



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante

**Dr. Roberto Godoy**

Instituto de Botánica

Facultad de Ciencias

**CUANTIFICACIÓN DE LOS SISTEMAS ANTIOXIDANTES EN  
RAÍCES DE *Nothofagus dombeyi* (MIRB.) OERST. MICORRIZADAS  
BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO**

Tesis de Grado presentada como parte  
de los requisitos para optar al grado de  
***Licenciado en Bioquímica*** y Título  
Profesional de ***Bioquímico***

**CARLOS GUILLERMO FERNÁNDEZ VEGA**

**VALDIVIA - CHILE**

**2006**

Carlos Fernández

*Dedicada a Ivette, mi esposa y a mi hija Constanza*

*Con todo mi amor*

## AGRADECIMIENTOS

A CONICYT, que a través del proyecto FONDECYT 1040913 permitió el financiamiento de esta investigación.

Al Instituto de Botánica, por acogerme en el desarrollo de mi tesis y brindarme todas las facilidades para ello.

Al Dr. Roberto Godoy, quien aceptó de la mejor manera, ser mi profesor patrocinante y permitió darle forma definitiva a este trabajo.

A la Dra. Miren Alberdi, por aceptar muy amablemente ser mi profesora informante y ayudarme en la corrección de este escrito y en mis presentaciones.

Al Dr. Juan G. Cárcamo por colaborar en la corrección de este trabajo como profesor informante.

A la Dra. Maricel Álvarez, por su dedicada ayuda en las correcciones realizadas a esta tesis, por su franqueza y amabilidad en su trato conmigo.

A Erik y Yessy por su apoyo, compañía y buen humor en las tareas de invernadero.

A la Sra. Mónica, Alejandra, Claudia, Viviana e Isabel, por su colaboración en las distintas tareas previas a los experimentos. A Rubén, Víctor y Pamela, por hacer agradable la estadía durante las frías mañanas en el instituto.

A Carlos, mi padre, por la confianza puesta en mí antes de su muerte.

A mi esposa, Ivette; a Constanza, mi hija; a mi madre, Alba; Patricio, mi hermano y a mis suegros José y María, por su incondicional apoyo durante estos largos años de estudio.

Gracias

## ÍNDICE

	Página
<b>1. RESUMEN</b>	1
<b>SUMMARY</b>	2
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	3
2.1. Estrés oxidativo y enzimas antioxidantes	5
2.2. Micorrizas y estrés hídrico	8
2.3. Hipótesis general	12
2.4. Hipótesis específicas	12
2.5. Objetivo general	12
2.6. Objetivos específicos	13
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	14
3.1. Materiales	14
3.2. Métodos	15
3.2.1. Cultivo de plántulas de <i>Nothofagus dombeyi</i>	15
3.2.2. Cultivo de los hongos <i>Pisolithus tinctorius</i> y <i>Descolea antarctica</i>	15
3.2.3. Inoculación de <i>N. dombeyi</i>	16
3.2.4. Evaluación de la formación de ectomicorrizas	17
3.2.5. Medición del nivel hídrico en el suelo	17
3.2.6. Fertilización	18
3.2.7. Diseño experimental	18

3.2.8. Obtención de las muestras	19
3.2.9. Evaluación del estrés oxidativo en raíces	20
3.2.9.1. Malondialdehído (MDA)	20
3.2.9.2. Peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	22
3.2.10. Evaluación de la actividad enzimática total en raíces	23
3.2.10.1. Superóxido Dismutasa (SOD)	23
3.2.10.2. Catalasa (CAT)	25
3.2.10.3. Glutati3n reductasa (GR)	26
3.2.10.4. Ascorbato peroxidasa (APX)	27
3.2.11. Cuantificación de Proteínas	28
3.2.12. Análisis estadístico	28
<b>4. RESULTADOS</b>	
4.1. Malondialdehído	29
4.1.1. Efecto del nivel hídrico en el contenido de MDA	29
4.1.2. Efecto de la fertilización en el contenido de MDA	33
4.1.3. Efecto de la micorrización y la especie micorrízica en el contenido de MDA	34
4.2. Peróxido de hidrógeno	37
4.1.1. Efecto del nivel hídrico en el contenido de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	37
4.1.2. Efecto de la fertilización en el contenido de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	41
4.1.3. Efecto de la micorrización y de la especie micorrízica en el contenido de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	42

4.3. Superóxido dismutasa	44
4.3.1. Efecto del nivel hídrico en la actividad SOD	44
4.3.2. Efecto de la fertilización en la actividad SOD	47
4.3.3. Efecto de la micorrización y la especie micorrízica en la actividad SOD	48
4.4. Catalasa	50
4.4.1. Efecto del nivel hídrico en la actividad CAT	50
4.4.2. Efecto de la fertilización en la actividad CAT	53
4.4.3. Efecto de la micorrización y la especie micorrízica en la actividad CAT	54
4.5. Glutación Reductasa	56
4.5.1. Efecto del nivel hídrico en la actividad GR	56
4.5.2. Efecto de la fertilización en la actividad GR	59
4.5.3. Efecto de la micorrización y la especie micorrízica en la actividad GR	59
4.6. Ascorbato peroxidasa	61
4.6.1. Efecto del nivel hídrico en la actividad APX	61
4.5.2. Efecto de la fertilización en la actividad APX	64
4.5.3. Efecto de la micorrización y la especie micorrízica en la actividad APX	65
<b>5. DISCUSIÓN</b>	
5.1. Malondialdehído	67
5.2. Peróxido de hidrógeno	72

5.3. Superóxido dismutasa	76
5.4. Catalasa	79
5.5. Glutación Reductasa	82
5.6 Ascorbato peroxidasa	85
5.7 Comentarios finales	87
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>91</b>
<b>7. LITERATURA</b>	<b>93</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Fig. 1: Efecto del nivel hídrico, fertilización y micorrización en el contenido de MDA en raíces.	30
Fig. 2: Efecto del nivel hídrico, fertilización y micorrización en el contenido de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en raíces.	38
Fig. 3: Efecto del nivel hídrico, fertilización y micorrización en la actividad SOD en raíces.	45
Fig. 4: Efecto del nivel hídrico, fertilización y micorrización en la actividad CAT en raíces.	51
Fig. 5: Efecto del nivel hídrico, fertilización y micorrización en la actividad GR en raíces.	57
Fig. 6: Efecto del nivel hídrico, fertilización y micorrización en la actividad APX en raíces.	62
Fig. 7: Las principales vías de eliminación de ERO en plantas	89

## 1. RESUMEN

Se cuantificaron los marcadores de daño oxidativo peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y malondialdehído (MDA) y las actividades enzimáticas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), catalasa (CAT, EC 1.16.1.6), ascorbato peroxidasa (APX, EC 1.11.1.11) y glutatión reductasa (GR, EC 1.6.4.2) en raíces de plantas de *Nothofagus dombeyi* de un año de edad, en una matriz de tratamientos que incluyó fertilización, cuatro niveles de contenido hídrico medido en el suelo e inoculación con los hongos ectomicorrízicos *Pisolithus tinctorius* y *Descolea antarctica*.

La menor concentración de  $H_2O_2$  y MDA se encontró en las plantas micorrizadas. Las mayores actividades de SOD y GR se determinaron en el tratamiento con *P. tinctorius*, mientras que las actividades aumentadas de CAT y APX se encontraron en el tratamiento con *D. antarctica*. Todas las enzimas aumentaron su actividad bajo condiciones de estrés hídrico. Los efectos de la fertilización fueron significativos sólo en algunos niveles, debido al bajo aporte nutricional, por lo cual los tratamientos mantuvieron la tendencia mostrada en el tratamiento sin fertilización.

En conclusión, *P. tinctorius* y *D. antarctica* influyen en el manejo del estrés hídrico de *N. dombeyi* mediante el aumento de las actividades enzimáticas antioxidantes y se propone a las dos especies fúngicas como potenciales simbioses con el fin de aumentar la tolerancia a la sequía de *N. dombeyi* en prácticas de vivero y posterior establecimiento de plantaciones.

## 1. SUMMARY

The markers of oxidative damage, peroxide of hydrogen ( $H_2O_2$ ) and malondialdehyde (MDA) and activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.16.1.6), ascorbate peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) and glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2) were quantified in roots of plants of *Nothofagus dombeyi* of one year of age, in a womb of treatments that included fertilization, four levels of soil water contend and inoculation with the ectomycorrhizal fungi *Pisolithus tinctorius*, and with *Descolea antarctica* and

The smallest concentration in  $H_2O_2$  and MDA were in the mycorrhizae. The biggest activity of SOD and GR were determined in the *N. dombeyi* - *P. tinctorius* mycorrhizae, while the increased activities of CAT and APX were in the *N. dombeyi* - *D. antarctic* mycorrhizae. All the enzymes increased their activity when the plant underwent drought stress. The effects of the fertilization were significant only in some levels, due to the low nutritional contribution, reason why the treatments maintained the tendency shown in the treatment without fertilization.

In conclusion, *P. tinctorius* and *D. antarctica* symbiosis they influence in the handling of the drought stress of *N. dombeyi* by means of the increase of the antioxidant enzymatic activities. Therefore, it is propose to the two fungus species like possible *N. dombeyi* symbionts with the purpose of increasing the tolerance to the drought of *N. dombeyi* in greenhouse and later establishment of plantations.

## 2. INTRODUCCIÓN

En los bosques de la zona centro-sur de Chile se encuentran variadas especies arbóreas nativas, la mayoría maderables, importantes económicamente y por lo tanto sometidas a presión antrópica (Lara *et al.*, 1997; 2003). Sin embargo, a nivel nacional aún no existen programas eficientes para el desarrollo de la explotación sustentable del recurso bosque nativo (Arroyo *et al.*, 1999) y en los cuales se incluyan prácticas silviculturales de las especies del género *Nothofagus*, en especial *N. alpina* (raulí), *N. obliqua* (roble-pellín) y *N. dombeyi* (coigüe) (Donoso *et al.*, 1999).

*N. dombeyi* es una de las especies de más amplia distribución en los bosques de Chile y se extiende entre los 34°37' y los 47°30' S, abarcando desde la cordillera de la costa al oeste, hasta el lado oriental de la cordillera de los Andes, en Argentina (Donoso, 1995). Este rango de distribución es altitudinal y latitudinalmente mayor que *N. alpina* y a su vez, mucho más extenso que *N. obliqua* (Donoso *et al.*, 1999).

Las actividades y prácticas silviculturales de estas especies se basan principalmente en el manejo de renovales (Grosse y Quiroz, 1999). El proceso de viverización es aún incipiente, no se realiza extensivamente con especies nativas y en ningún caso incluye las asociaciones simbióticas con otros organismos, en especial, hongos ectomicorrízicos (Donoso *et al.*, 1999). La asociación simbiótica es vital en el desarrollo y subsistencia para las especies arbóreas de todo el mundo a través de los más diversos climas y especialmente, en el establecimiento de plantaciones forestales sobre suelos degradados (Smith y Read, 1997; Bledsoe, 1992).

En los bosques de la zona centro-sur de Chile, un importante factor de estrés ambiental que afecta a *N. dombeyi* lo constituye la baja disponibilidad de agua en el suelo, debido a la escasez de lluvia en verano y a las bajas temperaturas en invierno, bajo determinadas condiciones edafoclimáticas (Alberdi, 1997).

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

Se postula que en condiciones de estrés hídrico las plantas que se encuentran micorrizadas, presentarían mecanismos antioxidantes que las harían menos sensibles a esta condición desfavorable y por lo tanto, presentarían mejores condiciones adaptativas para su desarrollo tanto en plantaciones forestales, en prácticas de invernadero u otras, que aquellas que no presentan micorrizas.

En estas condiciones, sería posible observar algunas características bioquímicas que den cuenta de la resistencia de las plantas frente al fenómeno de limitación hídrica. De esta manera se hace necesaria la determinación de parámetros moleculares, tales como marcadores de daño oxidativo y enzimas antioxidantes, que permitan cuantificar la magnitud en la cual las ectomicorrizas limitarían el daño oxidativo provocado por la escasez de agua disponible.

## 2.1. Estrés oxidativo y enzimas antioxidantes

El estrés hídrico, al igual que otros tipos de estrés, afecta directa o indirectamente casi todas las actividades de las plantas. En una situación general de estrés se generan muchas reacciones degenerativas tales como peroxidación lipídica (Blokhina *et al.*, 1999) y denaturación de proteínas (Gardner y Fridovich, 1991), debido a la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) tales como el anión radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), oxígeno singlete y radical hidroxilo. Estas especies, normalmente presentes en el medio celular, pueden resultar tóxicas cuando sobrepasan niveles fisiológicos de funcionamiento considerados óptimos (Halliwell y Gutteridge, 1989).

Las ERO son generadas normalmente y en condiciones no estresantes. Reacciones fisiológicas enzimáticas y no enzimáticas son los mecanismos a través de los cuales se generan las ERO (Skulachev, 1997) y localizadas en estructuras tales como cloroplastos (Eltner, 1991) y mitocondrias (Turrens *et al.*, 1982), donde habitualmente se encuentran. De la misma forma en que naturalmente son producidos, existen mecanismos que protegen estructuras y funciones celulares frente a concentraciones normales o excesivas de ERO, las cuales están a cargo de moléculas antioxidantes tales como el glutatión (GSH; Jiménez *et al.*, 1998), ácido ascórbico (AsA; Smirnoff, 2000), tocoferoles (Kagan, 1989) y otros, metabolitos que conforman el sistema antioxidante en plantas (Maldonado y Pahlich, 2004).

El GSH es un tripéptido muy abundante en los tejidos vegetales y presente virtualmente en todos los compartimientos celulares (May *et al.*, 1998). Su función

como antioxidante la ejecuta a través de un residuo central de cisteína y por un mecanismo redox. El residuo de cisteína puede reaccionar con diferentes ERO, como en el caso de la reacción con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , donde éste último es reducido a  $\text{H}_2\text{O}$ , en tanto glutatión se oxida a una forma inactiva que debe ser regenerada enzimáticamente (Larson, 1988).

El AsA es uno de los antioxidantes más poderosos y estudiados (Arrigoni y Tullio, 2000), detectado en la mayoría de los tipos celulares de plantas y en diferentes organelos (Smirnoff, 2000). En su mecanismo de detoxificación puede actuar independientemente eliminando directamente al  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , radicales hidroxilo y oxígeno singlete (Noctor y Foyer, 1998). Está implicado en otros mecanismos antioxidantes como cofactor enzimático y donante de electrones para la regeneración de otros antioxidantes (Thomas *et al.*, 1992).

Los tocoferoles, componentes de las membranas (Packer *et al.*, 2001), son capaces de donar un protón ( $\text{H}^+$ ) a un radical lipídico, previniendo de esta forma la propagación de la reacción en cadena que peroxida los lípidos (Kamal-Eldin y Appelqvist, 1996). La regeneración del radical tocoferoxil resultante se realiza a través del AsA o el GSH (Fryer, 1992). La peroxidación lipídica daña los sistemas membranosos en donde el proceso de peroxidación lipídica se ha iniciado. Cuando la reacción en cadena no es detenida, a partir de lípidos poliinsaturados se generan productos degradados tales como hidrocarburos, alcoholes, dímeros entrecruzados y aldehídos. De éstos últimos, el malondialdehído (MDA) constituye un marcador característico de las reacciones de peroxidación lipídica y por lo tanto de estrés oxidativo (Halliwell y Gutteridge, 1989).

Sin embargo, en determinadas situaciones, la principal y más eficiente detoxificación celular de las ERO durante períodos de estrés, la realizan los sistemas antioxidantes enzimáticos. Esta función la realizan enzimas tales como superóxido-dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1; McCord y Fridovich 1969); catalasas en general y particularmente Catalasa (CAT, EC. 1.16.1.6); peroxidasas (Willekens *et al.*, 1995), especialmente ascorbato-peroxidasa (APX, EC 1.11.1.11) y glutatión-reductasa (GR, EC 1.1.1.42, Maldonado y Pahlich, 2004).

El sistema SOD es uno de los más importantes y estudiados. SOD está presente en los compartimentos subcelulares susceptibles al estrés oxidativo (Bowler *et al.*, 1992). Se han descrito al menos dos isoformas estructuralmente similares de SOD en eucariontes, las cuales difieren en los iones metálicos que contienen como cofactor. FeSOD, presente en el estroma del cloroplasto y MnSOD, presente en la mitocondria (Beyer y Fridovich, 1987). Existe una tercera isoenzima de SOD, la cual no está estructuralmente relacionada con las otras dos, Cu/ZnSOD, presente en el citosol y el cloroplasto de la célula vegetal (Bannister *et al.*, 1987). SOD protege del estrés oxidativo catalizando la dismutación de  $O_2^{\bullet-}$  a  $H_2O_2$  y  $O_2$  (Scandalias, 1993), reacción que ocurre 10.000 veces más rápido que una dismutación espontánea.

CAT es una enzima que contiene un grupo prostético hemo y cataliza la dismutación de  $H_2O_2$  a  $O_2$  y  $H_2O$  mediante una serie de reacciones en cadena, principalmente a nivel de membranas y citoplasmático (Elstner y Oswald, 1994). Elimina tanto el  $H_2O_2$  generado en los peroxisomas luego de procesos oxidativos, como el producto de la dismutación del  $O_2^{\bullet-}$  por SOD. Existen isoformas localizadas en los distintos compartimentos celulares (Elstner y Oswald, 1994)

APX cataliza una reacción de descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  parecida a catalasa, también asociada con la membrana, pero principalmente al interior de compartimientos subcelulares tales como peroxisomas y mitocondrias (Sugimoto, 1997).

Tanto APX como GR están directa o indirectamente relacionadas a la eliminación del exceso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  mediante la vía de Halliwell-Asada. En estas reacciones, una vez que SOD ha catalizado la dismutación del  $\text{O}_2^{\bullet-}$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2$ , APX reduce al  $\text{H}_2\text{O}_2$  generando  $\text{H}_2\text{O}$  al tiempo que una molécula de AsA es oxidada en el proceso. La regeneración del AsA es catalizada por la enzima deshidroascorbato-reductasa la cual reduce el producto oxidado del AsA, monodeshidroascorbato a AsA. En esta última reacción dos moléculas de GSH son oxidadas. Finalmente, GR cataliza la regeneración del glutatión oxidado (GSSG), (Asada, 1999).

## **2.2. Micorrizas y estrés hídrico**

La asociación simbiótica que ocurre entre hongos ectomicorrízicos y la mayoría de las raíces de las plantas vasculares, se denomina genéricamente micorriza (Kendrick, 1992; Brundrett, 1991). Se reconocen al menos siete tipos de asociaciones (Smith y Read, 1997). La micorriza arbuscular (MA), que ocurre entre plantas y hongos endomicorrízicos, es la más común (Trappe, 1987). Se estima que más del 80% de las plantas terrestres forman este tipo de asociación, muchas de las cuales son de especial interés agronómico (Smith y Read, 1997). La principal característica de este tipo de micorriza es que, la colonización implica penetración de las hifas en células individuales del tejido radicular y la formación intracelular de una estructura

arbuscular, producto de la división dicotómica de las hifas.

Menos común es la simbiosis que se establece entre las plantas y hongos ectomicorrízicos (ECM), que a diferencia de las endomicorrizas, colonizan la raíz externamente, formando un “manto fúngico”, extendiendo las hifas entre las células de la raíz hospedante, hasta constituir una estructura denominada *Red de Hartig* (Brundrett *et al.*, 1996). A este último tipo de asociación corresponde la micorriza del género *Nothofagus* (Harley y Harley, 1987; Brundrett *et al.*, 1996).

La distribución de los hongos implicados en esta simbiosis varía geográficamente y en cuanto a la especificidad de la planta que colonizan. Hongos del género *Pisolithus* se encuentran a través de todos los continentes formando micorrizas con distintas especies hospedantes y consecuentemente con un carácter universal (Alexander y Hogberg, 1986; Bougher y Malajczuk, 1990). Las especies con distribución geográfica reducida presentan mayor especificidad de hospedante. Tal es el caso de *Descolea antarctica*, que se encuentra en los bosques de *Nothofagus* de Sudamérica y por lo tanto sólo es simbiote de especies pertenecientes a este género y su frecuencia de micorrización es menor (Valenzuela, 1993; Álvarez *et al.*, 2003).

Garrido (1988) describe por primera vez morfológica y anatómicamente micorrizas del género *Nothofagus* y realiza ensayos de inoculación con cultivos puros de hongos. Posteriormente Godoy y Palfner (1997) y Palfner (2001) comienzan con una clasificación sistemática de las micorrizas en *Nothofagus spp.* del sur de Chile. Subsiguientemente Álvarez *et al.* (2001, 2003, 2004, 2005, 2006), verificaron que una de las estrategias por medio de la cual la micorriza favorece el desarrollo de la planta es debido a una absorción mejorada de fósforo bajo distintas condiciones de pH y

fósforo disponible.

Se encontró, además que la presencia de micorrizas en *N. dombeyi* sometidos a estrés hídrico, favoreció el desarrollo y la calidad de la planta (Gacitúa, 2005), junto a una eficiente mantención de la actividad fotosintética (Olivares, 2005).

En efecto, la micorriza presenta distintos beneficios para la planta, entre los que se puede incluir: protección contra hongos parásitos o nemátodos (Duchesne *et al.*, 1989; Grandmaison *et al.*, 1993; Newsham *et al.*, 1995; Little y Maun, 1996; Cordier *et al.*, 1998, Morin *et al.*, 1999); cambios en la arquitectura de la raíz, que le facilitan una mayor superficie de absorción (Daniels *et al.*, 1988; Miller *et al.*, 1997) y beneficios relacionados en general con una absorción mejorada (Russell, 1977; Marschner, 1995). Se han reportado otros efectos no relacionados con beneficios nutricionales tales como los cambios en las relaciones hídricas entre el suelo y la raíz (Brundrett, 1991; Smith y Read, 1997) que involucran ajuste osmótico (Augé, 2001) y mayor captación de agua gracias a las hifas presentes en el suelo, sin embargo, las ventajas permanecen menos claras e implican la asociación con MA.

Finalmente, existe una serie de estudios en los que se pueden establecer algún tipo de relación, entre asociaciones del tipo MA y sus respectivas especies micorrícicas hospedantes, donde la presencia de hongos podrían proteger del daño oxidativo en condiciones de estrés hídrico. En este sentido, se ha observado que en raíces de leguminosas aparecen dos isoformas de SOD, no presentes en sus raíces sin micorrizar (Palma *et al.*, 1993). Otro estudio también mostró que en AM la actividad de SOD fue mayor, comparada con raíces de plantas sin micorrizar (Ruiz-Lozano y Azcón, 1996). Recientemente, se observó que en raíces con AM sometidas a estrés

hídrico, la actividad enzimática antioxidante representada por la enzima GR logró proteger del daño oxidativo producido por la limitante hídrica (Ruiz-Lozano *et al.*, 2001; Porcel *et al.*, 2003).

A pesar de esto, no existe una correspondencia unívoca entre las micorrizas, la protección frente al daño oxidativo producto de las condiciones de estrés hídrico y el aumento de las actividades enzimáticas antioxidantes y poco es lo que sabe aún de la relación simbiótica de hongos ectomicorrízicos con raíces de árboles nativos chilenos.

Dado que existe una creciente atención en *N. dombeyi* debido a su potencial riqueza genética (Premoli, 1997), como recurso maderable económicamente importante (Alberdi *et al.*, 1985; Veblen *et al.*, 1996) y es una especie capaz de desarrollarse en condiciones estresantes, siendo pionera en la colonización de suelos pobres o ambientalmente degradados (Grosse y Quiroz, 1999). Se postula que uno de los mecanismos implicados en estas características, es la relación simbiótica y protectora con hongos ectomicorrízicos; lo cual resulta especialmente relevante en el contexto de procesos silviculturales de viverización para *N. dombeyi*. Esta asociación induciría en la planta un aumento de los sistemas antioxidantes enzimáticos SOD, CAT, APX y GR durante períodos de estrés hídrico, mientras que esta mayor actividad enzimática antioxidante protegería a la planta de fenómenos tales como peroxidación lipídica, denaturación de proteínas o daños en ácidos nucleicos, evaluado en parte a través de los marcadores de estrés oxidativo,  $H_2O_2$  y MDA. Este conjunto de eventos finalmente facultaría a la planta para su persistencia en programas de reforestación o plantaciones comerciales.

### **2.3. Hipótesis general**

Plántulas de *N. dombeyi* micorrizadas selectivamente bajo condiciones experimentales, presentarían mayor protección frente al daño oxidativo generado por estrés hídrico, que las plántulas sin micorrizar.

### **2.4. Hipótesis específicas**

Plántulas de *N. dombeyi* no micorrizadas sometidas a estrés hídrico presentarían mayor daño oxidativo en comparación con aquellas micorrizadas y bajo condiciones hídricas normales.

Los sistemas enzimáticos antioxidantes aumentarían en raíces de plántulas de *N. dombeyi* micorrizadas con respecto a las sin micorrizar.

### **2.5. Objetivo general**

Caracterizar las respuestas de los sistemas antioxidantes en situaciones de estrés hídrico, en plántulas de *N. dombeyi* micorrizadas y sin micorrizar, en condiciones experimentales de invernadero.

## 2.6. Objetivos específicos

Cuantificar los marcadores de estrés oxidativo  $H_2O_2$  y MDA provocado por estrés hídrico en raíces micorrizadas y sin micorrizar de plántulas de *N. dombeyi*, en condiciones controladas de invernadero.

Cuantificar las actividades enzimáticas antioxidantes SOD, CAT, APX y GR, inducidas por estrés hídrico en raíces micorrizadas y sin micorrizar de plántulas de *N. dombeyi*, en condiciones experimentales de invernadero.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Materiales

Pipetas volumétricas, matraces, vasos de precipitado, placas Petri, material de vidrio en general, morteros y pistilos de Schott. Homogenizador Jürgens Type RM 90, Bremen, Alemania. pHmetro, balanza analítica y semianalítica, espectrofotómetro UV-Visible Shimadzu. Destilador de agua, desionizador de agua Barnsted, centrífuga refrigerada de Eppendorf, micropipetas Trasferpette de Brand. Cámara de cultivo Scico. Microtubos y puntas de pipeta de Eppendorf. Cubetas de cuarzo provistas por Brand. Nitrógeno líquido adquirido en Centro de Inseminación Artificial, Valdivia. Vermiculita y sustrato tierra de corteza adquirido en CEFOR. Sondas TDR de EijelKamp. Agar-Melin-Norkrans modificado (MNM), Agar-Malta de Merck. Peroxidasa Tipo IV de rábano picante y Cu/Zn SOD de hígado bovino Polivinilpirrolidona. NBT\*2HCl, L-metionina, riboflavina, Tritón X-100, glutatión oxidado, NADPH de Calbiochem. Reactivo de Bradford, albúmina sérica bovina (BSA, Sigma Chem.), de Bio-Rad.  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , KCl,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , EDTA sal disódica,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ascorbato, 4-aminoantipirina, fenol, ácido 2-tiobarbitúrico,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Tris-HCl, HCl, ácido tricloroacético, 2- $\beta$ -mercaptoetanol, de Merck. Hojas de aluminio Alusafoil, bolsas plásticas, tijeras, pinzas, malla plástica, algodón hidrófilo, ampolletas fluorescentes Phillips de 20 W adquiridos en comercios locales.

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Cultivo de plántulas de *Nothofagus dombeyi*

Las plantas de *N. dombeyi* originadas a partir de semillas procedentes del sector Raulintal (40° S, 72° E) X región, Chile, se adquirieron en el Centro Experimental Forestal (CEFOR). Antes de ser transplantadas, las plántulas de *N. dombeyi* se pesaron para determinar su peso fresco. El trasplante se realizó desde los contenedores a macetas plásticas de volumen aproximado 2 L con el sustrato de corteza esterilizado en autoclave a 121 °C, 1 atm de presión durante 50 min. De esta manera se obtienen condiciones semiestériles durante el experimento.

Las plantas transplantadas se aclimataron en el vivero durante un mes, luego de lo cual se establecieron en invernadero a 90 % de humedad relativa, 12 °C e intensidad lumínica de 20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; por 12 h. diarias

### 3.2.2. Cultivo de los hongos *Pisolithus tinctorius* y *Descolea antarctica*

*P. tinctorius* se cultivó a partir de muestras cedidas por el centro de estudios ambientales y tecnología de Bremen, Alemania y se realizó en placas Petri con medio Agar- Melin-Norkrans modificado (MNM) durante 2 semanas. A continuación, se dispusieron tres discos de medio MNM con micelio masificado en frascos de 1 L que contenían una mezcla de 65 g de vermiculita y 300 mL de medio MNM esterilizados por 20 min. a 121 °C y 1 atm. La masificación del inóculo se realizó en

cámara de cultivo durante 4 semanas.

*D. antarctica* se cultivó sobre la base de una selección de muestras aisladas en el Instituto de Microbiología de la Universidad Austral de Chile, provenientes del bosque templado de *N. dombeyi* en el Parque Nacional Puyehue (41° S, 72° E) X Región, Chile. El cultivo se realizó en forma separada en placas Petri con Agar-Malta al 2% mantenidas en cámara de cultivo durante 4 semanas.

Para la masificación del micelio se prepararon frascos que contenían como sustrato sólido 100 g de vermiculita mezclado con 400 mL de caldo malta al 1% para *D. antarctica* y 100 g de vermiculita con 400 mL de medio MMN para *P. tinctorius*, una vez llenados los frascos de vermiculita impregnada, se esterilizaron por 20 min., 121 °C y 1 atm.

De las placas donde el micelio se masificó, se cortaron tres discos con un tubo de ensayo previamente esterilizado en un mechero. Los discos se depositaron en forma equidistante al interior de cada frasco. Posteriormente, cada frasco se llevó a la cámara de cultivo por 4 semanas, hasta desarrollo visible del micelio vegetativo como potencial inóculo en el ensayo experimental.

### **3.2.3. Inoculación de *N. dombeyi***

La inoculación se realizó con 30 g de vermiculita-medio de cultivo que contiene el micelio del hongo ectomicorrízico *D. antarctica*, incorporándolo cerca de las raíces jóvenes a través de un agujero realizado en el sustrato de los contenedores de las

plántulas. Para *P. tinctorius* se utilizó la misma técnica de inoculación con 15 g de inóculo.

#### **3.2.4. Evaluación de la formación de ectomicorrizas**

Después de lograda la ectomicorrización en el bioensayo de invernadero, la presencia de la *Red de Hartig*, característica morfológica de las ectomicorrizas, confirmó o no la formación de la simbiosis. Adicionalmente, se observó el color, grosor, textura y otros cambios en la morfología de la raíz, características que varían en plántulas micorrizadas (Brundrett *et al.*, 1996).

#### **3.2.5. Medición del nivel hídrico en el suelo**

Las variables hídricas corresponden a mediciones realizadas con sondas TDR (Time Domain Reflectometry, IMKO), que es una medida del contenido hídrico por volumen (2 L).

Los potenciales hídricos del suelo medidos corresponden a los siguientes valores:

Para el nivel de irrigación normal (8,5 - 19,5%): -0,07 a -0,09 MPa.

Para el nivel denominado estrés 1: (3,6 - 5,6): -1 a -1,5 MPa.

Para el nivel denominado estrés 2 (1 - 3%): -1,6 a -2,1 MPa.

El nivel de recuperación implica un potencial hídrico de suelo igual al normal.

Los niveles hídricos fueron monitoreados cada cinco días, durante el período experimental. A los contenedores con valores bajo el rango se les agregó agua hasta alcanzar nuevamente el valor de referencia.

### **3.2.6. Fertilización**

Se realizó por riego sólo una vez, antes de iniciar los tratamientos de estrés hídrico. Se aplicó una solución “Knopschen” (1:3) desarrollada por Ziegler (1998) y que contiene 143 mg/L de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 88 mg/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 46 mg/L de  $\text{KCl}$ , 146 mg/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,6 mg/L de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1 mg/L de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,04 mg/L de  $\text{ZnCl}_2$  y 0,007 mg/L de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

### **3.2.7. Diseño experimental**

Las plantas de *N. dombeyi* micorrizadas fueron sometidas a una matriz de tratamientos donde se consideró un tratamiento de fertilización más su control sin fertilización, dos tratamientos de inoculación y los respectivos controles, dos niveles de estrés hídrico más un control y un nivel de recuperación. El Contenido Hídrico por Volumen de 8,5-19,5 % se consideró como un nivel sin estrés hídrico. El diseño implica un total de 120 plántulas, 5 por cada tratamiento.

### 3.2.8. Obtención de las muestras

Luego de 4 semanas posteriores a la inoculación, se inició la disminución del nivel hídrico. Una vez alcanzado el nivel hídrico deseado, éste es mantenido durante 4 semanas. Posteriormente, las plántulas fueron procesadas para la obtención de las muestras, que se prepararon a partir de las raíces más finas, que corresponden a las de mayor actividad fisiológica.

Para esto, se elimina la tierra de la raíz con pincel, pinza y sacudiéndola suavemente. De esta manera se obtienen aproximadamente 2 g en peso fresco de raíces finas por cada planta, en aproximadamente 30 min.

Las raíces así obtenidas son empacadas en una malla de material plástico, envueltas en papel aluminio, rotuladas y sometidas a choque térmico en nitrógeno líquido. Los empaques consisten en aproximadamente 1 g para las actividades enzimáticas, 0,5 g para  $H_2O_2$  y 0,5 g para MDA. Posteriormente el material es almacenado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su homogenización.

Para la obtención de las proteínas solubles, las raíces almacenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  son colocadas nuevamente en nitrógeno líquido y, aún empacadas, son molidas en un mortero enfriado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sobre hielo y con nitrógeno líquido. Del tejido radicular obtenido, 0,5 g se mezclan con 20 mL de tampón fosfato de extracción 50 mM, pH 7,8; 0,1 mM de EDTA y 0,5 g/mL de polivinilpirrolidona para cuantificar SOD y CAT (Lester, 2004). Para APX y GR; 0,5 g de tejido radicular son mezclados en 20 mL del mismo medio enriquecido con 10 mM de B-mercaptoetanol y 1 mM de ascorbato fresco. La homogenización se realizó en el homogenizador de cuchillas durante 4

minutos y a 4 °C. El extracto es filtrado a través de una capa de algodón, se dispone en 10 microtubos de 1,5 mL, los cuales posteriormente serán centrifugados a 20000 g por 20 min. a 4 °C. El sobrenadante se extrae y se deposita en alícuotas de volumen apropiado en microtubos, los cuales serán sometidos a choque térmico en nitrógeno líquido y luego almacenados a -80°C hasta el momento de la realización de las determinaciones (Lester, 2004).

Para la cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y MDA se homogenizaron muestras de tejido radicular de entre 0,3 - 0,5 g en un mortero enfriado a -20 °C, sobre hielo y con nitrógeno líquido y al momento de realizar el ensayo (Lester, 2004).

Las actividades enzimáticas y la cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y MDA fueron seguidas espectrofotométricamente a temperatura ambiente de 25 °C aproximadamente.

### **3.2.9. Evaluación del estrés oxidativo en raíces**

#### **3.2.9.1. Malondialdehído (MDA)**

Malondialdehído es un producto de la peroxidación de lípidos de membrana y se cuantificó según la técnica de Halliwell & Gutteridge (1989).

En este ensayo el MDA (proveniente de la muestra) se une al ácido tiobarbitúrico (TBA, reactivo) formando un aducto con un máximo de absorción a 532 nm (Ec. 1).

La absorbancia medida a esta longitud de onda es proporcional a la concentración de MDA presente en la muestra.

**MDA + TBA → MDA-TBA**

Ec. 1

Se prepararon las siguientes soluciones *stock*:

Tampón fosfato de potasio 100 mM, pH 7,4 y ácido clorhídrico 0,25 M a partir de HCl comercial. Ambas soluciones se almacenaron en envases plásticos a 4 °C durante 30 días. MDA en HCl 0,25 M; 10,626 nmol/mL.

La mezcla de reacción contiene 15 % p/v de ácido tricloracético; 0,1 % p/v de butilhidroxitolueno y 0,375 % de TBA en HCl 0,25 M. Esta mezcla se almacenó a 4 °C en envase plástico durante un período máximo una semana.

Las raíces se homogenizaron en 10 mL del tampón fosfato de potasio 100 mM, pH 7,4 y como se describió previamente. El homogenizado se filtró por una capa de algodón y se centrifugó a 15000 g por 20 min a 4 °C.

El cromógeno se formó agregando 200 µL del sobrenadante obtenido a 1 mL de la mezcla de reacción y se incubó a 100 °C durante 30 min. Después de enfriar a temperatura ambiente, los tubos se centrifugaron a 800 g por 5 min. El sobrenadante se utilizó para la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro a 532 nm.

La peroxidación lipídica fue estimada como el contenido de Sustancias Reactivas con Ácido 2-Tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés) y expresadas como equivalentes de MDA. Para esto se construyó una curva de calibración utilizando MDA en el rango de concentración de 0,1 – 10 nmol, a partir del *stock* de MDA. La concentración de MDA se obtuvo mediante la ecuación de la recta obtenida.

### 3.2.9.2. Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Se cuantificó con un método de oxidaciones acopladas con peroxidasa de rábano picante (Frew *et al.*, 1983).

En este método el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente en la muestra se acopla oxidativamente con 4-aminoantipirina y fenol, en presencia de peroxidasa. La reacción genera un producto quinonaimina coloreado con un máximo de absorción a 505 nm (Ec. 2). La absorbancia medida a esta longitud de onda es proporcional a la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente en la muestra.



Se prepararon 100 mL de la siguiente mezcla de reacción:

0,234 g de fenol; 0,10 g de 4-aminoantipirina; 1,0 mL de tampón fosfato 0,1 M, pH 6,9; peroxidasa de rábano picante, 2,0 E-8 M; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2,5 μM.

Las raíces se homogenizaron como se describió anteriormente en HCl 25 mM. Este homogenizado se filtró a través de cuatro capas de algodón, posteriormente, el filtrado resultante fue neutralizado a pH 7,0. De esta manera se obtuvo un volumen aproximado de 6 mL, el cual fue agregado a 4 mL de la mezcla de reacción. El cromógeno formado es medido a 505 nm de longitud de onda.

La curva de calibración se elaboró de acuerdo a Frew *et al.* (1983), utilizando la ecuación de la recta para el cálculo de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 3.2.10. Evaluación de la actividad enzimática total en raíces

#### 3.2.10.1. Superóxido Dismutasa (SOD)

La cuantificación de SOD se realizó mediante un ensayo competitivo con azul nitrotetrazolio cloruro (NBT, por sus siglas en inglés), el cual reacciona y elimina el  $O_2^{\bullet-}$ . En este ensayo, riboflavina es fotoquímicamente excitada (Ec.3.1). En dicho estado, riboflavina es capaz de oxidar a un donante de electrones (L-metionina), luego de lo cual el colorante se reduce a una semiquinona, proceso en el cual reduce el  $O_2$  a  $O_2^{\bullet-}$  (Ec.3.2). En este punto, al anión  $O_2^{\bullet-}$  dismuta a  $H_2O_2$  y  $O_2$  catalizado por SOD (Ec.3.3) o bien, reduce a NBT, originando un precipitado formazán de color púrpura insoluble (Ec. 3.4).

La concentración de este último compuesto es determinada espectrofotométricamente a 560 nm y resulta ser inversamente proporcional a la concentración de SOD en la muestra (Beyer y Fridovich, 1987).



**$O_2^{\bullet-} + NBT \rightarrow$  Precipitado formazán Ec.3.4**

Se prepararon disoluciones *stock* de los siguientes reactivos:

L-metionina, 300 mg / 10 mL; NBT, 14,1 mg / 10 mL; riboflavina, 4,4 mg / 100 mL, Tritón X-100, 1%; en frascos recubiertos con papel aluminio y almacenados por un período máximo de 30 días a 4 °C.  $K_2HPO_4$  50 mM y  $KH_2PO_4$  50 mM y tampón fosfato 50 mM, pH 7,8; que se almacenaron en envases plásticos a 4 °C durante un período máximo de 30 días. SOD 1,0 mg / mL almacenada a -20° C en alícuotas adecuadas.

A partir de estas disoluciones se preparó otra de 50 mL que contiene 50 mM de tampón fosfato, pH 7,8; 0,1 mM de EDTA; 9,9 mM de L-metionina; 57  $\mu$ M de NBT; 0,9  $\mu$ M de riboflavina; 0,025% de Tritón X-100. Esta disolución se preparó una vez cada día y fue utilizada solamente fresca. Se toma 1 mL de esta disolución y se agregan 5  $\mu$ L de muestra a este volumen. La reacción se inició al iluminar los microtubos con lámparas fluorescentes de 20 W en una caja revestida con papel de aluminio durante 7 min., luego de lo cual se lee la absorbancia a 560 nm de longitud de onda.

Para la elaboración de la curva de calibración se reemplazó la muestra por distintos volúmenes de la disolución *stock* de SOD 1,0 mg / mL que contenían la masa de enzima adecuada según Beyer y Fridovich (1987).

La unidad de actividad enzimática es definida como la cantidad de SOD en  $\mu$ g que es capaz de inhibir el 50% de la fotoreducción de NBT en las condiciones establecidas.

( $U \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ ).

### 3.2.10.2. Catalasa (CAT)

Se cuantificó mediante una reacción que utiliza el sustrato de la enzima,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en bajas concentraciones. La descomposición enzimática del  $\text{H}_2\text{O}_2$  es seguida directamente (Ec. 4), mediante espectrofotómetro UV-Visible, por la disminución de la absorbancia a 240 nm (Aebi, 1984).



Se prepararon disoluciones *stock* de los siguientes reactivos:

Tampón fosfato 50 mM, pH 7,0 (con base  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ );  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 mM fresco, que se preparó a partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% en el tampón dado. El tampón se almacenó a 4 °C durante un período máximo de 30 días, mientras que el peróxido se preparó durante el día, eliminando lo que no se utilizó en el transcurso de 24 hrs.

En este ensayo se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de muestra a un volumen de tampón de 600  $\mu\text{L}$  luego de lo cual la mezcla se homogenizó. La reacción se inicia agregando 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  diluido. Se sigue el descenso de la absorbancia a 240 nm de longitud de onda, durante 3 min.

La diferencia en la absorbancia por unidad de tiempo es una medida de la actividad CAT, expresada como  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot.}$

### 3.2.10.3. Glutación reductasa (GR)

Se basa en una reacción de oxido-reducción acoplada. En este ensayo GR cataliza la reducción de GSSH a GSH, en una reacción dependiente de NADPH, el cual es oxidado a NADP<sup>+</sup> (Ec. 5). Esta oxidación se sigue espectrofotométricamente a 340 nm de longitud de onda (Carlberg y Mannervik, 1985).



Se prepararon disoluciones *stock* de los siguientes reactivos:

Tampón fosfato de potasio 0,2 M; pH 7,0 con 0,2 mM de EDTA; 2 mM NADPH, en 10 mM de Tris-HCl pH 7,0; 20mM de GSSH en agua destilada y desionizada. NADPH y GSSH se dispusieron en alícuotas de 500 µL y se almacenaron a -20°C, hasta el momento de su utilización, dentro de un período máximo de 30 días. El tampón se almacenó a 4 °C durante un período máximo de 30 días.

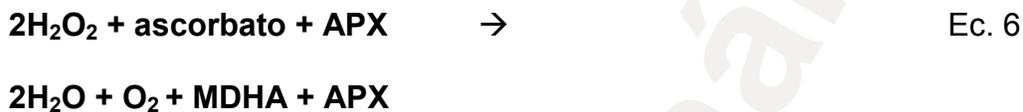
En una cubeta de 1 mL se agregaron 750 µL de tampón más 150 µL de muestra, se mezcló, se agregaron 50 µL de GSSH en agua y se mezcló.

La reacción se inició agregando 50 µL de NADPH en Tris-HCl. Se siguió el descenso de la absorbancia a 340 nm de longitud de onda, durante 2 min.

La diferencia en la absorbancia por unidad de tiempo es una medida de la actividad GR, expresada como nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot.

#### 3.2.10.4. Ascorbato peroxidasa (APX)

Se basa en una reacción de oxido-reducción acoplada. En este ensayo APX cataliza la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ , en una reacción dependiente de ascorbato (AsA), el cual es oxidado a Malondehidroascorbato (MDHA). Esta oxidación se sigue espectrofotométricamente a 290 nm de longitud de onda (Amako *et al.*, 1994).



Se prepararon disoluciones *stock* de los siguientes reactivos:

50 mM de ascorbato en agua destilada y desionizada; 1,0 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en tampón. Ambas soluciones se prepararon durante el día, eliminando lo que no se utilizó en el transcurso de 24 hrs.

A una cubeta de cuarzo de volumen 1,0 mL se agregaron 840  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato 50 mM; pH 7,0; 50  $\mu\text{L}$  de muestra y se mezcló; se agregaron 0,5 mM de AsA y se inició la reacción con 0,1 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se siguió el descenso de la absorbancia a 290 nm de longitud de onda, durante 1 min.

La diferencia en la absorbancia por unidad de tiempo es una medida de la actividad APX, expresada como  $\text{mmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot.}$

### **3.2.11. Cuantificación de Proteínas**

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método azul de Coomassie de Bradford (Bradford, 1976), modificado para microensayo con el reactivo del laboratorio "Bio-Rad", según indicaciones del fabricante. La curva estándar se preparó con albúmina sérica bovina, según indicaciones del fabricante.

Para el cálculo de la concentración de proteínas se utilizó la ecuación de la recta resultante.

### **3.2.12. Análisis estadístico**

Los parámetros evaluados en los ensayos enunciados se sometieron a análisis de varianza. Para las variables no paramétricas, los datos se transformaron sacando la raíz cuadrada de cada observación antes de proceder al análisis de la varianza (Stell y Torrie 1985). Para detectar si existieron diferencias significativas específicas entre los tratamientos se utilizó la prueba de rango múltiple de Tukey y Bonferroni, a un nivel de significancia de 5%, para ambas pruebas (Stell y Torrie 1985).

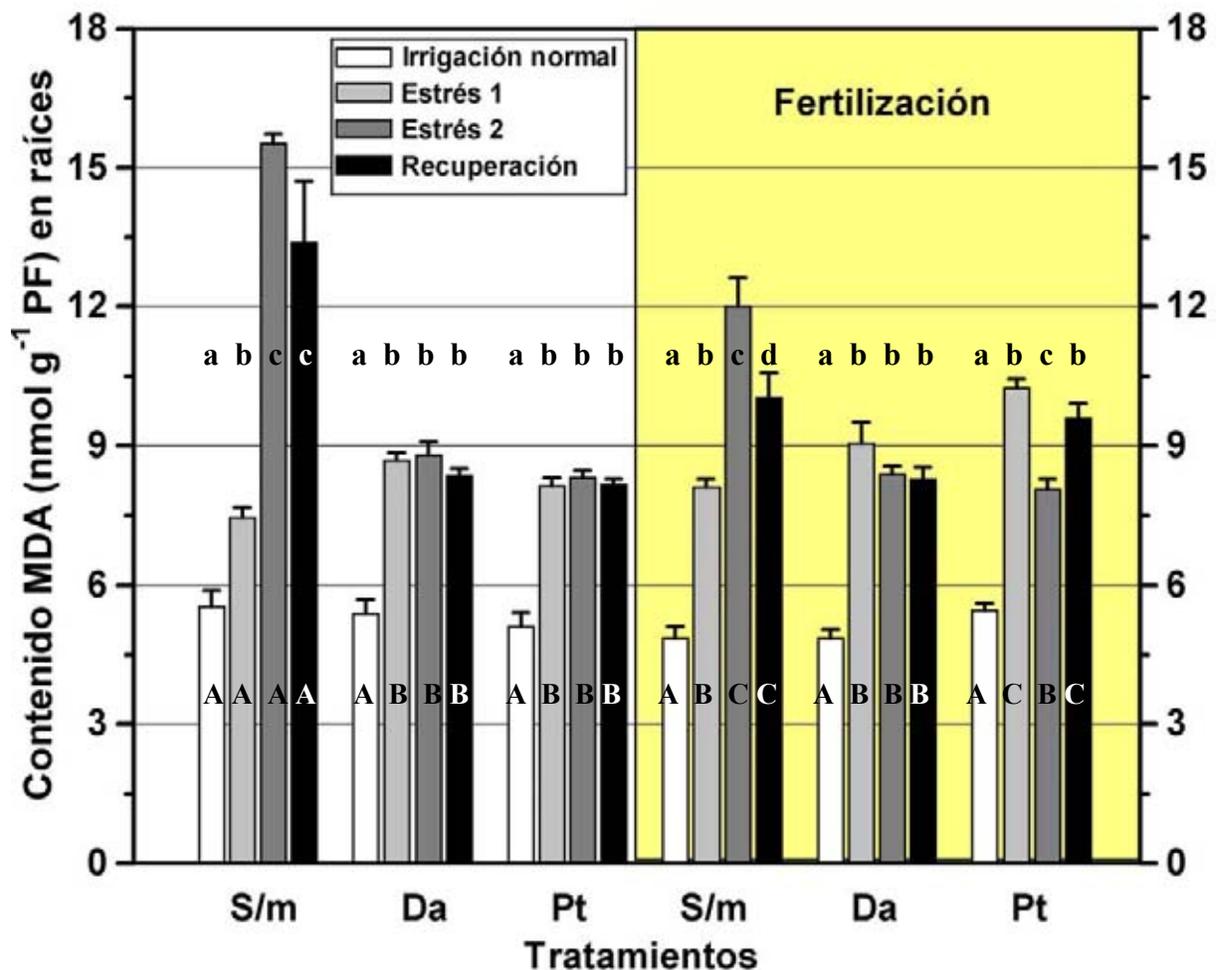
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Malondialdehído (MDA)

#### 4.1.1. Efecto del nivel hídrico en el contenido de MDA

En general, hubo un incremento en el contenido de MDA en todos los tratamientos, a medida que disminuyó el contenido hídrico del sustrato; es decir, cuando la planta fue sometida a un mayor estrés hídrico, el contenido de MDA en las raíces de las plantas estudiadas aumentó. Este efecto fue evidente cuando se compararon los niveles de estrés y recuperación con los respectivos niveles de irrigación normal y es aún más notable en los tratamientos S/m con/sin fertilización (Fig.1).

En los tratamientos S/m sin fertilización, en los niveles de estrés 2 y recuperación y en S/m fertilizado, en el nivel de estrés 2, los contenidos de MDA fueron los máximos de todo el experimento. En el tratamiento S/m sin fertilizar, en el nivel de estrés 1, el contenido de MDA fue de  $7,46 \text{ nmol g}^{-1} \text{ PF}$ ; 34,6 % superior al nivel control denominado irrigación normal ( $5,55 \text{ nmol g}^{-1} \text{ PF}$ ). En el nivel de estrés 2, el contenido de MDA fue de  $15,5 \text{ nmol g}^{-1} \text{ PF}$ ; 179,8 % superior al control y 107,9 % superior al nivel de estrés 1. Re-hidratar el sustrato para verificar la recuperación de la planta al estrés, no causó efectos estadísticos significativos en comparación al nivel de estrés 2 y el contenido de MDA en este nivel de recuperación ( $13,38 \text{ nmol g}^{-1} \text{ PF}$ ) fue 141,2 % superior al nivel de irrigación normal y 79,2 %



**Fig. 1: Efectos del nivel hídrico, fertilización y micorrización en el contenido de MDA en raíces.** Plantas sin micorrizas (S/m); *N. dombeyi* en simbiosis con *D. antarctica* (Da); *N. dombeyi* en simbiosis con *Pisolithus tinctorius* (Pt). Cada columna representa la media  $\pm$  S.E. de 3 plantas. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los mismos niveles de irrigación de cada tratamiento. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre los distintos niveles de irrigación, dentro del mismo tratamiento. Ambos análisis estadísticos según las comparaciones múltiples del test de Bonferroni ( $p < 0,05$ ) y Tukey ( $p < 0,05$ ).

superior al nivel de estrés 1. Para S/m fertilizado, los contenidos de MDA observados fueron de 4,86 nmol g<sup>-1</sup> PF en el control; 8,13 nmol g<sup>-1</sup> PF en el nivel del estrés 1; 12,02 nmol g<sup>-1</sup> PF en el nivel de estrés 2 y 10,04 nmol g<sup>-1</sup> PF en el nivel de recuperación. El contenido de MDA en el nivel de estrés 1 fue 67,1 % superior al control. En el estrés 2, el contenido de MDA fue 147,1 % superior al nivel de irrigación normal y 47,9 % superior al nivel de estrés 1. En el nivel de recuperación, el contenido de MDA fue 106,4 % superior al nivel de irrigación normal y 23,5 % superior al contenido de MDA observado en el nivel de estrés 1. En este nivel de recuperación se observó un descenso estadísticamente significativo de 16,5 % en el contenido de MDA, respecto al nivel de estrés 2.

Entre los tratamientos Da fertilizado y sin fertilizar, en los niveles de estrés y recuperación, el contenido de MDA aumentó con respecto al control de manera estadísticamente significativa. Sin embargo, a partir del nivel de estrés 1 el contenido de MDA se mantuvo constante, tanto en los niveles de estrés como en los de recuperación. En el tratamiento Da sin fertilizar, los contenidos de MDA fueron de 5,38; 8,68; 8,81 y 8,37 nmol g<sup>-1</sup> PF; para los niveles de irrigación normal, estrés 1, estrés 2 y recuperación, respectivamente. En el nivel de estrés 1 el contenido de MDA fue 61,5 % superior al control. En el nivel de estrés 2 el contenido de MDA fue 63,8 % superior al control y sin diferencia significativa con el nivel de estrés 1. En el nivel de recuperación el contenido de MDA fue 55,7 % superior al control y sin diferencias significativas con el nivel de estrés 1 ni con el estrés 2. En el tratamiento

Da fertilizado, los contenidos de MDA fueron de 4,85; 9,04; 8,39 y 8,29 nmol g<sup>-1</sup> PF; en los niveles de irrigación normal, estrés 1, estrés 2 y recuperación, respectivamente. En el nivel de estrés 1 el contenido de MDA fue 86,2 % superior al control. En el nivel de estrés 2 el contenido de MDA fue 72,9 % superior al control y sin diferencia significativa con el nivel de estrés 1. En el nivel de recuperación el contenido de MDA fue 70,7 % superior al control y sin diferencias significativas con el nivel de estrés 1 y estrés 2, respectivamente.

En el tratamiento Pt sin fertilizar, en el nivel de estrés y en el de recuperación, el contenido de MDA aumentó con respecto al nivel de control de manera estadísticamente significativa, sin embargo, a partir del nivel de estrés 1 el contenido de MDA se mantuvo constante, tanto en los niveles de estrés como en los de recuperación. En el tratamiento Pt sin fertilizar, los contenidos de MDA fueron de 5,12; 8,14; 8,32 y 8,15 nmol g<sup>-1</sup> PF; en los niveles de irrigación normal, estrés 1, estrés 2 y recuperación, respectivamente. En el nivel de estrés 1 el contenido de MDA fue 59,0 % superior al control. En el nivel de estrés 2 el contenido de MDA fue 62,6 % superior al control y sin diferencia significativa con el nivel de estrés 1. En el nivel de recuperación el contenido de MDA fue 59,3 % superior al control y sin diferencias significativas con los niveles de estrés 1 y estrés 2. En el tratamiento Pt fertilizado, los contenidos de MDA fueron de 5,45; 10,25; 8,06 y 9,58 nmol g<sup>-1</sup> PF; para los niveles de irrigación normal, estrés 1, estrés 2 y recuperación, respectivamente. En el nivel de estrés 1 el contenido de MDA fue 88,0 % superior al

control. En el nivel de estrés 2 el contenido de MDA fue 48,0 % superior al control y un 21,3 % menor al nivel de estrés 1. En el nivel de recuperación el contenido de MDA fue 75,7 % superior al control, sin diferencias significativas con el nivel de estrés 1 y 18,8 % superior al nivel de estrés 2.

#### **4.1.2. Efecto de la fertilización en el contenido de MDA**

Como muestra la Fig. 1, los efectos de la fertilización pudieron apreciarse en el tratamiento S/m fertilizado, en los niveles de estrés 1, 2 y recuperación en comparación al tratamiento S/m sin fertilizar en los mismos niveles hídricos. También se observaron diferencias estadísticamente significativas en el tratamiento Pt fertilizado, en los niveles hídricos de estrés 1 y recuperación, con respecto al tratamiento Pt sin fertilización en los niveles hídricos equivalentes. En condiciones de irrigación normal, el contenido de MDA se mantuvo sin diferencias estadísticamente significativas en todos los tratamientos.

El tratamiento S/m fertilizado, en el nivel de irrigación normal, no presentó diferencia estadísticamente significativa con el tratamiento S/m sin fertilizar. En el nivel de estrés 1, el contenido de MDA fue 8,9 % mayor en el tratamiento S/m fertilizado, en comparación a S/m sin fertilizar. En el nivel de estrés 2 el contenido de MDA fue 22,6 % menor en el tratamiento S/m fertilizado respecto a S/m sin fertilizar. En el nivel de recuperación el contenido de MDA fue 25,0 % menor en el tratamiento S/m

fertilizado, en comparación a S/m sin fertilizar. Entre los tratamientos Da con/sin fertilizar, no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos niveles de irrigación.

En el tratamiento Pt fertilizado, en el nivel de irrigación normal, no existió diferencia significativa con el tratamiento Pt sin fertilizar. En el nivel de estrés 1, el contenido de MDA fue 26,0 % superior en el tratamiento Pt fertilizado, en comparación a Pt sin fertilizar. En el nivel de estrés 2 no existió diferencia significativa entre el contenido de MDA de los tratamientos Pt fertilizado, respecto a Pt sin fertilizar. En el nivel de recuperación el contenido de MDA fue 17,5 % mayor en el tratamiento Pt fertilizado, en comparación a Pt sin fertilizar.

#### **4.1.3. Efecto de la micorrización y la especie micorrízica en el contenido de MDA**

En la Fig. 1 se observa que la micorrización tuvo efectos significativos tanto en los tratamientos sin fertilización como en los fertilizados, aunque en diferentes niveles hídricos. En condiciones de irrigación normal, la formación de micorrizas no presentó efectos estadísticamente significativos en el contenido de MDA para ningún tratamiento.

Entre los tratamientos Da y Pt sin fertilización y en todos los niveles hídricos, no existieron diferencias significativas en el contenido de MDA. Para el grupo sin fertilizar, en el nivel de estrés 1, el contenido de MDA fue menor en el tratamiento

S/m, 7,46 nmol g<sup>-1</sup> PF (S/m sin fertilizar), versus 8,68 nmol g<sup>-1</sup> PF (Da sin fertilizar) y 8,14 nmol g<sup>-1</sup> PF (Pt sin fertilizar). En el tratamiento Da sin fertilizar, en el nivel de estrés 1, el contenido de MDA fue 16,4 % mayor a S/m sin fertilizar en el mismo nivel de estrés. En el tratamiento Pt sin fertilizar, en el nivel de estrés 1, el contenido de MDA fue 9,0 % mayor a S/m sin fertilizar en el mismo nivel de estrés. En el tratamiento S/m sin fertilizar, en el nivel de estrés 2, el contenido de MDA alcanzó el valor máximo de todo el experimento, 15,52 nmol g<sup>-1</sup> PF. En el tratamiento Da sin fertilizar, en el nivel de estrés 2, el contenido de MDA fue 43,3 % menor a S/m sin fertilizar en el mismo nivel de estrés. En el tratamiento Pt sin fertilizar, en el nivel de estrés 2, el contenido de MDA fue 46,4 % menor a S/m sin fertilizar en el mismo nivel de estrés. En el tratamiento S/m sin fertilizar, en el nivel de recuperación, el contenido de MDA no presentó diferencia estadística con el estrés 2. En el tratamiento Da sin fertilizar, en el nivel de recuperación, el contenido de MDA fue 37,4 % menor a S/m sin fertilizar en el mismo nivel de estrés. En el tratamiento Pt sin fertilizar, en el nivel de recuperación, el contenido de MDA fue 39,0 % menor a S/m sin fertilizar, en el mismo nivel de estrés.

En el grupo de tratamientos con fertilización, Da fertilizado no presentó diferencias estadísticas significativas en el contenido de MDA dentro del tratamiento, entre los niveles de estrés 1, 2 y recuperación. Así mismo, entre Da fertilizado y S/m fertilizado, en el nivel de estrés 1, no existieron diferencias estadísticas. Lo mismo ocurrió entre Pt fertilizado y S/m fertilizado, en el nivel de recuperación y entre Da y Pt fertilizados,

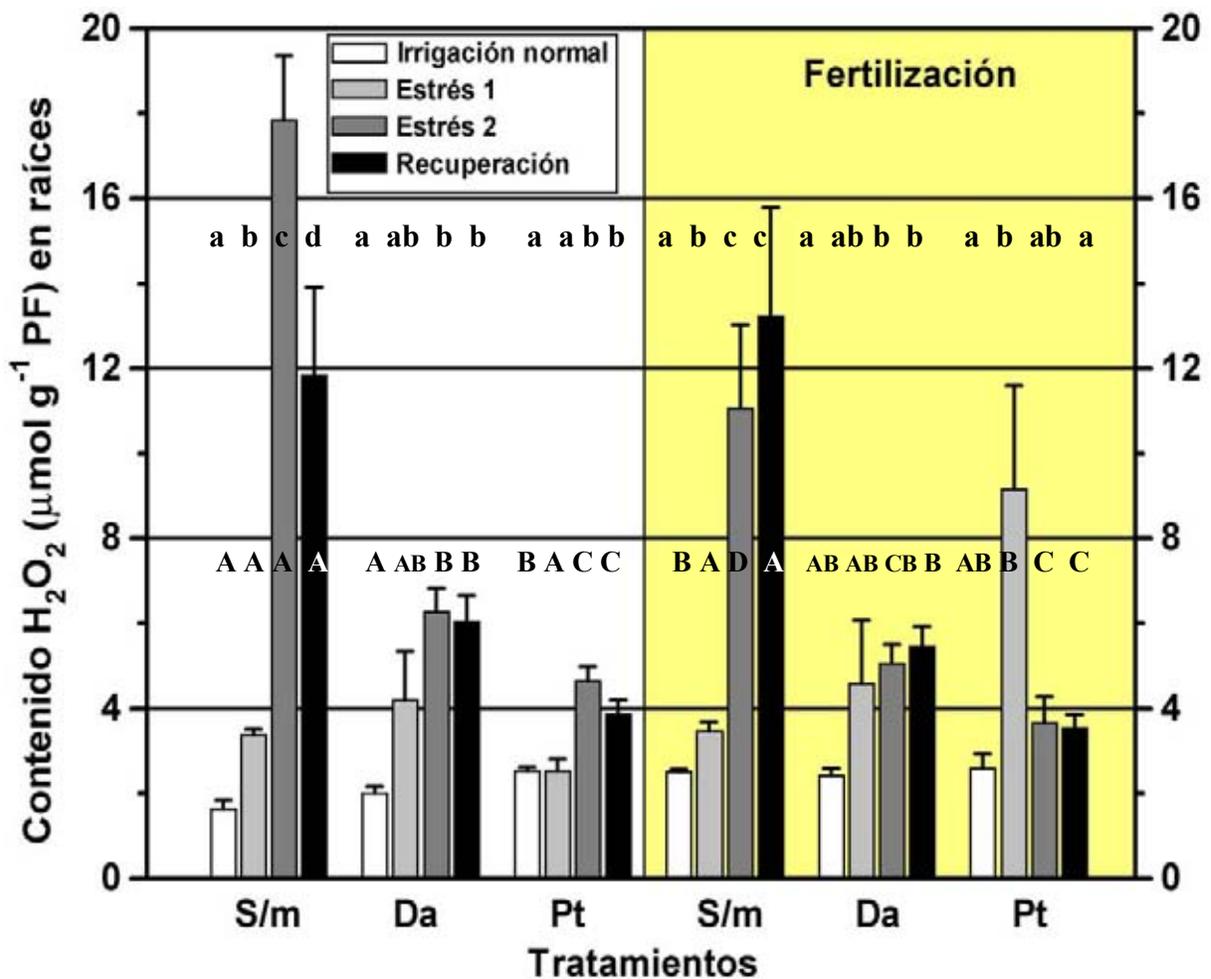
en el nivel de estrés 2. En el nivel de estrés 1, el contenido de MDA fue menor en el tratamiento S/m;  $8,13 \text{ nmol g}^{-1} \text{ PF}$  (S/m fertilizado), versus  $9,04 \text{ nmol g}^{-1} \text{ PF}$  (Da fertilizado) y  $10,25 \text{ nmol g}^{-1} \text{ PF}$  (Pt fertilizado). En el tratamiento Da fertilizado, en el nivel de estrés 1, el contenido de MDA fue 11,2 % mayor a S/m fertilizado en el mismo nivel de estrés. En el tratamiento Pt fertilizado, en el nivel de estrés 1, el contenido de MDA fue 26,1 % mayor a S/m fertilizado y 13,4 % mayor a Da fertilizado en el mismo nivel de estrés. En el tratamiento S/m fertilizado, en el nivel de estrés 2, el contenido de MDA alcanzó el máximo del grupo fertilizado;  $12,02 \text{ nmol g}^{-1} \text{ PF}$ . En el tratamiento Da fertilizado, en el nivel de estrés 2, el contenido de MDA fue 30,2 % menor a S/m fertilizado en el mismo nivel de estrés. En el tratamiento Pt fertilizado, en el nivel de estrés hídrico 2, el contenido de MDA fue 32,9 % menor a S/m fertilizado en el mismo nivel de estrés. En el tratamiento S/m fertilizado, en el nivel de recuperación, el contenido de MDA no presentó diferencia estadística con el nivel de estrés 2. En el tratamiento Da fertilizado, en el nivel de recuperación, el contenido de MDA fue 17,4 % menor a S/m fertilizado en el mismo nivel de régimen hídrico.

## 4.2. Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )

### 4.2.1. Efecto del nivel hídrico en el contenido de $H_2O_2$

Como puede observarse en la Fig. 2, en general hubo un incremento en el contenido de  $H_2O_2$  para todos los tratamientos a medida que disminuyó el contenido hídrico del sustrato, es decir, cuando la planta fue sometida a un mayor estrés, el contenido de  $H_2O_2$  en las raíces de las plantas estudiadas aumentó. Este efecto es evidente cuando se comparan los niveles de estrés y recuperación con los respectivos niveles de irrigación normal y es aún más notable, en los tratamientos S/m con/sin fertilización

En los tratamientos S/m con/sin fertilización, en los niveles de estrés 2 y recuperación, los contenidos de  $H_2O_2$  fueron los máximos de todo el experimento. En el tratamiento S/m sin fertilizar, en el nivel de estrés 1, el contenido de  $H_2O_2$  fue de  $3,36 \mu\text{mol g}^{-1}$  PF; 105,1 % superior al control ( $1,64 \mu\text{mol g}^{-1}$  PF). En el nivel de estrés 2, el contenido de  $H_2O_2$  alcanzó el máximo del experimento;  $17,83 \mu\text{mol g}^{-1}$  PF; 987,7 % superior al control y 430,2 % superior al nivel de estrés 1. Re-hidratar el sustrato para verificar la recuperación ( $11,84 \mu\text{mol g}^{-1}$  PF) implicó un descenso en el contenido de  $H_2O_2$  de 33,6 % en relación al nivel de estrés 2. El contenido de  $H_2O_2$  en este nivel de recuperación fue 622,0 % superior al nivel de irrigación normal y 252,0% superior al nivel de estrés 1. Para S/m fertilizado, los contenidos de  $H_2O_2$



**Fig. 2: Efectos del nivel hídrico, fertilización y micorrización en el contenido de  $H_2O_2$  en raíces.** Plantas sin micorrizas (S/m); *N. dombeyi* en simbiosis con *D. antarctica* (Da); *N. dombeyi* en simbiosis con *Pisolithus tinctorius* (Pt). Cada columna representa la media  $\pm$  S.E. de 3 plantas. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los mismos niveles de irrigación de cada tratamiento. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre los distintos niveles de irrigación, dentro del mismo tratamiento. Ambos análisis estadísticos según las comparaciones múltiples del test de Bonferroni ( $p < 0,05$ ) y Tukey ( $p < 0,05$ ).

observados fueron de  $2,49 \mu\text{mol g}^{-1}$  PF en el control;  $3,46 \mu\text{mol g}^{-1}$  PF durante el nivel de estrés 1;  $11,06 \mu\text{mol g}^{-1}$  PF en el nivel de estrés 2 y  $13,23 \mu\text{mol g}^{-1}$  PF en el nivel de recuperación. El contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el estrés 1 fue 39,0 % superior al control. En el nivel de estrés 2, el contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue 344,1 % superior al nivel de irrigación normal y 219,7 % superior al nivel de estrés 1. En el nivel de recuperación, el contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue 431,3 % superior al nivel de irrigación normal; 282,3% superior al contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$  observado en el nivel de estrés 1 y 19,6% superior al contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el nivel de estrés 2.

Los tratamientos Da fertilizado y sin fertilizar presentaron incrementos estadísticamente significativos en el contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a medida que aumentó el estrés, con respecto al nivel hídrico del control. Esta diferencia fue estadísticamente significativa cuando se compararon los contenidos de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en los niveles de estrés 2 y recuperación, con el contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$  del control, tanto en los tratamientos Da fertilizado y sin fertilizar. En el tratamiento Da sin fertilizar los contenidos de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fueron de  $2,00 \mu\text{mol g}^{-1}$  PF en el nivel del control;  $4,19 \mu\text{mol g}^{-1}$  PF, en el nivel de estrés 1;  $6,26 \mu\text{mol g}^{-1}$  PF, en el nivel de estrés 2 y  $6,03 \mu\text{mol g}^{-1}$  PF en el nivel de recuperación. En el nivel de estrés 1 el contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue 109,2 % superior al control, pero sin diferencia estadística con éste. En el nivel de estrés 2 el contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue 212,6 % superior al control y sin diferencia significativa con el nivel de estrés 1. En el nivel de recuperación, el contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue 201,2 % superior al control y sin diferencias significativas con el nivel de estrés 1 y 2. En el tratamiento

Da fertilizado, los contenidos de  $H_2O_2$  fueron de 2,41; 4,57; 5,07 y 5,45  $\mu\text{mol g}^{-1}$  PF; en los niveles de irrigación normal, estrés 1, estrés 2 y recuperación, respectivamente. En el nivel de estrés 1 el contenido de  $H_2O_2$  fue 90,0 % superior al control, pero sin diferencia estadística. En el nivel de estrés 2 el contenido de  $H_2O_2$  fue 110,3 % superior al control y sin diferencia significativa con el nivel de estrés 1. En el nivel de recuperación, el contenido de  $H_2O_2$  fue 126,5 % superior al control y sin diferencias significativas con el nivel de estrés 1 y 2.

Los tratamientos Pt fertilizado y sin fertilizar presentaron incrementos estadísticamente significativos con respecto al nivel hídrico del control en el contenido de  $H_2O_2$  a medida que aumentó el estrés. Esta diferencia fue estadísticamente significativa cuando se compararon los contenidos de  $H_2O_2$  en el tratamiento Pt sin fertilizar en los niveles de estrés 2 y recuperación con el contenido de  $H_2O_2$  del control. En el tratamiento Pt fertilizado, las diferencias estadísticas se observaron cuando se compararon el nivel de estrés 1 con el nivel del control y recuperación. En el tratamiento Pt sin fertilizar los contenidos de  $H_2O_2$  fueron de 2,52  $\mu\text{mol g}^{-1}$  PF en el nivel del control; 2,53  $\mu\text{mol g}^{-1}$  PF, en el nivel de estrés 1; 4,64  $\mu\text{mol g}^{-1}$  PF, en el nivel de estrés 2 y 3,84  $\mu\text{mol g}^{-1}$  PF en el nivel de recuperación. El contenido de  $H_2O_2$  en el nivel de estrés 1 no presentó diferencia estadística con el control. En el nivel de estrés 2 el contenido de  $H_2O_2$  fue 84,1 % superior al control y 83,8 % superior al nivel de estrés 1. En el nivel de recuperación, el contenido de  $H_2O_2$  fue 52,1 % superior al control, 51,9 % superior al nivel de estrés 1 y sin

diferencia significativa con el nivel de estrés 2. En el tratamiento Pt fertilizado, los contenidos de  $H_2O_2$  fueron de 2,59; 9,15; 3,65 y 3,53  $\mu\text{mol g}^{-1}$  PF; en los niveles de irrigación normal, estrés 1, estrés 2 y recuperación, respectivamente. En el nivel de estrés 1 el contenido de  $H_2O_2$  fue 253,0 % superior al control. En el nivel de estrés 2 el contenido de  $H_2O_2$  fue 40,9 % superior al control y 60,1 % inferior al nivel de estrés 1. En el nivel de recuperación, el contenido de  $H_2O_2$  fue 61,4 % inferior al nivel de estrés 1 y sin diferencias significativas con el control ni con el nivel de estrés 2.

#### **4.2.2. Efecto de la fertilización en el contenido de $H_2O_2$**

Como muestra la Fig. 2, los efectos de la fertilización pudieron observarse entre los tratamientos S/m con/sin fertilización y entre los tratamientos Pt con/sin fertilización. Entre los tratamientos Da con/sin fertilización, el contenido de  $H_2O_2$  no presentó diferencias estadísticas significativas. En el tratamiento S/m fertilizado, el contenido de  $H_2O_2$  en el nivel del control fue 51,9 % mayor que S/m sin fertilizar y en el nivel de estrés 2 el contenido de  $H_2O_2$  fue 38,0 % menor en S/m fertilizado que en S/m sin fertilizar en el mismo nivel hídrico. En el tratamiento Pt fertilizado, el contenido de  $H_2O_2$  en el nivel de estrés 1 fue 161,9 % mayor que el contenido de  $H_2O_2$  en el mismo nivel de estrés del tratamiento Pt sin fertilizar.

#### 4.2.3. Efecto de la micorrización y la especie micorrízica en el contenido de $H_2O_2$

En la Fig. 2 se observa que la micorrización tuvo efectos estadísticamente significativos tanto en los tratamientos sin fertilización como en los fertilizados aunque en diferentes niveles hídricos. En el tratamiento Pt sin fertilizar, en condiciones de irrigación normal, la formación de micorrizas tuvo efectos estadísticamente significativos en el contenido de  $H_2O_2$  con respecto al control.

Entre los tratamientos Da y Pt sin fertilización, los menores contenidos de  $H_2O_2$  se observaron en los niveles de irrigación normal del tratamiento Da sin fertilización y en los niveles de estrés 1, estrés 2 y recuperación del tratamiento Pt sin fertilizar. Las diferencias estadísticas se observaron entre los niveles de irrigación normal, estrés 2 y recuperación de Da sin fertilizar comparado con los mismos niveles de irrigación en el tratamiento Pt sin fertilizar. En el nivel de irrigación normal, el contenido de  $H_2O_2$  fue 26,1 % menor en Da fertilizada que en Pt sin fertilizar. En los niveles de estrés 2 y recuperación, los contenidos de  $H_2O_2$  fueron, respectivamente; 39,7 % y 25,8 % menores en el tratamiento Pt sin fertilizar que en los mismos niveles hídricos de Da sin fertilizar. En el tratamiento Da sin fertilizar, en el nivel de estrés 1, el contenido de  $H_2O_2$  no presentó diferencia estadística con S/m sin fertilizar en el mismo nivel de estrés. En el tratamiento Da sin fertilizar, en el nivel de estrés 2, el contenido de  $H_2O_2$  fue 64,9% menor a S/m sin fertilizar en el mismo nivel de estrés hídrico. En el

tratamiento Da sin fertilizar, en el nivel de recuperación, el contenido de  $H_2O_2$  fue 49,1 % menor a S/m sin fertilizar en el mismo nivel de estrés. En el tratamiento Pt sin fertilizar, en el nivel de estrés 1, el contenido de  $H_2O_2$  fue 24,9 % menor a S/m sin fertilizar en el mismo nivel de estrés. En el tratamiento S/m sin fertilizar, en el nivel de estrés 2, el contenido de  $H_2O_2$  alcanzó el máximo de todo el experimento,  $17,8 \mu\text{mol g}^{-1}$  PF. En el tratamiento Pt sin fertilizar, en el nivel de estrés 2, el contenido de  $H_2O_2$  fue 74,0 % menor a S/m sin fertilizar en el mismo nivel de estrés. En el tratamiento Pt sin fertilizar, en el nivel de recuperación, el contenido de  $H_2O_2$  fue 67,6 % menor a S/m sin fertilizar en el mismo nivel de estrés hídrico.

Entre los tratamientos Da fertilizado y Pt fertilizado, los menores contenidos de  $H_2O_2$  se observaron en los niveles de irrigación normal y estrés 1 del tratamiento Da fertilizado y en los niveles de estrés 2 y recuperación del tratamiento Pt fertilizado. La diferencia estadística se observó entre el nivel de recuperación de Da fertilizado comparado con el nivel de recuperación en el tratamiento Pt fertilizado. En el nivel de estrés 1, el contenido de  $H_2O_2$  fue 99,9 % menor en el tratamiento Da fertilizado que en el mismo nivel hídrico del tratamiento Pt fertilizado, sin embargo, debido a la dispersión de los datos en este tratamiento, esta diferencia no es estadísticamente significativa. Lo mismo se observó cuando se compararon los contenidos de  $H_2O_2$  de los niveles de estrés 2 entre Da y Pt fertilizados. En el nivel de recuperación, el contenido de  $H_2O_2$  fue 27,9 % menor en el tratamiento Pt sin fertilizar que en el mismo nivel hídrico del tratamiento Da sin fertilizar.

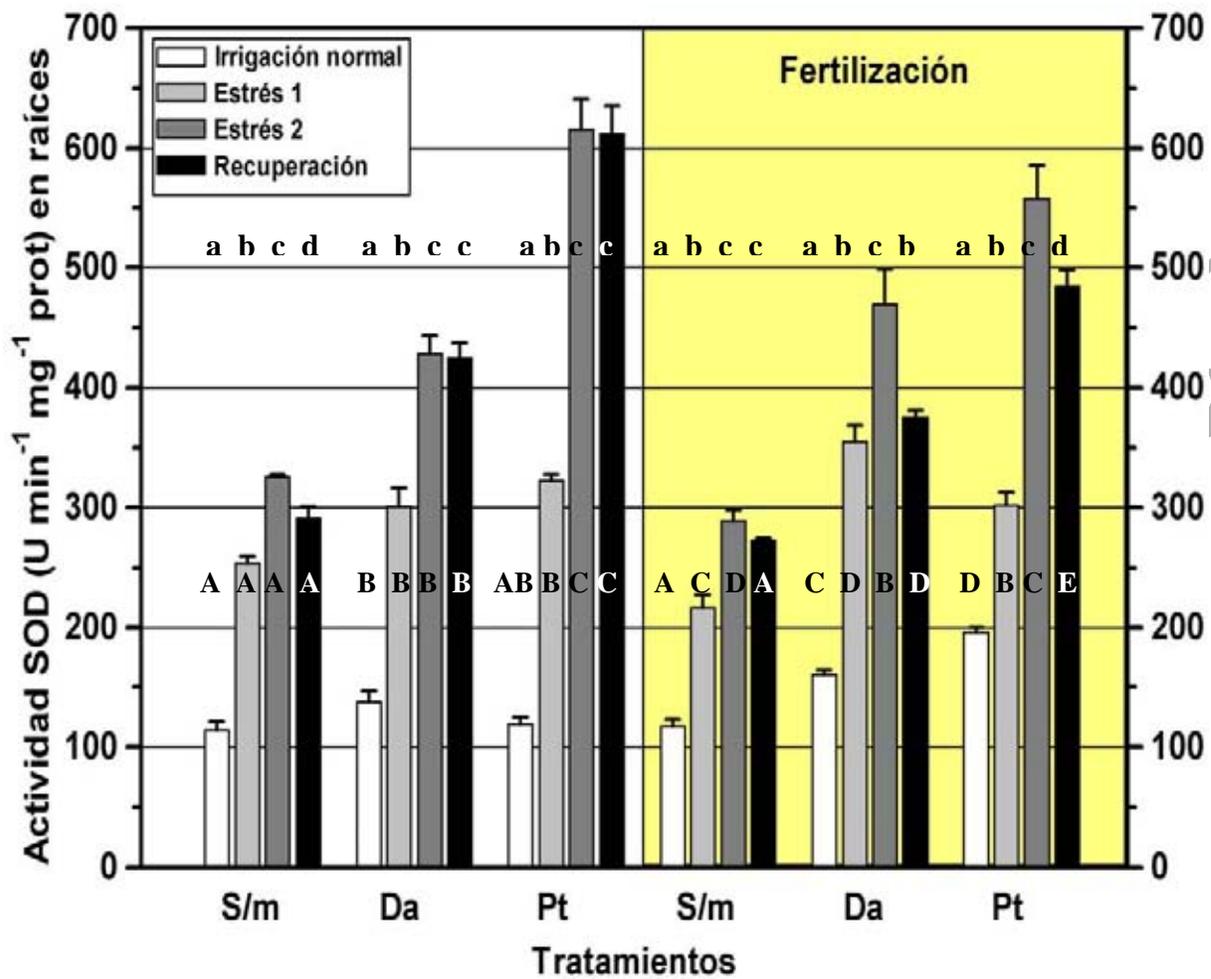
### 4.3. Superóxido dismutasa (SOD)

#### 4.3.1. Efecto del nivel hídrico en la actividad SOD

Como muestra la Fig. 3, en general se observó un aumento de la actividad SOD a medida que aumentó el nivel de estrés hídrico. En todos los tratamientos (S/m, Da y Pt con/sin fertilización), la actividad SOD fue estadísticamente diferente entre los niveles de irrigación normal, de estrés 1 y estrés 2, del mismo tratamiento.

En el grupo S/m sin fertilizar, la actividad SOD aumentó de 114,15 U min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot en el nivel de irrigación normal a 253,92 U min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot en el nivel de estrés 1; 122,4 % superior. En el estrés 2, la actividad SOD fue de 325,71 U min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot; 185,3 % superior al control y 28,3 % mayor que el nivel de estrés 1. En el nivel de recuperación, la actividad SOD fue de 290,6 U min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot; 154,6 % superior al nivel de irrigación normal e implicó un descenso en 10,8 % respecto al nivel de estrés hídrico 2.

En el grupo Da sin fertilizar, la actividad SOD aumentó de 137,65 U min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot en el nivel de irrigación normal a 300,90 U min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot en el nivel de estrés 1; 118,6 % superior. En el estrés 2, la actividad SOD fue de 429,03 U min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot; 211,7 % superior al control y 42,6 % mayor que el nivel de estrés 1. En el nivel de recuperación, la actividad SOD fue de 425,06 U min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot; 208,8 % superior al nivel de irrigación normal y sin diferencias estadísticas con el nivel de estrés 2.



**Fig. 3: Efectos del nivel hídrico, fertilización y micorrización en la actividad SOD en raíces.** Plantas sin micorrizas (S/m); *N. dombeyi* en simbiosis con *D. antarctica* (Da); *N. dombeyi* en simbiosis con *Pisolithus tinctorius* (Pt). Cada columna representa la media  $\pm$  S.E. de cinco plantas. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los mismos niveles de irrigación de cada tratamiento. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre los distintos niveles de irrigación, dentro del mismo tratamiento. Ambos análisis estadísticos según las comparaciones múltiples del test de Bonferroni ( $p < 0,05$ ) y Tukey ( $p < 0,05$ ).

En el grupo Pt sin fertilizar, la actividad SOD aumentó de 118,76 U min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot en el nivel de irrigación normal a 322,83 U min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot en el nivel de estrés 1; 171,8 % superior. En el nivel de estrés 2, la actividad SOD fue de 615,32 U min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot; 418,1 % superior al control y 90,6 % mayor que el nivel de estrés 1. En el nivel de recuperación, la actividad SOD fue de 611,51 U min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot; 414,9 % superior al nivel de irrigación normal y sin diferencias estadísticas con el nivel de estrés 2.

En el grupo S/m fertilizado, la actividad SOD aumentó de 117,24 U min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot en el nivel de irrigación normal a 216,00 U min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot en el nivel de estrés 1; 84,2 % superior. En el estrés 2, la actividad SOD fue de 289,32 U min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot; 146,8 % superior al control y 33,9 % mayor que el nivel de estrés 1. En el nivel de recuperación, la actividad SOD fue de 272,51 U min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot; 132,4 % superior al nivel de irrigación normal y sin diferencias estadísticas con el nivel de estrés 2.

En el grupo Da fertilizado, la actividad SOD aumentó de 160,05 U min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot en el nivel de irrigación normal a 354,90 U min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot en el nivel de estrés 1; 121,7 % superior. En el nivel de estrés 2, la actividad SOD fue de 469,77 U min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot; 193,5 % superior al control y 132,4 % mayor que el nivel de estrés 1. En el nivel de recuperación, la actividad SOD fue de 375,61 U min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot; 134,7 % superior al nivel de irrigación normal e implicó un descenso en 20,0 % respecto al nivel de estrés 2.

En el grupo Pt fertilizado, la actividad SOD aumentó de  $195,75 \text{ U min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$  en el nivel de irrigación normal a  $301,51 \text{ U min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$  en el nivel de estrés 1; 54,0 % superior. En el nivel de estrés 2, la actividad SOD fue de  $557,90 \text{ U min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ ; 185,0 % superior al control y 85,0 % mayor que el nivel de estrés 1. En el nivel de recuperación, la actividad SOD fue de  $484,26 \text{ U min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ , 147,4% superior al nivel de irrigación normal e implicó un descenso en 13,2 % respecto al estrés hídrico 2.

#### **4.3.2. Efecto de la fertilización en la actividad SOD**

Como muestra la Fig. 3, la fertilización tuvo algunos efectos estadísticamente significativos en la actividad SOD en todos los tratamientos, tanto en condiciones de irrigación normal, como durante el estrés y la recuperación.

En los tratamientos S/m con/sin fertilización, en los niveles hídricos de estrés 1 y 2, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad SOD. S/m sin fertilizar, durante el estrés 1, presentó una actividad 14,9 % mayor que S/m fertilizado en el mismo nivel hídrico. De la misma forma, S/m sin fertilizar, durante el estrés 2, presentó una actividad 11,2% mayor que S/m fertilizado en igual nivel hídrico.

En los tratamientos Da con/sin fertilización, en los niveles hídricos de irrigación normal, estrés 1 y recuperación, se observaron diferencias estadísticamente

significativas sobre la actividad SOD. Da fertilizado, en el nivel de irrigación normal, presentó una actividad 16,8% mayor que Da sin fertilizar en el mismo nivel hídrico. Da fertilizado, en el nivel de estrés 1, presentó una actividad 18,0 % mayor que Da sin fertilizar en el mismo nivel hídrico. Da sin fertilizar, en el nivel de recuperación, presentó una actividad 11,6 % mayor que Da fertilizado en el nivel hídrico equivalente.

En los tratamientos Pt con/sin fertilización, en los niveles hídricos de irrigación normal y recuperación, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad SOD. Pt fertilizado, en el nivel de irrigación normal, presentó una actividad 64,8 % mayor que Pt sin fertilizar en el mismo nivel hídrico. Pt sin fertilizar, durante el nivel de recuperación, presentó una actividad 20,8 % mayor que Pt fertilizado en la misma condición.

#### **4.3.3. Efecto de la micorrización y la especie micorrízica en la actividad SOD**

En la Fig. 3 se puede observar aumento de la actividad SOD en todos los tratamientos y en la mayoría de los niveles hídricos que contemplan micorrizas, en comparación a S/m con/sin fertilizar. La excepción lo constituye Pt sin fertilizar, durante el nivel de irrigación normal, ya que la actividad SOD no presentó diferencias estadísticas con el control. También fue posible apreciar diferencias estadísticamente significativas entre las dos especies de hongos aplicados, principalmente durante la

aplicación de mayor estrés (estrés 2, Da y Pt con/sin fertilizar), donde se presentan las mayores actividades SOD del experimento.

Da sin fertilizar aumentó su actividad SOD en un 20,6 %; 18,5 %; 31,7 % y 46,3 %, en comparación a la actividad SOD de S/m sin fertilizar, en los niveles de irrigación normal, estrés 1, estrés 2 y recuperación, respectivamente. Pt sin fertilizar aumentó su actividad SOD en un 27,1 %; 89,0 % y 110,4 %, en comparación a la actividad SOD de S/m sin fertilizar, en los niveles de estrés 1, estrés 2 y recuperación, respectivamente. Pt sin fertilizar aumentó su actividad SOD en 43,4 % y 43,9 %, en comparación a la actividad SOD de Da sin fertilizar, en los niveles de estrés 2 y recuperación, respectivamente.

Da fertilizado aumentó su actividad SOD en un 36,5 %; 64,3 %; 62,4 y 37,9 %, en comparación a la actividad SOD de S/m fertilizado, en los niveles de irrigación normal, estrés 1, estrés 2 y recuperación, respectivamente. Pt fertilizado aumentó su actividad SOD en un 67,0 %; 40,0 %; 92,8 y 77,7 %, en comparación a la actividad SOD de S/m fertilizado, en los niveles de irrigación normal, estrés 1, estrés 2 y recuperación, respectivamente. Pt fertilizado aumentó su actividad SOD en un 22,3 %; 18,8 % y 28,9 %, en comparación a la actividad SOD de Da fertilizado, en los niveles de irrigación normal, estrés 2 y recuperación, respectivamente. Da fertilizado aumentó su actividad SOD en 15,0 %, en comparación a la actividad SOD de Pt fertilizado, en el nivel de estrés 1.

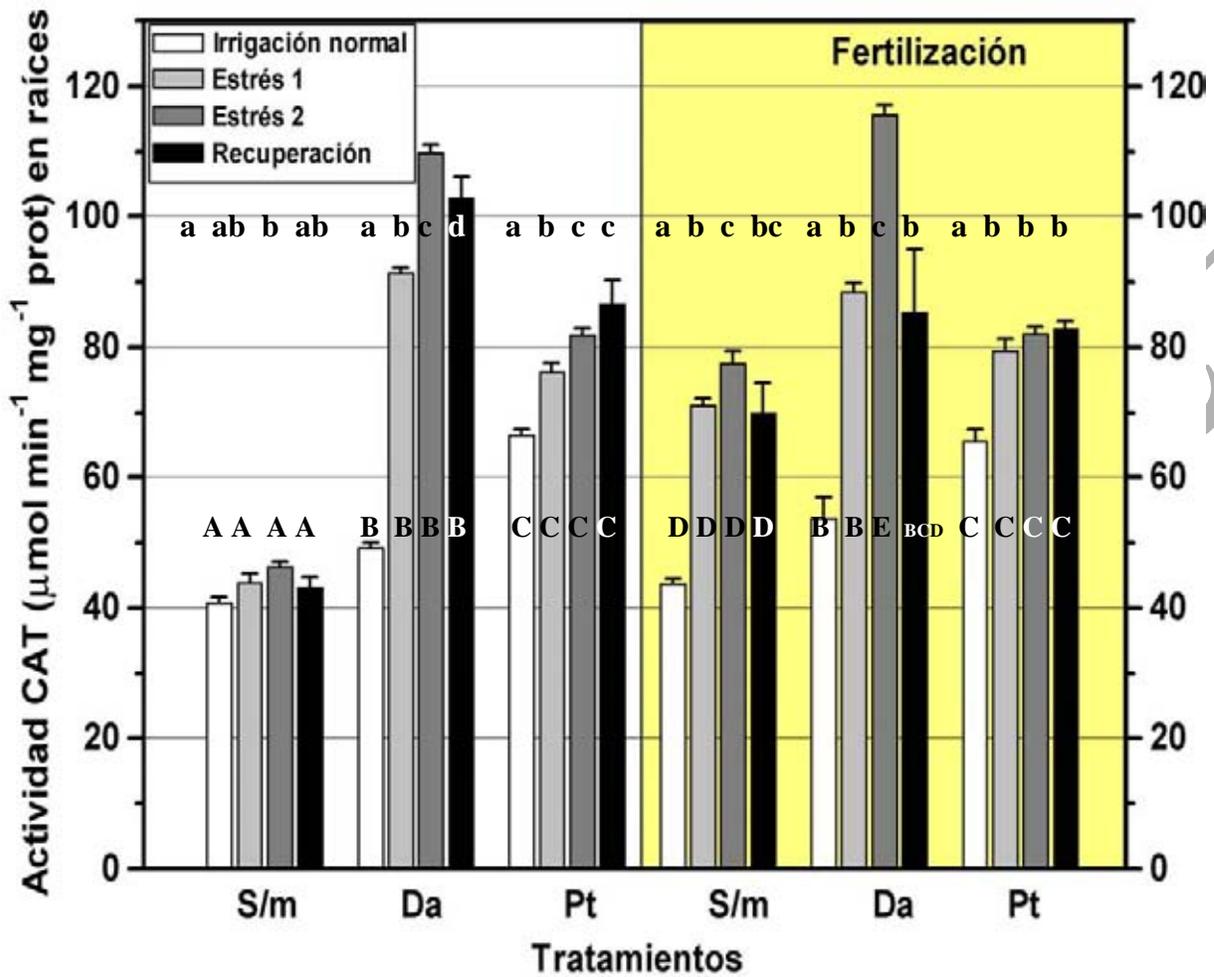
#### 4.4. Catalasa (CAT)

##### 4.4.1. Efecto del nivel hídrico en la actividad CAT

Como puede observarse en la Fig. 4, en general hubo un aumento de la actividad CAT a medida que aumentó el nivel de estrés hídrico. En todos los tratamientos (S/m, Da y Pt con/sin fertilización), existió algún grado de diferencia estadística en la actividad CAT, entre los niveles de irrigación normal y estrés 1 (excepto S/m sin fertilizar), y entre los niveles de irrigación normal y estrés 2 (todos los tratamientos).

En el grupo S/m sin fertilizar, la actividad CAT aumentó de  $40,70 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$  en el nivel de irrigación normal a  $46,26 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$  en el nivel de estrés 2; 13,6 % superior y único cambio significativo.

En el grupo Da sin fertilizar, la actividad CAT aumentó de  $49,11 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$  en el nivel de irrigación normal a  $91,27 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$  en el nivel de estrés 1; 85,8 % superior. En el nivel de estrés 2, la actividad CAT fue de  $109,71 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$ ; 123,4 % superior al control y 20,2 % mayor que el nivel de estrés 1. En el nivel de recuperación, la actividad CAT fue de  $102,83 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$ ; 109,4 % superior al nivel de irrigación normal e implicó un descenso de 6,3 % respecto al nivel de estrés 2.



**Fig. 4: Efectos del nivel hídrico, fertilización y micorrización en la actividad CAT en raíces.** Plantas sin micorrizas (S/m); *N. dombeyi* en simbiosis con *D. antarctica* (Da); *N. dombeyi* en simbiosis con *Pisolithus tinctorius* (Pt). Cada columna representa la media  $\pm$  S.E. de cinco plantas. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los mismos niveles de irrigación de cada tratamiento. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre los distintos niveles de irrigación, dentro del mismo tratamiento. Ambos análisis estadísticos según las comparaciones múltiples del test de Bonferroni ( $p < 0,05$ ) y Tukey ( $p < 0,05$ ).

En el grupo Pt sin fertilizar, la actividad CAT aumentó de 66,48  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$  en el nivel de irrigación normal a 76,17  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$  en el nivel de estrés 1; 14,6 % superior al control. En el nivel de estrés 2, la actividad CAT fue de 81,77  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$ ; 7,4 % mayor que el nivel de estrés 1 y 23,0 % superior al control. En el nivel de recuperación, la actividad CAT fue de 86,54  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$ ; 30,2 % superior al nivel de irrigación normal y sin diferencias estadísticas con el nivel de estrés 2.

En el grupo S/m fertilizado, la actividad CAT aumentó de 43,68  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$  en el nivel de irrigación normal a 71,07  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$  en el nivel de estrés 1; 62,7 % superior. En el nivel de estrés 2, la actividad CAT fue de 77,49  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$ ; 77,4 % superior al control y 9,0 % mayor que el nivel de estrés 1. En el nivel de recuperación, la actividad CAT fue de 69,74  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$ ; 59,6 % superior al nivel de irrigación normal y sin diferencias estadísticas con el nivel de estrés 2.

En el grupo Da fertilizado, la actividad CAT aumentó de 53,76  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$  en el nivel de irrigación normal a 88,33  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$  en el nivel de estrés 1; 64,3 % superior. En el nivel de estrés 2, la actividad CAT fue de 115,53  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$ ; 114,9 % superior al control y 30,8 % mayor que el nivel de estrés 1. En el nivel de recuperación, la actividad CAT fue de 85,28  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$ ; 58,6 % superior al nivel de irrigación normal e implicó un descenso en 26,2 %, respecto al nivel de estrés 2.

En el grupo Pt fertilizado, la actividad CAT aumentó de  $65,63 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$  en el nivel de irrigación normal a  $79,34 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$  en el nivel de estrés 1; 20,9 % superior. En el nivel de estrés 2, la actividad CAT fue de  $81,90 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$ ; 24,5 % superior al control y sin diferencias estadísticas con el nivel de estrés 1. En el nivel de recuperación, la actividad CAT fue de  $82,62 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$ ; 25,9 % superior al nivel de irrigación normal, y sin diferencias estadísticas con el nivel de estrés 2

#### **4.4.2. Efecto de la fertilización en la actividad CAT**

Como muestra la Fig. 4, la fertilización tuvo algunos efectos estadísticamente significativos sobre la actividad CAT, particularmente en el tratamiento S/m, donde se observó un aumento de la actividad CAT en todos los niveles hídricos.

En los tratamientos S/m con/sin fertilización y en todos los niveles hídricos, se observaron diferencias estadísticamente significativas sobre la actividad CAT. S/m fertilizado, en el nivel de irrigación normal, presentó una actividad 7,3 % mayor que S/m sin fertilizar en el mismo nivel hídrico. S/m fertilizado, en el nivel de estrés 1, presentó una actividad 62,3 % mayor que S/m sin fertilizar en dicho nivel hídrico. S/m fertilizado, en el nivel de estrés 2, presentó una actividad 67,5 % mayor que S/m sin fertilizar en el mismo nivel hídrico. De la misma forma, S/m sin fertilizar, en el nivel de recuperación, presentó una actividad 61,5 % mayor que S/m fertilizado en dicho nivel hídrico.

Entre los tratamientos Da con/sin fertilización, sólo en el nivel hídrico de estrés 2, se observaron diferencias estadísticamente significativas sobre la actividad CAT. Da fertilizado, durante el nivel de estrés 2, presentó una actividad 5,3 % mayor que Da sin fertilizar en el mismo nivel hídrico. En el nivel de irrigación normal, de estrés 1 y de recuperación, no existió diferencia significativa en la actividad CAT.

En los tratamientos Pt con/sin fertilización y en todos los niveles hídricos, no se presentaron cambios significativos en la actividad CAT.

#### **4.4.3. Efecto de la micorrización y la especie micorrízica en la actividad CAT**

En la Fig. 4 se puede observar un aumento de la actividad CAT en todos los tratamientos y en la mayoría de los niveles hídricos que contemplan micorrizas, en comparación a S/m con/sin fertilizar. La excepción lo constituyó Da fertilizado, durante la recuperación, ya que la actividad CAT no presentó diferencias estadísticas con el control (S/m fertilizado).

También fue posible apreciar diferencias estadísticamente significativas entre las dos especies de hongos seleccionados, en casi todos los niveles de irrigación, comparando los tratamientos Da y Pt fertilizado, excepto en el nivel de recuperación. En el tratamiento Da sin fertilizar la actividad CAT aumentó en 20,7 %; 108,4 %; 137,2 % y 138,2 %, en comparación a la actividad CAT de S/m sin fertilizar, en los niveles de irrigación normal, estrés 1, 2 y recuperación, respectivamente. En el

tratamiento Pt sin fertilizar la actividad CAT aumentó en 63,3 %; 73,9 %; 176,8 % y 100,4 %; en comparación a la actividad CAT de S/m sin fertilizar, en los niveles de irrigación normal, estrés 1, estrés 2 y recuperación, respectivamente. En el tratamiento Pt sin fertilizar, en el nivel de irrigación normal, la actividad CAT aumentó en 35,4 % en comparación a la actividad CAT de Da sin fertilizar, en el mismo nivel hídrico. En el tratamiento Da sin fertilizar la actividad CAT aumentó en 16,5 %, 25,5 % y 115,8 %, en comparación a la actividad CAT del tratamiento Pt sin fertilizar, en los niveles de estrés 1, 2 y recuperación, respectivamente.

En el tratamiento Da fertilizado, la actividad CAT aumentó en 123,1 %; 24,3 % y 49,1 %, en comparación a la actividad CAT del tratamiento S/m fertilizado, en los niveles de irrigación normal, estrés 1 y 2, respectivamente. En el tratamiento Pt fertilizado la actividad CAT aumentó en 50,2 %; 11,6 %; 5,7 % y 18,9 %, en comparación a la actividad CAT del tratamiento S/m fertilizado, en los niveles de irrigación normal, estrés 1, 2 y recuperación, respectivamente. En el tratamiento Pt fertilizado, en el nivel de irrigación normal, la actividad CAT aumentó en 22,1% en comparación a la actividad CAT de Da fertilizado, en el mismo nivel hídrico. En el tratamiento Da fertilizado la actividad CAT aumentó en 10,2 % y 29,1 %, en comparación a la actividad CAT del tratamiento Pt fertilizado, en los niveles de estrés 1 y 2, respectivamente.

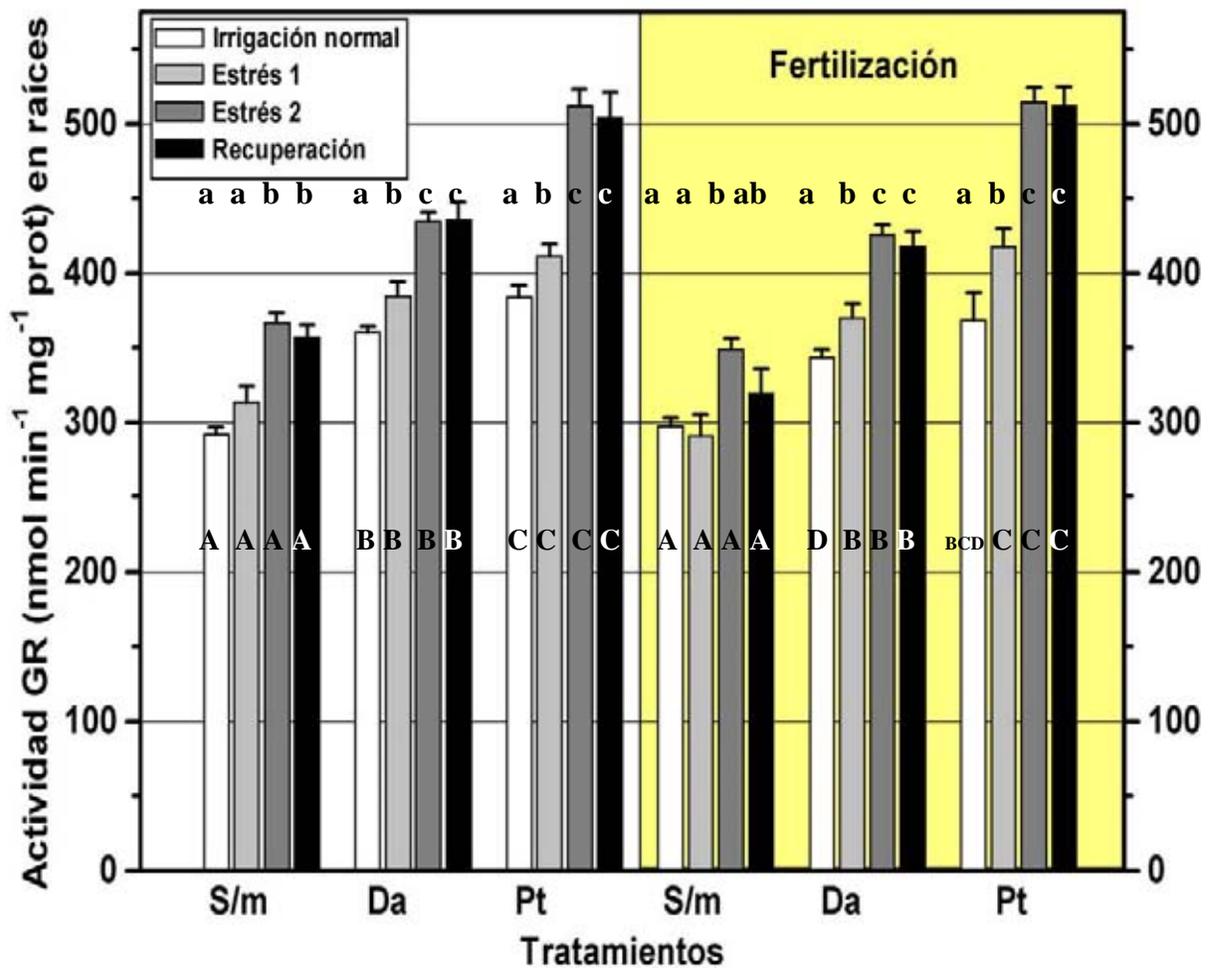
## 4.5. Glutación reductasa (GR)

### 4.5.1. Efecto del nivel hídrico en la actividad GR

Como puede observarse en la Fig. 5, en general hubo aumento de la actividad GR con el nivel de estrés hídrico. En todos los tratamientos (S/m, Da y Pt con/sin fertilización), existió algún grado de diferencia estadística en la actividad GR. La excepción lo constituyen los tratamientos S/m con/sin fertilización, donde no existió diferencia estadística entre el nivel de irrigación normal y el nivel de estrés 1. Además, en ningún tratamiento existe diferencia estadística entre los niveles hídricos de estrés 2 y recuperación.

En el grupo S/m sin fertilizar, la actividad GR aumentó de 291,77  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$  en el nivel de irrigación normal a 366,71  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$  en el nivel de estrés 2; 25,7 % superior. En la recuperación, la actividad GR fue de 357,11  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$ ; 22,4 % superior al nivel de irrigación normal y 2,6 % menor que el estrés 2.

En el grupo Da sin fertilizar, la actividad GR aumentó de 360,20  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$  en el nivel de irrigación normal a 384,07  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$  en el nivel estrés 1; 6,6 % superior. En el nivel de estrés 2, la actividad GR fue de 434,33  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$ ; 20,6 % superior al control y 13,1 % mayor que el nivel de estrés 1. En el nivel de recuperación, la actividad GR fue de 435,44  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$ ; 20,9 % superior al nivel de irrigación normal y sin diferencias estadísticas con el estrés 2.



**Fig. 5: Efectos del nivel hídrico, fertilización y micorrización en la actividad GR en raíces.** Plantas sin micorrizas (S/m); *N. dombeyi* en simbiosis con *D. antarctica* (Da); *N. dombeyi* en simbiosis con *Pisolithus tinctorius* (Pt). Cada columna representa la media  $\pm$  S.E. de cinco plantas. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los mismos niveles de irrigación de cada tratamiento. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre los distintos niveles de irrigación, dentro del mismo tratamiento. Ambos análisis estadísticos según las comparaciones múltiples del test de Bonferroni ( $p < 0,05$ ) y Tukey ( $p < 0,05$ ).

En el grupo Pt sin fertilizar, la actividad GR aumentó de 383,73  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$  en el nivel de irrigación normal a 411,27  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$  en el nivel de estrés 1; 7,2 % superior. En el nivel de estrés 2, la actividad GR fue de 512,27  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$ ; 33,5 % superior al control y 24,6 % mayor que el nivel de estrés 1. En el nivel de recuperación, la actividad GR fue de 503,67  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$ ; 31,3 % superior al nivel de irrigación normal y sin diferencias estadísticas con el estrés 2.

En el grupo S/m fertilizado, la actividad GR aumentó de 297,39  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$  en el nivel de irrigación normal a 348,56  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$  en el nivel de estrés 2; 17,2 % superior y único cambio significativo.

En el grupo Da fertilizado, la actividad GR aumentó de 343,07  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$  en el nivel de irrigación normal a 369,75  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$  en el nivel de estrés 1; 7,8 % superior. En el nivel de estrés 2, la actividad GR fue de 425,33  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$ ; 24,0 % superior al control y 15,0 % mayor que el nivel de estrés 1. En el nivel de recuperación, la actividad GR fue de 417,89  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$ ; 21,8 % superior al nivel de irrigación normal y sin diferencias estadísticas con el estrés 2.

En el grupo Pt fertilizado, la actividad GR aumentó de 368,42  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$  en el nivel de irrigación normal a 417,25  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$  en el nivel de estrés 1; 13,3 % superior. En el nivel de estrés 2, la actividad GR fue de 514,60  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$ ; 39,7 % superior al control y 23,3 % mayor que el nivel de estrés 1.

En el nivel de recuperación, la actividad GR fue de 511,89 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot; 39,0 % superior al nivel de irrigación normal, y sin diferencias estadísticas con el nivel de estrés 2.

#### **4.5.2. Efecto de la fertilización en la actividad GR**

Como muestra la Fig. 5, la fertilización tuvo pocos efectos estadísticamente significativos sobre la actividad GR. Sólo Da sin fertilizar en el nivel de irrigación normal (360,20 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot) fue mayor (4,8 %) a Da fertilizado, durante el mismo nivel de irrigación.

#### **4.5.3. Efecto de la micorrización y la especie micorrízica en la actividad GR**

En la Fig. 5 se observa un aumento de la actividad GR en todos los tratamientos y todos los niveles hídricos que contemplan micorrizas, en comparación a S/m con/sin fertilizar. También fue posible apreciar diferencias estadísticamente significativas entre las dos especies de hongos empleados, en todos los niveles de irrigación.

En el tratamiento Da sin fertilizar la actividad GR aumentó en 23,5 %; 22,51 %; 18,4 % y 21,9 %, en comparación a la actividad GR de S/m sin fertilizar, en los niveles de irrigación normal, estrés 1, 2 y recuperación, respectivamente. En el tratamiento Pt sin fertilizar la actividad GR aumentó en 31,5%; 31,19 %; 39,7 y

41,04 %, en comparación a la actividad GR de S/m sin fertilizar, en los niveles de irrigación normal, estrés 1, 2 y recuperación, respectivamente. En el tratamiento Pt sin fertilizar la actividad GR aumentó en 7,4 %; 12,9 %; 21,0 % y 22,5 %, en comparación a la actividad GR de Da sin fertilizar, en los niveles de irrigación normal, estrés 1, estrés 2 y recuperación, respectivamente. En el tratamiento Da fertilizado la actividad GR aumentó en 15,4 %; 27,0 %; 22,0 % y 31,1 %, en comparación a la actividad GR de S/m fertilizado, en los niveles de irrigación normal, estrés 1, estrés 2 y recuperación, respectivamente.

En el tratamiento Pt fertilizado la actividad GR aumentó en 23,9 %; 43,3 %; 47,6 % y 60,6 %, en comparación a la actividad GR de S/m fertilizado, en los niveles de irrigación normal, estrés 1, 2 y recuperación, respectivamente. En el tratamiento Pt fertilizado la actividad GR aumentó en 12,9 %; 21,0 % y 22,5 %, en comparación a la actividad GR de Da fertilizado, en los niveles de irrigación estrés 1, estrés 2 y recuperación, respectivamente.

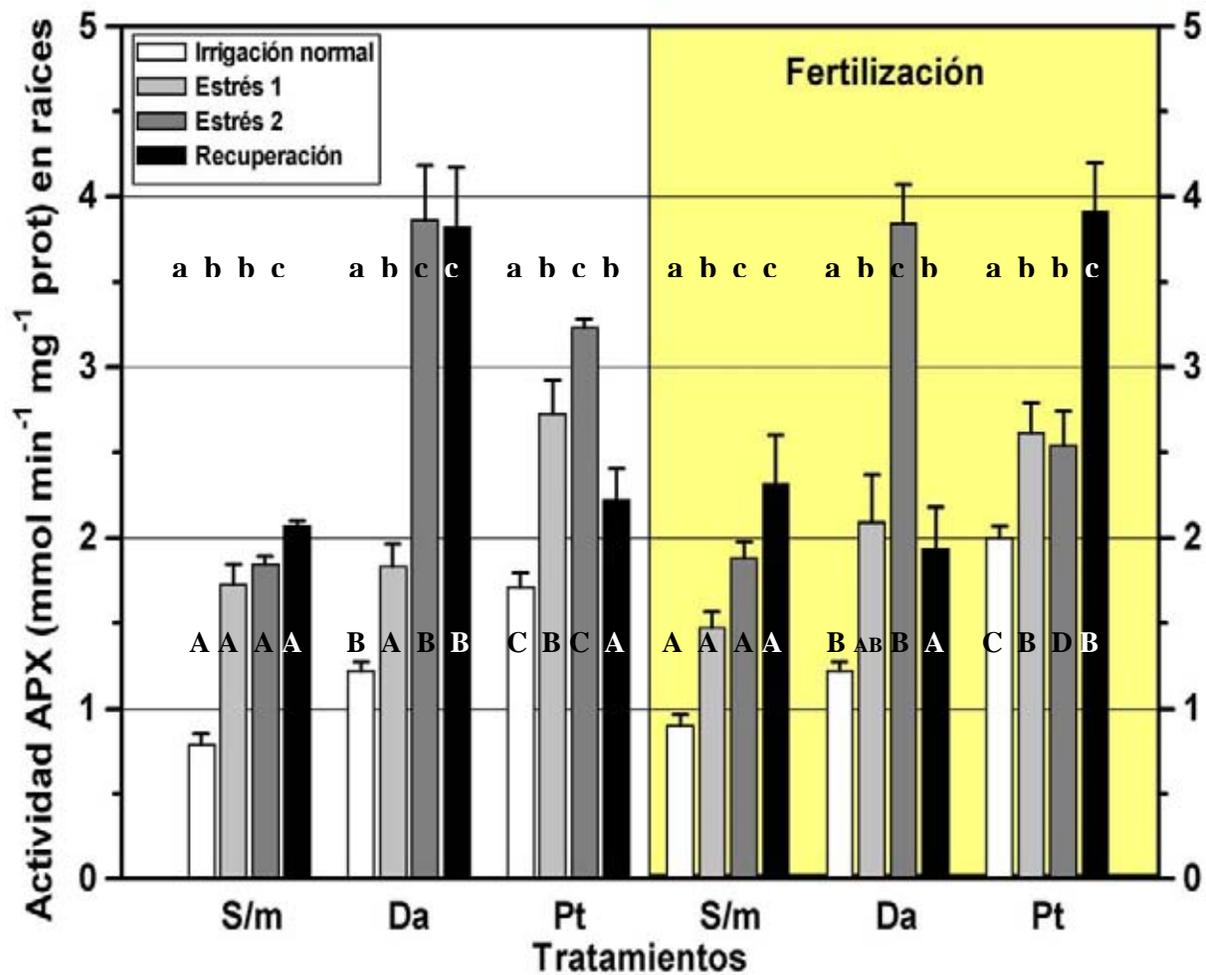
## 4.6. Ascorbato peroxidasa (APX)

### 4.6.1. Efecto del nivel hídrico en la actividad APX

Como puede observarse en la Fig. 6, en general hubo un aumento de la actividad APX a medida que aumenta el nivel de estrés hídrico. En todos los tratamientos (S/m, Da y Pt con/sin fertilización), existió algún grado de diferencia estadística en la actividad APX. En los tratamientos S/m sin fertilizar y Pt fertilizado, no se presentaron diferencias estadísticas entre los niveles de estrés 1 y estrés 2. En Da sin fertilizar y S/m fertilizado no existieron diferencias estadísticas entre los niveles de estrés 2 y recuperación. Da fertilizado no presentó diferencias estadísticas entre los niveles de estrés 1 y recuperación.

En el grupo S/m sin fertilizar, la actividad APX aumentó de  $0,79 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$  en el nivel de irrigación normal a  $1,73 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$  en el nivel de estrés 1; 120,1 % superior. En el nivel de estrés 2, la actividad APX fue de  $1,85 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ ; 135,0 % superior al control. En la recuperación, la actividad APX fue de  $2,08 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ ; 164,1 % superior al nivel de irrigación normal y 1,4 % mayor que el nivel de estrés 2.

En el grupo Da sin fertilizar, la actividad APX aumentó de  $1,22 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$  en el nivel de irrigación normal a  $1,83 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$  en el nivel de estrés 1;



**Fig. 6: Efectos del nivel hídrico, fertilización y micorrización en la actividad APX en raíces.** Plantas sin micorrizas (S/m); *N. dombeyi* en simbiosis con *D. antarctica* (Da); *N. dombeyi* en simbiosis con *Pisolithus tinctorius* (Pt). Cada columna representa la media  $\pm$  S.E. de cinco plantas. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los mismos niveles de irrigación de cada tratamiento. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre los distintos niveles de irrigación, dentro del mismo tratamiento. Ambos análisis estadísticos según las comparaciones múltiples del test de Bonferroni ( $p < 0,05$ ) y Tukey ( $p < 0,05$ ).

50,2 % superior. En el estrés 2, la actividad APX fue de  $3,86 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ ; 217,0 % superior al control y 11,0 % mayor que el nivel de estrés 1. En el nivel de recuperación, la actividad APX fue de  $3,82 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ ; 213,1 % superior al nivel de irrigación normal, 48,0 % superior al nivel de estrés 1 y sin diferencias estadísticas con el nivel de estrés 2.

En el grupo Pt sin fertilizar, la actividad APX aumentó de  $1,71 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$  en el nivel de irrigación normal a  $2,72 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$  en el nivel de estrés 1; 59,1 % superior. En el estrés 2, la actividad APX fue de  $3,23 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ ; 88,9 % superior al control y 18,8 % mayor que el nivel de estrés 1. En el nivel de recuperación, la actividad APX fue de  $2,22 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ ; 29,5 % superior al nivel de irrigación normal e implicó un descenso de un 31,5 % respecto al estrés 2 y 18,6 % respecto al nivel de estrés 1.

En el grupo S/m fertilizado, la actividad APX aumentó de  $0,90 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$  en el nivel de irrigación normal a  $1,48 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$  durante el estrés 1; 64,86 % superior. En el nivel de estrés 2, la actividad APX fue de  $1,88 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ ; 109,7 % superior al control y 27,2 % mayor que el nivel de estrés 1. En el nivel recuperación, la actividad APX fue de  $2,31 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ ; 157,9 % superior al nivel de irrigación normal, 56,4 % superior al nivel de estrés 1 y sin diferencias estadísticas con el nivel de estrés 2.

En el grupo Da fertilizado, la actividad APX aumentó de  $1,22 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$  en el nivel de irrigación normal a  $2,09 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$  en el nivel de estrés 1; 71,1 % superior. En el estrés 2, la actividad APX fue de  $3,84 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ ; 214,4 % superior al control y 83,7 % veces mayor que el nivel de estrés 1. En el nivel de recuperación, la actividad APX fue de  $1,93 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ ; 58,2 % veces superior al nivel de irrigación normal e implicó un descenso de un 49,7 % respecto al nivel de estrés 2.

En el grupo Pt fertilizado, la actividad APX aumentó de  $2,00 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$  en el nivel de irrigación normal a  $2,61 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ ; en el nivel de estrés 1; 30,6 % superior. En el nivel de estrés 2, la actividad APX fue de  $2,53 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ ; 26,6 % superior al control y sin diferencias estadísticas con el nivel de estrés 1. En el nivel de recuperación, la actividad APX fue de  $3,91 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ ; 95,5 % superior al nivel de irrigación normal, 49,7 % mayor al nivel de estrés 1 y 49,7 % superior al nivel de estrés 2.

#### **4.6.2. Efecto de la fertilización en la actividad APX**

Como muestra la Fig. 6, la fertilización presentó pocos efectos estadísticamente significativos sobre la actividad APX. Las diferencias estadísticas se observaron entre Da con/sin fertilizar, en el nivel de recuperación y entre Pt con/sin fertilizar en los niveles de estrés 2 y recuperación. En el tratamiento Da sin fertilizar, en el nivel

de estrés 2, la actividad APX fue 49,3 % mayor a Da fertilizado, en el mismo nivel hídrico. En el tratamiento Pt sin fertilizar, en los niveles de estrés 2 y recuperación la actividad APX fue un 21,7 % mayor y un 76,5 % menor, respectivamente, a Pt fertilizado en los mismos niveles hídricos.

#### **4.6.3. Efecto de la micorrización y la especie micorrízica en la actividad APX**

En la Fig. 6 se observa un aumento de la actividad APX en todos los tratamientos y algunos niveles hídricos que contemplan micorrizas, en comparación a S/m con/sin fertilizar. También fue posible apreciar diferencias estadísticamente significativas entre las dos especies de hongos utilizados, en la mayoría de los niveles de irrigación.

En el tratamiento Da sin fertilizar, en los niveles de irrigación normal, estrés 2 y recuperación; la actividad APX aumentó en un 55,2 % 109,3 % y 84,0 %; respectivamente, en comparación a la actividad APX de S/m sin fertilizar, en los mismos niveles de irrigación. En el tratamiento Pt sin fertilizar, en los niveles de irrigación normal, estrés 1 y estrés 2; la actividad APX aumentó en un 117,8 % 57,4 % y 75,1 %; respectivamente, en comparación a la actividad APX de S/m sin fertilizar, en los mismos niveles de irrigación. En el tratamiento Pt sin fertilizar, en los niveles de irrigación normal y estrés 1; la actividad APX aumentó en un 40,4 % y un 48,6 % respectivamente, en comparación a la actividad APX de Da sin fertilizar, en

los mismos niveles de irrigación. En el tratamiento Da sin fertilizar, en los niveles de estrés 2 y recuperación; la actividad APX aumentó en un 16,4 % y 42,0 %; respectivamente, en comparación a la actividad APX de Pt sin fertilizar, en los mismos niveles de irrigación.

En el tratamiento Da fertilizado, en los niveles de irrigación normal y estrés 2; la actividad APX aumentó en un 36,5 % y un 104,6 % respectivamente, en comparación a la actividad APX de S/m fertilizado, en los mismos niveles de irrigación. En el tratamiento Pt fertilizado, en los niveles de irrigación normal, estrés 1, estrés 2 y recuperación; la actividad APX aumentó en un 123,3 %; 76,9 %; 34,8 % y 69,3 %; respectivamente, en comparación a la actividad APX de S/m sin fertilizar, en los mismos niveles de irrigación. En el tratamiento Da sin fertilizar, en el nivel de estrés 2; la actividad APX aumentó en un 34,1 %, en comparación a la actividad APX de Pt sin fertilizar, en el mismo nivel de irrigación. En el tratamiento Pt sin fertilizar, en los niveles de irrigación normal y recuperación; la actividad APX aumentó en un 63,6 % y 102,2 % respectivamente, en comparación a la actividad APX de Da sin fertilizar, en los mismos niveles de irrigación.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 Malondialdehído

La bicapa lipídica está formada por una mezcla compleja de fosfolípidos y glicolípidos que contienen cadenas de ácidos grasos anclados al C1 y C2 del esqueleto de glicerol por una unión éster. La reacción de peroxidación difiere entre estos ácidos grasos dependiendo del número y posición de dobles enlaces en la cadena lateral (Blokhina *et al.*, 2003). Las ERO pueden reaccionar con distintos ácidos grasos, produciendo una mezcla variada de hidroperóxidos, ácidos grasos entrecruzados de alto peso molecular y fosfolípidos (Bradley y Minn, 1992), que pueden acumularse en muestras de membranas lipídicas peroxidadas. La peroxidación de lípidos involucra las tres etapas típicas de una reacción en cadena y se inicia cuando una ERO,  $\text{OH}\cdot$ , sustrae un átomo de H desde un grupo metil-vinil de un ácido graso. El radical remanente forma una estructura resonante. Esta estructura reacciona con  $\cdot\text{O}_2\cdot$  (oxígeno triplete), formando un radical peroxil, el cual sustrae un átomo de H a otro ácido graso formando un hidroxiperóxido lipídico originando otro radical libre que puede participar en una segunda sustracción de H, propagando de esta manera la reacción (Blokhina *et al.*, 2003). Las reacciones de peroxidación en las membranas lipídicas terminan cuando el carbono o el radical peroxil se entrecruzan formando un producto conjugado que no es un radical libre. Los productos de la degradación de los hidroxiperóxidos, tales como el malondialdehído, son el producto final de la peroxidación lipídica comúnmente cuantificado (Leshem, 1992). Como se esperaba, según la hipótesis propuesta, el contenido de MDA aumentó bajo condiciones de estrés hídrico, tanto en las

raíces de las plantas de los tratamientos Da y Pt como aquellas S/m, fertilizadas y sin fertilizar. Como se observa en la Fig. 1, la principal diferencia entre los tratamientos radica en la magnitud del aumento. Las raíces de las plantas en el nivel de estrés más severo (estrés 2) de los tratamientos S/m con/sin fertilizar alcanzaron los contenidos máximos de MDA del experimento, en especial, el tratamiento S/m sin fertilizar. Las raíces de las plantas en los tratamientos Da y Pt con/sin fertilizar tuvieron los contenidos de MDA más bajos. Como muestra la Fig.1, fue posible observar que las raíces de las plantas en el nivel de recuperación del tratamiento S/m fertilizado, efectivamente se recuperaron de un episodio de déficit hídrico, mostrando un descenso de 16,5 % en el contenido de MDA respecto al nivel de estrés 2. El efecto de la recuperación, esperado como un descenso en el contenido de MDA respecto a los niveles de estrés 1 y 2, no fue observado en los tratamientos restantes. Esto evidentemente muestra que, durante estadios de estrés por déficit hídrico y bajo las condiciones experimentales, se genera un daño a las membranas, (Yan *et al.*, 1996) lo cual determina el aumento en el contenido de MDA presentado en este trabajo. Estos resultados son concordantes con los encontrados por Porcel *et al.* (2003), Liang *et al.* (2003), y Arbona *et al.* (2003), en donde raíces tanto micorrizadas como sin micorrizar, presentan un aumento en el contenido de MDA respecto a un nivel control de irrigación normal. En Porcel *et al.* (2004), los contenidos de MDA son de hasta 30 veces superiores a los resultados obtenidos en el presente trabajo. En cuanto a la recuperación, Sofo *et al.* (2004) encontraron que los contenidos de MDA disminuían al re-hidratar el sustrato y que la magnitud de este descenso depende, entre otros factores, del nivel de re-hidratación que alcancen los tejidos estudiados al momento de la cuantificación. Por otro lado, encontraron que luego de la re-hidratación de la planta a continuación de un

severo estrés hídrico toman parte en los procesos de reparación celular mecanismos de estrés oxidativo con las consecuencias de daño oxidativo a membranas. Se podría decir que *N. dombeyi* posee eficientes mecanismos de defensa antioxidantes, sin embargo, hay que mencionar que los trabajos citados anteriormente cuantifican MDA en herbáceas, cuyas estructuras son evidentemente más sensibles al déficit hídrico, debido, por ejemplo, a la mayor cantidad de estomas por unidad de superficie (Hernández, 2001) y por lo tanto al estrés oxidativo y daño de membranas. Las especies leñosas, tales como *N. dombeyi*, poseen paredes celulares más gruesas y cutículas o sustancias cerosas en las hojas que protegen mejor de la pérdida de agua y resultan en una ventaja respecto a otras especies de plantas (Hernández, 2001). La importancia del mantenimiento de la estructura de la membrana, en particular, de una adecuada razón de ácidos grasos saturados/insaturados es fundamental para preservar la función fotosintetizadora del cloroplasto (Eltner, 1991), el transporte de agua y nutrientes en la raíz (Blokhina *et al.*, 2003) y para mantener potenciales electroquímicos fisiológicamente adecuados junto a enzimas y transportadores embebidos apropiadamente en la bicapa lipídica (Pastori y Foyer, 2002). Finalmente, al observar un bajo contenido de MDA, el cual es uno de los productos finales de la peroxidación de lípidos, puede concluirse que existe un escaso daño a lípidos de membrana, y por lo tanto, está dando cuenta de mecanismos de protección eficientes frente a daño oxidativo durante períodos de estrés producido por déficit hídrico.

Como pudo observarse en la Fig. 1, la fertilización tuvo efectos importantes en el contenido de MDA, particularmente durante períodos de estrés y cuando la planta no está en asociación simbiótica. En el nivel de estrés 2, las raíces de las plantas del tratamiento

S/m fertilizado mostraron un descenso de 22,3 % en el contenido de MDA respecto al contenido de MDA de las raíces de las plantas del tratamiento S/m sin fertilizar. De la misma forma, existió una recuperación estadísticamente significativa cuando la planta fue fertilizada. Cuantitativamente, en los tratamientos Da y Pt sin fertilizar, la especie de hongo ectomicorrízico no tiene efecto en el contenido de MDA y en este nivel, cualquiera de los dos o ambos, podrían servir de inóculo para ayudar a la planta en el manejo del estrés hídrico y del daño oxidativo. Sin embargo, en los tratamientos con fertilización, el tratamiento Da fertilizado presentó un menor contenido de MDA que Pt fertilizado durante el estrés 1 y la recuperación, es decir, durante episodios de estrés moderado. Durante el estrés más severo (estrés 2), Da y Pt fertilizado presentaron el mismo contenido de MDA. Según estos resultados, la fertilización afectó negativamente a las plantas del tratamiento Pt fertilizado en relación al tratamientos Da fertilizado. Algunos autores relacionan la fertilización negativamente con la micorrización (Morone, 2006), mientras que otros proponen que los pequeños cambios en el grado de micorrización no afectan a la planta en su totalidad (Quoreshi y Timmer, 1998; De Giorgio, 2004). En este trabajo se muestra que cuando la planta no está micorrizada, la fertilización adquiere un rol preponderante en la protección frente al estrés hídrico. Para la explicación de este fenómeno se han propuesto algunas hipótesis (ver más adelante), pero el mecanismo no ha sido elucidado y probablemente implique una suma de efectos no bien descritos aún pero que podrían contemplar los siguientes factores: la solución nutritiva suministrada a la planta contiene los más importantes nutrientes necesarios para un buen desarrollo de ésta y fue agregada una vez al inicio del experimento, cuando el suelo se encontraba aún con un contenido relativo de agua apropiado para el transporte de estos compuestos desde el suelo a la

planta. Con esto podría deducirse que las plantas fertilizadas se encontraban en un mejor estado nutricional que aquellas sin fertilizar, ya que al contener N, como  $\text{NO}_3^-$ , forma fácilmente asimilable por la planta, ésta pudo sintetizar aminoácidos y enzimas que la ayudarían a protegerse del estrés hídrico por la vía de ajuste osmótico y/o de enzimas antioxidantes. Por otra parte,  $\text{K}^+$ , el catión celular más abundante, se requiere para la conformación activa de muchas enzimas que participan en el metabolismo celular, son necesarias concentraciones abundantes de  $\text{K}^+$  para mantener el potencial osmótico y además, el  $\text{K}^+$  actúa como cofactor o activador de muchas enzimas del metabolismo de carbohidratos y proteínas. De la misma forma, el S se encuentra bajo las formas orgánicas de los aminoácidos cisteína, cistina y metionina, así como en compuestos de azufre activados análogos al ATP, adenosina 5'-fosfosulfato (APS) y 3'-fosfoadenosina, 5'-fosfosulfato (PAPS). El grupo sulfhidrilo (-SH) puede participar directamente en reacciones de óxido-reducción, como ocurre con el glutatión. El S en forma reducida se encuentra en los anillos heterocíclicos de algunas coenzimas, como tiamina o biotina. Todos ellos con un rol preponderante en la defensa antioxidante de la planta. Otros elementos tales con  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ , son microelementos esenciales como cofactores enzimáticos en las diferentes isoformas de SODs y el  $\text{Fe}^{2+}$  lo es de peroxidasas y catalasas (Clarkson y Hanson. 1980; Marschner, H. 1995; Hernández 2001).

El efecto de la micorrización en el contenido de MDA es concordante con la hipótesis propuesta. Como se muestra en la Fig. 1, el máximo contenido de MDA se cuantificó en el tratamiento S/m sin fertilizar;  $15,52 \text{ nmol g}^{-1} \text{ PF}$ ; 179,8 % superior al control, mientras que en las raíces de las plantas micorrizadas, el máximo incremento en el contenido de MDA

ocurrió en el tratamiento Pt fertilizado y fue desde  $5,45 \text{ nmol g}^{-1}$  PF bajo irrigación normal a un máximo de  $10,25 \text{ nmol g}^{-1}$  PF durante el nivel de estrés 1; 88,0 % superior al control. Este resultado es análogo al propuesto por Ruiz-Lozano (2001), y al planteado por Porcel *et al.* (2003). En ambos casos, el contenido de MDA aumentó con el nivel de estrés pero fue menor en plantas micorrizadas que en aquellas sin micorrizar. Por otro lado, cuando las plantas están bien irrigadas, es indiferente la presencia o no de micorrizas (Ruiz-Lozano, 2001; Porcel *et al.*, 2003), evidentemente por el hecho de no existir daño oxidativo en lípidos. Finalmente, Laczko *et al.* (2003), encontraron que la composición de los ácidos grasos y esteroides difieren marcadamente cuando la planta y el hongo ectomicorrízico crecen separados o juntos, de hecho, el hongo tiene una abundancia relativa de esteroides mucho mayor que la planta por sí misma. Estos resultados demostrarían la estrecha relación e interdependencia durante la simbiosis, especialmente en las primeras etapas de la micorrización y el hecho de que, probablemente, estos cambios en la composición lipídica de la membrana ayuden a evitar o aliviar una excesiva degradación lipídica.

## 5.2 Peróxido de Hidrógeno

Algunos autores han sugerido que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  ejerce una función dual, ya que a bajas concentraciones y en condiciones fisiológicas actúa como una molécula mensajera involucrada en la señalización para la aclimatación, inicio de procesos de tolerancia frente a diversos estreses abióticos y regulación de la expresión de genes, mientras que a altas concentraciones está implicado en la muerte celular programada. De manera que su

concentración debe ser muy bien regulada, pero no debe ser eliminado (Neill *et al.*, 2002; Schützendübel y Polle, 2002; Vandenabeele *et al.*, 2003; Dias de Azevedo *et al.* 2005). La toxicidad del  $H_2O_2$  radica en el hecho de que puede reaccionar con trazas de  $Fe^{2+}$  u otro metal reductor generando  $OH\cdot$ , uno de los más poderosos agentes oxidantes, el cual, a su vez, puede reaccionar con moléculas orgánicas (lípidos de membrana), oxidándolas en una reacción en cadena como la descrita en 5.1 (Bradley y Minn, 1992; Leshem, 1992 y Blokhina *et al.*, 2003). Como se observa en la Fig. 2, el contenido de  $H_2O_2$  aumentó bajo condiciones de estrés hídrico en las plantas de todos los tratamientos, lo cual concuerda plenamente con la hipótesis propuesta. Cuantitativamente, la diferencia entre cada tratamiento se manifiesta en la magnitud del aumento en el contenido  $H_2O_2$ . De manera similar a lo ocurrido con el contenido de MDA, las plantas de los tratamientos S/m, en los niveles de estrés 2 y de recuperación, presentaron los mayores contenidos de  $H_2O_2$  del experimento. En general, las raíces de las plantas en los Da y Pt presentaron los menores contenidos de  $H_2O_2$ . En este trabajo se muestra que condiciones de déficit hídrico, conducirían a un estrés oxidativo, dado por el aumento en el contenido de  $H_2O_2$ . Cho y Seo (2005) también encontraron que en condiciones de estrés, los contenidos de  $H_2O_2$  y MDA aumentaron en relación a controles sin estrés y este aumento, es consecuente con el aumento de las actividades enzimáticas antioxidantes CAT, APX, SOD y GR. En la Fig. 2 se observa un marcado aumento del contenido de  $H_2O_2$  en el tratamiento S/m sin fertilizar, en el nivel de estrés 2. Este incremento es de 987,7 % superior al nivel de control en el mismo tratamiento. Este resultado es diferente al obtenido por Porcel *et al.* (2003), en el sentido que no encontró diferencias en el contenido de  $H_2O_2$  entre plantas micorrizadas y sin micorrizar sometidas a estrés hídrico. Por otra parte, Jiang y Zhang (2001) encontraron

que bajo condiciones de estrés, el contenido de  $H_2O_2$  efectivamente aumentaba significativamente en relación a plantas no sometidas a estrés. Estos resultados son concordantes con los observados para el contenido de MDA, en el mismo tratamiento y nivel hídrico, ya que, en la medida que existe un mayor contenido de  $H_2O_2$  (S/m sin fertilizar, nivel de estrés 2), se observó un mayor daño a lípidos de membrana, determinado como el contenido de MDA en dicho nivel y tratamiento. Un resultado semejante se observa en el tratamiento S/m fertilizado, en el nivel de estrés 2. Según lo mostrado, durante estadios de estrés oxidativo por déficit hídrico, se genera una acumulación de  $H_2O_2$ , lo cual puede ser explicado por una o ambas de las siguientes posibilidades: Una de las fuentes de  $H_2O_2$  en el medio celular durante episodios de estrés oxidativo, está dado por la dismutación del  $\bullet O_2^-$  en  $O_2$  y  $H_2O_2$  (Blokhina *et al.*, 2003). Por otra parte, Schützendübel y Polle (2002), sugieren que para iniciar la acumulación de  $H_2O_2$  basta con una leve disminución de alguno de los antioxidantes presentes en la célula vegetal. Ambas situaciones son compatibles con las condiciones presentadas en este trabajo, donde efectivamente la planta se encuentra sometida a estrés oxidativo y como se mencionó anteriormente,  $H_2O_2$  actúa como mensajero en la célula vegetal demostrándose que induce la expresión de los genes de las enzimas CAT (Polidoros y Scandalios, 1999), APX (Van Breusegem *et al.*, 2001) y GR (Janda *et al.*, 1999), las cuales, están incrementadas.

Como puede observarse en la Fig. 2, la fertilización tuvo efectos similares a los que se obtuvieron para el contenido de MDA (ver Capítulo 5.1), excepto que los resultados obtenidos para el contenido de  $H_2O_2$  fueron más dispersos que los obtenidos para MDA.

Como se explicó en 5.1, durante el estrés más severo se aprecian las diferencias estadísticas más claras en cuanto al efecto de la fertilización, ya que S/m fertilizado presentó un menor contenido de  $H_2O_2$  cuando estaba fertilizada.

Como se mencionó anteriormente, los antecedentes mostrados respecto al efecto de la micorrización y el contenido de  $H_2O_2$  son opuestos (Porcel y Ruiz-Lozano, 2004). En este trabajo se demuestra entonces que la micorrización previene la acumulación excesiva de  $H_2O_2$ , evitando de esta manera la peroxidación lipídica y manteniendo un nivel fisiológico de  $H_2O_2$ . Aunque existen algunos modelos que permiten determinar los niveles óptimos de  $H_2O_2$  en plantas, no existe un acuerdo y se acepta que el estado oxidativo es propio de las especies y dentro de cada especie, el contenido de  $H_2O_2$  depende entre otras variables del estado de desarrollo de planta y condición fotosanitaria (Foyer y Noctor, 2005). En el caso de este trabajo, el nivel normal de  $H_2O_2$ , según los controles, es del orden de  $2 \mu\text{mol g}^{-1}$  PF, lo cual es concordante con los resultados obtenidos por Jiang y Zhang (2001). También es posible observar que, si bien es cierto, existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos Da y Pt con/sin fertilizar, estas se hacen menos notorias si se comparan Da y Pt con/sin fertilizar con los controles S/m con/sin fertilizar. Cuando la planta no está fertilizada, el mejor desempeño ocurre con la simbiosis entre *N. dombeyi* y *P. tinctorius*, ya que tanto en el nivel de estrés 2 como durante la recuperación, los menores contenidos de  $H_2O_2$  se observan en este tratamiento. Cuando las plantas están fertilizadas el comportamiento se mantiene, aunque aparece mayor dispersión en los datos y el efecto más notorio se presenta en el nivel de recuperación.

### 5.3 Superóxido Dismutasa

Como se esperaba, según la hipótesis propuesta, la actividad SOD aumentó a medida que se incrementó el nivel de estrés hídrico, tanto en las raíces de los tratamientos S/m como Da y Pt, fertilizadas y sin fertilizar. La principal diferencia entre los tratamientos radica en la magnitud del aumento, ya que pudieron observarse aumentos de hasta 418,1 % respecto al nivel de irrigación normal. Este resultado es concordante con lo expuesto en Ushimaro *et al.* (2001), sin embargo, se han observado descensos de la actividad (Pavelic *et al.*, 2000), aumentos compartimentalizados (Ushimaro *et al.*, 1999; Blokhina *et al.*, 2003), o simplemente la actividad no se ha visto afectada (Biemelt *et al.*, 2000). La explicación a este fenómeno viene dado por el hecho que SODs constituyen la primera línea de defensa contra las ERO dentro de la célula y es crucial que estas SODs estén presentes en todos los compartimentos celulares en donde las ERO son producidas (Alscher, 2003). Dependiendo del metal cofactor presente en la enzima existen 3 grupos de SOD. Fe-SOD se encuentra en cloroplastos, Mn-SOD en mitocondrias y peroxisomas y Cu/Zn SOD en cloroplastos, citosol y probablemente en el medio extracelular (Fridovich, 1986; Palma *et al.*, 1993). Los genes de cada una de estas isoformas enzimáticas probablemente responden de diferente manera a las condiciones impuestas. En el presente trabajo, el método de cuantificación utilizado (espectrofotometría) permite determinar la actividad enzimática total y las situaciones expuestas anteriormente, no quedan reflejadas en la actividad enzimática cuantificada. Se ha demostrado también en este experimento que la planta por si sola tiene una alta actividad SOD, comparada con los resultados de Porcel, *et al.* (2003), sin embargo, en Arbona *et al.* (2003), los valores obtenidos tienen órdenes de

magnitud semejante, lo cual, nuevamente demuestra la amplia variabilidad de los resultados observados. Para el caso del nivel denominado recuperación se esperaba un descenso de la actividad SOD, al menos al nivel del estrés 1 o incluso al nivel presentado durante la irrigación normal. Sólo Da y Pt fertilizados mostraron un descenso de la actividad SOD durante este nivel, aunque de ninguna manera el esperado, probablemente porque el hecho de retornar al nivel de irrigación normal luego de un estrés tan severo, implica otro nivel de estrés (re-hidratación), además, existe un efecto residual de daño necrótico que debe aún ser subsanado (Bryla *et al.*, 1997), motivos por los cuales la actividad SOD pudo permanecer elevada.

Si bien es cierto que se observan diferencias significativas entre los tratamientos con/sin fertilización la tendencia general, esto es, al aumento de la actividad SOD en la medida que disminuye el contenido hídrico del suelo, permanece constante (Davies *et al.*, 1996). Según Gacitúa (2005) la fertilización está negativamente relacionada con la presencia de micelio en el suelo y el grado de micorrización en la planta. De la misma forma, Treseder (2004), en un estudio de meta-análisis, encontró que la abundancia de micorrizas disminuye levemente bajo fertilización con P, mientras que en régimen de fertilización con N los resultados eran menos claros, pero tendientes a la disminución de la micorriza. De Giorgio *et al.* (2004), encontraron que plantas micorrizadas y sometidas a diferentes cargas de fertilización sólo disminuyen el grado de micorrización respecto a las sin fertilizar en una pequeña proporción apenas significativa. En base a esto podría haberse esperado un descenso en la actividad SOD, si tomamos en cuenta que el aporte de actividad SOD de las hifas es menor en este caso. En el tratamiento S/m fertilizado

durante los niveles de estrés 1 y 2 la actividad SOD disminuyó en 14,9 % y 11,2 %, respectivamente, comparado con el control sin fertilizar. En Da fertilizado se observó un aumento en los tratamientos de control y estrés y un descenso en la recuperación y finalmente para Pt fertilizado se observó una tendencia semejante a Da fertilizado excepto en nivel de estrés 1 donde no presentó diferencias. Puede decirse que cuantitativamente la actividad SOD no estaría relacionada con los parámetros medidos por los autores anteriormente mencionados (presencia de micelio y grado de micorrización) y más aún, en términos globales la suma de micorrización y fertilización resultan más favorables para la planta que dichos tratamientos por separado (De Giorgio *et al.*, 2004; Barra, 2004).

La micorrización implicó un aumento en la actividad enzimática SOD en casi todos los niveles hídricos. Puede observarse incluso que sin estrés las raíces presentan mayor actividad SOD cuando están micorrizadas (irrigación normal: Da sin fertilizar y Da y Pt fertilizados) lo cual implicaría, al menos en este nivel, un efecto aditivo de la actividad SOD presente en el hongo y la raíz de la planta. Este resultado es concordante con la hipótesis propuesta y con los resultados de Ruiz-Lozano (2001), pero es discordante a lo planteado por Porcel *et al.*, (2004) donde se encontró que la actividad SOD permaneció inalterada o disminuyó (Porcel *et al.*, 2003) en raíces micorrizadas y sometidas a estrés hídrico, en comparación a aquellas sin micorrizar. En el presente estudio, la máxima actividad alcanzada por SOD en los tratamientos control (S/m) fue  $325,71 \text{ U min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ . La mayor actividad SOD fue determinada en la micorriza *N. dombeyi-P. tinctorius* sin fertilizar durante el estrés 2 y llegó a  $615,32 \text{ U min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ , 88,9 % superior a la actividad observada sin micorrización. Estos incrementos estarían demostrando la importancia de

SOD como primera línea de defensa contra el exceso de ERO (Polle, 2001) y particularmente el hecho de que durante el estrés hídrico y en las condiciones establecidas, está aumentada la generación de  $O_2\bullet^-$ , lo cual queda bastante claro con los sucesivos aumentos de la actividad SOD a medida que aumenta el nivel de estrés hídrico, especialmente cuando existen micorrizas.

#### 5.4 Catalasa

Como se esperaba, según la hipótesis propuesta, la actividad CAT aumentó, tanto en las raíces de las plantas micorrizadas como aquellas sin micorrizar, fertilizadas y sin fertilizar. Como muestra la Fig. 4, la principal diferencia entre los tratamientos radica en la magnitud del aumento, ya que en el caso de S/m sin fertilizar el aumento fue significativo (13,6 % mayor durante el estrés 2 que en el control). En los restantes tratamientos hubo diferencias entre todos los niveles hídricos dentro de cada tratamientos, excepto en Pt fertilizado, donde, a partir del estrés 1 no hubo diferencias estadísticas. Turkan *et al.* (2005) y Porcel *et al.* (2003) encontraron que CAT permaneció constante en plantas micorrizadas sometidas a estrés hídrico, en comparación a plantas sin micorrizar, mientras que Jiang y Zhang (2001) y Liang *et al.*, (2003) encontraron que en condiciones de estrés oxidativo por déficit hídrico la actividad CAT aumentó su actividad. Esto nuevamente demuestra la variedad de resultados observados. La actividad enzimática CAT también depende del tipo de estrés impuesto ya que, si bien, el resultado final es la generación de ERO, la activación de los genes que codifican para estas enzimas varía en función del tipo de estrés abiótico impuesto (Shanker, 2004). CAT no está presente en los cloroplastos y

en estos organelos la eliminación de  $H_2O_2$  se realiza a través de las enzimas del ciclo ascorbato-glutación, por lo cual no es demasiado importante en la parte aérea de la planta (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2001). CAT está presente en organelos distintos al cloroplasto, tal como peroxisomas. En estos organelos, se generan importantes cantidades de  $H_2O_2$  por oxidasas involucradas en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, el ciclo del glioxilato y el catabolismo de las purinas (Feierabend, 1992). En este sentido, el aumento de la actividad CAT, a diferencia de otros autores, podría explicarse por el hecho de que porciones de membrana plasmática dañadas por la peroxidación lipídica fueron eliminadas a través de los peroxisomas, generando de esta manera cantidades extra de  $H_2O_2$ , lo que a su vez implicó un aumento de la actividad CAT, por vía de la expresión de los genes que la codifican, como se mencionó anteriormente. Finalmente, en este trabajo se demuestra que la actividad CAT, estuvo aumentada en todos los tratamientos y estaría aportando a la eliminación de  $H_2O_2$  de manera importante en el sistema radicular de la planta ayudando al manejo del estrés oxidativo impuesto por el déficit hídrico.

La tendencia general se mantuvo entre los tratamientos con/sin fertilización (Davies *et al.*, 1996), pero existen algunas diferencias importantes. Como se observa en la Fig 4, para S/m fertilizado se observó que la actividad CAT aumentó significativamente en todos los niveles hídricos llegando a una actividad máxima de  $77,49 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$ ; 67,5 % superior al control S/m sin fertilizar en el mismo nivel hídrico, lo cual implica que la fertilización ayudaría a la planta en su manejo del estrés hídrico. La aplicación de N y P durante condiciones de estrés hídrico puede resultar en un crecimiento desbalanceado de la raíz respecto a la parte aérea, situación que desde el punto de vista productivo puede

no ser deseable (Zainudin, 2003), sin embargo, esta situación depende de la fisiología de cada planta, ya que se ha observado que suelos con adecuadas cantidades de nutrientes tales como N, P y K, ayudarían a aliviar el estrés hídrico debido a un aumento de la exploración del suelo por la raíz (Potash and Phosphate Institute) con lo cual existirían más raíces fisiológicamente activas lo que a su vez podría traducirse en una mayor actividad CAT. En el caso de Da sólo durante el estrés 2 fertilizado, se observó una mayor actividad CAT 5,3 % mayor con respecto al control. En el caso de Pt no existen diferencias significativas, por lo cual puede decirse que la fertilización tuvo pocos efectos sobre la micorrización y la magnitud de la actividad CAT, lo cual nuevamente concuerda con el hecho que, globalmente, la fertilización más la micorrización favorecerían a la planta de mejor forma que micorrización y fertilización por separados.

La micorrización implicó un aumento en la actividad enzimática CAT en casi todos los niveles hídricos. La excepción la constituye el nivel de recuperación de Da fertilizado y en menor medida el tratamiento Da sin fertilizar, en el mismo nivel hídrico. Sin embargo, era un descenso en la actividad CAT lo que se esperaba en el nivel de recuperación en comparación al nivel de estrés 2. Pudo observarse que sin estrés, las raíces presentan mayor actividad CAT cuando están micorrizadas (irrigación normal: Da con/sin fertilizar y Pt con/sin fertilizados) y al igual que la actividad SOD, al menos en este nivel, implicaría un efecto aditivo de la actividad CAT presente en el hongo más la actividad CAT de la raíz de la planta. Este resultado es concordante con la hipótesis propuesta y con los resultados de Porcel *et al.* (2004), pero es opuesto a lo planteado por el mismo autor en 2003, donde se encontró que la actividad CAT permaneció inalterada en raíces micorrizadas y

sometidas a estrés hídrico, en comparación a aquellas sin micorrizar. Como se observó, la máxima actividad alcanzada por CAT en los tratamientos control (S/m fertilizado) fue  $77,49 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot.}$  La mayor actividad CAT fue determinada en la micorriza *N. dombeyi*-*D. antarctica* fertilizado durante el estrés 2 y fue de  $114,88 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot.}$  Estos incrementos estarían demostrando la importancia de CAT en la eliminación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la raíz (micorriza) a diferencia de lo que ocurre en las hojas de la planta, donde el papel preponderante en la eliminación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  lo desempeñan AsA y APX (Shanker, 2004).

### 5.5 Glutación-reductasa

GR y APX, tienen roles claves en el ciclo ascorbato-glutación, tanto en los cloroplastos como en otros compartimentos celulares. La función ejercida por GR es clave debido a que debe reducir al GSSG (oxidado) y mantener un nivel fisiológico de GSH (en su estado reducido). GSH es quien ejecuta la función antioxidante, de manera directa, reduciendo a una ERO o bien, regenerando el pool de Ascorbato por vía de la enzima DHAR. (Foyer and Halliwell, 1976). Aunque en este trabajo no se cuantificaron GSH ni AsA, las actividades GR y APX dan cuenta indirecta del estado de este tampón antioxidante. Un aumento de la actividad GR implicaría la necesidad de reducir GSSG originado como respuesta frente al estrés hídrico. Como se observa en la Fig. 5, y en concordancia a la hipótesis propuesta, la actividad GR presentó una situación semejante a SOD y CAT, en la que a mayor nivel de estrés hídrico, la actividad enzimática es mayor. GR aumentó, tanto en las raíces de los tratamientos Da y Pt como aquellas S/m, fertilizadas y sin fertilizar. La principal diferencia entre los tratamientos radica en la magnitud del aumento, ya que la

mayor diferencia observada en el aumento es de 39,7 % (Pt fertilizado estrés 2 v/s Pt fertilizado irrigación normal). Este resultado es concordante con lo expuesto por Jiang y Zhang, (2001); Arbona et al., (2003); Shanker, (2004) y Türkan, (2005), donde, en general se observa un aumento de la actividad GR cuando la planta se encuentra en condiciones de estrés oxidativo. En el presente trabajo queda de manifiesto que, bajo las condiciones impuestas, en las raíces de *N. dombeyi* se encuentra una elevada actividad GR (297,39 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot en S/m fertilizado) comparada con la actividad GR encontrada en las raíces micorrizadas, donde se observa un máximo de 383,73 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot (Pt fertilizado) lo cual implica un aumento de 31.5 %, razón que se mantiene aproximadamente constante durante el nivel de estrés 2 comparando S/m sin fertilizar con Pt fertilizado.

El efecto de la fertilización en la actividad GR fue mucho más claro que en los casos anteriores. En la Fig. 5 se observa que no hubo diferencias entre los tratamientos fertilizados y sin fertilizar, con excepción de los tratamiento Da en el nivel de irrigación normal, donde la actividad GR fue significativamente mayor en Da no fertilizado que Da fertilizado (4,8 % mayor). Como se mencionó previamente, De Giorgio *et al.* (2004), encontraron que plantas micorrizadas y sometidas a diferentes cargas de fertilización sólo disminuyen el grado de micorrización respecto a las sin fertilizar en una pequeña proporción apenas significativa. En base a estos resultados, la actividad GR no se ve alterada por efectos nutricionales y tomando en cuenta los resultados anteriores, el efecto de la fertilización y la micorrización conducen a un mejor estado general de la planta, sin importar el hecho de que probablemente el grado de micorrización pueda resultar menor

cuando la planta es sometida a fertilización.

La micorrización implicó un aumento en la actividad enzimática GR en todos los niveles hídricos, comparando Pt y Da con/sin fertilizar con S/m con/sin fertilizar. En la Fig. 5 puede observarse que sin estrés las raíces presentaron mayor actividad GR en el nivel de irrigación normal: Da con/sin fertilizar y Pt con/sin fertilizar) y al igual que la actividad SOD y CAT, al menos en este nivel, implicaría un efecto aditivo de la actividad GR presente en el hongo más la actividad GR de la raíz de la planta. Porcel *et al.* (2003) encontraron que sólo GR aumentó en raíces de plantas micorrizadas sometidas a estrés hídrico, en comparación a plantas sin micorrizar, mientras que el mismo autor en 2004 encontró que la actividad GR disminuyó considerablemente cuando la planta estaba micorrizada y sometida a estrés hídrico. Por otro lado Jiang y Zhang (2001) también observaron que en condiciones de estrés oxidativo por déficit hídrico, GR aumentaba su actividad. Como se vio, la máxima actividad alcanzada por GR en los tratamientos control (S/m fertilizado) fue  $297,39 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$  La mayor actividad GR fue determinada en la micorriza *N. dombeyi-P. tinctorius* sin fertilizar durante el estrés 2 y llegó a  $512,27 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$  Aunque los incrementos no son tan elevados, el principal aumento se obtiene con Pt fertilizado durante la recuperación; 60.6 % superior que S/m fertilizado en el mismo nivel hídrico.

## 5.6 Ascorbato-peroxidasa

La actividad APX aumentó, tanto en las raíces de los tratamientos Da y Pt como aquellos S/m, fertilizadas y sin fertilizar. Hubo diferencias entre casi todos los niveles hídricos dentro de cada tratamiento, excepto en el tratamiento S/m sin fertilizar en los niveles de estrés 1 y 2; Da sin fertilizar en los niveles de estrés 2 y recuperación; S/m fertilizado en los niveles de estrés 2 y recuperación y Pt fertilizado en los niveles de estrés 1 y 2. Porcel *et al.* (2003) encontraron que APX aumentó en raíces de plantas micorrizadas sometidas a estrés hídrico, en comparación a plantas micorrizadas bien irrigadas, resultado semejante a Jiang y Zhang (2001) y Liang *et al.*, (2003) quienes también encontraron que en condiciones de estrés oxidativo por déficit hídrico, APX aumentaba su actividad. APX, a diferencia de CAT y en similitud con SOD y GR, se encuentra presente tanto en los cloroplastos como en los otros compartimentos de la planta y es una de las enzimas clave en el ciclo AsA - GSH para la eliminación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los cloroplastos (Asada y Takahashi, 1987). Esta función ha sido bien establecida, junto al hecho de existir 3 isoformas de la enzima (Miyake y Asada, 1992; Chen y Asada, 1989), las cuales, al igual que SOD, presentan patrones de expresión en función de las condiciones impuestas (Miyake y Asada, 1994; Ishikawa *et al.*; 1996a, 1996b, y Leonardis *et al.*, 2000). Se demuestra en este trabajo la importancia de APX en la raíz de la planta, donde puede ser sintetizada *in situ* o transportada desde las estructuras aéreas. Como se mencionó en 5.5.; existe una estrecha relación entre APX y GR, particularmente en el cloroplasto, sin embargo, la eliminación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en este organelo también es ejecutada por antioxidantes no enzimáticos. Para la planta, más importante que el consumo de AsA por APX, es el hecho

de mantener una adecuada concentración de AsA, el cual por sí sólo, es el más importante antioxidante en los cloroplastos (Foyer y Halliwell, 1976). Como puede observarse, esta situación cambia en la raíz, ya que, evidentemente APX incrementa su actividad consecuentemente con el aumento del nivel de estrés, llegando a un máximo de  $3,91 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$  en el tratamiento Pt fertilizado, en el nivel de recuperación.

La tendencia general se mantiene entre los tratamientos con/sin fertilización, ya que se observan muy pocas diferencias. La principal de ellas ocurre entre los tratamientos Da con/sin fertilización, en el nivel de recuperación, donde existe un importante descenso de 49,3 % en la actividad APX cuando la planta fue fertilizada. Como se mencionó con anterioridad, en términos globales, y para las condiciones aquí impuestas, la suma de micorrización y fertilización resultan más favorables para la planta que dichos tratamientos por separado (De Giorgio *et al.*, 2004; Barra 2004). Por otra parte la actividad APX en el tratamiento Pt fertilizado, en el nivel de recuperación, aumentó en 74,6 % respecto al tratamiento Pt sin fertilizar, en el mismo nivel hídrico. Este resultado implica que Da fertilizado se recuperó más rápido que Da sin fertilizar y con Pt ocurrió al revés, sin embargo, hay que recordar, que en este nivel los resultados en general fueron bastante diferentes a lo esperado por que, como se mencionó, la re-hidratación impuso otro grado de estrés a la planta, de manera que en estas condiciones Da fertilizada tuvo un mejor comportamiento.

La micorrización implicó un aumento en la actividad enzimática APX en casi todos los niveles hídricos. La excepción la constituye el nivel de estrés 1 con Da con/sin fertilizar

comparado con S/m con/sin fertilizar en el mismo nivel de estrés hídrico. Como puede observarse en la Fig 6, las raíces sin estrés presentan mayor actividad APX cuando están micorrizadas (irrigación normal: Da con/sin fertilizar y Pt con/sin fertilizar) y al igual que la actividad SOD y CAT y GR, al menos en este nivel, implicaría un efecto aditivo de la actividad APX presente en el hongo más la actividad APX de la raíz de la planta. Finalmente, Porcel *et al.* (2003) encontraron que APX disminuyó en raíces de plantas micorrizadas sometidas a estrés hídrico, en comparación a plantas sin micorrizar, mientras que en Porcel *et al.* (2004) encontraron que la actividad APX permaneció alta en plantas no micorrizadas y que bajo irrigación normal o estrés hídrico, plantas micorrizadas igualmente presentan baja actividad APX. Por otro lado Jiang y Zhang (2001), observaron que en condiciones de estrés oxidativo por déficit hídrico, APX aumentaba su actividad.

### **5.7 Comentarios finales**

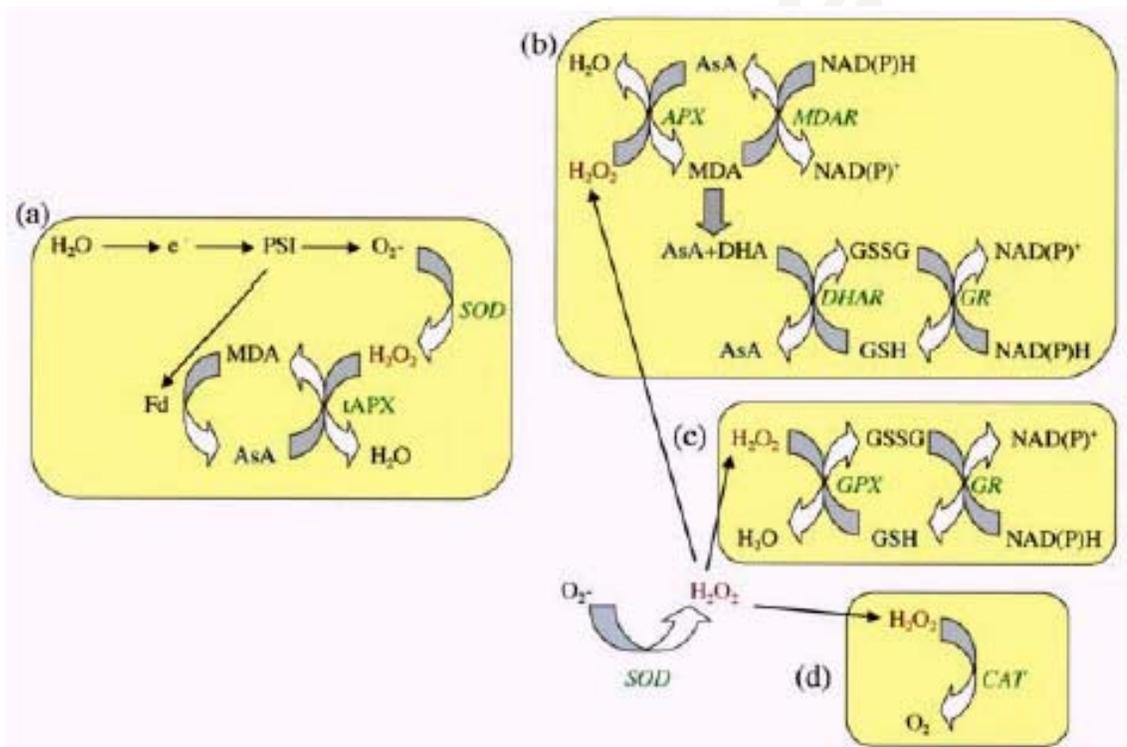
Cuando la disponibilidad del agua en el suelo disminuye, el potencial de agua del suelo decrece y la planta tiene que disminuir su potencial hídrico para continuar con el flujo de agua desde el suelo. Para lograr esto, la planta debe generar un potencial osmótico menor, mecanismo fisiológico denominado ajuste osmótico (Flexas *et al.* 2004). El cierre inmediato de estomas (como uno de los mecanismos de ajuste osmótico) genera una disminución de la disponibilidad de CO<sub>2</sub> fotoasimilable. Con el desarrollo del estrés, en el cloroplasto resulta limitante la generación de poder reductor (NADPH), convirtiendo al O<sub>2</sub> en aceptor de electrones. Esto deriva en un aumento en la generación de ERO, moléculas que conducen a la disminución de la eficiencia fotosintética en un proceso conocido como

fotoinhibición (Asada, 1999), disminuyendo la producción de energía por parte de la planta la cual, eventualmente, morirá. Sin embargo, durante el desarrollo del estrés, las ERO, también actúan como señales que inducen diferentes vías de defensas (Fig. 7). Ya que las ERO son tóxicas pero también participan en eventos de señalización claves, la planta requiere diferentes mecanismos para regular las concentraciones intra- y extra celulares de ERO. Estos mecanismos incluyen SOD, APX, CAT, GR (Fig. 7). El balance entre la actividad celular de SOD, and APX (y/o CAT) es considerado crucial para mantener en estado estacionario el nivel de  $O_2$  y  $H_2O_2$ .

Los estudios de los mecanismos de defensa que la planta despliega cuando se encuentra en simbiosis micorrízica, se centran principalmente en modelos simbióticos con MA y en la parte aérea de plantas herbáceas. Son pocos los estudios realizados en raíces de especies leñosas y con ectomicorrizas, por lo que, hasta ahora, existen pocos parámetros de comparación. Los resultados obtenidos por diferentes investigadores son disímiles, probablemente debido, entre otros factores, a las diferentes especies fúngicas, al tipo de planta y a las diferentes interacciones que se establecen entre ambas y el sustrato utilizado. La mayoría de estos estudios apuntan a que primero la planta evita o tolera el déficit hídrico, poniendo en juego una serie de mecanismos fisiológicos, tales como aumento de la captación de agua por las hifas (Marulanda *et al.*, 2003) o acumulación de azúcares y aminoácidos en las hojas (Porcel *et al.*, 2004) y que luego se iniciaría la cascada de reacciones que involucran, por ejemplo, un aumento de las actividades enzimáticas antioxidantes.

Los datos obtenidos en este experimento demuestran un incremento de la actividad enzimática antioxidante en concordancia con la disminución de los niveles hídricos, tanto

en las plantas micorrizadas como en aquellas sin micorrizar. Aunque esta diferencia no fue siempre estadísticamente significativa, existe una tendencia que es más clara mientras menor es el contenido hídrico del suelo, con respecto al control.



**Fig. 7: Las principales vías de eliminación de ERO en plantas.** (a). SOD y APX unida a tilacoide (tyl-APX) en el cloroplasto como parte del ciclo agua-agua. (b). SOD y APX en el estroma, citosol, mitocondria y apoplasto de plantas, como parte de la vía Ascorbato-glutatión. (c) Glutatión peroxidasa (GPX) y su ciclo de regeneración. (d) Catalasa en peroxisomas. AsA, ascorbato; GSH y GSSG, glutatión reducido y oxidado; DHA, deshidroascorbato; DHAR, deshidroascorbato reductasa; MDA, monodeshidroascorbato; MDAR, monodeshidroascorbato reductasa; GR, Glutatión reductasa; PSI, fotosistema I; Fd, ferredoxina; e-, electrón.

En cuanto a los efectos de la fertilización, también existen diferencias entre este trabajo y otros autores. La mayoría propone que, por ejemplo, la fertilización con N altera el balance entre costos y beneficios en la simbiosis micorrízica y que las comunidades de hongos micorrízicos establecidas en suelos fertilizados con N presentan menores beneficios mutualistas que aquellos en suelos no fertilizados (Corkidi *et al.*, 2002). Sin embargo, en el conjunto, se observa que la fertilización en general benefició a la planta, dado que se observaron aumentos importantes en las actividades enzimáticas antioxidantes con la fertilización. Aún cuando es conocido que, por ejemplo, una elevada carga de fertilizante nitrogenado, tiene efectos deletéreos sobre la simbiosis, en este trabajo, la fertilización aplicada está muy por debajo de los valores estándar experimentales que a menudo se hace referencia.

Para la cuantificación de los marcadores de daño oxidativo, en particular, con el contenido de  $H_2O_2$  los resultados no son tan claros pero es posible observar una tendencia, en la cual a mayor déficit hídrico existe un aumento en el contenido de  $H_2O_2$  y un descenso en simbiosis micorrízica. Con el contenido de MDA se observa de manera más clara la situación anterior.

## 6. CONCLUSIONES

Uno de los mecanismos por los cuales el estrés hídrico conduce a un estrés oxidativo es por vía del agotamiento del poder reductor (NADH, NADPH) de la planta, lo cual causa activación del  $O_2$  y daño oxidativo, medido como aumento en el contenido de MDA en las raíces de *N. dombeyi*. Este fenómeno involucra la generación en exceso de ERO, tales como  $O_2^{\cdot -}$  y  $H_2O_2$ , este último, claramente aumentó su contenido en las raíces de *N. dombeyi*.

$H_2O_2$  y otras ERO están involucradas en procesos de señalización celular e inducen genes implicados en la respuesta al estrés. Algunos de estos genes activados serían finalmente traducidos a enzimas antioxidantes tales como SOD, CAT, GR y APX, las cuales están aumentadas durante períodos de estrés, como pudo observarse en todos los tratamientos a nivel del tejido radicular de *N. dombeyi*.

Las plantas micorrizadas presentan mayores actividades de estas enzimas con funciones antioxidantes probablemente por alguno de los siguientes mecanismos: Las hifas discriminan el déficit hídrico del suelo y activan sus propias vías de señalización, aumentando la síntesis de sus enzimas antioxidantes y/o las moléculas de señalización (factores de transcripción, por ejemplo) son translocadas a la planta y éstas activan a los genes de enzimas antioxidantes y/o la planta activa sus propias vías de señalización y las moléculas son translocadas a las hifas del hongo y/u ocurre todo a la vez dependiendo del factor que inició la respuesta al estrés y de la enzima que debe a ser activada.

Las enzimas antioxidantes actúan eliminando el exceso de ERO, particularmente  $O_2^{\cdot -}$  y  $H_2O_2$ , protegiendo a la planta de su acumulación y permitiendo que ésta continúe desenvolviéndose en rangos fisiológicos.

Finalmente, se concluye que la micorrización permitió a las plantas de *N. dombeyi* un mejor desempeño en condiciones de déficit hídrico, en las condiciones experimentales impuestas y por este motivo se propone a las dos especies de hongos estudiados, *P. tinctorius* y *D. antarctica*, como potenciales inóculos en *N. dombeyi*, a modo de favorecer la protección frente al estrés oxidativo producido por déficit hídrico tanto en prácticas silviculturales de vivero como de campo.

## 7. LITERATURA

Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*. 105: 121–126.

Alberdi, M.; Romero, M.; Rios, D. y Wenzel, H. 1985. Altitudinal gradients of seasonal frost resistance in *Nothofagus* communities of southern Chile. *Acta Ecologica / Ecologia Plantarum*. 6: 21-30.

Alberdi, M. 1997. Ecofisiología de especies leñosas de los bosques higrófilos templados de Chile: Resistencia a la sequía y bajas temperaturas. En: Armesto J.; Villagrán, C. y Arroyo, M. (Eds.). *Ecología de los bosques nativos de Chile*. Editorial Universitaria, págs. 279-299

Alexander, I. y Hogberg, P. 1986. Ectomycorrhizae of tropical angiosperm trees. *New Phytologist*. 102: 541-549.

Alscher, R.G.; Erturk, N. y Heath, L.S. 2003. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. of Experimental Botany*. 53 (372): 1331-1341.

Álvarez, M. 2001. Die Bedeutung ektotropher Mykorrhiza für die Nährstoffversorgung von *Nothofagus obliqua*. Untersuchungen unter Berücksichtigung der Boden-und Nährstoffbedingungen der *Nothofagus*-Wälder in

Südchile im Hinblick auf Wiederaufforstung und nachhaltige Forstwirtschaft. Dissertation. Bremen, Germany. Pág. 93.

Álvarez, M.; Härtel, S.; Godoy, R. y Heyser, W. 2003. New perspectives in determination of phosphatase activity in ectomycorrhiza of *Nothofagus obliqua* forests in southern chile. *Gayana Botanica*. 60 (1): 41-46.

Álvarez, M.; Godoy, R.; Heyser, W. y Härtel, S. 2004. Surface bound phosphatase activity in living hyphae of ectomycorrhizal fungi of *Nothofagus obliqua*. *Mycologia*. 96: 479-487.

Álvarez, M.; Godoy, R.; Heyser, W. y Härtel, S. 2005. Anatomical-physiological determination of bound phosphatase activity in ectomycorrhiza of *Nothofagus obliqua* based on image processed confocal fluorescence microscopy. *Soil Biol and Biochem*. 37: 125-132.

Álvarez, M.; Gieseke, A.; Godoy, R. y Härtel, S. 2006. Surface-bound phosphatase activity in ectomycorrhizal fungi: a comparative study between colorimetric and microscope-based method. *Biol and Fertility of Soils*. 37: 125-132.

Amako, K.; Chen, G. y Asada, K. 1994. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant and Cell Physiol*. 35: 497–504.

Arbona V.; Flors, V.; Jacas, J.; García-Agustín, P. y Gómez-Cadenas, A. 2003. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses of carrizo citrage, a salt-sensitive citrus rootstock, to different levels of salinity. *Plant Cell Physiol.* 44 (4): 388-394.

Arrigoni, O. y Tulio, M. 2000. The role of ascorbic acid in cell metabolism: between genes directed functions and unpredictable chemical reactions. *J. of Plant Physiol.* 157: 481-488

Arroyo, M.; Armesto, J.; Rozzi, R. y Peñaloza, A. 1999. Bases de la sustentabilidad ecológica y sus implicaciones para el manejo y conservación del bosque nativo en Chile. Capítulo 2. En: Donoso C. y Lara A. (Eds.). *Silvicultura de los bosques nativos de Chile*. Editorial Universitaria.

Asada, K. y Takahashi, M. 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. En: Kyle, D.; Osmond, C. y Arntzen, C. (Eds.). *Photoinhibition*. Elsevier, Amsterdam. Págs. 227-287

Asada, K. 1999. The water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Rev. of Plant Physiol. and Plant Mol. Biology.* 50: 601-639.

Augé, R. 2001. Water relations, drought and VA mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*. 11: 3-42.

Azcón, R. y Tobar, R. 1998. Activity of nitrate reductase and glutamine synthetase in shoot of mycorrhizal *Allium cepa*. Effect of drought stress. *Plant Science*. 133: 1-8.

Bannister, J.; Bannister, W. y Rotilio, C. 1987. Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. *Crit. Rev in Biochem*. 22: 111-180.

Barra, M. 2004. Ensayos de inoculación micorrízica en *N. obliqua* (Mirb.) Oerst. en condiciones de invernadero. Tesis, Escuela de Ingeniería Forestal. Facultad de Ciencias Forestales. Univ. Austral de Chile. 36 págs.

Beyer, W. y Fridovich, I. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochem*. 161: 559–566.

Biemelt, S.; Keetman, U.; Mock, H-P. y Grimm, B. 2000. Expression and activity of isoenzymes of superoxide dismutase in wheat roots in response to hypoxia and anoxia. *Plant Cell and Environment*. 23: 135-134.

Bledsoe, C. 1992. Physiological ecology of ectomycorrhizae: implications and field application. En: Allen, M. (Ed.). *Mycorrhizal functioning*. Chapman & Hall, Nueva

York. Págs. 424-437.

Blokhina, O.; Fagerstedt, V. y Chirkova, T. 1999. Relationships between lipid peroxidation and anoxia tolerance in a range of species during post-anoxic. *Physiologia Plantarum*. 105: 625-632.

Blokhina, O.; Virolainen, E. y Fagerstedt, K. 2003. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of Botany*. 91: 179-194.

Bougher, N. y Malajczuk, N. 1990. Effect of high soil moisture on formation of ectomycorrhizas and growth of karri (*Eucalyptus diversicolor*) seedlings inoculated with *Descolea maculata*, *Pisolithus tinctorius* and *Laccaria laccata*. *New Phytologist*. 114: 87-91.

Bowler, C.; Inze, D. y Van Montagu, M. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual. Rev. of Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 83-116

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochem.* 72: 248-254.

Bradley, D.E. y Min. D.B. 1992. Singlet oxygen oxidation of foods. *Cat. Rev. Food Sci. Nutri.* 31: 211-236.

Brundrett, M. 1991. Mycorrhizas in natural ecosystems. *Advances in Ecol. Research*, 21: 171-313.

Brundrett, M.; Bougher, N.; Dell, B.; Grave, T. y Malajczuk, N. 1996. Examining mycorrhizal associations. *En: Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture*. Australian Centre for International Agricultural Research. Camberra. Monograph. 32 págs.

Bryla, D. y Duniway, J. 1997. Effects of mycorrhizal infection on drought tolerance and recovery in safflower and wheat. *Plant and Soil*. 197: 95-103.

Carlberg, I. y Mannervik, B. 1985. Glutathione reductase. *Methods in Enzymol*. 113: 484-489

Chen, G-X. y Asada, K. 1989. Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isoenzymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant Cell*. 30: 987-998.

Cho U.H. y Seo N.H. 2005. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Sci*. 168 (1): 113-120

Clarkson, D. y Hanson, J. 1980. The mineral nutrition of higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol*. 31:239-298.

Cordier, C.; Pozo, M.; Barea, J.; Gianinazzi, S. y Gianinazzi-Pearson, V. 1998. Cell defense responses associated with localized and systematic resistance to *Phytophthora parasitica* induced by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mol. Plant-Microbe Interactions*. 11: 1017-1028.

Corkidi L.; Rowland D.; Johnson N.C. y Allen E. 2002. Nitrogen fertilization alters the functioning of arbuscular mycorrhizas at two semiarid grasslands. *Plant and Soil*. 240 (2): 299-310.

Daniels, B.; Leslie, J.; Thompson, G. y Gerschevske, G. 1988. Physical and topological assessment of effects of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus on root architecture of big bluestem. *New Phytologist*. 110: 85-96.

Davies, Jr. F. ; Svenson, S. ; Cole, J. ; Phavaphutanon, L. ; Duray, S. ; Olalde-Portugal, V. ; Meier, C. y Bo, S. 1996. Non-nutritional stress acclimation of mycorrhizal woody plants exposed to drought. *Tree Physiol*. 16: 985-993.

De Giorgio D.; Sisto D.; Ubaldo D. y Vonella. A. 2004. The effects of N-fertilization levels and root mycorrhizal colonization on plant-growth and grain yield in durum wheat. En: 13th International Soil Conservation Organization Conference – Brisbane. *Conserving Soil and Water for Society: Sharing Solutions*. Págs: 150-168.

Dias de Azevedo A, Tarquinio J., Enéas-Filho, J., Rolim J.V., Gomes-Filho, E. 2005. Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt stress acclimation in maize plants. *J. of Plant Physiol.* 162:1114-1122

Donoso, C. 1995. *Bosques templados de Chile y Argentina: variación, estructura y dinámica*. Editorial Universitaria.

Donoso, P.; González, M.; Escobar, B.; Basso, I. y Otero, L. 1999. Viverización y plantación de raulí, roble y coigüe en Chile. En: Donoso C. y Lara, A. (eds.). *Silvicultura de los Bosques Nativos de Chile*. Editorial Universitaria. Págs: 189-212.

Duchesne, L.; Peterson, R. y Ellis, B. 1989. The future of ectomycorrhizal fungi as biological control agents. *Phytoprotection*. 70: 51-57.

Elstner, E. 1991. Mechanism of oxygen activation in different compartments of plant cell. En: Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism. Pell, E. y Steffen, K. (Eds.). *American Soc. Plant Physiol.* Rockville, M.D. Págs. 13-25

Elstner, E. y Oswald, W. 1994. Mechanism of oxygen activation during plant stress. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*. 102: 131-154.

Feierabend, J.; Schaan, C.; y Hertwig, B. 1992. Photoinactivation of catalase occurs under both high-and low-temperature stress conditions and accompanies photoinhibition of photosystem II. *Plant Physiol.* 100:1554-1561.

Flexas, J.; Bota, J.; Cifre, J.; Escalona, J.; Galmés, J.; Gulías, J.; Lefi, E.K.; Martínez-Cañelas, S.; Moreno, M.; Ribas-Carbó, M.; Riera, D.; Sampol, B.; y Medrano, H. 2004. Understanding down-regulation of photosynthesis under water stress: future prospects and searching for physiological tools for irrigation management. *Ann. Appl. Biol.* 144: 273-283

Foyer, CH. y Halliwell, B. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta.* 133: 21-25

Foyer, G.H y Noctor, G. 2005. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. *The Plant Cell*, 17: 1866–1875.

Frew, J.; Jones, P. y Scholes, G. 1983. Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide and organic hydroperoxide at low concentration in aqueous solution. *Anal Chim. Acta.* 15: 139–150.

Fridovich, I. 1986. Superoxide dismutase. En: *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*. John Wiley Sons (Eds.), N.Y. 58: 61-97

Fryer, M. 1992. The antioxidant effects of thylakoid vitamin E. *Plant Cell Environ.* 15: 381-392.

Gacitúa, Y. 2005. Respuestas morfológicas de plántulas de *N dombeyi* micorrizadas, frente a diferentes niveles de estrés hídrico. Tesis, Escuela de Ing. Forestal. Facultad de Ciencias Forestales. Univ. Austral de Chile. 53 págs.

Gardner, P. y Fridovich, I. 1991. Superoxide sensitivity of *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydratase. *J. Biol. Chem.* 226:1 478-1483.

Garrido, N. 1988. *Agaricales* S.I. und ihre Mycorrhizen in den *Nothofagus*-Wäldern Mittelchile. *Bibliotheca Mycologica*. Band 120. J. Cramer (Ed.). Berlin, Stuttgart. Germany, 528 págs.

Godoy, R. y Palfner, G. 1997. Ectomicorrizas en *Nothofagus alpina* y *N. dombeyi* del sur de Chile. *Boletín Micológico*. 12 (1-2): 55-66.

Grandmaison, J.; Olah, G.; van Calsteren, M. y Furlan, V. 1993. Characterization and localization of plant phenolics likely involved in the pathogen resistance expressed by endomycorrhizal roots. *Mycorrhiza*. 3: 155-164.

Grosse, H y Quiroz, I. 1999. Silvicultura de los bosques de segundo crecimiento de roble, raulí y coigüe en la región centro sur de Chile. En: Donoso C. y Lara, A. (Eds.). *Silvicultura de los bosques nativos de Chile*. Editorial Universitaria.

Halliwell, B. y Gutteridge, J. 1989. *Free radicals in biology and medicine*. 2° Edición. Clarendon Press. Oxford, UK.

Harley, J. y Harley, E. 1987. A check-list of mycorrhiza in the British flora. *New Phytologist* (Supplement). 105: 1-102.

Hernández, R. 2001. Libro de Botánica On Line. Versión 2.0. <http://www.forest.ula.ve/~rubenhg>.

Ishikawa, T.; Sakai, K.; Yoshimura, K.; Takeda, T. y Shigeoka, S. 1996a. cDNAs encoding spinach stromatal and thylakoid-bound ascorbate peroxidase, differing in the presence or absence of their 3' -coding regions. *FEBS Letters*. 384: 289-293

Ishikawa, T.; Takeda, T. y Shigeoka, S. 1996b. Purification and characterization of cytosolic ascorbate peroxidase from Komatsuna (*Brassica rapa*). *Plant Science*. 120: 11-18.

Iturbe-Ormaetxe, I.; Matamoros, MA.; Rubio, M.; Dalton, D. y Becana, M. 2001. The antioxidants of legume nodule mitochondria. *Mol. Plant-Microbe Interactions*. 14:

1189-1196.

Janda, T.; Salía, G.; Tari, I.; Páldi, E. 1999. Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta*. 208: 175–80.

Jiang, M. y Zhang, J. 2001. Effect of Abscicic Acid on Active Oxygen Species, Antioxidative Defense System and Oxidative Damage in Leaves of Maize Seedlings. *Plant Cell Physiol*. 42 (11): 1265-1273.

Jimenez, A.; Hernandez, J.; Pastori, G.; del Rio, L. y Sevilla, F. 1998. Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescent of pea leave. *Plant Physiol*. 118: 1327-1335.

Kagan, V. 1989. Tocoferol stabilizes membrane against phospholipase A, free fatty acid and lysophospholipids. En: Diplock, A.; Machlin, J.; Packer, L. y Pryor, W. (Eds.) Vitamin E: biochemistry and health implications, Vol 570. New York, NY: *Annals of the New York Academy Sci.* Págs. 121-135.

Kamal-Eldin, A. y Appelvist, L-A. 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31: 671-701.

Kendrick, B. 1992. The Fifth Kingdom. Mycologue Publications, Waterloo. UK

Laczko, E.; Boller, T. y Wiemken, V. 2003. Lipids in roots of *Pinus sylvestris* seedlings and in mycelia of *Pisolithus tinctorius* during ectomycorrhiza formation: changes in fatty acid and sterol composition. *Plant Cell and Environment*. 27: 27–40

Lara, A.; Donoso, C. y Aravena, J. 1997. La conservación del bosque nativo en Chile: problemas y desafíos. En: Armesto, J.; Villagrán, C.; Arroyo, M. (Eds.). *Ecología de los bosques nativos de Chile*. Editorial Universitaria.

Lara, A.; Soto, D.; Armesto, J.; Donoso, P. y Wernli, C. 2003. Componentes científicos clave para una política nacional sobre usos, servicios y conservación de los bosques nativos chilenos. Reunión científica: Valdivia 17-18 de julio de 2003.

Larson, R. 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochem*. 27: 969-978.

Leonardis, S.D.; Dipierro, N. y Dipierro, S. 2000. Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato tuber mitochondria. *Plant Physiol. and Biochem*. 38: 773-779.

Leshem, Y.Y. 1992. *Plant Membranes: A Biophysical Approach to Structure, Development and Senescence*. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, The Netherlands. Pág. 266.

Lester, G.; Hodges, M.; Meyer, R. y Munro, K. 2004. Pre-extraction Preparation (Fresh, Frozen, Freeze-Dried, or Acetone Powdered) and Long-Term Storage of Fruit and Vegetable Tissues: Effects on Antioxidant Enzyme Activity. *J. Agric. Food Chem.* 52 (8): 2167 -2173.

Liang, Y.; Hu, F.; Yang, M. y Yu, J. 2003. Antioxidative defenses and water deficit-induced oxidative damage in rice (*Oryza sativa* L.) growing on non-flooded paddy soils with ground mulching. *Plant and Soil.* 257: 407-416.

Little, L. y Maun, M. 1996. The '*Ammophila* problem' revisited: a role for mycorrhizal fungi. *J. of Ecology.* 84: 1-7.

Maldonado, C. y Pahlich, E. 2004. Dinámica autogenerativa del sistema antioxidativo en plantas. En: Cabrera, H. (Ed.). Fisiología ecológica en plantas. Mecanismos y respuestas a estrés en los ecosistemas. Págs: 27-41.

Marschner, H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press, London.

May, M.; Vernoux, T.; Leaver, C.; Van Montagu, M. e Inze, D. 1998. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *J. of Experimental Botany.* 49: 649-667.

McCord, J. y Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase, an enzymatic function for erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055

Miller, R.; Hetrick, B. y Wilson, G. 1997. Mycorrhizal fungi affect root stele tissue in grasses. *Canadian J. of Botany*. 75: 1778-1784.

Miyake, C. y Asada, K. 1992. Thylakoid-Bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant Cell Physiol*. 33: 541-553.

Miyake, C. y Asada, K. 1994. Ferredoxin-dependent photoreduction of the monodehydroascorbate radical in spinach thylakoids. *Plant Cell Physiol*. 35: 539-549.

Morin, C.; Samson, J. y Dessureault, M. 1999. Protection of black spruce seedlings against *Cylindrocladium* root rot with ectomycorrhizal fungi. *Canadian J. of Botany*. 77: 169-174.

Morone, C.; Ruta, A.; Tagarelli, V. 2006. The Influence of Mineral and Organic Fertilization on the Survival of Mycorrhiza in Artichoke roots. ISHS *Acta Horticulturae* 660: V International Congress on Artichoke <http://www.actahort.org/>

Nelly, S.J.; Desikan, R.; Hancock, J.T.; 2002. Hydrogen peroxide signalling. *Plant Biol*. 5: 388-95.

Newsham, K.; Fitter, A. y Watkinson, A. 1995. Arbuscular mycorrhiza protect an annual grass from root pathogenic fungi in the field. *J. of Ecology*. 83: 991-1000.

Noctor, G. y Foyer, C. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Rev. of Plant Physiol and Plant Mol. Biol.* 49: 249-279.

Olivares, E. 2005. Efecto de la asociación micorrizica sobre la actividad del PSII de *N. dombeyi* bajo condiciones de sequía. Tesis, Escuela de Licenciatura en Ciencias. Facultad de Ciencias. Univ. Austral de Chile.

Packer, L.; Weber, S. y Rimbach, G. 2001. Molecular aspects of  $\alpha$ -tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *J of Nutrition.* 131: 369-373.

Palfner, G. 2001. Taxonomische Studien an Ektomycorrhizen aus den Nothofagus-Wäldern Mittelsüdchiles. *Biblioteca Mycologica.* Band 190. Pág. 243.

Palma, J.; Angeles-Longa, M.; del Rio, L. y Arines, J. 1993. Superoxide dismutase in vesicular arbuscular-mycorrhizal red clover plants. *Physiologia Plantarum.* 87:77-83.

Pastori G. y Foyer C. 2002. Common Components, Networks, and Pathways of Cross-Tolerance to Stress. The Central Role of "Redox" and Abscisic Acid-Mediated Controls. *Plant Physiol.* 129: 460–468.

Pavelic, D.; Arpagaus, S.; Rawyler, A. y Braendle, R. 2000. Impact of post-anoxia stress on membrane lipids of anoxia pretreated potato cells. A re-appraisal. *Plant Physiol.* 124: 1285-1292.

Polidoros, A. y Scandalios, J. 1999. Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione-S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). *Physiol Plant*. 106: 112–20.

Polle, A. 2001. Dissecting the Superoxide Dismutase-Ascorbate-Glutathione-Pathway in Chloroplasts by Metabolic Modeling. Computer Simulations as a Step towards Flux Analysis. *Plant Physiol*. 126: 445-462.

Porcel, R.; Barea, J. y Ruiz-Lozano, M. 2003. Antioxidant activities in mycorrhizal soybean plants under drought stress and their possible relationship to the process of nodule senescence. *New Phytologist*. 157: 135-143.

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

Potash and Phosphate Institute. 2006. How potash is helpful to crops when monsoons play havoc.htm. <http://www.ppi-ppic.org/ppiweb/sindia.nsf>.

Premoli, A. 1997. Genetic variation in a geographically restricted and two widespread species of South American *Nothofagus*". *J. Biogeography* 24: 883-892.

Quoreshi, A.M. y Timme,r V.R. 1998. Exponential fertilization increases nutrient uptake and ectomycorrhizal development of black spruce seedlings. *Can. J. For. Res.* 28: 674-682

Ruiz-Lozano, J. y Azcón, R. 1996. Mycorrhizal colonization and drought stress exposition as factors affecting nitrate reductase activity in lettuce plants. *Agric Ecosyst Environ.* 60:175–181.

Ruiz-Lozano, M.; Collados, C.; Barea, M. y Azcón, R. 2001. Cloning of cDNAs encoding SODs from lettuce plants which show differential regulation by arbuscular mycorrhizal symbiosis and by drought stress. *J. of Experimental Botany.* 52 (364): 2241-2242.

Ruiz-Lozano, M.; Collados, C.; Barea, M. y Azcón, R. 2001. Arbuscular mycorrhizal simbiosis can alleviate drought-induced nodule senescence in soybean plants. *New Phytologist.* 151: 493-502.

Russell, R. 1977. *Plant Root Systems: Their Function and Interaction with the Soil.* McGraw-Hill Book Co. Ltd., London.

Scandalias, J. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiol.* 101: 7-72

Schützendübel, A. y Polle, A. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*. 53 (372): 1351-1365

Shanker, A.K.; Djanaguiraman, M.; Sudhagar, R.; Chandrashekar, C.N. y Pathmanabhan, G. 2004. Differential antioxidative response of ascorbate glutathione pathway enzymes and metabolites to chromium speciation stress in green gram (*Vigna radiata* (L.) R.Wilczek. cv CO 4) roots. *Plant Sci*. 166: 1035–1043

Skulachev, V. 1997. Membrane-linked systems preventing superoxide formation. *Bioscience Reports*. 17: 347-366

Smirnoff, N. 2000. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multifaceted molecule. *Current Opinion in Plant Biol*. 3: 229-235

Smith, S. y Read, D. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. Second Edition. Academic Press. London. UK.

Sofo, A.; Dichio, B.; Xiloyannis, C. y Masia, A. 2004. Effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondialdehyde content during rewatering in olive tree. *Plant Science*. 166 (2): 293-302

Steel y Torrie. 1985. *Biostatistics, principles and procedures*. Second edition. Editorial McGraw -Hill.

Sugimoto, M. 1997. Molecular cloning and characterisation of a cDNA encoding putative phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase from spinach. *Bioscience, Biotech. and Biochem.* 61: 1379-13891

Thomas, C.; Mclean, L.; Parker, R. y Ohlweiler, D. 1992. Ascorbate and phenolic and lipid peroxidation in mitochondrial membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* 1002: 189-197

Trappe, J. 1987. Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint. En: Safir, G. (Ed.). *Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants*. CRC Press, Boca Raton, Florida. Págs. 5-25

Treseder, K. 2004. A meta-analysis of mycorrhizal responses to nitrogen, phosphorus, and atmospheric CO<sub>2</sub> in field studies. *New Phytologist*. 164 (2): 347-355.

Türkan, I.; Bor, M.; Özdemir, F. y Koca , H. 2005. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Sci.* 168: 223–231.

Turrens, J.; Freeman, B. y Crapo, J. 1982. Hyperoxia increases H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by lung mitochondria and microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 217: 411-421

Ushimaru, T.; Kanematsu, S.; Shibasaka, M. y Tsuji, H. 1999. Effect of hypoxia on the antioxidative enzymes in aerobically grown rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiologia Plantarum.* 107: 181-187.

Ushimaru, T.; Kanematsu, S.; Shibasaka, M. y Tsuji, H. 2001. Antioxidative enzymes in seedlings of *Nellumbo nucifera* germinated under water. *Physiologia Plantarum.* 112: 39-46.

Valenzuela, E. 1993. Estudio sistemático, corológico y ecológico de los *Agaricales sensu lato* de los bosques autóctonos de la región de Los Lagos en Chile. Trabajo de doctorado. Departamento de Biología Vegetal. Sección Biológica. Facultad de Ciencias. Universidad de Alcalá de Henares. España.

Van Breusegem, F.; Vranová, E.; Dat, J.F, e Inzé, D. 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci.* 161: 405–14.

Vandenabeele, S.; Van Der Kelen, K.; Dat, J.; Gadjev, I.; Boonefaes, T.; Morsa, S.; Rottiers-Slooten, L.; Van Montagu, M.; Zabeau, M, Inzé, D. y Van Breusegen, F. 2003. Comprehensive analysis of hydrogen peroxide-induced gene expression in tobacco. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 23: 16113–8.

Veblen, T.; Donoso, C.; Kitzberger, T. y Robertus, A. 1996. The ecology of southern Chilean and Argentinean *Nothofagus* forest. En: Veblen, T.; Hill, R. y Read, J. (Eds.). *The ecology and biography of Nothofagus forests*. Yale University Press.

Willekens, H.; Inze, D.; Van Montagu, M. y Van Camp, W. 1995. Catalase in plants. *Molecular Breeding*. 1: 207-228

Yan, B.; Dai, Q.; Liu, X.; Huang, S. y Wang, Z. 1996. Flooding-induced membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in corn leaves. *Plant and Soil*. 179: 261-268.

Zainudin, S.R.; °Awang, K. y Hanif, A.H bin M. 2003. Effects of combined nutrient and water stress on the growth of *Hopea odorata* Roxb. and *Mimusops elengi* linn. Seedlings. En <http://www.looksmartgardening.com/p/articles/mi.qa4107>.

Ziegler, H. 1998. Physiology. En: Sitte, P.; Ziegler, H.; Ehrendorfer, F. y Bresinsky, A. (Hrsg.). Strasburger. *Lehrbuch der Botanik*. 34. Auflage. Gustav Fischer. Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm. Germany.