantas a las que colonizan, junto con la escasa información científica al respecto en especies de interés agronómico, los principales objetivos de este estudio son los siguientes:

- Evaluar de forma conjunta el efecto de la simbiosis MA y del estrés abiótico (hídrico y salino) en el desarrollo de solanáceas de gran importancia agronómica, como son el pimiento y la berenjena.
- Valorar el efecto de la contribución de los hongos MA sobre la producción de fruto de estas especies de gran interés agronómico, un parámetro de importancia clave en el aspecto económico, pero escasamente estudiado hasta el día de hoy.
- Examinar los mecanismos bioquímicos y moleculares implicados en la posible mayor tolerancia al estrés abiótico de las plantas colonizadas.
- Determinar por primera vez el efecto de la simbiosis MA y del estrés abiótico sobre la viabilidad de las microsporas de pimiento y berenjena, así como sobre su respuesta al proceso androgénico.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL GENERAL

Distintos experimentos fueron llevados a cabo durante el periodo de estudio:

- Primer experimento: El 1 de marzo de 2019 se cultivó berenjena DH36 en semilleros de 5x8 alveolos, tanto en condiciones controles, sin hongo, como aplicándoles un inóculo de hongos MA. Este experimento se realizó para evaluar el efecto de la simbiosis MA sobre las plantas en condiciones óptimas de riego en invernadero en su fase adulta (Figura 5A).

- Segundo experimento: El 30 de mayo de 2019 se cultivó pimiento variedad “Herminio”, de forma análoga al experimento anterior. En este experimento, se evaluó el efecto de la simbiosis MA sobre estas plantas tanto en condiciones óptimas de riego como en condiciones de estrés salino en su estado adulto en invernadero (Figura 5B).

- Tercer experimento: El 11 de octubre de 2019 se cultivó tanto berenjena DH36 como pimiento variedad ‘Herminio’, igual que en los experimentos anteriores. Con este experimento, se pretendió evaluar el efecto de la simbiosis MA sobre estas plantas en invernadero tanto en condiciones óptimas de riego (Figura 5C) como en condiciones de estrés hídrico, posteriormente.

- Cuarto experimento: El 7 de febrero y el 13 de marzo de 2020 se cultivó tanto berenjena DH36 como pimiento variedad ‘Herminio’. A diferencia de los experimentos anteriores, las plantas crecieron únicamente en cámara de cultivo y fueron sometidas a estrés hídrico (Figura 5D) o salino en su fase juvenil.



Figura 5. Distribución de los experimentos realizados. (A) Primer experimento (berenjena) a las pocas semanas de su paso a invernadero. (B) Segundo experimento (pimiento) justo antes de la aplicación del estrés salino. (C) Tercer experimento (berenjena y pimiento) a las pocas semanas de su paso a invernadero. (D) Cuarto experimento (berenjena y pimiento, a la izquierda y derecha, respectivamente) justo antes de la aplicación del estrés hídrico.

3.2. MATERIAL BIOLÓGICO

3.2.1. Cultivos utilizados

3.2.1.1. Berenjena

La berenjena (*Solanum melongena* L.) es un cultivo perteneciente a la familia de las solanáceas, normalmente autógama, pero que puede presentar una cierta tasa de alogamia (Şekara et al., 2007). Según los datos actualizados por la FAO en 2018, constituye la tercera solanácea más importante

respecto al área cultivada, detrás del tomate (*Solanum lycopersicum*) y la patata (*Solanum tuberosum*), con más de 1.8 Mha cultivadas en el mundo. Además, su producción mundial es de más de 50 millones de toneladas anuales, con un valor de más de 10 mil millones de dólares al año, lo que la convierte en la quinta solanácea más importante económicamente (FAOSTAT, 2020).

En este estudio se utilizó la línea DH36 de berenjena (doble haploide y de alta respuesta androgénica), obtenida en el laboratorio de Biología Celular del Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV) (Rivas-Sendra et al., 2017).

3.2.1.2. Pimiento

El pimiento (*Capsicum annuum*, L.) también es un cultivo perteneciente a la familia de las solanáceas, cuyas flores presentan alogamia parcial. Su producción anual es cercana a los 40 millones de toneladas a nivel mundial, situándose entre los 4 cultivos de solanáceas más importantes a nivel económico. Su área cultivada global se sitúa cerca de los 2 Mha (FAOSTAT, 2020). En este estudio se utilizaron híbridos F1 comerciales de la variedad de pimiento “Herminio”, tipo lamuyo, comercializados por la empresa Syngenta AG, S.A.

3.2.2. Material fúngico utilizado

Para la inoculación fúngica de las plantas se utilizó el hongo MA *Rhizophagus irregularis* (Schenk and Smith), cepa EEZ 58, que se mantuvo en cultivos trampa de *Zea mays* L. en cámara de cultivo, con las condiciones que se detallan a continuación. Por tanto, el inóculo estaba formado por suelo, micelio, esporas, y fragmentos infectados de raíz de *Zea mays* L. por este hongo.

3.3. MÉTODO DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

3.3.1. Cultivo y crecimiento en cámara de cultivo

En todos los experimentos realizados, el substrato en el que germinaron las semillas estaba compuesto de una mezcla de substrato comercial y vermiculita en la proporción 1:2 (v/v). El substrato comercial fue Humin N3, producido por la empresa Klasmann-Deilmann GmbH (Alemania), y estaba compuesto principalmente de turba de *Sphagnum*, con un 90% de materia orgánica y un pH de 5.5-6.5. La vermiculita fue producida por la empresa Projar, S.A., y presentaba una granulometría de 0.5-3.0 mm, y un pH cercano a 7.

Todas las plantas germinaron en semilleros de 5x8 alveolos, en cámara de cultivo a una temperatura de 20 °C, 60-65% de humedad relativa, fotoperiodo de 16/8 horas, y una intensidad luminosa de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En el caso de pimiento se germinaron en luz azul, y en el caso de berenjena en luz roja, ya que así se había comprobado previamente que el proceso es más eficiente.

El inóculo de hongo MA, que consistió en un volumen aproximado equivalente a dos cucharas-espátula de laboratorio, se aplicó en todos los casos (excepto en los controles) a la mitad de altura del alveolo. Por otro lado, las plantas controles recibieron 3 mL del mismo inóculo filtrado (20 μm) con el fin de proveer la población microbiana presente en el inóculo, pero libre de propágulos AM.

En los experimentos en los que las plantas crecieron íntegramente en cámara de cultivo (cuarto experimento), además de todo lo comentado anteriormente, tanto el sustrato comercial como la vermiculita fueron esterilizados previamente en autoclave a 120 °C durante 20 minutos, para eliminar la posible presencia de organismos que interfieran en el experimento.

3.3.2. Crecimiento en invernadero

Excepto en el cuarto experimento, cuando las plantas presentaron 5-10 hojas verdaderas (aproximadamente a los 3-4 meses), se pasaron al invernadero en macetas de 17 L con substrato

Horticoco (pH 5.5-6.8, y libre de patógenos y semillas viables), a una temperatura de 20-25 °C y bajo luz natural (fotoperiodo variable). El aporte de agua se realizó mediante riego por goteo, y las plantas fueron entutoradas progresivamente, pero se evitó la poda en aquellas plantas que se sometieron a análisis fisiológicos.

3.4. APLICACIÓN DEL ESTRÉS

3.4.1. Aplicación del estrés salino

En el segundo experimento (con pimiento), la aplicación del estrés salino se llevó a cabo aplicando un riego con 1 L de agua con NaCl a una concentración de 200 mM a la mitad de las plantas de cada tratamiento (plantas micorrizadas y control de riego), cada 3 días y hasta que se vio una afectación notable en las plantas sometidas al estrés (10 días en este caso).

En el cuarto experimento (con pimiento y berenjena), se pretendía aplicar este estrés salino regando periódicamente en la bandeja del semillero con una disolución salina a una concentración de 150 mM, también hasta que se observara una afectación notable en las plantas estresadas.

3.4.2. Aplicación del déficit hídrico

En todos los casos, la aplicación del estrés hídrico se llevó a cabo eliminando el aporte de agua en la mitad de las plantas micorrizadas y la mitad de las controles, hasta que se observaron síntomas evidentes de un estrés por sequía. La eliminación del aporte de agua en el tercer experimento duró 10 días y se realizó quitando la irrigación por goteo y disponiendo las plantas de forma aleatoria, para evitar que algunos tratamientos estuvieran sometidos a una mayor incidencia solar, y por tanto mayor estrés. En el caso del cuarto experimento (en cámara de cultivo) el cese del aporte de agua se realizó dejando de regar manualmente durante un periodo de 21 días.

3.5. EVALUACIÓN DEL GRADO DE MICORRIZACIÓN

3.5.1. Tinción de las raíces

En todos los experimentos, se reservó un número de plantas (3 por tratamiento) para teñir sus raíces y evaluar su porcentaje de colonización. En los experimentos en invernadero, la tinción se realizó en el momento de pasarlas al invernadero, y en el experimento realizado únicamente en la cámara de cultivo (experimento cuarto), la tinción se realizó antes de la aplicación del estrés. Además, también se realizó la tinción de las raíces de las plantas adultas del segundo experimento, una vez finalizado el estrés salino.

Para realizar la tinción, se siguió el método de Phillip y Hayman (Phillips y Hayman, 1970), en el que se utiliza azul tripán, que tiñe la quitina presente en las paredes de los hongos MA sin colorear la raíz (Barrow y Aaltonen, 2004). Tras lavar cuidadosamente las raíces, se seleccionó la parte central, se sumergió en KOH 10% (p/v) y se hirvió durante 20 min en el caso de las raíces de plantas juveniles o 30 minutos en el caso de plantas adultas. Se eliminó el KOH y se lavaron las raíces 3 veces con agua. Se incubaron durante 2 minutos en HCL 0.1N. Tras eliminar el HCL, se les añadió azul tripán al 0.05% en ácido láctico (v/v) y se llevaron a ebullición durante 10 minutos. Finalmente se eliminó el colorante y se conservaron a temperatura ambiente en ácido láctico.

3.5.2. Cálculo del porcentaje de micorrización

Para determinar el porcentaje de micorrización, se utilizó el método de Giovannetti y Mosse (Giovannetti y Mosse, 1980), según el cual las raíces teñidas se depositan de forma aleatoria en una placa Petri de 9 cm de diámetro con líneas formando una cuadrícula. Se observaron en la lupa (Figura 6A) y se cuantificaron las intersecciones entre las líneas de la cuadrícula y las raíces, primero en

horizontal, y luego girando la placa 90° (en vertical), diferenciando si en esa intersección la raíz estaba colonizada o no (Figura 6B). De esta forma, se puede obtener el porcentaje colonizado del total de longitud de las raíces, aplicando la siguiente ecuación (Ecuación 2):

$$\text{Longitud de raíz colonizada (\%MA)} = \frac{\text{Número de intersecciones micorrizadas}}{\text{Número de intersecciones totales}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Además, Giovannetti y Mosse vieron que la precisión de la estimación mejoraba si las muestras se volvían a depositar de forma aleatoria en la placa, y se repetía el proceso varias veces (Giovannetti y Mosse, 1980). Por tanto, en todos los casos, el proceso se repitió 2 veces y se calculó el porcentaje de micorrización como la media de ambos resultados. Es importante que en todos los experimentos la visualización se realice por el mismo observador, y siguiendo un criterio establecido.

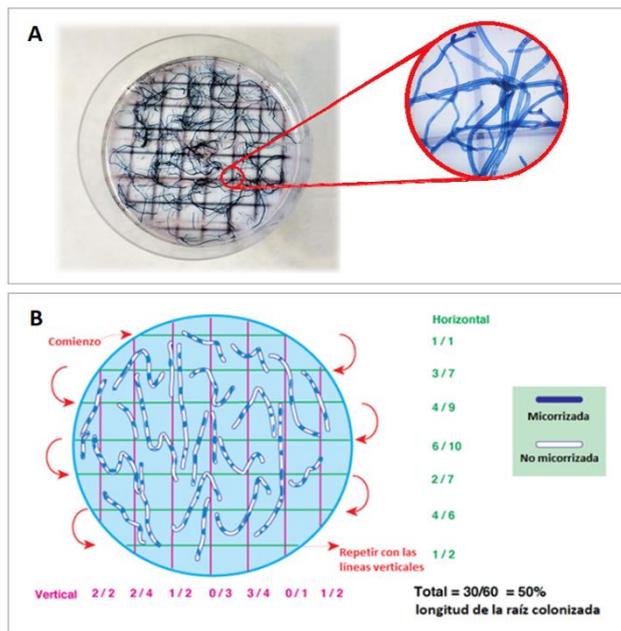


Figura 6. Proceso de determinación del porcentaje de micorrización. (A) Deposición aleatoria en una placa Petri cuadrículada de las raíces teñidas y observación de la micorrización en la lupa, en este caso es muy leve. (B) Explicación esquemática del método de conteo, recuperado de Brundrett et al. (1996).

3.6. DETERMINACIONES FISIOLÓGICAS

3.6.1. Producción de biomasa

En los experimentos cuyas plantas crecieron en invernadero (experimento 1, 2 y 3), inmediatamente antes del paso a invernadero se seleccionaron al azar 3 plantas de cada tratamiento, se lavaron y secaron con papel de filtro, y se separó la raíz de la parte aérea para su pesado. Se obtuvo el peso fresco de raíz y parte aérea en una báscula analítica con resolución de 0.1 mg.

En el caso de los experimentos que se realizaron íntegramente en el estado juvenil de las plantas, este procedimiento se realizó tanto antes de la aplicación del estrés como después del mismo, usando un mínimo de 8 plantas por tratamiento. Además, una vez finalizado el estrés se midió también el peso seco después de 4 días a 65 °C en un horno para determinar el contenido hídrico (Ecuación 3). No se pudo medir aquí el contenido hídrico relativo porque para medir el peso fresco y el peso seco se necesitó sacrificar plantas completas, y no quedaron suficientes para medir el peso turgente.

$$\text{Contenido hídrico (CH)} = \frac{\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}}{\text{Peso fresco}} * 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

En cuanto a la determinación de la producción de biomasa en plantas adultas, en todos los experimentos se llevaron a cabo monitoreos periódicos (aproximadamente cada 4 semanas) midiendo la longitud de las plantas desde el punto del tallo en contacto con el sustrato hasta su punto más

apical, utilizando una cinta métrica flexible. Al mismo tiempo, también se midió el perímetro del tallo de la planta en el punto más cercano al sustrato. Además, en las plantas adultas del tercer experimento, una vez finalizado el estrés, se tomó muestra de hoja para determinar el peso fresco, el peso turgente y el peso seco para calcular el contenido hídrico relativo (Ecuación 4).

$$\text{Contenido hídrico relativo (CHR)} = \frac{\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}}{\text{Peso turgente} - \text{Peso seco}} * 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

3.6.2. Producción de fruto

En los experimentos con plantas adultas se realizó periódicamente, al mismo tiempo en que se realizó el monitoreo de su producción de biomasa, cosechas de todos los frutos producidos con un tamaño superior a 4 cm y teniendo en cuenta tanto el número de frutos como el peso de los mismos.

Posteriormente, se calculó el rendimiento en la producción de frutos de las plantas evaluadas en cada tratamiento como el promedio del peso total de frutos recogidos entre todos los monitoreos en cada una de las plantas (g/planta), y como el promedio del número total de frutos recogidos en cada una de las plantas (n° de frutos/planta).

3.6.3. Observaciones macroscópicas

Durante los monitoreos periódicos llevados a cabo con plantas adultas, en todos los experimentos, también se contó el número aproximado de flores producido por cada planta, y se anotó y fotografió el estado fisiológico aparente de la planta, y otras observaciones que se consideraron pertinentes con el fin de llevar un control de los posibles cambios experimentados. Cuando se aplicó un estrés, ya sea hídrico o salino, también se evaluó de forma macroscópica y periódicamente el estado fisiológico de las plantas, para evitar que el daño causado por el estrés supusiera la muerte de la planta.

3.7. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

3.7.1. Toma de muestras

En el segundo experimento con pimiento bajo condiciones de estrés salino, en el tercero con pimiento y berenjena sometidos a sequía, y en el cuarto, se tomaron muestras de material foliar y de fruto (excepto en el cuarto experimento en cámara de cultivo, ya que se evaluó solamente la etapa juvenil de las plantas) porque se pretendía llevar a cabo análisis bioquímicos y moleculares. En el caso de las muestras foliares, se tomaron en todos los casos varias alícuotas de aproximadamente 1 g, se congelaron inmediatamente en el invernadero (para evitar la generación de un estrés adicional) introduciéndolas en un vaso Dewar con N₂ líquido, y se mantuvieron hasta su análisis a -80 °C. En el caso de las muestras de fruto, el proceso fue análogo excepto la congelación en N₂ líquido que se realizó en el laboratorio tras su cosecha, debido a la mayor estabilidad que presenta el fruto.

3.7.2. Daño oxidativo a lípidos

Esta evaluación se llevó a cabo según el protocolo de Minotti y Aust (1987), cuantificando espectrofotométricamente el complejo formado entre el ácido tiobarbitúrico (TBA) y el malondialdehído (MDA) que deriva de la degradación de los lípidos debido a su peroxidación, siguiendo el procedimiento descrito en el Anexo I.

3.7.3. Peróxido de hidrógeno

Para la cuantificación del H₂O₂, se utilizó el método de Patterson et al. (1984) con algunas modificaciones, siguiendo el proceso descrito en el Anexo I.

3.7.4. Prolina y azúcares totales

Se llevó a cabo la extracción de la prolina y los azúcares totales a partir de muestras de 1 gramo previamente recogidas, utilizando el método de Bligh y Dyer (1959), como se describe en el Anexo I. Para la cuantificación de la prolina, se llevó a cabo la reacción de la ninhidrina (Bates et al., 1973), y para la cuantificación de los azúcares solubles, se siguió el método de Irigoyen et al. (1992). Ambos procesos aparecen detallados en el Anexo I.

3.7.5. Contenido de pigmentos

Para evaluar el contenido en pigmentos fotosintéticos, se prepararon los extractos machacando 100 mg de las muestras en un mortero previamente enfriado sumergido en hielo con 10 mL de etanol al 95% (v/v). El homogeneizado fue centrifugado a 3 165 x g durante 10 minutos a 4 °C. Después, se recuperó una alícuota de 1 mL del sobrenadante, se le añadió 4 mL de etanol al 95%, y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 750 (A750), 665 (A665), 649 (A649) y 470 nm (A470). Las cantidades de clorofila a (Chla), la b (Chlb), la total (Chla+b), y los carotenoides (Cx), se determinaron siguiendo el método de Lichtenthaler (1987), según las Ecuaciones 5-8.

$$Chla = 13.36 * A665 - 5.19 * A649 \quad \text{Ecuación 5}$$

$$Chlb = 27.43 * A649 - 8.12 * A665 \quad \text{Ecuación 6}$$

$$Chla + b = 5.24 * A664 + 22.24 * A649 \quad \text{Ecuación 7}$$

$$Cx = \frac{(1.000 * A470 - 2.13 * Chla - 97.46 * Chlb)}{198} \quad \text{Ecuación 8}$$

3.8. DETERMINACIONES MOLECULARES

3.8.1. Aislamiento del ARN

Se aisló el ARN total de las muestras previamente congeladas a -80 °C utilizando el método de Kay et al. (1987), que básicamente consiste en la extracción con fenol/cloroformo seguido de precipitación con LiCl. El ARN obtenido en el paso anterior se sometió a un tratamiento con ADNasa utilizando un kit QuantiTect (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.8.2. Síntesis del ADNc

El ADNc se sintetizó utilizando un kit Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando para ello 2.5 mg del ARN anteriormente purificado. Con el fin de descartar la posible contaminación con ADN genómico, todas las muestras de ADNc se verificaron mediante reacciones PCR con alícuotas del mismo ARN tratadas con ADNasa pero a las que no se les realizó la transcripción reversa (Quiroga et al., 2017).

3.8.3. PCR cuantitativa con transcripción reversa (RT-PCRq)

Tras hacer una búsqueda en la bibliografía y en las bases de datos, se seleccionaron 3 genes de interés para cada uno de los cultivos con el objetivo de analizar su expresión mediante RT-PCRq utilizando un equipo Roche LightCycler[®]480 Real-Time PCR (Roche, Indianápolis, Indiana, EE. UU.). Los genes seleccionados fueron *CaHsp25.9*, *CaAQP5*, *CaAQP12* para el pimiento, y *SmelCMT3*, *SmelDemethylase4* y *SmelCAT* para berenjena. El proceso de este análisis se detalla en el Anexo I.

3.9. DETERMINACIONES CON RELACIÓN A LA RESPUESTA ANDROGÉNICA

3.9.1. Recuento de la viabilidad de microsporas

Para medir la viabilidad de las microsporas, en todos los experimentos se utilizó diacetato de fluoresceína (FDA), un colorante vital que, cuando penetra en las células, es hidrolizado por hidrolasas que se encuentran ligadas a la membrana (Stubberfield y Shaw, 1990) y por esterases citoplasmáticas (Steward et al., 1999) quedando la fluoresceína libre, la cual emite fluorescencia verde a 510 nm cuando se ilumina con luz azul de 493 nm. Por tanto, solo se detectará esta fluorescencia en las microsporas viables, cuando se observen bajo el microscopio de fluorescencia. Para realizar la tinción, se seleccionaron yemas en su estadio adecuado de al menos dos plantas de cada tratamiento a evaluar, se extrajeron las anteras, y se colocaron dos o tres anteras (dos en el caso de berenjena y tres en el caso de pimiento) sobre un portaobjetos y se machacaron utilizando la punta de un bisturí. Posteriormente, se eliminó el tejido de la pared de la antera con cuidado. A continuación, se añadió una gota de agua sobre la muestra, y posteriormente 5 µL de FDA previamente preparado y mantenido en el congelador. Para preparar la solución de FDA, se partió de una solución comercial de FDA al 0.2% en acetona y se realizó una dilución 1/100 en agua destilada. Después, se colocó un cubreobjetos y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Por último, se visualizaron las muestras en el microscopio de fluorescencia invertido, equipado con la combinación de filtros de 480/520 nm.

El cálculo se realizó repitiendo este proceso dos veces para cada análisis, y contando dos campos distintos en cada una de las réplicas que tuvieran un número aproximado a 100 microsporas. De esta forma, el porcentaje de microsporas viables se calculó según la Ecuación 9:

$$\text{Viabilidad de microsporas (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ microsporas viables en los 4 campos}}{\text{N}^\circ \text{ microsporas totales en los 4 campos}} \quad \text{Ecuación 9}$$

3.9.2. Cultivo de anteras y microsporas aisladas

3.9.2.1. Medios de cultivo

Para el cultivo *in vitro* de anteras de pimiento y berenjena se necesitaron dos medios sólidos en ambos casos: un medio de inducción y un medio de regeneración (Tabla 1). Para su preparación, se utilizó una botella de vidrio de 0.5 L en la que se introdujeron el preparado C, la sacarosa y el bacto-agar. A continuación, se enrasó hasta los 0.5 L, se ajustó su pH a 5.9 y se esterilizó en el autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Después, una vez el medio se enfrió, pero sin llegar a solidificar, se añadieron las cantidades adecuadas de los compuestos termosensibles (que aparecen en verde en la Tabla 1) previamente esterilizados por filtración. Por último, tras su homogeneización, el medio se plaqueó en placas de 9 cm de diámetro en condiciones de esterilidad en la cabina de flujo. En todos los casos, los medios de cultivo se prepararon progresivamente a medida que se necesitaron, para garantizar que estuvieran frescos.

Tabla 1. Componentes de los medios de inducción y regeneración para el cultivo de anteras en pimiento y berenjena. En verde aparecen aquellos componentes que son termosensibles.

COMPONENTES	MEDIO DE INDUCCIÓN		MEDIO DE REGENERACIÓN	
	PIMIENTO	BERENJENA	PIMIENTO	BERENJENA
Preparado C	4.24 g/L	4.55 g/L	4.24 g/L	4.55 g/L
Sacarosa	3.00%	12.00%	3.00%	3.00%
Bacto-agar	0.80%	0.80%	0.80%	0.80%
Kinetina	0.01 mg/L	5.00 mg/L	0.10 mg/L	0.10 mg/L
2,4-D	0.01 mg/L	5.00 mg/L	-	-
Vitamina B12	0.03 mg/L	0.20 mg/L	-	-
Cefotaxima	100.00 mg/L	-	100.00 mg/L	-

En el caso del cultivo *in vitro* de microsporas aisladas de berenjena, se necesitó un medio cuya composición aparece en la Tabla 2. En este caso, los componentes se añadieron en una botella de vidrio de 0.25 L, se ajustó su pH a 5.9 y posteriormente se realizó su esterilización mediante filtrado, utilizando filtros de jeringa Whatman de 0.22 μm de tamaño de poro.

Tabla 2. Componentes del medio de cultivo de microsporas aisladas de berenjena.

COMPONENTES	CANTIDADES
Vitaminas NLN	1.04 g/L
Sales NLN	0.39 g/L
Sacarosa	20.00 g/L
Ácido 1-naftalenacético (NAA)	0.50 mg/L
6-Benciladenina (6-BA)	0.50 mg/L

3.9.2.2. Procedimiento de cultivo de anteras

El procedimiento del cultivo de anteras fue análogo tanto en berenjena como en pimiento. Así, en primer lugar, se seleccionaron de las plantas aquellas yemas con el tamaño adecuado (Figura 7A), que en el caso de pimiento son las que tienen los pétalos cubiertos un 80% por los sépalos (Parra-Vega et al., 2013) y en el caso de la berenjena las que tienen los pétalos completamente cubiertos por los sépalos (Calabuig-Serna et al., 2020), y se llevaron al laboratorio en tubos Falcon de 50 mL mantenidos en hielo. Después, en cabina de flujo laminar se procedió a la esterilización de las yemas (Figura 7B), donde todas las soluciones empleadas se enfriaron previamente a 4 °C. A partir de este momento todos los pasos se realizaron en condiciones de esterilidad. De esta forma, las yemas se sumergieron en etanol al 70% durante 30 segundos, retirando esta solución y añadiendo hipoclorito de sodio a una concentración de 4 g/L con unas gotas de Tween 20 durante 5 minutos, y realizando posteriormente 3 lavados de 4 minutos con agua destilada estéril. A continuación, se colocaron las yemas sobre papel de filtro estéril para extraer las anteras. Para ello, se cortó la parte basal con un bisturí, después se realizó un corte longitudinal que corte la corola y el cáliz sin dañar las anteras, y luego se extrajeron las anteras (Figura 7C). En el caso del pimiento, se descartaron aquellas anteras que poseían una coloración antociánica (porque están en un estadio más avanzado del desarrollo), y en el caso de la berenjena, se extrajo una antera de cada yema y se midió con un pie de rey, seleccionando sólo aquellas anteras que tuvieron un tamaño que oscilaba entre 5.3 y 5.9 mm (Figura 7D), debido a que este es el tamaño óptimo para el genotipo DH36, previamente determinado por ser el tamaño en el que contiene un mayor porcentaje de microsporas vacuoladas y polen bicelular joven, estadios más adecuados para la inducción androgénica (Seguí-Simarro y Nuez, 2008; Seguí-Simarro, 2010b). De esta forma, en berenjena, cuando la antera tenía el tamaño correcto, se descartó y se utilizaron las demás que contenía esa yema. Posteriormente, con las anteras seleccionadas, se retiró el filamento lo máximo posible y se depositaron en el medio de inducción previamente preparado, colocando la parte cóncava de la antera (la interna) en contacto con el medio de cultivo, y disponiendo unas 20 anteras por placa de forma ordenada (Figura 7E). Tras sellar las placas con Parafilm, se envolvieron con papel de aluminio y se mantuvieron en oscuridad a 35 °C durante 8 días para que tuviera lugar la inducción. En el día 8, se descubrieron las placas y se incubaron en una cámara Fitotrón a 25 °C con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad durante 4 días. Pasados los 4 días (día 12), se llevaron estas anteras de nuevo a la cabina de flujo laminar y se transfirieron al medio de regeneración previamente preparado, manteniendo condiciones de esterilidad. Tras sellar las placas con Parafilm, se volvieron a llevar a la cámara Fitotrón bajo las mismas condiciones especificadas anteriormente, hasta que evaluó su respuesta.

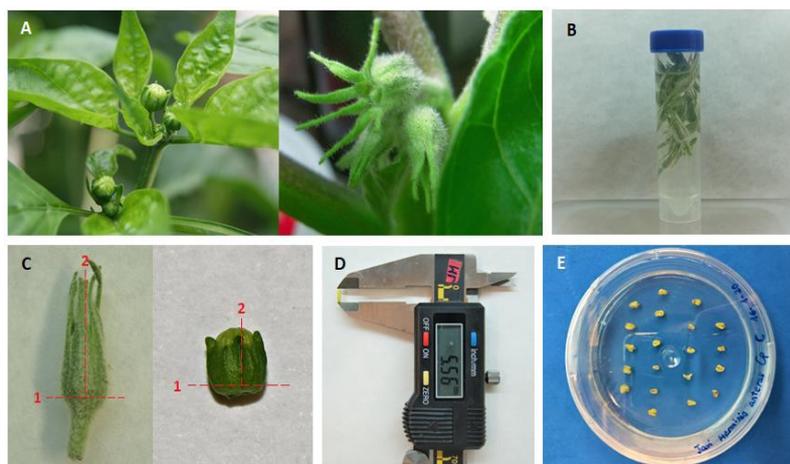


Figura 7. Proceso de cultivo de anteras en pimienta o berenjena. (A) Yemas de pimienta (izquierda) y berenjena (derecha) en la planta. (B) Desinfección de las yemas de berenjena, en el caso de pimienta el proceso es idéntico. (C) Extracción de anteras en berenjena (izquierda) y pimienta (derecha). (D) Medida de anteras de berenjena con pie de rey. (E) Disposición en placa de anteras de pimienta, en el caso de berenjena el proceso es análogo.

3.9.2.3. Procedimiento de cultivo de microsporas aisladas

En primer lugar, se recogieron manualmente las yemas de berenjena con el mismo tamaño y siguiendo los mismos pasos que se describe en el apartado “Cultivo de anteras” (Figura 8A). Una vez en el laboratorio, se extrajeron las anteras de forma análoga a la descrita en el apartado anterior (Figura 8B) y seleccionando las que tuvieran el tamaño adecuado de 5.3-5.9 mm (Figura 8C). A partir de este paso ya todas las etapas se realizaron en condiciones de esterilidad. Así, las anteras se desinfectaron por inmersión en etanol al 70% durante 30 segundos, seguida de inmersión en hipoclorito sódico con unas gotas de Tween 20 durante 5 minutos, y 3 lavados con agua destilada estéril durante 2 minutos cada uno. Todas las soluciones se enfriaron previamente a 4 °C, y la inmersión se realizó introduciendo las anteras en unas pinzas de té (Figura 8D). Después, las anteras se pasaron a un vaso de precipitado de 50 mL con 2-3 mL de agua destilada estéril y se machacaron con el émbolo de una jeringuilla de 50 mL liberando así las microsporas de las anteras. Una vez machacadas, el contenido del vaso se pasó a través de un filtro de nylon con poro de 41 μm de diámetro (ya que las microsporas tienen un tamaño aproximado de 20 μm en los estadios adecuados), y recogiendo el filtrado en un matraz de vidrio estéril. Este filtrado se volvió a pasar a través de un filtro de 11 μm (Figura 8E), quedando así las microsporas retenidas en el filtro, y eliminando el resto de pared de la antera. Este filtro se lavó en un vaso de precipitado, y se trasvasó el contenido en varios tubos Falcon estériles de 15 mL (Figura 8F), en función de la cantidad recogida. Esta suspensión celular se centrifugó durante 5 minutos a 131 x g y 4 °C en una centrífuga refrigerada Eppendorf 5804 R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), y se eliminó el sobrenadante. Después, se recogió el *pellet* de todos los tubos en uno solo, con 13 mL de agua destilada estéril. Este paso se repitió dos veces más, para limpiar las microsporas del resto de tejidos de forma más eficiente. Tras esto, el *pellet* se recogió en 5 mL de agua destilada estéril y se midió la concentración de microsporas en una cámara de Neubauer (Figura 8G). Con estos datos, las microsporas contenidas previamente en 5 mL se diluyeron hasta alcanzar una concentración de 500 000 microsporas/mL. Por último, esta suspensión celular se depositó en placas de 6 cm de diámetro, añadiendo 6 mL a cada placa, sellándolas con Parafilm, e incubándolas en oscuridad durante 3 días a 35 °C (Figura 8H). Pasados los 3 días, se recogió la suspensión celular de las placas en tubos Falcon estériles de 15 mL y se volvieron a centrifugar durante 5 minutos a 131 x g y 4 °C, eliminando el sobrenadante y recuperando el *pellet* en el mismo volumen de medio con sacarosa al 13% (v/v), previamente esterilizado utilizando un filtro de 0.22 μm de tamaño de poro. Esta suspensión se devolvió a las placas Petri, se sellaron de nuevo con Parafilm, y se incubaron en oscuridad a 25 °C durante al menos 30 días.

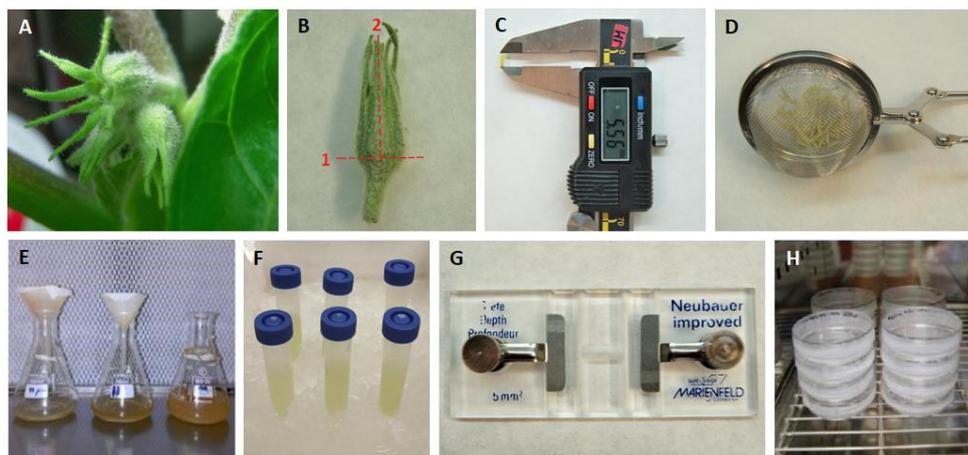


Figura 8. Algunos pasos del proceso de cultivo de microsporas aisladas de berenjena. (A) Yemas en la planta. (B) Extracción de anteras. (C) Selección de las anteras con el tamaño adecuado mediante medida con pie de rey. (D) Anteras en pinzas de té justo antes de su desinfección. (E) Filtrado de microsporas con filtro de 11 µm. (F) Filtrado recuperado en tubos Falcon. (G) Cámara de Neubauer. (H) Placas Petri durante la primera incubación de 3 días en oscuridad a 35 °C.

3.9.3. Recuento del porcentaje de respuesta androgénica

Una vez que los cultivos de anteras estuvieron al menos dos meses en la cámara Fitotrón, se consideró que ya se podía evaluar su respuesta androgénica. Así, esta respuesta se cuantificó contando, en cada tratamiento de cada experimento, el número de anteras que habían mostrado una respuesta en forma de generación de un callo androgénico, y el número de anteras cultivadas totales, obteniendo así un porcentaje de respuesta androgénica o callogénesis (Ecuación 10).

$$\text{Respuesta androgénica (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de anteras que han sufrido callogénesis}}{\text{N}^\circ \text{ de anteras totales cultivadas}} \quad \text{Ecuación 10}$$

En el caso de los cultivos de microsporas, la respuesta androgénica se comprobó pasados unos días desde la realización del cultivo, para evaluar si se habían producido las primeras divisiones celulares en estas microsporas hacia el desarrollo de embriones.

3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó utilizando el software IBM SPSS Statistics 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.). Todos los datos en los que únicamente se comparaban dos muestras independientes (plantas micorrizadas y controles) fueron sometidos a una prueba t-Student, con un nivel de significación $p < 0.05$. Para ello, previamente se comprobó que las muestras siguieran una distribución normal realizando la prueba de Shapiro-Wilk, y que fueran homogéneas en sus varianzas (homocedásticas) realizando la prueba de Levene. Cuando las varianzas eran distintas, se empleó una prueba t-Student modificada (aproximación de Welch).

En los casos en los que se compararon tres o más grupos, los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) con la inoculación (micorrizada o control) y el estrés aplicado (estrés salino y control, o sequía y control) como fuentes de variación. En el caso de los monitoreos de altura y diámetro del tallo de plantas adultas, las fuentes de variación fueron tanto la inoculación como el tiempo en que se realizó el monitoreo. Para estimar el efecto del estrés salino en la viabilidad de microsporas, se tomaron como fuentes de variación tanto la inoculación, como el estrés salino y el tiempo transcurrido tras la aplicación del estrés. En todos los casos, cuando se detectaron diferencias significativas, se calculó estas diferencias utilizando la prueba de rangos múltiples de Duncan con un nivel de significación $p < 0.05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PORCENTAJE DE COLONIZACIÓN MICORRÍCICA

Tras cuantificar la colonización micorrícica durante el estadio juvenil de las plantas en todos los experimentos realizados, se comprobó que no existió ningún grado de micorrización en plantas controles en ningún caso, y además se vio que esta colonización fue bastante débil en todas las plantas previamente inoculadas (Tabla 3). Este hecho indica que para observarse mayores efectos y diferencias significativas entre plantas micorrizadas y controles, se deberían haber dejado las plantas más tiempo para dar lugar a una colonización mejor establecida. Sin embargo, a pesar de que el grado de micorrización fue bajo, sí que fue suficiente para comprobar el éxito de la inoculación en todos los casos, y la formación de estructuras características de la simbiosis MA (Figura 9).

Tabla 3. Porcentaje de colonización micorrícica de las plantas previamente inoculadas en los distintos experimentos realizados.

Experimento	Cultivo	Micorrización	Unidad	Días aproximados desde la siembra hasta la medición
Experimento 1	Berenjena	6.96 ± 1.25	%	81
Experimento 2	Pimiento	16.07 ± 1.04	%	127
Experimento 3	Berenjena	6.73 ± 0.89	%	87
Experimento 3	Pimiento	10.11 ± 1.01	%	87
Experimento 4	Berenjena	5.54 ± 0.20	%	68
Experimento 4	Pimiento	8.75 ± 0.80	%	68

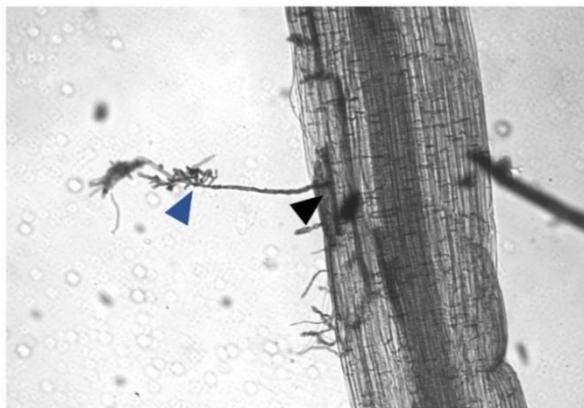


Figura 9. Formación de algunas estructuras características de la simbiosis micorrícico-arbuscular, en este caso en el primer experimento con berenjena. La punta de flecha azul señala el micelio fúngico, y la punta de flecha negra señala un apresorio.

No es posible comparar estadísticamente los niveles de colonización entre experimentos y cultivos, ya que esta cuantificación se llevó a cabo en momentos distintos, la inoculación fue muy similar pero no idéntica en todos los casos (se hizo aportando un volumen aproximado de inóculo de 2 cucharas-espátula de laboratorio), y además no pasó el mismo tiempo desde la siembra hasta la medición en todos los casos, pues esta última se realizó cuando se observó un tamaño adecuado de la planta para su paso a invernadero o para la aplicación del estrés en el cuarto experimento. Sin embargo, sí que puede advertirse que el nivel de colonización micorrícica es, a pesar de ser bajo en ambos cultivos, mayor en pimiento que en berenjena, pues se observa que en el tercer experimento esta colonización es más de un 3% superior en pimiento que en berenjena habiendo pasado el mismo tiempo desde su siembra hasta su medición, y lo mismo ocurre en el cuarto experimento (Tabla 3). Estos datos afirmarían los resultados ya previamente publicados que indican que el grado de infección micorrícica es dependiente del cultivar y la especie colonizada (Habte y Manjunath, 1991; Hetrick et

al., 1992), e incluso del genotipo dentro de la especie (Graham y Eissenstat, 1994). Sin embargo, sería interesante plantear un experimento donde se evalúe la micorrización en todos los cultivares al mismo tiempo y bajo cantidades exactamente iguales de inoculación.

Por otro lado, también se evaluó visualmente la influencia del estrés salino en el grado de infección fúngica de la raíz, observando a nivel macroscópico los beneficios de esta colonización en las plantas sometidas a un riego óptimo, pero también en aquellas sometidas a estrés salino, con una densidad radicular muy superior a las no inoculadas (Figura 10). En cuanto a su porcentaje de colonización micorrícica, este no ha podido ser determinado en el momento de la redacción de este manuscrito, quedando estas raíces teñidas y reservadas para su utilización en futuras publicaciones.



Figura 10. Desarrollo radicular de pimiento en estadio adulto sometido a estrés salino. Izquierda: Pimiento no inoculado (control). Derecha: Pimiento inoculado con el hongo micorrícico-arbuscular.

Con este resultado, y teniendo en cuenta experimentos previos, como el publicado por Pringle y Bever (2008) en el que se utilizaron en los campos de Carolina del Norte distintos cultivares previamente inoculados con hongos MA y se demostró que los beneficios y características obtenidas en cultivos en invernadero se mantienen el cultivo en campo, parece lógico pensar que los beneficios del cultivo en campo podrían ser incluso superiores a los obtenidos en el laboratorio, ya que en el caso del cultivo en campo este gran desarrollo radicular podría servir para captar un mayor volumen de agua y nutrientes, mientras que en volumen reducido de la maceta esta captación será más similar entre las plantas inoculadas y en las controles.

4.2. EFECTO DE LA MICORRIZACIÓN Y EL ESTRÉS ABIÓTICO EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN PLANTAS JUVENILES

4.2.1. Condiciones óptimas de riego

El peso fresco de las plantas juveniles sometidas a unas condiciones de riego óptimas, antes de su traslado al invernadero, fue superior en las plantas previamente inoculadas con *Rhizophagus irregularis* que en las plantas controles, observándose que las plantas inoculadas presentaban un peso fresco de la parte aérea superior al de las no inoculadas en todos los casos, al igual que ocurrió con el peso de la raíz y la planta completa (Figura 11). A pesar de esto, en el primer experimento con berenjena ninguna de estas diferencias resultó ser estadísticamente significativa (Figura 11A). En cambio, estas diferencias sí fueron significativas cuando se evaluó la parte aérea y la planta completa en el segundo experimento con pimiento (Figura 11B).

Atendiendo al tercer experimento, algunas de estas diferencias también resultaron significativas, pero en este caso las diferencias aparecieron cuando se evaluó la raíz y también cuando se evaluó la planta completa, tanto en berenjena (Figura 11C) como en pimiento (Figura 11D).

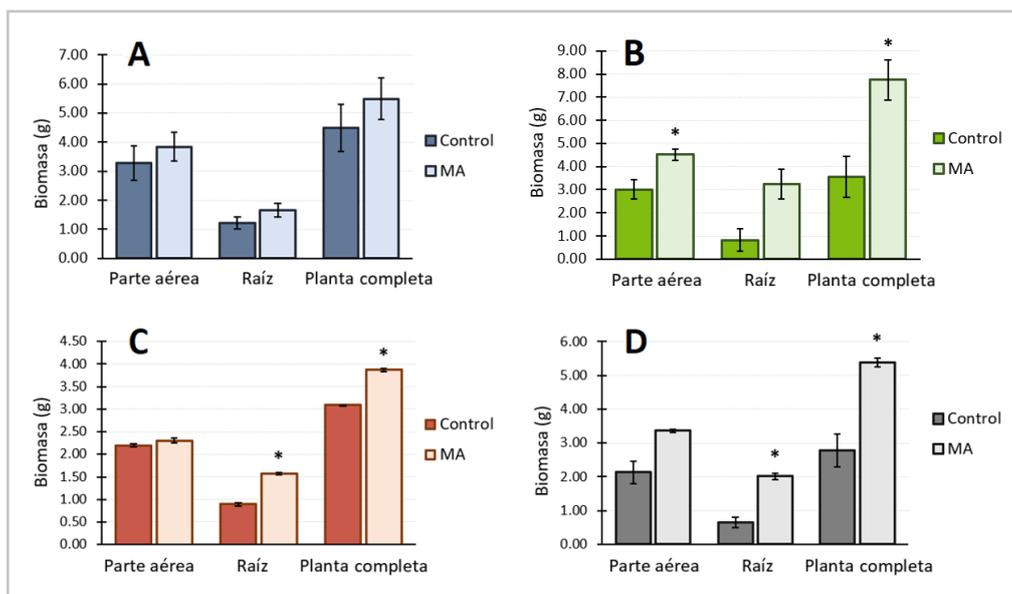


Figura 11. Influencia de la inoculación con hongos micorrízico-arbusculares (MA) o la no inoculación (control) en la producción de biomasa de distintos órganos (parte aérea y raíz), así como de la planta completa, en plantas juveniles. (A) Primer experimento, berenjena. (B) Segundo experimento, pimienta. (C) Tercer experimento, berenjena. (D) Tercer experimento, pimienta. Las barras representan la media de las distintas replicas con su desviación estándar (\pm DE). Dentro de cada órgano evaluado (o la planta completa), las barras que presentan un asterisco representan una diferencia estadísticamente significativa de acuerdo con la prueba de t-Student ($p < 0.05$).

Respecto al cuarto experimento, que se realizó íntegramente en el estado juvenil de las plantas (Figura 12), el peso fresco en el momento previo a la aplicación del estrés abiótico (estrés hídrico en este caso) resultó ligeramente más elevado en las plantas de berenjena previamente inoculadas con el hongo MA en todos los órganos vegetales estudiados (Figura 12A), aunque estas diferencias únicamente resultaron significativas cuando se estudió la parte aérea. Por el contrario, este mayor peso fresco de las plantas previamente inoculadas no apareció en el caso de pimienta, donde más bien se vio que las plantas controles tenían un peso ligeramente superior a las inoculadas, pero sin resultar estas diferencias significativas en ningún caso (Figura 12B).

Como en este cuarto experimento también se evaluó la longitud de las plantas además de su peso fresco, se comprobó que la superioridad en el peso fresco de las distintas plantas de berenjena también se correspondió en una superioridad en su altura, aunque en este caso fueron las diferencias en la longitud de la raíz y de la planta completa las que resultaron significativas (Figura 12C). Además, a pesar de que en pimienta el peso fresco fue ligeramente superior en las plantas no inoculadas, no ocurrió lo mismo con su longitud, presentando las plantas previamente inoculadas una longitud ligeramente superior a las plantas controles tanto en la parte aérea como en la raíz, y por tanto también en la planta completa, pero sin aparecer diferencias relevantes en ningún caso (Figura 12D).

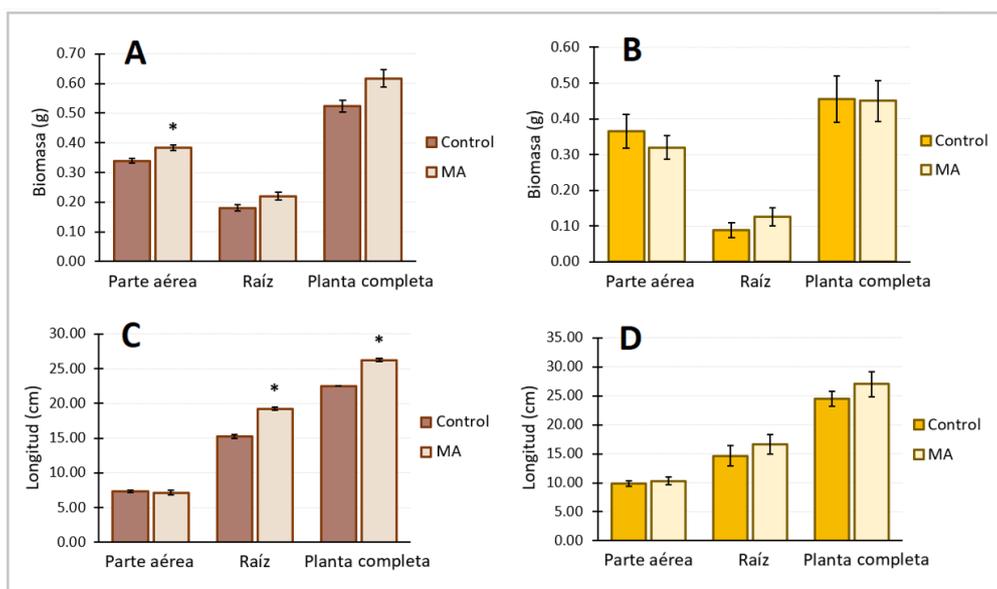


Figura 12. Influencia de la inoculación con hongos micorrízico-arbusculares (MA) o la no inoculación (control) en la producción de biomasa y la longitud de distintos órganos (parte aérea y raíz), así como de la planta completa, en plantas juveniles, previa a la aplicación de un estrés hídrico. (A) Evaluación de la producción de biomasa en el cuarto experimento, berenjena. (B) Evaluación de la producción de biomasa en el cuarto experimento, pimienta. (C) Evaluación de la longitud en el cuarto experimento, berenjena. (D) Evaluación de la longitud en el cuarto experimento, pimienta. Las barras representan la media de las distintas replicas con su desviación estándar (\pm DE). Dentro de cada órgano evaluado (o la planta completa), las barras que presentan un asterisco representan una diferencia estadísticamente significativa de acuerdo con la prueba de t-Student ($p < 0.05$).

Por tanto, en general se pudo observar cómo las plantas colonizadas con este genotipo concreto de hongo MA, en ambos cultivos de interés agronómico ensayados, presentaron un peso fresco superior a las plantas no inoculadas, aunque este incremento no resultó ser significativo en todos los experimentos. Estos resultados coinciden con otras investigaciones previas que ya habían demostrado un mayor incremento de peso en plantas juveniles tanto en pimienta (Ikiz et al., 2008; Sensoy et al., 2007; Al Raddad, 1987) como en berenjena (Al Raddad, 1987) inoculados con hongos MA. Además, siguiendo las conclusiones planteadas en el artículo de Ikiz et al. (2008) en el que se afirma que un mayor porcentaje de micorrización en general conduce a un mayor peso de las plantas colonizadas, este planteamiento también se observa en general aquí, pues se aprecia que las diferencias obtenidas son en general menores en el cuarto experimento, que como se comentó previamente era el que menor porcentaje de colonización micorrízica presentó. Debido a esto, parece lógico pensar que, para poder observar unas diferencias más significativas entre ambos tratamientos, se debería haber dejado las plantas más tiempo para que hubiesen alcanzado una colonización más prominente.

Por otro lado, también se extrae de estos resultados la evidencia de que, a pesar de que la micorrización en general aporta beneficios en la producción de biomasa de las plantas colonizadas, es difícil establecer con seguridad en qué se van a reflejar esos beneficios, pues tanto en pimienta como en berenjena en unos casos resultaron significativas las diferencias en el peso de la parte aérea, y en otros casos ocurrió esto con el peso de la raíz.

4.2.2. Condiciones de estrés hídrico

Tras el paso de las plantas de pimienta del segundo experimento al invernadero, una parte de ellas se descartó porque que se sembraron en exceso, y se dejaron en estas instalaciones (sin ningún cuidado ni aporte de agua) durante un periodo de dos semanas para su posterior eliminación. Sin embargo, en ese momento se observó que las plantas no inoculadas (Figura 13A) presentaban un estado fisiológico mucho más deteriorado que las plantas infectadas (Figura 13B), ya que, aunque

ambas presentaban un nivel de clorosis similar, las plantas no inoculadas presentaban una escisión foliar muy superior y un cierto grado de encamamiento. Esto hizo pensar que los beneficios aportados por la simbiosis MA fueran superiores bajo condiciones de estrés, lo que alentó al planteamiento de los experimentos posteriores.



Figura 13. Estado fisiológico de las plantas sobrantes del segundo experimento tras su paso al invernadero, privadas de agua durante aproximadamente dos semanas. (A) Plantas no inoculadas (control). (B) Plantas inoculadas con el hongo MA.

De esta forma, tras la aplicación en el cuarto experimento de un estrés hídrico durante 21 días a plantas juveniles crecidas en cámara de cultivo, tanto de berenjena como de pimiento, se pudo comprobar que en berenjena, como era de esperar, existió un marcado efecto negativo del estrés hídrico sobre la producción de biomasa de las plantas, en todas sus partes evaluadas. En cuanto a la inoculación con el hongo MA, esta no resultó significativa estadísticamente en berenjena en ningún caso con independencia del tipo de riego (Figura 14A).

Sin embargo, al analizar las plantas de pimiento se comprobó que la sequía, al igual que en el caso anterior, produjo una ligera disminución del peso fresco en plantas no inoculadas en todos los casos, aunque sin diferencias significativas, pero en las plantas previamente inoculadas se observó un aumento de biomasa en condiciones de sequía respecto a las condiciones de riego óptimo. Además, este aumento de la biomasa resultó significativo cuando se evaluó la parte aérea. Si analizamos el efecto de la inoculación con el hongo MA, se observó cómo en condiciones de riego óptimo el peso fresco fue ligeramente superior en las plantas no inoculadas en todos los casos, pero, por el contrario, en condiciones de sequía el peso fresco fue ligeramente superior en las plantas micorrizadas en todos los casos, apareciendo aquí diferencias significativas cuando se analizó la parte aérea (Figura 14B).

Siguiendo con lo anterior, la evaluación del peso seco de estas plantas proporcionó resultados más relevantes. Así, en el caso de berenjena se pudo observar cómo el estrés también causó diferencias significativas en todas las partes de la planta evaluadas, mostrando todas las plantas estresadas un peso significativamente menor que las sometidas a riego óptimo, independientemente de su inoculación. Además, también la inoculación causó diferencias significativas en el caso de la raíz, de manera que las plantas micorrizadas mostraron un mayor peso seco, lo que indica que perdieron menor cantidad de agua respecto a sus controles sin micorrizar y, por tanto, su estatus hídrico fue mejor (Figura 14C).

Por otra parte, en el caso de pimiento, la evaluación del peso seco mostró resultados más significativos. La sequía, como cabía esperar, produjo una disminución en el peso seco en las plantas no inoculadas en todos los casos, siendo significativo en la parte aérea y a nivel de toda la planta. Sin embargo, la micorrización produjo un efecto contrario, es decir, favoreció el peso seco de las plantas en condiciones de estrés de forma significativa en la parte aérea y la planta completa. En conjunto, estos resultados demuestran que mientras que las plantas de berenjena mostraron en condiciones de sequía mejor estatus hídrico en la raíz, las de pimiento lo mostraron a nivel de la parte aérea (Figura 14D).

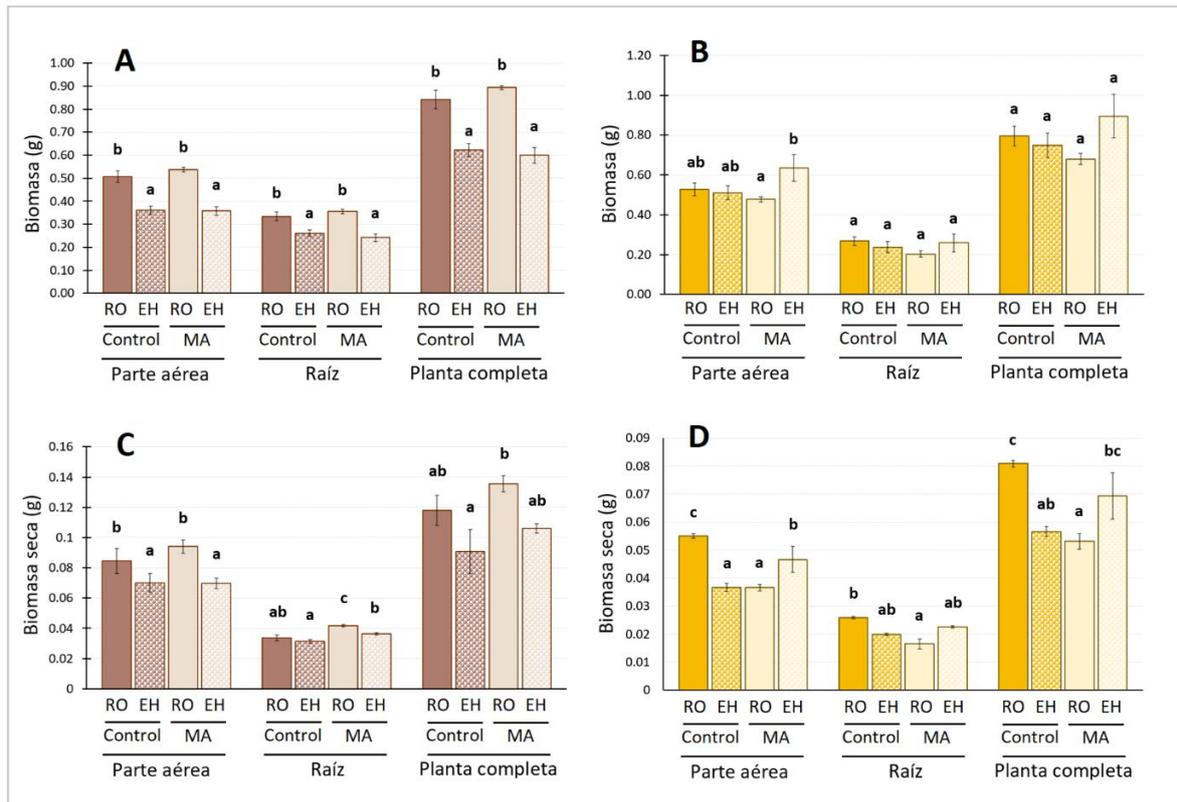


Figura 14. Influencia del estrés hídrico y la inoculación con hongos micorrízico-arbusculares en la producción de biomasa de distintos órganos (parte aérea y raíz), así como de la planta completa, en plantas juveniles. (A) Peso fresco del cuarto experimento, berenjena. (B) Peso fresco del cuarto experimento, pimienta. (C) Peso seco del cuarto experimento, berenjena. (D) Peso seco del cuarto experimento, pimienta. Las barras representan la media de las distintas replicas con su desviación estándar (\pm DE). Dentro de cada órgano evaluado (o la planta completa), las barras con letras distintas son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de rangos múltiples de Duncan ($p < 0.05$). EH: Estrés hídrico; RO: Riego óptimo; MA: plantas micorrizadas; Control: plantas no micorrizadas.

Junto con los resultados anteriores, también se obtuvo la longitud de las mismas plantas cuyo peso fue evaluado previamente. Los resultados aquí fueron muy similares en berenjena a los obtenidos al medir su peso seco, mostrando que la aplicación del estrés produjo un menor crecimiento en longitud en las plantas estresadas respecto a las regadas de forma óptima, siendo estas diferencias más relevantes en el caso de la parte aérea. Además, la inoculación con el hongo MA resultó significativa en la longitud de la raíz y de la planta completa, presentando en estos casos las plantas colonizadas un significativo mayor tamaño tanto en condiciones de sequía como en condiciones de riego óptimo (Figura 15A).

Sin embargo, en pimienta las diferencias encontradas se asemejaron más aquí a cuando se evaluó su peso fresco, de forma que el efecto negativo del estrés sobre la longitud se mostró levemente en las plantas controles, pero ocurrió lo contrario en las plantas micorrizadas, y además el efecto positivo de la micorrización se observó de forma tenue y sin relevancias estadísticas tanto en condiciones de riego óptimo como en condiciones de sequía, siendo este efecto levemente superior en estas últimas condiciones (Figura 15B).

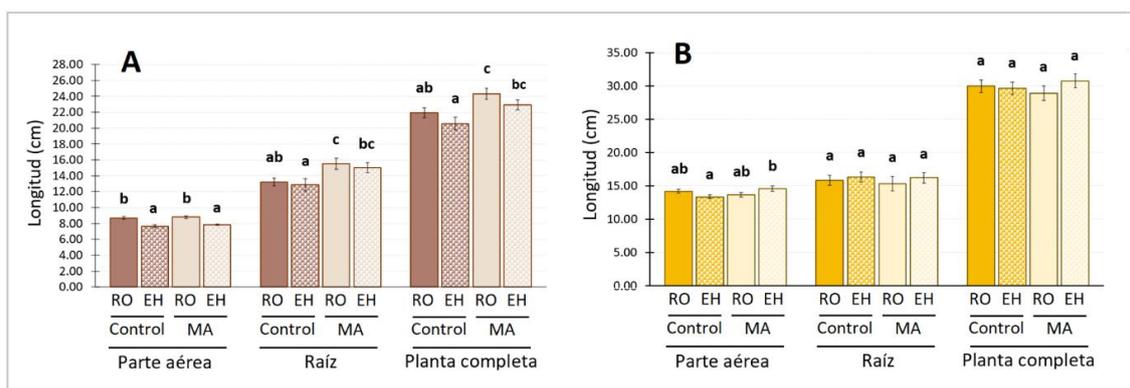


Figura 15. Influencia del estrés hídrico y la inoculación con hongos micorrízico-arbusculares en la longitud de distintos órganos (parte aérea y raíz), así como de la planta completa, en plantas juveniles. (A) Cuarto experimento, berenjena. (B) Cuarto experimento, pimiento. Las barras representan la media de las distintas replicas con su desviación estándar (\pm DE). Dentro de cada órgano evaluado (o la planta completa), las barras con letras distintas son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de rangos múltiples de Duncan ($p < 0.05$). EH: Estrés hídrico; RO: Riego óptimo; MA: plantas micorrizadas; Control: plantas no micorrizadas.

Por tanto, a pesar de que hay muy poca información en las dos especies de interés agronómico aquí utilizadas sobre los posibles efectos beneficiosos que les aporta la simbiosis MA en condiciones de sequía, se puede deducir de este experimento que, en ambas especies, la simbiosis MA parece contribuir a una mayor tolerancia a la sequía, observándose en general mayores diferencias cuando se evaluó el peso seco y la longitud de las plantas en lugar de su peso fresco. Además, estas diferencias observadas fueron normalmente mayores en berenjena que en pimiento. Esto podría explicarse por el hecho de que las respuestas asociadas a la inoculación con hongos micorrízico-arbusculares son muy dependientes del genotipo de hongo utilizado y la especie vegetal colonizada (Marulanda et al., 2003; Sensoy et al., 2007).

Si se analizan estudios similares, en la publicación de Waterer y Coltman (1989) se observaron diferencias más relevantes que las aquí obtenidas entre las plantas de pimiento inoculadas y no inoculadas bajo condiciones de sequía, aunque es cierto que este estudio se realizó en campo y no en macetas, lo que podría indicar que la influencia de estos hongos MA sobre la tolerancia a la sequía de las plantas colonizadas se manifiesta de forma más relevante cuando estas son cultivadas en campo abierto, porque las raíces micorrizadas podrían desarrollar un tamaño bastante superior para inspeccionar la profundidad del suelo de forma más efectiva en busca de agua.

Por otro lado, con los resultados de peso seco y peso fresco obtenidos anteriormente, se procedió a comprobar el efecto del estrés hídrico y la simbiosis MA sobre el contenido hídrico de la hoja de las plantas anteriores. Así, en berenjena, la sequía, como cabía esperar, disminuyó el contenido hídrico en plantas controles y plantas micorrizadas. Sin embargo, en condiciones de déficit hídrico, el contenido hídrico fue mayor en las plantas que fueron inoculadas comparadas con sus correspondientes controles sin inocular. Esto indica que, a pesar del daño ocasionado por la falta de agua, dicho perjuicio fue menor en las plantas micorrizadas. (Figura 16A).

En el caso de pimiento, las plantas sometidas a condiciones de estrés hídrico también mostraron tal como esperábamos un contenido hídrico en la hoja inferior que aquellas no estresadas, aunque estas diferencias fueron únicamente significativas en aquellas plantas previamente inoculadas. Atendiendo a la micorrización, podemos resaltar lo observado en condiciones óptimas de riego en plantas micorrizadas, que mostraron un estatus hídrico muy superior a las mismas plantas sin inocular (Figura 16B).

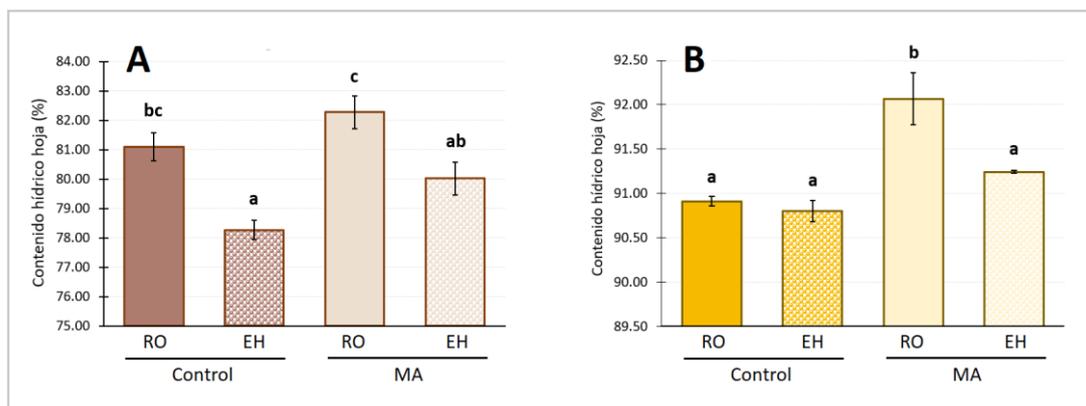


Figura 16. Influencia del estrés hídrico y la inoculación con hongos micorrízico-arbusculares en el contenido hídrico (%) de la hoja en plantas juveniles. (A) Cuarto experimento, berenjena. (B) Cuarto experimento, pimiento. Las barras representan la media de las distintas replicas con su desviación estándar (\pm DE). Las barras con letras distintas son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de rangos múltiples de Duncan ($p < 0.05$). EH: Estrés hídrico; RO: Riego óptimo; MA: plantas micorrizadas; Control: plantas no micorrizadas.

Estos resultados respecto al contenido hídrico de la hoja muestran cómo, en general, la simbiosis MA contribuye de forma relevante al mantenimiento del agua en las células de estas plantas colonizadas bajo condiciones de estrés hídrico. Además, también se puede afirmar que esta simbiosis MA contribuye a una significativa mayor acumulación de agua en las células de la planta colonizada bajo riego óptimo, siendo esta diferencia especialmente elevada en pimiento.

4.2.3. Condiciones de estrés salino

Al igual que se ha hecho para el estrés hídrico, y teniendo en cuenta investigaciones previas en las que se ha visto que algunos genotipos de hongos MA parecen contribuir a una mayor tolerancia al estrés salino en los cultivos aquí estudiados (Kaya et al., 2009; Beltrano et al., 2013; Mohammad y Mitra, 2013), resultaría interesante también examinar el efecto combinado de un estrés salino junto con la inoculación con el hongo MA aquí utilizado en el peso y la longitud de plantas juveniles. Sin embargo, los resultados en este caso no se pudieron obtener a tiempo, encontrándose las plantas destinadas a este experimento en su estadio adecuado para la aplicación de dicho estrés en el momento de la redacción de este trabajo. Por tanto, estos resultados se reservarán para publicaciones posteriores.

4.3. EFECTO DE LA MICORRIZACIÓN Y EL ESTRÉS ABIÓTICO EN LAS CARACTERÍSTICAS AGRONÓMICAS DE PLANTAS ADULTAS

4.3.1. Condiciones óptimas de riego

Como ya se comprobó en los experimentos llevados a cabo con plantas juveniles, los resultados de los distintos parámetros que se evaluaron en las plantas adultas también mostraron que la contribución de la simbiosis MA bajo condiciones óptimas de riego es en general variable, aunque sí que parece existir un efecto beneficioso del mismo sobre el desarrollo de las plantas.

4.3.1.1. Altura de las plantas

Únicamente se realizó un monitoreo en el primer experimento con berenjena, mostrando las plantas previamente colonizadas una longitud superior, pero no significativamente distinta a las no colonizadas (Figura 17A). Además, durante el periodo en el que se realizó este monitoreo las plantas sufrieron una plaga de araña roja, mostrando las plantas micorrizadas un estado fisiológico más

saludable que las plantas controles, a pesar de estar ambas plagadas. En el segundo experimento con pimiento, la longitud de las plantas adultas se midió en tres ocasiones distintas con el objetivo de evaluar si la simbiosis MA beneficiaba más al desarrollo de las plantas en unas etapas de su vida que en otras, resultando el tiempo de medición estadísticamente significativo, como era de esperar. Así, aunque tanto las plantas micorrizadas como las plantas controles tuvieron un crecimiento similar en cada monitoreo, se constató una diferencia significativa entre las plantas del primer y segundo monitoreo (Figura 17B)

Debido a que ya no se observó casi crecimiento entre el segundo y el tercer monitoreo en el segundo experimento, en el tercer experimento ya solo se llevaron a cabo dos monitoreos. Así, en berenjena, el efecto del tiempo de la medición, como era de esperar, fue significativo, pero también se observó al principio que la micorrización no tuvo un efecto positivo en la altura de la planta, aunque esta observación se revirtió en el segundo monitoreo dado que, aunque plantas controles y micorrizadas crecieron de forma significativa con respecto al primer monitoreo, este aumento fue mucho mayor en las plantas micorrizadas (Figura 17C). En pimiento, no se encontraron diferencias en la altura de las plantas en el primer monitoreo, pero el crecimiento de las plantas micorrizadas fue significativamente superior en el segundo monitoreo (Figura 17D).

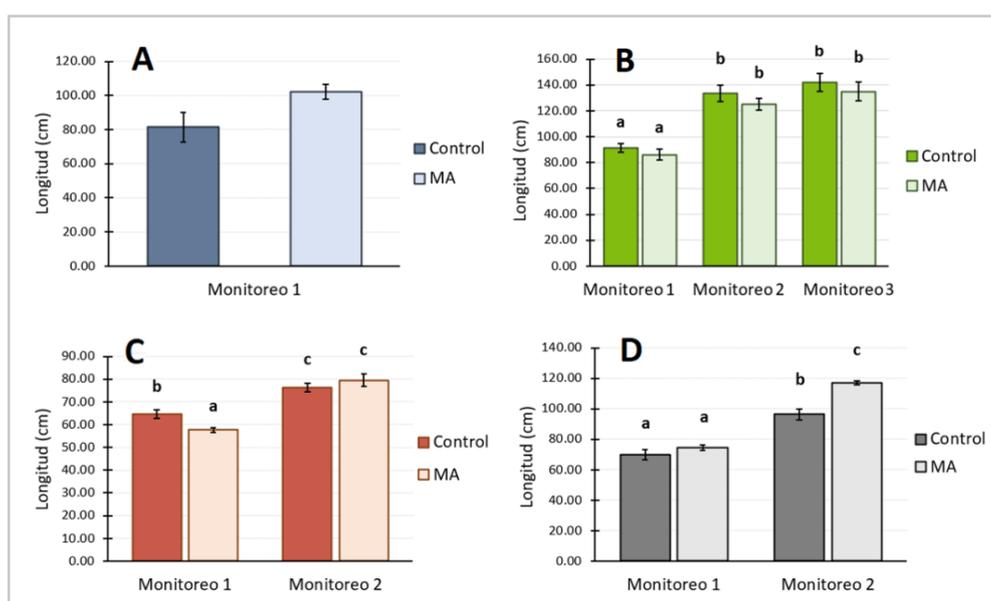


Figura 17. Influencia de la inoculación previa con el hongo micorrícico-arbuscular (MA) o la no inoculación (control) sobre la longitud de las plantas en estadio adulto. (A) Primer experimento, berenjena. (B) Segundo experimento, pimiento. (C) Tercer experimento, berenjena. (D) Tercer experimento, pimiento. Las barras representan la media de las distintas replicas con su desviación estándar (\pm DE). En el caso del primer experimento, la presencia de un asterisco representa una diferencia estadísticamente significativa de acuerdo con la prueba de t-Student ($p < 0.05$). En el resto de los casos, las barras con letras distintas son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de rangos múltiples de Duncan ($p < 0.05$).

Por tanto, parece que los mayores beneficios de la simbiosis MA en el incremento del tamaño de las plantas adultas aparecen en los cultivos evaluados en las etapas más avanzadas de su crecimiento, como se demuestra sobre todo en el tercer experimento en pimiento. Esto es lógico porque en etapas más tardías, más tiempo ha tenido el hongo MA para establecerse y reproducirse, pudiendo así ofrecer unos efectos más evidentes y una mayor protección. El hecho de que las diferencias no sean muy significativas coincide con el estudio de Regvar et al. (2003), en el que se trabajó también con pimiento, y donde se explica que las diferencias en la longitud de las plantas entre ambos tratamientos fueron menos pronunciadas que cuando se evaluó su peso seco, al igual que ocurrió en el estudio de Waterer y Coltman (1989), y también en general en el estudio de Ortas et al. (2011) con berenjena.

Sin embargo, hay que tener en cuenta los resultados publicados por Douds Jr y Reider (2003) trabajando con pimiento, donde explica también que en general se observó un mayor tamaño de las plantas inoculadas desde el principio, aunque en este caso los cultivos se realizaron en campo, por lo que cabría esperar unos beneficios mayores de la simbiosis MA, como se explica anteriormente.

4.3.1.2. Perímetro del tallo

A la vez que se evaluó la altura de las plantas, también se monitorizó el perímetro de su tallo, un parámetro que ha sido muy pobremente estudiado en la bibliografía publicada previamente. De esta forma, en el primer experimento en berenjena, el promedio del perímetro del tallo de las plantas micorrizadas fue prácticamente idéntico al de las plantas no micorrizadas (Figura 18A), por lo que se deduce que, al menos en este experimento, la simbiosis MA contribuyó a una mayor altura (aunque no significativa) de las plantas colonizadas, pero no afectó prácticamente al aumento del grosor del tallo. Lo mismo ocurrió en el segundo experimento y el tercero con pimiento aunque aquí, como era de esperar, sí aparecieron diferencias significativas en función del momento de realización del monitoreo, observándose un aumento significativo del perímetro del tallo en cada uno de los monitoreos realizados (Figura 18B, D).

Sin embargo, resulta interesante como en el tercer experimento con berenjena (Figura 18C), resultó significativo tanto el tiempo de realización del monitoreo como la interacción de esta fuente de variación con la inoculación, observándose que, en el segundo monitoreo, las plantas previamente inoculadas presentaron un perímetro del tallo significativamente superior a las controles.

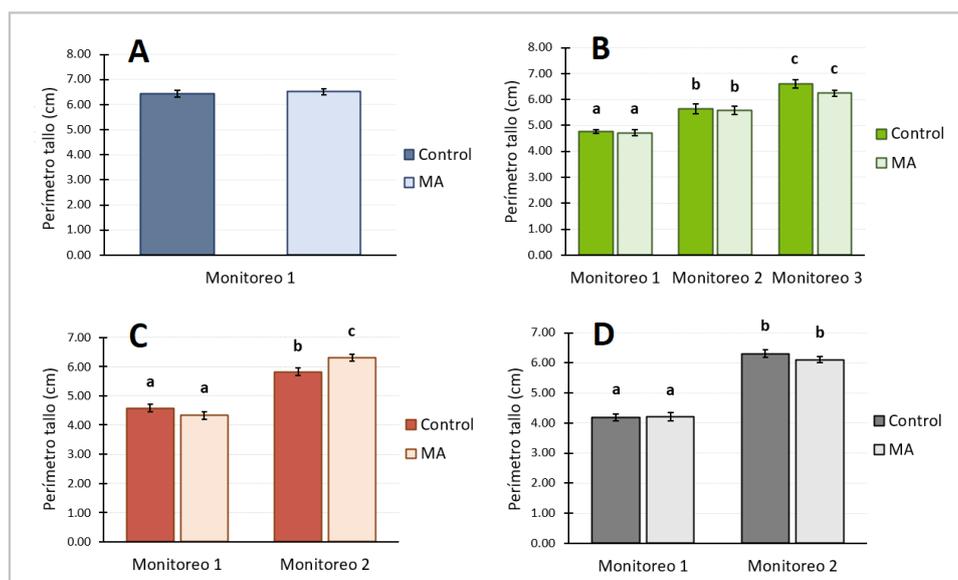


Figura 18. Influencia de la inoculación previa con el hongo micorrízico-arbuscular (MA) o la no inoculación (control) sobre el perímetro del tallo de las plantas en estadio adulto. (A) Primer experimento, berenjena. (B) Segundo experimento, pimiento. (C) Tercer experimento, berenjena. (D) Tercer experimento, pimiento. Las barras representan la media de las distintas replicas con su desviación estándar (\pm DE). En el caso del primer experimento, la presencia de un asterisco representa una diferencia estadísticamente significativa de acuerdo con la prueba de t-Student ($p < 0.05$). En el resto de los casos, las barras con letras distintas son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de rangos múltiples de Duncan ($p < 0.05$).

Por tanto, de estos resultados se deduce que la simbiosis MA no suele contribuir a un mayor perímetro del tallo en los cultivos de interés agronómico aquí tratados, aunque sí ha habido evidencias de esta influencia en uno de los experimentos con berenjena. Analizando la altura y el perímetro del tallo en conjunto, parece que la inoculación previa con *Rhizophagus irregularis* sí que contribuye en general, aunque de forma leve y con excepciones, a un mayor tamaño de las plantas

colonizadas. Sin embargo, parece difícil predecir cuál será el efecto concreto de esta simbiosis sobre la planta colonizada, pues no siempre un aumento de la altura de la planta va acompañado de un aumento también del perímetro de su tallo, y viceversa.

4.3.1.3. Número de flores

Como el número de flores es bastante difícil de evaluar con precisión, se estimó este parámetro de forma aproximada. En el primer experimento con berenjena, las plantas no inoculadas mostraron en general un menor número de flores, y además con un color más claro y aspecto menos sano que las previamente inoculadas, debido posiblemente a la actuación de la plaga de araña roja como un estrés biótico añadido. En el segundo experimento con pimiento, las plantas no inoculadas mostraron mayor número de flores que las inoculadas al principio, pero esta diferencia tendió a igualarse cuando las plantas entraron más en su fase adulta. En el tercer experimento con berenjena y pimiento, en ambos casos, las plantas micorrizadas mostraron en general un mayor número de flores, aunque este número fue muy bajo en ambos tratamientos en el caso de berenjena.

Estos resultados podrían indicar que la simbiosis MA incrementa positivamente la capacidad reproductiva de los cultivos estudiados y su capacidad de producir fruto, como se indica a continuación, y que además este incremento podría ser mayor cuando las plantas están sometidas a algún tipo de estrés, como se observó cuando las plantas de berenjena estuvieron sometidas, aunque de forma accidental, a un estrés adicional de tipo biótico.

4.3.1.4. Producción de frutos

Uno de los parámetros que resultan más interesantes desde el punto de vista práctico y económico es la capacidad de producción de frutos. Así pues, se pudo observar que, si se tiene en cuenta el número de frutos producidos por planta, los resultados son muy similares entre las plantas inoculadas y no inoculadas en todos los experimentos, sin diferencias significativas (Figura 19).

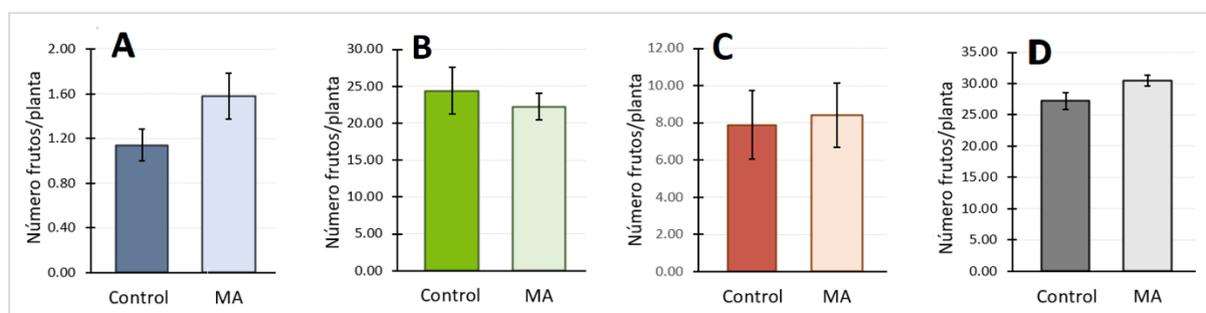


Figura 19. Influencia de la inoculación previa con el hongo micorrízico-arbuscular (MA) o la no inoculación (control) sobre el número de frutos producidos por planta de las plantas en estadio adulto. (A) Primer experimento, realizado con berenjena. (B) Segundo experimento, realizado con pimiento. (C) Tercer experimento, llevado a cabo con berenjena. (D) Tercer experimento, realizado con pimiento. Las barras representan la media de las distintas replicas con su desviación estándar ($\pm DE$). La presencia de un asterisco representa una diferencia estadísticamente significativa de acuerdo con la prueba de t-Student ($p < 0.05$).

Estos resultados, junto con los expuestos en el apartado anterior de “número de flores” encajan completamente con los resultados obtenidos por Regvar et al. (2003) con pimiento, donde se expone que, al igual que en nuestro estudio, a pesar de haberse observado un incremento en el número de flores en las plantas micorrizadas, estos resultados no se reflejaron, en general, en un incremento en el número de frutos.

Para evaluar en mayor profundidad el efecto de la simbiosis micorrízico-arbuscular en la producción de frutos, se estimó también la productividad por planta (g/planta), y es ahí donde

aparecieron resultados más concluyentes. Así, en el primer experimento con berenjena, no todas las plantas produjeron frutos, pero los porcentajes de plantas productoras fueron muy similares entre plantas no inoculadas (61.54%) y plantas previamente inoculadas (57.58%). Este bajo porcentaje de plantas productoras podría deberse a que todas las plantas de este experimento sufrieron una plaga de araña roja, como se indica previamente. Sin embargo, aunque no todas las plantas tuvieron producción, la productividad de estas plantas fue significativamente superior en las plantas micorrizadas (Figura 20A). En el resto de los experimentos sí que produjeron frutos todas las plantas de ambos tratamientos, viéndose como en el segundo experimento con pimiento y en el tercero con berenjena la productividad fue muy similar entre plantas micorrizadas y controles (Figura 20B, C). Por el contrario, estas diferencias sí que fueron significativas, al igual que en el primer experimento, en el caso del tercer experimento con pimiento, presentando las plantas micorrizadas una productividad casi 0.5 kg superior a las plantas control (Figura 20D).

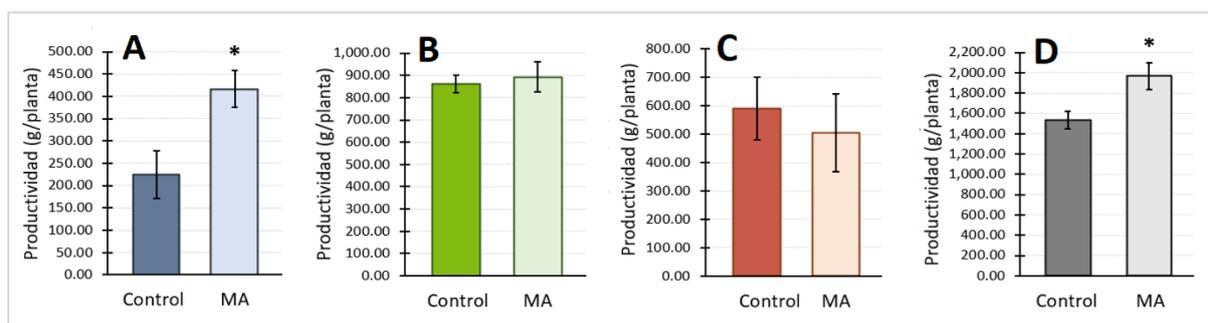


Figura 20. Influencia de la inoculación previa con el hongo micorrízico-arbuscular (MA) o la no inoculación (control) sobre la producción de fruto por planta de las plantas en estadio adulto. (A) Primer experimento, berenjena. (B) Segundo experimento, pimiento. (C) Tercer experimento, berenjena. (D) Tercer experimento, pimiento. Las barras representan la media de las distintas replicas con su desviación estándar (\pm DE). La presencia de un asterisco representa una diferencia estadísticamente significativa de acuerdo con la prueba de t-Student ($p < 0.05$).

Esta mayor producción de frutos por planta, en peso, coincide con los resultados de Regvar et al. (2003), lo que hace pensar que, como en general se observan resultados muy similares en cuanto al número de frutos producidos por planta entre ambos tratamientos, pero sí que aparecen diferencias significativas en dos de los experimentos en cuanto al peso de la producción de frutos por planta, la simbiosis MA contribuye, al menos en los cultivos aquí estudiados y con el hongo aquí aplicado, a una producción de frutos más grandes y pesados. Sin embargo, en el estudio de Douds Jr et al. (2017) con berenjena ocurrió que el número de frutos sí que resultó significativamente superior en las plantas micorrizadas, por lo que, en ese caso, aunque también aumentó la productividad de frutos, no lo hizo aumentando el tamaño de estos como en este caso, sino su número. Por tanto, como se comenta previamente, aunque los resultados de la simbiosis MA suelen ser satisfactorios, resulta difícil predecir en qué se van a traducir esos beneficios, siendo esto en general muy dependiente del hongo empleado y el cultivo colonizado.

Además, también es interesante que en estudios realizados en parcelas en lugar de macetas, como los de Regvar et al. (2003) u Ortas (2012), la producción que se obtiene es bastante superior a la aquí obtenida, y las diferencias debidas a la contribución del hongo MA también lo son, lo que confirmaría la hipótesis planteada anteriormente de que los beneficios de la simbiosis MA deberían ser más marcados cuando se trabaja con ella en el campo en lugar de macetas de pequeño volumen.

4.3.2. Condiciones de estrés hídrico

El efecto combinado de la aplicación de un estrés hídrico y la inoculación micorrícica en plantas adultas del tercer experimento se determinó calculando el contenido hídrico relativo (CHR). Así, las plantas de berenjena estresadas mostraron un CHR significativamente menor que las no estresadas en ambos casos, siendo esta diferencia especialmente relevante en las plantas no inoculadas. En cuanto a la inoculación, las plantas previamente colonizadas mostraron un CHR superior a las plantas controles en ambas condiciones de riego, resultando estas diferencias significativas en condiciones de estrés hídrico (Figura 21A), lo que indica que la micorriza mejoró el estatus hídrico de las plantas en condiciones de sequía con respecto a las mismas plantas controles sin micorrizar. En las plantas de pimiento, el efecto del estrés hídrico también fue estadísticamente significativo como en el caso anterior, mostrando todas las plantas un CHR menor cuando estas estaban sometidas a la sequía. Sin embargo, aquí la inoculación no resultó significativa en ningún caso, aunque sí se vieron incrementos leves del CHR en plantas micorrizadas (Figura 21B).

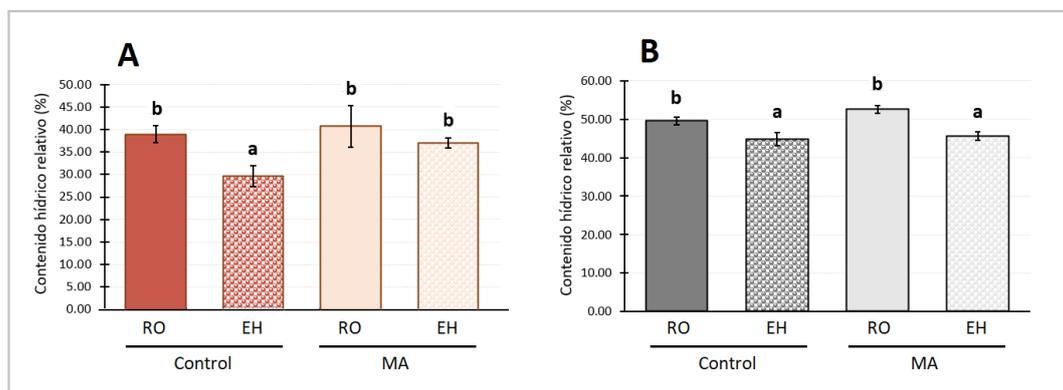


Figura 21. Influencia del estrés hídrico y la inoculación con hongos micorrízico-arbusculares en el contenido hídrico relativo (%) de plantas adultas. (A) Tercer experimento, berenjena. (B) Tercer experimento, pimiento. Las barras representan la media de las distintas replicas con su desviación estándar ($\pm DE$). Las barras con letras distintas son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de rangos múltiples de Duncan ($p < 0.05$). EH: Estrés hídrico; RO: Riego óptimo; MA: plantas micorrizadas; Control: plantas no micorrizadas.

Estos resultados en pimiento son similares a los ya publicados por Davies Jr et al. (1993a), y Garmendia et al. (2005), donde también observaron leves diferencias en el CHR entre plantas micorrizadas y controles. Sin embargo, en estos estudios tampoco obtuvieron grandes diferencias entre las condiciones de riego óptimo y la sequía, lo que sí ocurrió en nuestro caso. En berenjena, no se ha visto información previa publicada referente a este tema.

4.3.3. Condiciones de estrés salino

Durante la aplicación del estrés salino en plantas adultas (segundo experimento), todas las plantas sufrieron la enfermedad del mildiu (*Leveillula taurica*), por lo que al estrés abiótico aplicado habría que sumarle los efectos de este estrés biótico. Así, bajo estas condiciones, se comprobó macroscópicamente que las plantas no inoculadas previamente (Figura 22A) presentaban un aspecto fisiológico muy inferior a las plantas que si fueron inoculadas (Figura 22B) a pesar de estar todas infectadas, presentando estas primeras un elevado nivel de senescencia y escisión foliar. Además, el estado fisiológico de las plantas inoculadas y sometidas a estrés salino fue incluso superior a las plantas bajo riego óptimo pero no inoculadas (Figura 22C), presentando estas últimas un mayor nivel de clorosis foliar, lo cual indica el papel protector de la micorriza en condiciones de estrés biótico y abiótico. Sin embargo, como era de esperar, el mejor estado fisiológico lo presentaron las plantas inoculadas bajo riego óptimo (Figura 22D), mostrando asimismo unos síntomas de mildiu en el envés de la hoja casi insignificantes en comparación con los demás tratamientos.

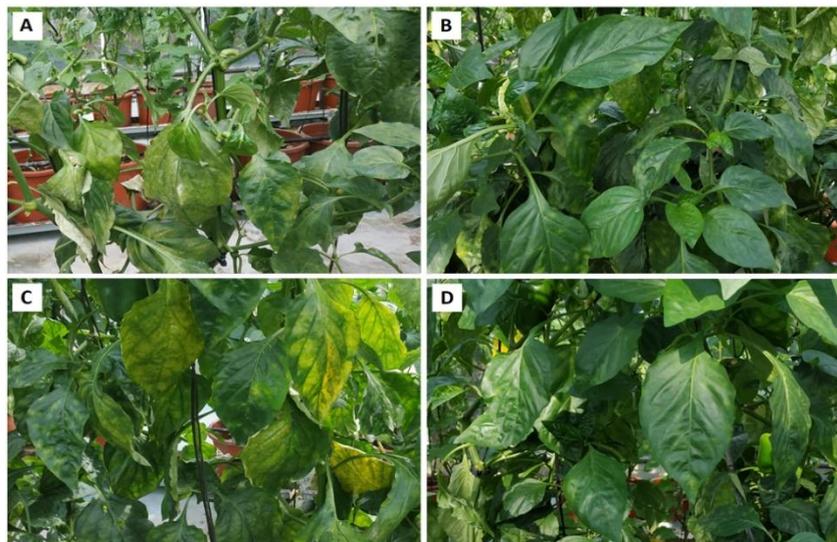


Figura 22. Estado fisiológico general de las plantas de pimiento del segundo experimento bajo condiciones de estrés salino. (A) Planta no inoculada (control) sometidas a estrés salino. (B) Planta inoculada con hongo MA sometida a estrés salino. (C) Planta control sometida a riego óptimo. (D) Planta con inoculación MA sometida a riego óptimo.

4.4. EFECTO DE LA MICORRIZACIÓN Y EL ESTRÉS ABIÓTICO EN LOS MECANISMOS BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES DESENCADENADOS

Aunque ya se han planteado los experimentos a llevar a cabo y se han tomado las muestras para su análisis, como se explica en la sección de materiales y métodos, debido a la situación de emergencia sanitaria no se han podido realizar las determinaciones programadas y extraer estos resultados en el momento de la presentación de este trabajo, reservando los mismos para futuras publicaciones. Todo apunta a que, a pesar de que ya se han advertido beneficios significativos en distintos parámetros fisiológicos o en el aspecto macroscópico causados por la simbiosis MA bajo condiciones de estrés abiótico, cabe esperar que las mayores diferencias se observarán a nivel bioquímico y molecular. Esto se debe al hecho de que cuando la planta detecta un estrés, desencadena una serie de reacciones y respuestas complejas a nivel bioquímico y molecular que conlleva el aumento de la concentración de determinadas moléculas protectoras y la inducción de genes implicados en la defensa de la planta y la tolerancia al estrés aplicado.

Por ejemplo, se pretendían evaluar los niveles peroxidación lipídica, parámetro en el cual ya ha sido demostrada la influencia de la simbiosis MA en pimiento (Hegazi et al., 2017). También se quiso evaluar la capacidad de esta simbiosis para equilibrar el potencial osmótico de la célula en condiciones estresantes, mediante la medida de la concentración de prolina, habiéndose obtenido ya resultados interesantes en varios estudios con las especies aquí utilizadas (Swetha y Padmavathi, 2019; Tallapragada et al., 2016; Nedorost et al., 2012). Por otro lado, mediante la evaluación del contenido en pigmentos fotosintéticos, se pretendía evaluar el efecto de la simbiosis MA en el mantenimiento de la fotosíntesis en plantas estresadas, efecto que ya se ha planteado positivo en algunas publicaciones con berenjena y pimiento (Swetha y Padmavathi, 2019; Nedorost et al., 2012).

Por último, también se pretendió evaluar si bajo estas condiciones de estrés abiótico las plantas inoculadas muestran una mayor expresión de los genes *CaHsp25.9*, *CaAQP5* y *CaAQP12* en pimiento (que codifican una proteína de choque térmico y dos acuaporinas, respectivamente), y los genes *SmelCMT3*, *SmelDemethylase4* y *SmelCAT* en berenjena (que codifican una metiltransferasa, una demetilasa, y una catalasa, respectivamente). Esto se pretendió realizar porque, como se ha comentado en apartados anteriores, se ha informado que bajo condiciones estresantes las plantas suelen producir una mayor cantidad de moléculas como proteínas de choque térmico o acuaporinas para combatir ese estrés. Y, además, también se ha visto que en berenjena el gen *SmelCMT3* reduce significativamente su expresión en condiciones de estrés hídrico o salino, mientras que el gen *SmelDemethylase4* incrementa su expresión, lo que indica que ambos genes pueden influir en alguna ruta de señalización que gobierne la resistencia a la sequía o la salinidad (Moglia et al., 2019).

4.5. EFECTO DE LA MICORRIZACIÓN Y EL ESTRÉS ABIÓTICO EN LA RESPUESTA ANDROGÉNICA

4.5.1. Condiciones óptimas de riego

Durante el tercer experimento y bajo condiciones óptimas de riego, se calculó el porcentaje de viabilidad de las microsporas de las plantas de pimienta y berenjena, observándose cómo en ambos cultivos, las plantas micorrizadas presentaron una viabilidad media superior (Figura 23A). Además, en el caso del pimienta esta diferencia resultó ser significativa (Figura 23B).

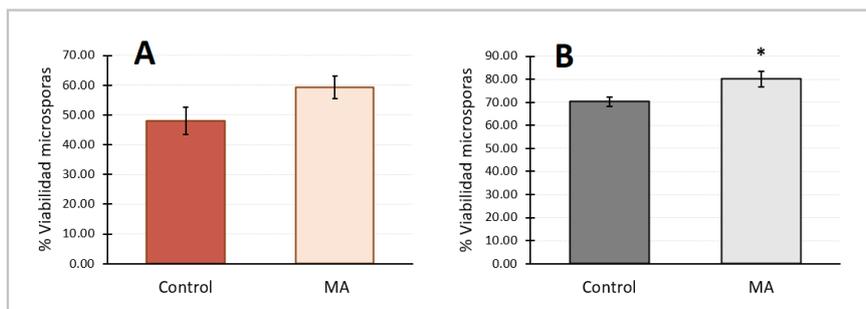


Figura 23. Influencia de la inoculación previa con el hongo micorrícico-arbuscular (MA) o la no inoculación (control) sobre el porcentaje de viabilidad de las microsporas producidas por las plantas evaluadas. (A) Tercer experimento, berenjena. (B) Tercer experimento, pimienta. Las barras representan la media de las distintas replicas con su desviación estándar (\pm DE). La presencia de un asterisco representa una diferencia estadísticamente significativa de acuerdo con la prueba de t-Student ($p < 0.05$).

Por tanto, se deduce que la simbiosis que aquí se estudia parece contribuir también a una mayor capacidad reproductiva de las plantas colonizadas en pimienta, y en menor medida en berenjena, hecho que no se había planteado hasta ahora en la bibliografía disponible, aunque sí se había demostrado algo similar en tomate y calabacín (Poulton et al., 2001; Lau et al., 1995).

Por otro lado, también se evaluó en estas condiciones la capacidad de respuesta androgénica mediante el cultivo de anteras *in vitro*. Se observó que en todos los casos la respuesta androgénica fue ligeramente superior cuando se utilizaron anteras de plantas procedentes de plantas micorrizadas (Figura 24A-D), lo que coincide con los anteriores resultados obtenidos al analizar la viabilidad de las microsporas, aunque estas diferencias no resultaron significativas en ninguno de los casos.

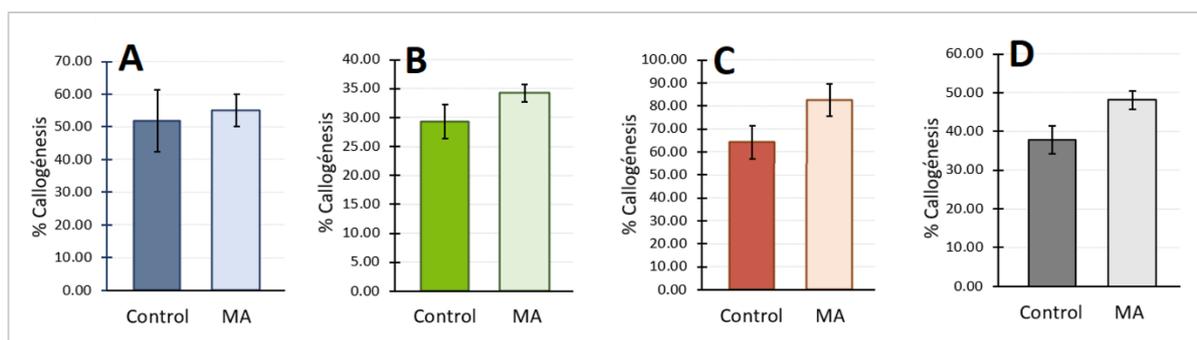


Figura 24. Influencia de la inoculación previa con el hongo micorrícico-arbuscular (MA) o la no inoculación (control) sobre el porcentaje de respuesta a la formación de callo de los cultivos de anteras de las plantas evaluadas en cada caso. (A) Primer experimento, berenjena. (B) Segundo experimento, pimienta. (C) Tercer experimento, berenjena. (D) Tercer experimento, pimienta. Las barras representan la media de las distintas replicas con su desviación estándar (\pm DE). La presencia de un asterisco representa una diferencia estadísticamente significativa de acuerdo con la prueba de t-Student ($p < 0.05$).

Además, también se observó que, aunque la viabilidad de las microsporas resultó ser superior en pimiento que en berenjena (Figura 23), la respuesta al cultivo *in vitro* y la formación de callo a partir de la antera fue superior en berenjena, pues en el tercer experimento el porcentaje de respuesta fue casi el doble que en pimiento, e incluso llegaron a generarse algunos brotes organogénicos en algunos callos procedentes de anteras de plantas micorrizadas.

También se planteó si la simbiosis MA contribuía positivamente a la respuesta androgénica en berenjena mediante el cultivo de microsporas *in vitro*, pero no se pudieron extraer resultados concluyentes de aquí debido a que ninguno de los cultivos realizados respondió, no llegándose a observar divisiones con claridad durante los primeros días tras el cultivo, y encontrándose las microsporas inviables a los pocos días. Por tanto, este es un aspecto que podría evaluarse en futuras investigaciones.

4.5.2. Condiciones de estrés abiótico

Por último, para evaluar si el estrés abiótico influye en la pérdida de viabilidad de las microsporas, y si la simbiosis MA contribuye al mantenimiento de esta viabilidad, se realizó la determinación de la viabilidad de microsporas de las plantas de pimiento del segundo experimento durante la aplicación del estrés salino (Figura 25). Así, se comprobó que el tiempo en el que se realizó la medida de esta viabilidad fue la única fuente de variabilidad establecida que resultó ser estadísticamente significativa, lo que se corresponde con los datos previamente publicados en trigo y colza, donde se afirmó que el estrés salino generaba una pérdida de la viabilidad de las microsporas de estos cultivos (Abdullah et al., 1978; Gul y Ahmad, 2006).

Además, según las diferencias proporcionadas por el test de rangos múltiples de Duncan, se estableció que bajo condiciones de estrés salino las microsporas de plantas micorrizadas tuvieron una viabilidad similar entre el momento de la aplicación del estrés y 7 días tras la aplicación del mismo, pero esta viabilidad ya se redujo significativamente a los 11 días, mientras que en el caso de las plantas controles, bajo estas mismas condiciones de salinidad, la disminución de la viabilidad ya se observó a los 7 días. Sin embargo, es cierto que bajo condiciones de riego óptimo las plantas no inoculadas mostraron una pérdida de viabilidad menor que aquellas inoculadas.

Por tanto, en general, se podría afirmar que la previa aplicación de un inóculo de hongo MA a las plantas les proporciona, al menos en el caso estudiado con pimiento, una tolerancia superior al estrés salino durante los primeros días en lo que al mantenimiento de la viabilidad de las microsporas y la capacidad reproductiva se refiere, pero esta tolerancia pierde relevancia cuando el estrés se prolonga demasiado en el tiempo, debido posiblemente al gran gasto de recursos energéticos que sufren las plantas para hacer frente a este estrés y evitar la muerte.

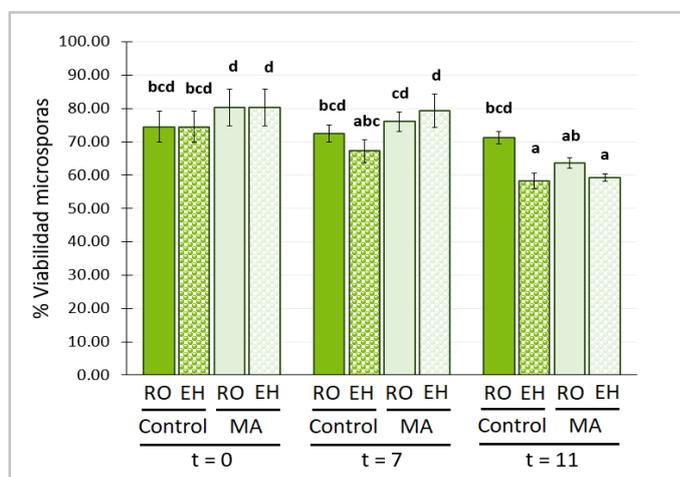


Figura 25. Influencia de la inoculación previa con el hongo micorrízico-arbuscular (MA) o la no inoculación (control) en el porcentaje de viabilidad de las microsporas de plantas sometidas a estrés salino (ES) o riego óptimo (RO) durante un periodo de tiempo de 11 días, con monitoreos al inicio del estrés, una semana tras su comienzo, y al finalizar el mismo. Las barras representan la media de las distintas réplicas y su desviación estándar (\pm DE). Letras distintas representan resultados significativamente diferentes según la prueba de los rangos múltiples de Duncan ($p < 0.05$).

5. CONCLUSIONES

1) Bajo condiciones de riego óptimo, la simbiosis micorrícico-arbuscular parece tener, en general, una influencia positiva sobre la producción de biomasa y las características agronómicas de las especies de interés agronómico aquí estudiadas, tanto en su estadio juvenil como adulto, a pesar de que no siempre las diferencias observadas resultaron significativas.

2) Dicha influencia positiva resulta más interesante si cabe cuando las plantas de berenjena y pimiento se encuentran sometidas a condiciones de estrés abiótico.

3) Esta simbiosis también parece ser beneficiosa en pimiento y berenjena sobre una característica agronómica clave desde el punto de vista práctico y económico como es la producción de fruto, observándose incrementos significativos en la producción cuando este parámetro ha sido determinado.

4) Debido al gran desarrollo radicular observado en las plantas adultas micorrizadas en comparación con aquellas que no fueron inoculadas, y basándonos en la literatura previamente publicada, parece lógico pensar que, aunque ya se obtuvieron beneficios en los cultivos aquí realizados en macetas con un volumen limitado, los beneficios de esta simbiosis se prevén superiores en el cultivo en parcela, y más todavía bajo condiciones de estreses abióticos.

5) En general, bajo condiciones de riego óptimo, el porcentaje de microsporas viables parece ser superior en estas especies cuando fueron previamente inoculadas con el hongo MA, al igual que ocurre con la respuesta androgénica tras el cultivo *in vitro*. Sin embargo, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas en la mayoría de los casos.

6) La viabilidad de las microsporas de pimiento disminuyó en condiciones de estrés salino, pero la previa aplicación de un inóculo de hongo MA les proporcionó, al menos en el caso aquí planteado, un incremento en la tolerancia a dicho estrés durante los primeros días en lo que al mantenimiento de la viabilidad de las microsporas se refiere, aunque este incremento en la tolerancia disminuyó cuando se prolongó el estrés en el tiempo.

7) Aunque la micorrización suele tener efectos beneficiosos sobre las plantas colonizadas, es difícil establecer con seguridad cuál va a ser ese efecto, debido a la gran dependencia en ello tanto del hongo como del cultivo utilizado. Por tanto, todavía queda mucho por investigar en este campo que se plantea seductor debido a la combinación actual de políticas que favorecen los cultivos ecológicos, al menos en Europa, junto con la necesidad de incrementar la producción de las cosechas.

6. BIBLIOGRAFÍA

ABDULLAH, Z; AHMAD, R. & AHMED, J. (1978). Salinity induced changes in the reproductive physiology of wheat plants. *Plant and Cell Physiology*, 19(1): 99-106.

AGUILERA, P.; CUMMING, J.; OEHL, F.; CORNEJO, P. & BORIE, F. (2015). Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Acidic Soils and Their Contribution to Aluminum Phytotoxicity Alleviation, en: *Aluminum Stress Adaptation in Plants*. Springer International Publishing. Switzerland: 203-228.

AL RADDAD, A. (1987). Effect of three vesicular-arbuscular mycorrhizal isolates on growth of tomato, eggplant and pepper in field soil. *Dirasat*, 14(11): 161-168.

ALARCÓN, A. & CERRATO, R. F. (1999). Manejo de la micorriza arbuscular en sistemas de propagación de plantas frutícolas. *Terra Latinoamericana*, 17(3): 179-191.

AMINI, F.; EHSANPOUR, A.; HOANG, Q. & SHIN, J. S. (2007). Protein pattern changes in tomato under in vitro salt stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 54(4): 464-471.

ANGULO-CASTRO, A.; FERRERA-CERRATOEA, R.; ALARCÓN, A.; ALMARAZ-SUÁREZA, J. J.; DELGADILLO-MARTÍNEZA, J.; JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, M.; & GARCÍA-BARRADASC, Ó. (2018). Crecimiento y eficiencia fotoquímica del fotosistema ii en plántulas de 2 variedades de *Capsicum annum* L. inoculadas con rizobacterias u hongos micorrícicos arbusculares. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(2): 178-188.

AROCA, R.; PORCEL, R. & RUIZ-LOZANO, J. M. (2007). How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses? *New Phytologist*, 173(4): 808-816.

ASADA, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Biology*, 50(1): 601-639.

AUGÉ, R. M. (2000). Stomatal behavior of arbuscular mycorrhizal plants, en: *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*. Springer. Dordrecht: 201-237.

AUGÉ, R. M.; STODOLA, A. J.; TIMS, J. E. & SAXTON, A. M. (2001). Moisture retention properties of a mycorrhizal soil. *Plant and Soil*, 230(1): 87-97.

AZCÓN-AGUILAR, C. & BAREA, J. (1997). Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens—an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza*, 6(6): 457-464.

BAKER, J.; VAN DENNSTEELE, C. & DURE, L. (1988). Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. *Plant Molecular Biology*, 11(3): 277-291.

BAREA, J. (2000). Rhizosphere and mycorrhiza of field crops, en: *Biological resource management connecting Science and Policy*. Springer. Berlin: 81-92.

BAREA, J.; AZCÓN-AGUILAR, C.; OCAMPO, J. & AZCÓN, R. (1991). Morfología, anatomía y citología de las micorrizas vesículo-arbusculares. *Fijación y movilización biológica de nutrientes*, 2: 149-173.

BARROW, J. R. & AALTONEN, R. (2004). A staining method for systemic endophytic fungi in plants, en: *Emerging Concepts in Plant Health Management*. Research Signpost. Kerala: 61-67.

BATES, L. S.; WALDREN, R. P. & TEARE, I. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39(1): 205-207.

BELTRANO, J.; RUSCITTI, M.; ARANGO, M. & RONCO, M. (2013). Effects of arbuscular mycorrhiza inoculation on plant growth, biological and physiological parameters and mineral nutrition in pepper grown under different salinity and P levels. *Journal of soil science and plant nutrition*, 13(1): 123-141.

- BJÖRKMAN, E. (1970). Forest tree mycorrhiza—the conditions for its formation and the significance for tree growth and afforestation. *Plant and Soil*, 32(1-3): 589-610.
- BLIGH, E. G. & DYER, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8): 911-917.
- BONFANTE, P. & GENRE, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*, 1(1): 1-11.
- BONFANTE, P. & PEROTTO, S. (1995). Tansley Review No. 82. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytologist*, 130(1): 3-21.
- BRAY, E. A. (1997). Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*, 2(2): 48-54.
- BRUNDRETT, M.; BOUGHER, N.; DELL, B.; GROVE, T. & MALAJCZUK, N. (1996). Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. *Australian Centre for International Agricultural Research Canberra Nº. 435-2016-33680*.
- CALABUIG-SERNA, A.; PORCEL, R.; CORRAL-MARTÍNEZ, P. & SEGUÍ-SIMARRO, J. M. (2020). Anther Culture in Eggplant (*Solanum melongena* L.), en: *Plant Embryogenesis: Methods and Protocols*. Springer US. New York: 453-466.
- CARVAJAL, M.; MARTÍNEZ-BALLESTA, M. & MARTÍNEZ, V. (2000). The response of plants to salinity involves root water channels, en: *Molecular Biology and Physiology of Water and Solute Transport*. Springer. Boston: 261-267.
- CUBERO, J. I. (2003). *Introducción a la mejora genética vegetal*, 2ª edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- CUSHMAN, J. C. (2001). Osmoregulation in plants: implications for agriculture. *American Zoologist*, 41(4): 758-769.
- CHÁVEZ, L. & GONZÁLEZ, L. (2009). Mecanismos moleculares involucrados en la tolerancia de las plantas a la salinidad. *ITEA*, 105(4): 231-256.
- CHIBUIKE, G. (2013). Use of mycorrhiza in soil remediation: a review. *Sci Res Essays*, 8(35): 679-1687.
- DALIAKOPOULOS, I.; TSANIS, I.; KOUTROULIS, A.; KOURGIALAS, N.; VAROUCHAKIS, A.; KARATZAS, G. & RITSEMA, C. (2016). The threat of soil salinity: A European scale review. *Science of the Total Environment*, 573: 727-739.
- DAVIES JR, F.; POTTER, J. & LINUERMAN, R. (1993a). Drought resistance of mycorrhizal pepper plants independent of leaf P concentration-response in gas exchange and water relations. *Physiologia Plantarum*, 87(1): 45-53.
- DAVIES JR, F.; POTTER, J. & LINUERMAN, R. (1993b). Drought resistance of mycorrhizal pepper plants independent of leaf P concentration - response in gas exchange and water relations. *Physiologia Plantarum*, 87(1): 45-53.
- DENBY, K. & GEHRING, C. (2005). Engineering drought and salinity tolerance in plants: lessons from genome-wide expression profiling in *Arabidopsis*. *Trends in Biotechnology*, 23(11): 547-552.
- DÍAZ, A. F. (1996). *Salinidad un nuevo concepto*. Universidad de Colima, Universidad Autónoma Metropolitana, Ministerio de Agricultura de Cuba. Cuba.
- DIXON, R. K.; RAO, M. & GARG, V. (1994). Water relations and gas exchange of mycorrhizal *Leucaena leucocephala* seedlings. *Journal of Tropical Forest Science*, 542-552.
- DOUDS JR, D. & REIDER, C. (2003). Inoculation with mycorrhizal fungi increases the yield of green peppers in a high P soil. *Biological agriculture & horticulture*, 21(1): 91-102.

- DOUDS JR, D. D.; CARR, E.; SHENK, J. E. & GANSER, S. (2017). Positive yield response of eggplant (*Solanum melongena* L.) to inoculation with AM fungi produced on-farm. *Scientia Horticulturae*, 224: 48-52.
- FANG, X.; TURNER, N. C.; YAN, G.; LI, F. & SIDDIQUE, K. H. (2010). Flower numbers, pod production, pollen viability, and pistil function are reduced and flower and pod abortion increased in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under terminal drought. *Journal of experimental botany*, 61(2): 335-345.
- FAOSTAT. (2020). Consultado en marzo de 2020 [Internet]. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat>.
- FERRIE, A. & CASWELL, K. (2011). Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104(3): 301-309.
- FERROL, N.; TAMAYO, E. & VARGAS, P. (2016). The heavy metal paradox in arbuscular mycorrhizas: from mechanisms to biotechnological applications. *Journal of Experimental Botany*, 67(22): 6253-6265.
- FESTER, T. & SAWERS, R. (2011). Progress and challenges in agricultural applications of arbuscular mycorrhizal fungi. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 30(5): 459-470.
- FORSTER, B. P.; HEBERLE-BORS, E.; KASHA, K. J. & TOURAEV, A. (2007). The resurgence of haploids in higher plants. *Trends in Plant Science*, 12(8): 368-375.
- FRANK, A. B. (1877). Ueber die biologischen Verhältnisse des Thallus einiger Krustenflechten. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 3: 128-145.
- FRANK, A. B. (1885). Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. Deutschland.
- FREY, B. & SCHÜEPP, H. (1993). Acquisition of nitrogen by external hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Zea mays* L. *New Phytologist*, 124(2): 221-230.
- GALAU, G. A.; HUGHES, D. W. & DURE, L. (1986). Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (Lea) mRNAs. *Plant Molecular Biology*, 7(3): 155-170.
- GARMENDIA, I.; GOICOECHEA, N. & AGUIRREOLEA, J. (2005). Moderate drought influences the effect of arbuscular mycorrhizal fungi as biocontrol agents against *Verticillium*-induced wilt in pepper. *Mycorrhiza*, 15(5): 345-356.
- GERMANÀ, M. A. (2011a). Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104(3): 283-300.
- GERMANÀ, M. A. (2011b). Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Reports*, 30(5): 839-857.
- GIOVANNETTI, M. & MOSSE, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, 489-500.
- GRAHAM, J. & EISSENSTAT, D. (1994). Host genotype and the formation and function of VA mycorrhizae. *Plant and Soil*, 159(1): 179-185.
- GUL, H. & AHMAD, R. (2006). Effect of salinity on pollen viability of different canola (*Brassica napus* L.) cultivars as reflected by the formation of fruits and seeds. *Pakistan Journal of Botany*, 38(2): 237.
- GUPTA, V.; SATYANARAYANA, T. & GARG, S. (2000). General aspects of mycorrhiza, en: *Mycorrhizal biology*. Springer. Boston: 27-44.
- HABTE, M. & MANJUNATH, A. (1991). Categories of vesicular-arbuscular mycorrhizal dependency of host species. *Mycorrhiza*, 1(1): 3-12.

- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. (1985). The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Molecular aspects of medicine*, 8(2): 89-193.
- HASSAWI, D. S. & LIANG, G. H. (1991). Antimitotic agents: effects on double haploid production in wheat. *Crop Science*, 31(3): 723-726.
- HE, Z.; HE, C.; ZHANG, Z.; ZOU, Z. & WANG, H. (2007). Changes of antioxidative enzymes and cell membrane osmosis in tomato colonized by arbuscular mycorrhizae under NaCl stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 59(2): 128-133.
- HEGAZI, A. M.; EL-SHRAIY, A. M. & GHONAME, A. (2017). Mitigation of salt stress negative effects on sweet pepper using arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), *Bacillus megaterium* and brassinosteroids (BRs). *Gesunde Pflanzen*, 69(2): 91-102.
- HETRICK, B.; WILSON, G. & COX, T. (1992). Mycorrhizal dependence of modern wheat varieties, landraces, and ancestors. *Canadian Journal of Botany*, 70(10): 2032-2040.
- IKIZ, O.; ABAK, K.; DAŞGAN, H. & ORTAŞ, I. (2008). Effects of mycorrhizal inoculation in soilless culture on pepper plant growth. International Symposium on Strategies Towards Sustainability of Protected Cultivation in Mild Winter Climate 807. 533-540.
- IRIGOYEN, J. J.; EINERICH, D. W. & SÁNCHEZ-DÍAZ, M. (1992). Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia plantarum*, 84(1): 55-60.
- JI, X.; DONG, B.; SHIRAN, B.; TALBOT, M. J.; EDLINGTON, J. E.; HUGHES, T.; WHITE, R. G.; GUBLER, F. & DOLFERUS, R. (2011). Control of abscisic acid catabolism and abscisic acid homeostasis is important for reproductive stage stress tolerance in cereals. *Plant Physiology*, 156(2): 647-662.
- KAY, R.; CHAN, A.; DALY, M. & MCPHERSON, J. (1987). Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science*, 236(4806): 1299-1302.
- KAYA, C.; ASHRAF, M.; SONMEZ, O.; AYDEMİR, S.; TUNA, A. L. & CULLU, M. A. (2009). The influence of arbuscular mycorrhizal colonisation on key growth parameters and fruit yield of pepper plants grown at high salinity. *Scientia Horticulturae*, 121(1): 1-6.
- KOGAN, F.; GOLDBERG, M.; SCHOTT, T. & GUO, W. (2015). Suomi NPP/VIIIRS: improving drought watch, crop loss prediction, and food security. *International Journal of Remote Sensing*, 36(21): 5373-5383.
- KOGAN, F.; GUO, W. & YANG, W. (2019). Drought and food security prediction from NOAA new generation of operational satellites. *Geomatics, Natural Hazards and Risk*, 10(1): 651-666.
- KOSKE, R. (1981). Multiple germination by spores of *Gigaspora gigantea*. *Transactions of the British Mycological Society*, 76(2): 328-330.
- LAU, T. C.; LU, X.; KOIDE, R. T. & STEPHENSON, A. G. (1995). Effects of soil fertility and mycorrhizal infection on pollen production and pollen grain size of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Plant, Cell & Environment*, 18(2): 169-177.
- LEVITT, J. (1980). *Responses of Plants to Environmental Stress*. Academic Press, No. 581.24/L666. New York.
- LICHTENTHALER, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. *Methods in Enzymology*, 148: 350-383.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods*, 25(4): 402-408.

- LUIS, A.; SANDALIO, L. M.; CORPAS, F. J.; PALMA, J. M. & BARROSO, J. B. (2006). Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology*, 141(2): 330-335.
- MARULANDA, A.; AZCON, R. & RUIZ-LOZANO, J. M. (2003). Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* plants under drought stress. *Physiologia Plantarum*, 119(4): 526-533.
- MESTRE, A. & MORENO, J. V. (2020). El seguimiento de la sequía en estaciones y sobre grandes cuencas a través del uso del índice SPI. *Acta de las Jornadas Científicas de la Asociación Meteorológica Española*, 30.
- MINOTTI, G. & AUST, S. (1987). The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry*, 262(3): 1098-1104.
- MOGLIA, A.; GIANOGLIO, S.; ACQUADRO, A.; VALENTINO, D.; MILANI, A. M.; LANTERI, S. & COMINO, C. (2019). Identification of DNA methyltransferases and demethylases in *Solanum melongena* L., and their transcription dynamics during fruit development and after salt and drought stresses. *PLoS ONE*, 14(10).
- MOHAMMAD, A. & MITTRA, B. (2013). Effects of inoculation with stress-adapted arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus deserticola* on growth of *Solanum melongena* L. and *Sorghum sudanese* Staph. seedlings under salinity and heavy metal stress conditions. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 59(2): 173-183.
- MONREAL, T. E. (2006). *La gestión de las sequías en España*. Ingeniería y territorio, Nº 74.
- MORENO, L. P. (2009). Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 27(2): 179-191.
- NAGAHASHI, G. & DOUDS, D. D. (2000). Partial separation of root exudate components and their effects upon the growth of germinated spores of AM fungi. *Mycological Research*, 104(12): 1453-1464.
- NEDOROST, L.; VOJTISKOVA, J. & POKLUDA, R. (2012). Influence of watering regime and mycorrhizal inoculation on growth and nutrient uptake of pepper (*Capsicum annuum* L.). *VII International Symposium on Irrigation of Horticultural Crops*. 559-564.
- NILSEN, E. T. & ORCUTT, D. M. (1996). *Physiology of plants under stress*. Abiotic factors. Ed. Wiley. New York.
- ORTAS, I. (2012). The effect of mycorrhizal fungal inoculation on plant yield, nutrient uptake and inoculation effectiveness under long-term field conditions. *Field crops research*, 125: 35-48.
- ORTAS, I.; SARI, N.; AKPINAR, C. & YETISIR, H. (2011). Screening mycorrhizae species for increased growth and P and Zn uptake in eggplant (*Solanum melongena* L.) grown under greenhouse conditions. *European Journal of Horticultural Science*, 76(3): 116.
- OUZIAD, F.; WILDE, P.; SCHMELZER, E.; HILDEBRANDT, U. & BOTHE, H. (2006). Analysis of expression of aquaporins and Na⁺/H⁺ transporters in tomato colonized by arbuscular mycorrhizal fungi and affected by salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 57(1-2): 177-186.
- PAGANO, M. C.; OEHL, F.; SILVA, G. A.; MAIA, L. C.; SILVA, D. K. & CABELLO, M. N. (2016). Advances in Arbuscular Mycorrhizal Taxonomy, en: *Recent Advances on Mycorrhizal Fungi*. Springer International Publishing. Switzerland: 15-21.
- PARDO, J. M. (2010). Biotechnology of water and salinity stress tolerance. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(2): 185-196.

- PARRA-VEGA, V.; GONZÁLEZ-GARCÍA, B. & SEGUÍ-SIMARRO, J. M. (2013). Morphological markers to correlate bud and anther development with microsporogenesis and microgametogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(2): 627-633.
- PATTERSON, B. D.; MACRAE, E. A. & FERGUSON, I. B. (1984). Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV). *Analytical biochemistry*, 139(2): 487-492.
- 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 of the British Mycological Society*, 55(1): 158-161.
- PNUMA (1992). Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Cumbre para la Tierra. Río de Janeiro.
- PORCEL, R. (2006). *Evaluación de la participación de genes de respuesta al déficit hídrico en el aumento de tolerancia de las plantas micorrizadas frente a la sequía*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- PORCEL, R.; AROCA, R. & RUIZ-LOZANO, J. M. (2012). Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi. A review. *Agronomy Sustainable Development*, 32: 181-200.
- PORCEL, R.; BUSTAMANTE, A.; ROS, R.; SERRANO, R. & MULET SALORT, J. M. (2018). BvCOLD1: a novel aquaporin from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) involved in boron homeostasis and abiotic stress. *Plant, Cell & Environment*, 41(12): 2844-2857.
- PORCEL, R. & RUIZ-LOZANO, J. M. (2004). Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 55(403): 1743-1750.
- POTTERS, G.; PASTERNAK, T. P.; GUISEZ, Y.; PALME, K. J. & JANSEN, M. A. (2007). Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science*, 12(3): 98-105.
- POULTON, J. L.; KOIDE, R. T. & STEPHENSON, A. G. (2001). Effects of mycorrhizal infection and soil phosphorus availability on in vitro and in vivo pollen performance in *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae). *American Journal of Botany*, 88(10): 1786-1793.
- PRINGLE, A. & BEVER, J. D. (2008). Analogous effects of arbuscular mycorrhizal fungi in the laboratory and a North Carolina field. *New Phytologist*, 180(1): 162-175.
- QUIROGA, G.; ERICE, G.; AROCA, R.; CHAUMONT, F. & RUIZ-LOZANO, J. M. (2017). Enhanced drought stress tolerance by the arbuscular mycorrhizal symbiosis in a drought-sensitive maize cultivar is related to a broader and differential regulation of host plant aquaporins than in a drought-tolerant cultivar. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1056.
- REGVAR, M.; VOGEL-MIKUŠ, K. & ŠEVERKAR, T. (2003). Effect of AMF inoculum from field isolates on the yield of green pepper, parsley, carrot, and tomato. *Folia Geobotanica*, 38(2): 223.
- REQUENA, N.; JEFFRIES, P. & BAREA, J. M. (1996). Assessment of natural mycorrhizal potential in a desertified semiarid ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(3): 842-847.
- REQUENA, N.; SERRANO, E.; OCÓN, A. & BREUNINGER, M. (2007). Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry*, 68(1): 33-40.
- RÍOS, L. V. C. (2004). Salinidad: Homeostasis iónica y acuaporinas. *IDESIA*, 22(2): 61-68.
- RIVAS-SENDRA, A.; CAMPOS-VEGA, M.; CALABUIG-SERNA, A. & SEGUÍ-SIMARRO, J. M. (2017). Development and characterization of an eggplant (*Solanum melongena*) doubled haploid population and a doubled haploid line with high androgenic response. *Euphytica*, 213(4): 89.

- ROBINSON, J. M. & BUNCE, J. A. (2000). Influence of drought-induced water stress on soybean and spinach leaf ascorbate-dehydroascorbate level and redox status. *International Journal of Plant Sciences*, 161(2): 271-279.
- RUIZ-LOZANO, J. & AZCÓN, R. (1995). Hyphal contribution to water uptake in mycorrhizal plants as affected by the fungal species and water status. *Physiologia Plantarum*, 95(3): 472-478.
- RUIZ-LOZANO, J. M. (2003). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza*, 13(6): 309-317.
- SAFIR, G., BOYER, J. & GERDEMANN, J. (1972). Nutrient status and mycorrhizal enhancement of water transport in soybean. *Plant Physiology*, 49(5): 700-703.
- SEGUÍ-SIMARRO, J. M. (2010a). Androgenesis revisited. *The Botanical Review*, 76(3): 377-404.
- SEGUÍ-SIMARRO, J. M. & NUEZ, F. (2008). How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 134: 1-12.
- SEGUÍ-SIMARRO, J. M. (2010b). *Biología y biotecnología reproductiva de las plantas*. Editorial Universitat Politècnica de València. Valencia, España.
- SĘKARA, A.; CEBULA, S. & KUNICKI, E. (2007). Cultivated eggplants: Origin, breeding objectives and genetic resources, a review. *Folia Horticulturae*, 19(1): 97-114.
- SENSOY, S.; DEMIR, S.; TURKMEN, O.; ERDINC, C. & SAVUR, O. B. (2007). Responses of some different pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes to inoculation with two different arbuscular mycorrhizal fungi. *Scientia Horticulturae*, 113(1): 92-95.
- SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58(2): 221-227.
- STEWART, N.; MARTIN, R.; ENGASSER, J. & GOERGEN, J. (1999). A new methodology for plant cell viability assessment using intracellular esterase activity. *Plant Cell Reports*, 19(2): 171-176.
- STRULLU-DERRIEN, C.; KENRICK, P. & SELOSSE, M. A. (2016). Origins of the mycorrhizal symbioses, en: *Molecular mycorrhizal symbiosis*. Wiley. New Jersey: 1-20.
- STUBBERFIELD, L. & SHAW, P. (1990). A comparison of tetrazolium reduction and FDA hydrolysis with other measures of microbial activity. *Journal of Microbiological Methods*, 12(3-4): 151-162.
- SWETHA, S. & PADMAVATHI, T. (2019). Mitigation of Drought Stress by *Piriformospora indica* in *Solanum melongena* L. cultivars. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 1-9.
- TALLAPRAGADA, P.; DIKSHIT, R. & SESHAGIRI, S. (2016). Influence of *Rhizophagus spp.* and *Burkholderia seminalis* on the Growth of Tomato (*Lycopersicon esculatum*) and Bell Pepper (*Capsicum annuum*) under Drought Stress. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 47(17): 1975-1984.
- TOURAEV, A.; PFOSSER, M. & HEBERLE-BORS, E. (2001). The microspore: A haploid multipurpose cell. *Advances in Botanical Research*, 35: 53-109.
- TSANTRIZOS, Y. S.; KOPE, H. H.; FORTIN, J. A. & OGILVIE, K. K. (1991). Antifungal antibiotics from *Pisolithus tinctorius*. *Phytochemistry*, 30(4): 1113-1118.
- VIJAYAN, K. (2009). Approaches for enhancing salt tolerance in mulberry (*Morus* L)-A review. *Plant Omics*, 2(1): 41.
- WANG, W.; VINOCCUR, B. & ALTMAN, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1): 1-14.

WANG, Y.; JIANG, J.; ZHAO, X.; LIU, G.; YANG, C. & ZHAN, L. (2006). A novel LEA gene from *Tamarix androssowii* confers drought tolerance in transgenic tobacco. *Plant Science*, 171(6): 655-662.

WATERER, D. R. & COLTMAN, R. R. (1989). Response of mycorrhizal bell peppers to inoculation timing, phosphorus, and water stress. *Hortscience*, 24 (4): 688-690.

WEDZONY, M.; FORSTER, B. P.; ZUR, I.; GOLEMIEC, E.; SZECHYNSKA-HEBDA, M.; DUBAS, E. & GOTEBIEWSKA, G. (2009). Progress in doubled haploid technology in higher plants, en: *Advances in haploid production in higher plants*. Springer. Dordrecht: 1-33.

WILD, A. (1988). *Russell's Soil conditions and Plant Growth*, 11^a Ed. Longman Scientific and Technical. Harlow, UK.

WU, Q. S. & XIA, R. X. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions. *Journal of Plant Physiology*, 163(4): 417-425.

ZHU, J. K. (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(5): 441-445.

ZHU, X. C.; SONG, F. B. & XU, H. W. (2010). Arbuscular mycorrhizae improves low temperature stress in maize via alterations in host water status and photosynthesis. *Plant and Soil*, 331(1-2): 129-137.

7. ANEXO I

PROTOSCOLOS

Debido a la imposibilidad de acceso a los laboratorios del Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV) durante el estado de alarma para la gestión de la situación de crisis sanitaria ocasionada por la COVID-19, no se pudieron realizar los experimentos con estrés salino planteados con las plantas del cuarto experimento, ni tampoco se pudieron llevar a cabo los experimentos que involucraban determinaciones bioquímicas y moleculares, como se explica en este trabajo. Sin embargo, como también se detalla, estos experimentos sí que fueron planteados y preparados, y las muestras se encuentran recogidas y conservadas para su análisis en el momento que la crisis sanitaria lo permita. Estos protocolos planteados se describen a continuación.

- **Daño oxidativo a lípidos**

Se extrajeron los peróxidos de lípidos machacando 0.5 g de las muestras recogidas anteriormente en un mortero sobre hielo, y se añadió 6 mL de tampón fosfato potásico 100 mM (pH = 7). A continuación, se realizó la filtración de los homogeneizados utilizando un filtro Miracloth, y centrifugándolo a 15.000 x g durante 20 minutos. Después, para la formación del cromógeno, se añadieron en un tubo limpio 200 mL del sobrenadante obtenido junto con 1 mL de una mezcla de reacción previamente preparada, que contenía ácido tricloroacético al 15% (p/v), ácido 2-triobarbitúrico al 0.375 (p/v), butilhidroxitolueno al 0.1% (p/v) y ácido clorhídrico (HCl) 0.25 N, y se incubó la mezcla a 100 °C durante 30 minutos. Una vez enfriada, la mezcla se volvió a centrifugar a 800 x g durante 5 minutos, y se cuantificó el sobrenadante en un espectrofotómetro Peak E-1000UV (Peak, Houston, Texas, EE. UU.), a una longitud de onda de 532 nm.

Para cuantificar la peroxidación de lípidos expresada en equivalentes de malondialdehído (MDA) (Halliwell y Gutteridge, 1985), se preparó una curva de calibración utilizando MDA en el rango de concentraciones 0.1-10 µM, utilizando en cada caso un volumen final de 1 mL. Además, se utilizó un blanco que contenía únicamente tampón de extracción (tampón fosfato potásico), y como controles para cada muestra, el proceso de preparación fue análogo, pero reemplazando en la mezcla de reacción el TBA por HCl 0.25 N.

- **Peróxido de hidrógeno**

Para esta determinación, se utilizaron 0.5 g de las muestras recogidas y se homogeneizaron en un mortero sumergido en hielo junto con 5 mL de ácido tricloroacético al 5% (p/v) que contenía 0.1 g de carbón activado y polivinilpolipirrolidona (PVPP) al 1% (p/v).

El homogeneizado obtenido se centrifugó a 18.000 g durante 10 minutos, y el sobrenadante recuperado se filtró utilizando un filtro Millipore de 0.22 µm. Después, se seleccionaron 130 mL del filtrado y se le añadió un volumen de 1.2 mL de tampón fosfato potásico 100 mM (pH = 8.4) y 0.6 mL de reactivo colorimétrico. Este reactivo se preparó realizando una mezcla 1:1 (v/v) de oxalato de titanio y potasio 0.6 mM y 4-(2-piridilazo) resorcinol 0.6 mM. Las muestras se incubaron a 45 °C durante 1 hora y se midió la absorbancia a 508 nm en el mismo espectrofotómetro que en el caso anterior. Además, los blancos se realizaron utilizando el mismo procedimiento pero reemplazando el homogeneizado obtenido a partir de las muestras por ácido tricloroacético al 5%.

- **Prolina y azúcares totales**

Para la extracción de la prolina y los azúcares totales, se homogeneizó la muestra con 3 mL de metanol durante 1 minuto en el vórtex, repitiendo el proceso una vez más. Después, se añadió 6 mL de cloroformo y se homogeneizó de forma análoga. Por último, se añadió 3 mL de NaCl al 0.9 % (p/v)

y se centrifugó a $4\,340 \times g$ durante 10 minutos en una centrífuga refrigerada Eppendorf 5804 R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), a $1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Con la fase metanólica (superior) del proceso anterior, se cuantificó tanto la prolina como los azúcares totales.

La reacción de la ninhidrina utilizada para cuantificar el contenido en prolina fue preparada haciendo reaccionar 1 mL de la fase metanólica con 1 mL de reactivo de ninhidrina y 1 mL de ácido acético glacial. Después se llevó esta mezcla a ebullición durante 1 hora y se paró la reacción sumergiendo los tubos en hielo. Por último, se extrajo la prolina con 2 mL de tolueno agitando en vórtex, y se midió espectrofotométricamente a 515 nm utilizando tolueno como blanco. Además, se realizó una curva patrón con concentraciones de prolina 0, 25, 50, 100, 200 y 300 μM a partir de una solución de prolina 1 mM.

En el caso de la cuantificación de los azúcares solubles, el proceso comenzó haciendo reaccionar 0.025 mL de la fase metanólica previamente recuperada con 3 mL de reactivo de antrona, preparado mezclando 200 mg de antrona con 100 mL de H_2SO_4 al 72% (v/v), y sumergiéndolo en agua hirviendo durante 10 minutos. Después de su enfriado, se midió la absorbancia a 620 nm en el espectrofotómetro mencionado anteriormente utilizando agua como blanco, y elaborando una curva patrón con glucosa en el rango de concentraciones 0.2-0.4 mg/mL.

- **PCR cuantitativa con transcripción reversa (RT-PCRq)**

Cada reacción de RT-PCRq consistió en un volumen de 23 μL que contenía 3 μL de una dilución 1:10 (v/v) de ADNc en agua, 10 μL de reactivo Green Master Mix (NZYTech, Lisboa, Portugal), 6.4 μL de agua desionizada, y 0.8 μL de cada par de cebadores a una concentración de 10 μM .

El programa de PCR que se utilizó fue una primera incubación de 5 minutos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ para activar la Taq ADN polimerasa, 45 ciclos de 10 segundos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 segundos a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (temperatura de unión de los cebadores), y 10 segundos a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, momento en el que se midió la señal de fluorescencia. Para comprobar que la PCR y los primers utilizados funcionaron correctamente, se realizó un protocolo de disociación por calor (desde 65 hasta $100\text{ }^{\circ}\text{C}$) después del proceso de PCR.

La cuantificación relativa de los niveles de ARNm en todos los casos se realizó mediante el método comparativo $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (Livak y Schmittgen, 2001), y los valores de expresión obtenidos se normalizaron utilizando los genes constitutivos *CaUBI3* para pimiento y *SmeI ACT* para berenjena.

Los experimentos se repitieron tres veces, determinando así el ciclo umbral (CT) por triplicado, utilizando tres muestras biológicas distintas. También se emplearon controles negativos sin ADNc en todas las reacciones de PCR llevadas a cabo.