

EFFECTO DE LA INOCULACIÓN DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO (PGPR) Y HONGOS MICORRÍDICOS EN PLANTAS DE LECHUGA SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA CALIDAD DEL SUELO

JV Kohler, F Caravaca, J Pascual, A Roldán

Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC), Dpto. Conservación de Suelos y Agua y Manejo de Residuos Orgánicos, Campus Universitario de Espinardo, Apdo. de correos 164, 30100 Murcia, rn014@cebas.csic.es

RESUMEN

La simbiosis micorrícica juega un papel directo en los ciclos de nutrientes en agroecosistemas y ambientes naturales, y puede contribuir a captar y suministrar nutrientes para la planta conectando las partes bióticas y geoquímicas del ecosistema. También se sabe de las rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR) que son capaces de estimular el crecimiento de la planta. Las interacciones entre las PGPR y los hongos micorrícicos arbusculares (AM) potencialmente pueden tener efectos beneficiosos en agricultura ecológica.

Se planteó un experimento de campo para evaluar los posibles efectos sinérgicos de la combinación de *P. mendocina* con *G. intraradices* o con una mezcla de hongos MA autóctonos, los efectos se evaluaron desde el punto de vista del rendimiento en cosecha y de la sostenibilidad del sistema suelo-planta. El diseño experimental fue un factorial al azar con bloques de repetición y lechuga como planta patrón.

Respecto al crecimiento de las plantas solamente se encontró un incremento significativo con la inoculación de *G. intraradices*. Los demás tratamientos incluida la fertilización no mostraron un efecto significativo en comparación con las plantas control. El contenido en fósforo subió significativamente en las plantas inoculadas con *P. mendocina*. Los niveles de potasio, hierro, calcio y sodio registrados en plantas tratadas con *G. intraradices* fueron significativamente superiores.

El suelo rizosférico de las plantas inoculadas solamente con *P. mendocina* también tenía un contenido elevado de carbono y carbohidratos hidrosolubles. Los mayores contenidos en carbohidratos totales se observaron en los suelos inoculados con hongos AM, siendo especialmente efectiva la mezcla de hongos autóctonos y las combinaciones con la cepa PGPR.

En relación directa con los carbohidratos totales se detectó el aumento más significativo en la estabilidad de agregados respecto al suelo control en los suelos inoculados con la mezcla de hongos micorrícicos autóctonos. La inoculación combinada con *P. mendocina* y *G. intraradices* también incrementó la estabilidad de agregados respecto al suelo control.

A modo de conclusión podemos confirmar que los efectos sinérgicos beneficiosos de la coinoculación bacterias PGPR-hongos MA se vieron restringidos al ámbito de las propiedades del suelo, favoreciendo la sostenibilidad del agroecosistema.

Palabras clave: PGPR, hongos MA, lechuga, sistema suelo-planta

INTRODUCCIÓN

La simbiosis micorrícica juega un papel directo en los ciclos de nutrientes en agroecosistemas y ambientes naturales (Six *et al.*, 2000) y puede contribuir a captar y suministrar nutrientes para la planta conectando las partes bióticas y geoquímicas del ecosistema (Jeffries y Barea 1994). También se sabe de las rizobacterias promotoras

de crecimiento de planta (PGPR) que son capaces de estimular el crecimiento de planta directa o indirectamente (Vessey, 2003). Las interacciones entre las PGPR y los hongos micorrícicos tienen potencialmente funciones beneficiosas (Artursson *et al.*, 2006), aunque sus mecanismos todavía no están muy bien comprendidos. Algunos mecanismos parecen ser más indirectos como la influencia de las bacterias sobre los hongos micorrícicos (Frey-Klett *et al.*, 2007) o la influencia de las bacterias en la fisiología de las plantas (Vivas *et al.*, 2003). Otros mecanismos de sinergismo son directos como la adquisición de nutrientes (Barea *et al.*, 2002) o la ramificación radical (Gamalero *et al.*, 2004b). Uno de los objetivos fue, por lo tanto, evaluar si hay efectos sinérgicos en una combinación de *P. mendocina* y *G. intraradices* o con una mezcla de hongos AM autóctonos.

Como indican varios autores (Alguacil *et al.*, 2005, Vivas *et al.*, 2006) parece que una inoculación con una mezcla de hongos AM autóctonos es más eficaz para promover el crecimiento y el estado nutricional de la planta que una inoculación con un hongo AM alóctono. Como consecuencia el segundo objetivo fue evaluar el efecto de una mezcla de hongos AM autóctonos en el crecimiento de lechuga.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño y factores experimentales

El experimento consistió en un ensayo bajo condiciones del campo con un diseño factorial en bloques al azar con dos factores. El primer factor fue la inoculación o no con la rizobacteria *P. mendocina* cepa 2. El segundo factor fue la inoculación o no bien con el hongo AM *G. intraradices* o bien con una mezcla de hongos autóctonos. Adicionalmente se plantó también lechugas con una enmienda de fertilizante como un segundo control pero bajo condiciones óptimas para las plantas.

Tabla 1. Características físico-químicas del suelo

pH (1:5, H ₂ O)	8,53± 0,04*
Conductividad eléctrica (1:5, \square S cm ⁻¹)	820± 80
Carbono orgánico total (g kg ⁻¹)	6,3± 0,6
Nitrógeno total (g kg ⁻¹)	0,52± 0,02
P asimilable (\square g g ⁻¹)	10± 0
K extraíble (\square g g ⁻¹)	166± 9
Na de cambio (\square g g ⁻¹)	545±70
Capacidad de cambio catiónico (cmol kg ⁻¹)	10,4± 0,1

* media ± desviación estándar (N=3)

En una huerta habilitada en el campo experimental (caracterización del suelo: Tabla 1) de la Universidad de Murcia se dispusieron plántulas de 15 días de edad de *L. sativa* var. Focea. Inmediatamente se inoculó o no con *G. intraradices* o con la mezcla de hongos AM autóctonos (5g de inóculo). Cada semana se inoculó o no con *P. mendocina* durante los dos meses de crecimiento (en total siete veces desde septiembre 2005 hasta diciembre 2005) con una dosis de 10¹⁰ ufc por planta en cada inoculación. Se llevó a cabo una fertilización (Compo® Universal) o no 2 veces.

Tras el tiempo de crecimiento las plantas fueron recolectadas y se tomaron las muestras de suelo. Las muestras de suelo fueron divididas en dos alícuotas. Una de ellas fue tamizada a 2 mm y almacenada a 2 °C para análisis y la otra se secó a temperatura ambiente y se tamizó de 0,25 a 4 mm para los análisis físico-químicos.

Inóculos

1. Hongos AM

Los hongos endomicorrícicos utilizados fueron *Glomus intraradices* Schenk & Smith (EEZ1) y *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe (EEZ 43). Ambos aislamientos proceden de la colección de la estación experimental del Zaidín, Granada. Además se utilizó una mezcla de distintos hongos micorrícicos procedente del suelo de huerta utilizado en los experimentos. Para la reproducción del inóculo se siguió el siguiente protocolo: se prepararon cultivos trampa utilizando como sustrato de crecimiento una mezcla de sepiolita:vermiculita (1:1, v/v) estéril y *Sorghum bicolor* como planta hospedadora. Las plántulas se inocularon con cada uno de los endófitos seleccionados, se fertilizaron con osmocote® de liberación lenta y se dejaron crecer bajo condiciones de invernadero durante 4 meses. El inóculo micorrícico resultante consiste en una mezcla de sustrato rizosférico que contiene esporas, hifas y fragmentos de raíces micorrizadas.

2. Bacterias PGPR

La cepa de *Pseudomonas mendocina* fue cedida por Probelte, S.A., Murcia, y se seleccionó por su capacidad de producir sideróforos. *Pseudomonas* spp. es un género del grupo de las γ -proteobacterias. Se caracterizan por ser bacilos rectos o ligeramente curvados, Gram negativos, oxidasa positivos, móviles y aeróbicos estrictos.

La cepa seleccionada se cultivó en un medio basado en extractos de carne y levadura, peptona y cloruro de sodio (Nutrient broth, Scharlau Chemie, Spain). Creció 48 horas en temperatura ambiente (25 °C) en un agitador Heidolph Unimax 1010. Para eliminar el medio se centrifugó el cultivo a 4000 rpm durante 5 minutos a 2 °C y se resuspendió en agua corriente estéril. La suspensión bacteriana contenía 10^9 UFC ml⁻¹.

Análisis de planta

El peso fresco de la parte aérea y radical fue anotado. Los pesos secos se determinaron tras proceder al secado del material a 65 °C durante 24h.

Se analizó el P total mediante una medida espectrofotométrica según el método de Murphy y Riley (1962).

Las concentraciones de potasio, hierro, calcio y sodio se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica en un aparato Termo Electrón Corporation modelo Iris Intrepid II XDL. Para la digestión se siguió el protocolo de Plank (1992):

El grado de micorrización fue determinado por las técnicas estándar para la visualización y cuantificación de hongos AM. Previamente a la cuantificación de la micorrización es necesario teñir las raíces con azul tripán siguiendo el método de Philips y Hayman (1970).

Propiedades físicas, físico-químicas, químicas y biológicas del suelo

Para la determinación de la actividad deshidrogenasa se utilizó el método de Garcia *et al.* (1997). En presencia de INT como aceptor de electrones se produce, en ausencia

de tampón, la formación de la correspondiente sal de formazano. La actividad fosfatasa ácida se determinó mediante la adición a la muestra de un sustrato artificial (p-nitrofenil fosfato) y posterior evaluación colorimétrica del p-nitrofenil liberado que, en medio ácido, desarrolla un color amarillo (Naseby y Lynch, 1997).

Se llevó a cabo la determinación de los agregados estables del suelo al impacto de una lluvia artificial de energía conocida (Lax *et al.*, 1994).

Las concentraciones en carbohidratos totales se determinaron según el método de Brink *et al.* (1960). Un extracto acuoso obtenido en la relación sólido líquido 1:5 por agitación mecánica durante dos horas se introdujo en el analizador de carbono orgánico total modelo TOC-5050A, dando la lectura directamente. El mismo extracto se utilizó para la determinación de los carbohidratos hidrosolubles mediante el método de Brink *et al.* (1960). La biomasa microbiana se determinó con el método de la fumigación extracción con cloroformo (CHCl₃) según Vance *et al.* (1987).

Análisis estadístico

Para los análisis de la varianza de aquellas variables que presentaban distribución log normal o heterogeneidad de varianzas se emplearon datos transformados logarítmicamente. Para los datos de porcentaje de agregados estables y de micorrización se utilizó la transformación arco seno. Las comparaciones entre las medias de los diferentes tratamientos se realizaron mediante la prueba DMS con $P < 0,05$.

RESULTADOS

Efecto en Planta

Respecto al crecimiento de las plantas solamente se encontró un incremento significativo con la inoculación con *G. intraradices*. Los demás tratamientos incluido la fertilización no mostraron un efecto significativo en comparación con las plantas control tanto en tallo como en raíz (Figura 1).

El contenido en fósforo subió significativamente en plantas inoculadas con *P. mendocina* (Figura 2). En los demás tratamientos no se pudo observar un incremento de P foliar significativo.

Los niveles de potasio, hierro, calcio y sodio registrados en las plantas tratadas con *G. intraradices* fueron mayores que los niveles en las demás plantas (Figura 2). La inoculación con *P. mendocina* y con ambos tratamientos de hongos micorrícicos aumentó el nivel de sodio foliar, pero no en el caso de una inoculación combinada entre los microorganismos (Figura 2). Los niveles de potasio en plantas tratados con hongos AM y PGPR eran más bajos que los niveles en las plantas control. La fertilización solamente tuvo un efecto positivo respecto a las plantas control en los niveles de calcio y hierro (Figura 2).

Parámetros del suelo

1. Actividades enzimáticas

La actividad de la enzima fosfatasa era prácticamente nula en el suelo rizosférico de las plantas control y se vió incrementada con los tratamientos, especialmente en el suelo de las plantas inoculadas con la mezcla de hongos AM (Figura 3).

La actividad de la enzima deshidrogenasa incrementó en el suelo rizosférico de las plantas inoculadas con hongos micorrícicos alcanzando las mayores niveles en el

suelo tratado con la mezcla de hongos AM. Este efecto positivo no se pudo observar en el suelo tratado con una combinación con hongos AM y *P. mendocina* (Figura 3).

2. Fracciones de carbono en el suelo rizosférico y estabilidad de agregados

Se detectó un mayor contenido de carbono hidrosoluble y de carbohidratos hidrosolubles en el suelo de las plantas control que en el suelo rizosférico de las demás plantas. El suelo de las plantas inoculadas solamente con *P. mendocina* también tenía un contenido elevado de carbono y carbohidratos hidrosolubles, mientras que ni el suelo fertilizado ni los suelos que estaban inoculados con PGPR y hongos AM mostraron valores elevados (Figura 4).

En contraste con el contenido en carbohidratos hidrosolubles, los mayores contenidos en carbohidratos totales se observó en el suelo inoculado con hongos AM (Figura 4).

En relación directa con los carbohidratos totales se detectó el aumento más significativo en la estabilidad de agregados respecto al suelo control en el suelo inoculado con la mezcla de hongos micorrícicos (Figura 4). La inoculación combinada con *P. mendocina* y *G. intraradices* también incrementó la estabilidad de agregados respecto al suelo control. Los demás tratamientos no incrementaron significativamente la estabilidad de agregados (Figura 4).

3. Biomasa microbiana y micorrización

Los mayores valores de biomasa microbiana se registraron en el suelo rizosférico inoculado con la PGPR *P. mendocina*. Este parámetro también se incrementó en los suelos inoculados con los hongos micorrícicos y la combinación hongos AM y PGPR. Los valores más bajos en biomasa microbiana se observaron en el suelo control y en el suelo fertilizado (Figura 4).

El grado de la micorrización de las raíces de lechuga fue significativamente elevado en todos los tratamientos con *G. intraradices* o la mezcla de hongos AM solo o en combinación (Figura 4).

DISCUSIÓN

Los resultados de este ensayo mostraron respecto al crecimiento de las plantas un crecimiento de planta significativo con una inoculación con *G. intraradices*. Los demás tratamientos incluida la fertilización no mostraron un efecto significativo en comparación con las plantas control tanto en tallo como en raíz. Los contenidos de fósforo foliar se elevaron con la enmienda con *P. mendocina*, lo que muestra su capacidad como rizobacteria solubilizadora de fósforo, como se mostró ya en ensayos anteriores, pero *P. mendocina* no fue capaz aumentar otros nutrientes foliares como el hierro, a pesar de que en otros ensayos sí fue incrementado en plantas de lechuga (Kohler *et al.*, 2006). Es más, con la inoculación combinada de *P. mendocina* y *G. intraradices* o la mezcla de hongos AM, el contenido de P y Na bajó al nivel de las plantas control, y el contenido de K foliar bajó incluso por debajo del nivel de las plantas control. Parece que en un suelo tan pobre en materia orgánica los hongos AM no fueron capaces de promover el crecimiento de lechuga.

En varias de las propiedades de suelo tanto físicas (estabilidad de agregados) como bioquímicas (actividades enzimáticas) se encontraron los valores más altos en el suelo rizosférico inoculado con la mezcla de hongos AM autóctonos, lo que indica que la mezcla de hongos está mejor adaptada. Pero estos valores elevados no se pudieron observar en los suelos inoculados con la combinación de hongos AM y *P. mendocina*. Es posible que dado un suelo muy pobre en materia orgánica (Tabla 1) y con una estructura deficiente (Figura 4), los grupos de microorganismos compitieron por los

nutrientes. Alguacil *et al.* (2005) observó en un estudio de reforestación con arbustos autóctonos en una zona semiárida, que la inoculación con una mezcla de hongos AM producía un mayor incremento en la estabilidad de agregados que una inoculación con un hongo de colección, *Glomus claroideum*. Conforme con Caravaca *et al.* (2003) el contenido total de nutrientes puede ser considerado como un parámetro representativo de la eficacia micorrícica, porque tiene en cuenta el efecto bien equilibrado de la adquisición de nutrientes y la producción de biomasa.

Llama la atención la biomasa microbiana elevada en el suelo inoculado sólo con *P. mendocina*, pero no se pudo observar el mismo resultado con los tratamientos fúngicos (Figura 4) Christensen y Jakobsen (1993) encontraron una reducción del crecimiento bacteriano por la presencia de un hongo AM y lo interpretaron como una competencia por nutrientes inorgánicos, lo que podría ser también una posible explicación en un suelo como el utilizado en nuestro experimento.

Si se comparan los resultados con el experimento de Kohler *et al.* (2006), donde se inoculó también plantas de lechuga con *P. mendocina* en condiciones del campo, llama la atención los distintos resultados. Mientras en el experimento de Kohler *et al.* (2006) aumentaron con la inoculación el rendimiento de la planta, los carbohidratos hidrosolubles, la estabilidad de agregados, la deshidrogenasa y la fosfatasa, en este experimento solamente coincidió con el aumento de fosfatasa del suelo y P foliar, lo que confirma *P. mendocina* como solubilizador de fósforo. Pero, como contraste, se pudo observar un aumento de la biomasa microbiana, algo que no se podía observar en el experimento de Kohler *et al.* (2006). El suelo usado en nuestro experimento era arcilloso y muy pobre en materia orgánica (Tabla 1), por lo tanto es posible que los microorganismos inoculados crecieron en un principio y luego bajó la actividad microbiana por limitaciones nutricionales. Cabe mencionar que la fertilización inorgánica tampoco tuvo un efecto positivo en el crecimiento de planta lo que pasa a menudo en suelos arcillosos debido a la falta de aireación, lo que constituye un estrés para la planta (Hu *et al.*, 2008).

No hubo efecto sinérgico entre *P. mendocina* y *Glomus* ssp. ni en el crecimiento de lechuga ni en las parámetros del suelo. Esto no coincide con experimentos recientes (Gamalero *et al.*, 2004a, Vivas *et al.*, 2003, Artursson *et al.*, 2006, Kumutha *et al.*, 2006) ni con un experimento anterior (Kohler *et al.*, 2007), aunque hay que añadir, que en este experimento se utilizó otro tipo de PGPR (*Bacillus subtilis*) y el experimento era un mesocosmos con substrato esterilizado. Gamalero *et al.* (2004b) vieron que los efectos sinérgicos se explicaron por la función de la rizobacteria aplicada como "mycorrhiza helper bacteria", una función que nosotros no pudimos observar, porque ni la micorrización de *G. intraradices* ni de la mezcla de hongos AM fue incrementada por la enmienda con *P. mendocina*.

Otros autores como Medina *et al.* (2003) observaron que una doble inoculación con cepas de PGPR y un hongo AM no incrementa el crecimiento de planta en comparación con una inoculación simple con un hongo micorrícico. En el experimento de Marulanda *et al.* (2008), que inocularon plantas de lechuga con la PGPR *Bacillus megaterium* y distintos hongos AM, solamente había efecto sinérgico si el hongo era autóctono o comercial, pero no había sinergismo si era de colección. Por lo tanto, los autores concluyen que un efecto positivo depende del origen de los microorganismos. Vivas *et al.* (2003, 2006) indican que se consigue un efecto positivo si ambos socios tienen el mismo origen y si han crecido en el suelo original, lo que puede explicar que no se encontrara efecto sinérgico en nuestro experimento, porque ni la PGPR, ni el hongo de la colección, *G. intraradices*, ni la mezcla de los hongos procedían del suelo del origen, aunque hay que destacar que la mezcla de hongos eran autóctonos de un suelo de huerta del municipio de Murcia. Esto podría ser el motivo de que en las propiedades del suelo la inoculación con la mezcla de hongos AM sí produjo el mejor efecto. Requena *et al.* (1997) sospecharon que un efecto neutral o hasta negativo de una doble inoculación con PGPR y hongos AM podría ser la competencia por P, lo que

es una posible explicación, en nuestro caso la inoculación simple con *P. mendocina* sí provocó un aumento en el P foliar de lechuga, pero con una combinación de la PGPR con cualquiera de los hongos AM bajó el nivel del P foliar al de las plantas control.

CONCLUSIÓN

Podemos confirmar que los efectos sinérgicos beneficiosos de la coinoculación bacterias PGPR-hongos MA se vieron restringidos al ámbito de las propiedades del suelo, favoreciendo la sostenibilidad del agroecosistema.

BIBLIOGRAFÍA

- Alguacil M.M., F. Caravaca, A. Roldán. 2005. Changes in rhizosphere microbial activity mediated by native or allochthonous AM fungi in the reafforestation of a Mediterranean degraded site. *Biol. Fertil. Soils* 41, 59–68.
- Artursson V., R.D. Finlay, J.K. Jansson. 2006. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environ. Microbiol.* 8, 1–10.
- Barea J.M., R. Azcón, C. Azcón-Aguilar. 2002 Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 81, 343-351.
- Brink R.H., P. Dubach, D.L. Lynch. 1960. Measurements of carbohydrates in soil hydrolyzates with anthrone. *Soil Sci.* 89, 157-166.
- Caravaca F., J.M. Barea, J. Palenzuela, D. Figueroa, M.M. Alguacil, A. Roldán. 2003. Establishment of shrub species in a degraded semiarid site after inoculation with native or allochthonous arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl. Soil Ecol.* 22, 103-111.
- Christensen H., I. Jakobsen. 1993. Reduction of bacterial growth by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in the rhizosphere of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Biol. Fertil. Soils* 15, 253-258.
- Frey-Klett P., J. Garbaye, M. Tarkka. 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *Tansley Review. New Phytol.* 176, 22-36.
- Gamalero E., M.G. Martinotti, A. Trotta, P. Lemanceau, G. Berta. 2004b. Morphogenetic modifications induced by *Pseudomonas fluorescens* A6RI and *Glomus mosseae* BEG12 in the root system of tomato differ according to plant growth conditions. *New Phytol.* 155, 293-300.
- Gamalero E., A. Trotta, N. Massa, A. Copetta, M.G. Martinotti, G. Berta. 2004a. Impact of two fluorescent pseudomonads and an arbuscular mycorrhizal fungus on tomato plant growth, root architecture and P acquisition. *Mycorrhiza* 14, 185-192.
- García C., M.T. Hernández, F. Costa. 1997. Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Commun. Soil Sci. Plant Nutr.* 28, 123-134.
- Hu Y., Z. Burucs, U. Schmidhalter., 2008. Effect of foliar fertilization application on the growth and mineral nutrient content of maize seedlings under drought and salinity *Soil Sci. Plant Nutr.* 54, 133–141.
- Jeffries P., J.M. Barea. 1994. Biogeochemical cycling and arbuscular mycorrhizas in the sustainability of plant-soil systems. En: S. Gianinazzi, H. Schuepp (Eds.). Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems. Birkhäuser Verlag, Basel, Suiza, 101-115.

- Kohler J., F. Caravaca, L. Carrasco, A. Roldán. 2006. Contribution of *Pseudomonas mendocina* and *Glomus intraradices* to aggregate stabilization and promotion of biological fertility in rhizosphere soil of lettuce plants under field conditions. *Soil Use Manage.* 22, 298-304.
- Kohler J., F. Caravaca, L. Carrasco, A. Roldán. 2007. Interactions between a plant growth-promoting rhizobacterium, an AM fungus and a phosphate-solubilising fungus in the rhizosphere of *Lactuca sativa*. *Appl. Soil Ecol.* 35, 480-487.
- Kumutha K., S.P. Sundaram, J. Sempavalam. 2006. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and PGPR inoculation on growth and biochemical parameters of mulberry. *Asian J. Microbiol. Biotechnol. Environm. Sci.* 8, 355-360.
- Lax A., E. Díaz, V. Castillo, J. Albaladejo. 1994. Reclamation of physical and chemical properties of a salinized soil by organic amendment. *Arid Soil Res. Rehab.* 8, 9-17.
- Marulanda-Aguirre A., R. Azcón, J.M. Ruiz-Lozano, R. Aroca. 2008. Differential effects of a *Bacillus megaterium* strains on *Lactuca sativa* plant growth depending on the origin of the arbuscular mycorrhizal fungus coinoculated: Physiologic and biochemical traits. *J. Plant Growth Regul.* 27, 10-18.
- Medina A., A. Probanza, F.J. Gutiérrez-Mañero, R. Azcón. 2003. Interactions of arbuscular-mycorrhizal fungi and *Bacillus* strains and their effect on plant growth, microbial rhizosphere activity (thymidine and leucine incorporation) and fungal biomass (ergosterol and chitin). *Appl. Soil Ecol.* 22, 15-28.
- Murphy J., J.P. Riley. 1962. A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27, 31-36.
- Naseby D.C., J.M. Lynch. 1997. Rhizosphere soil enzymes as indicators of perturbation caused by a genetically modified strain of *Pseudomonas fluorescens* on wheat seed. *Soil Biol. Biochem.* 29, 1353-1362.
- Phillips J.M., D.S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55, 158-161.
- Plank C.O. 1992. Reference Plant Analysis Procedures for the Southern Region of the United States. *Southern Co-operative Series Bulletin* 368, 71-73.
- Requena N., I. Jimenez, M. Toro, J.M. Barea. 1997. Interactions between plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR), arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* spp. in the rhizosphere of *Anthyllis cytisoides*, a model legume for revegetation in mediterranean semi-arid ecosystems. *New Phytol.* 136, 667-677.
- Six J., E.T. Elliott, K. Paustian. 2000. Soil macroaggregate turnover and microaggregate formation: A mechanism for C sequestration under no-tillage agriculture. *Soil Biol. Biochem.* 32, 2099-2103
- Vance E.D., P.C. Brookes, D. Jenkinson. 1987. An extraction method for measuring microbial biomass carbon. *Soil Biol. Biochem.* 19, 703-707.
- Vessey J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255, 571-586
- Vivas A., I. Vörös, B. Biró, E. Campos, J.M. Barea, R. Azcón. 2003. Symbiotic efficiency of autochthonous arbuscular mycorrhizal fungus (*G. mosseae*) and *Brevibacillus* sp. isolated from cadmium polluted soil under increasing cadmium levels. *Environ. Pollut.* 126, 179-189.
- Vivas A., J.M. Barea, B. Biró, R. Azcón. 2006. Effectiveness of autochthonous bacterium and mycorrhizal fungus on *Trifolium* growth, symbiotic development

1. Figuras

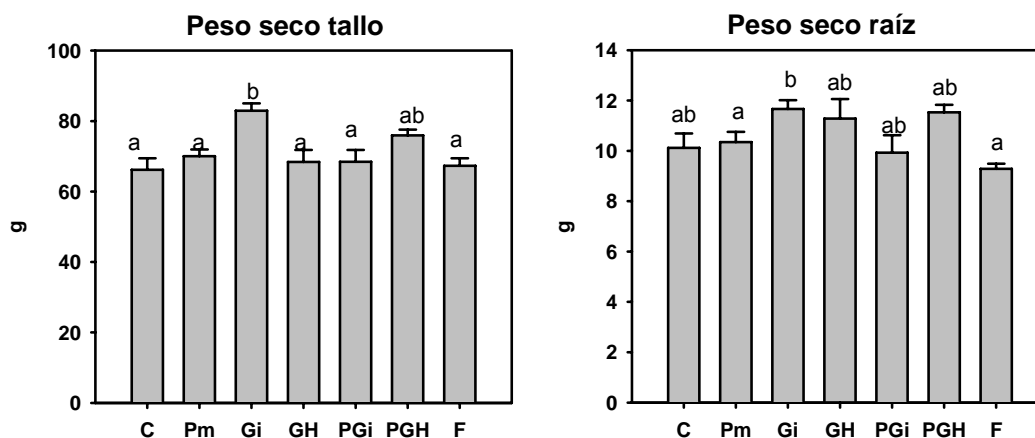


Figura 1: Peso seco de lechuga (Tallo y raíz) después de dos meses desde la plantación (n = 5). C, control; F, fertilizado; Gi, inoculado con *G. intraradices*; GH, inoculado con una mezcla de hongos micorrícicos, Pm, inoculado con *P. mendocina*, PGi, inoculado con *G. intraradices* y *P. mendocina*, PGH, inoculado con una mezcla de hongos micorrícicos y *P. mendocina*. Los valores que comparten letra no difieren estadísticamente según el test DMS ($p < 0,05$).

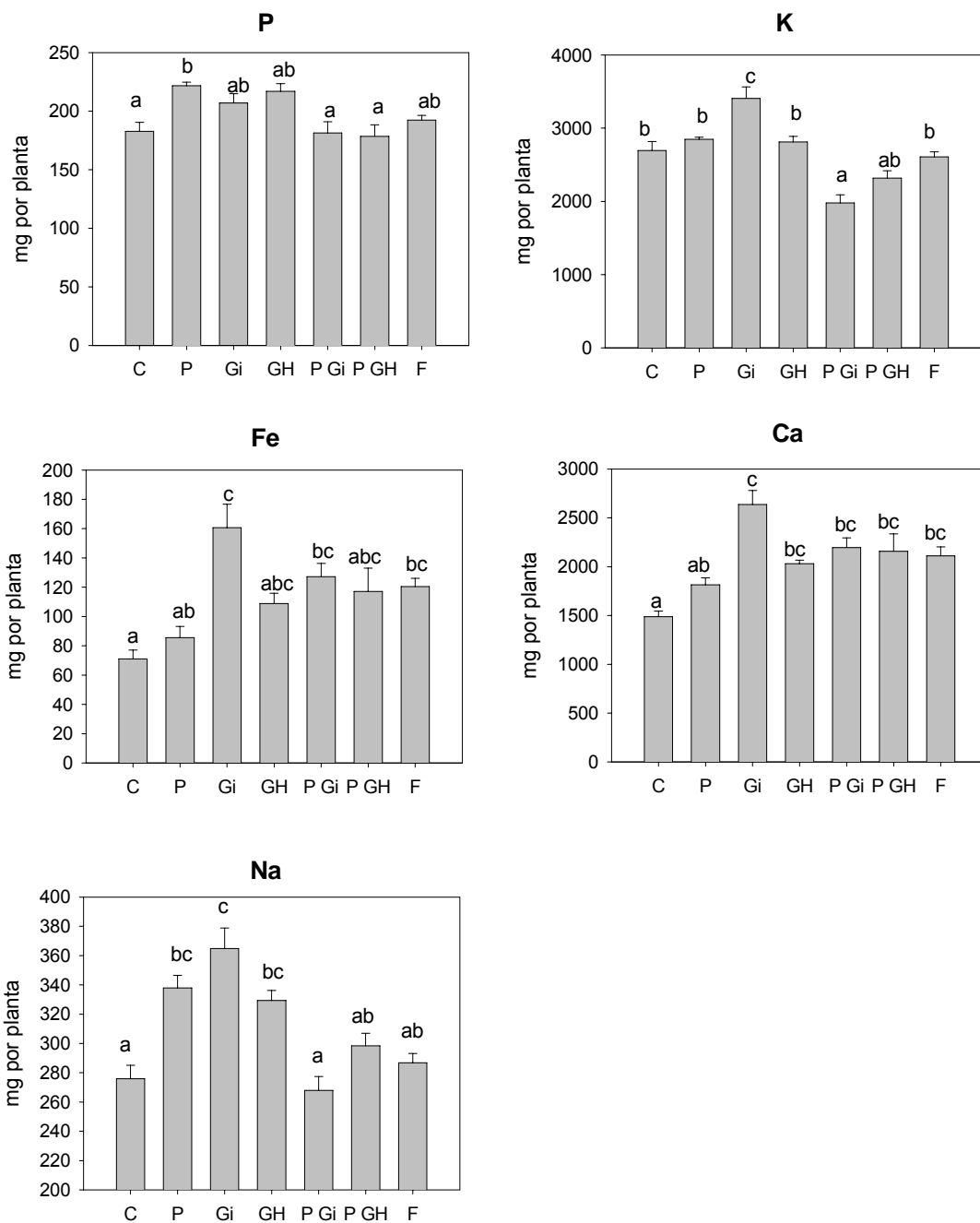


Figura 2: Nutrientes de *Lactuca sativa* después de dos meses desde la plantación (n = 5). C, control; F, fertilizado; Gi, inoculado con *G. intraradices*; GH, inoculado con una mezcla de hongos micorrícicos; Pm, inoculado con *P. mendocina*; PGi, inoculado con *G. intraradices* y *P. mendocina*; PGH, inoculado con una mezcla de hongos micorrícicos y *P. mendocina*. Los valores que comparten letra no difieren estadísticamente según el test DMS ($p < 0,05$).

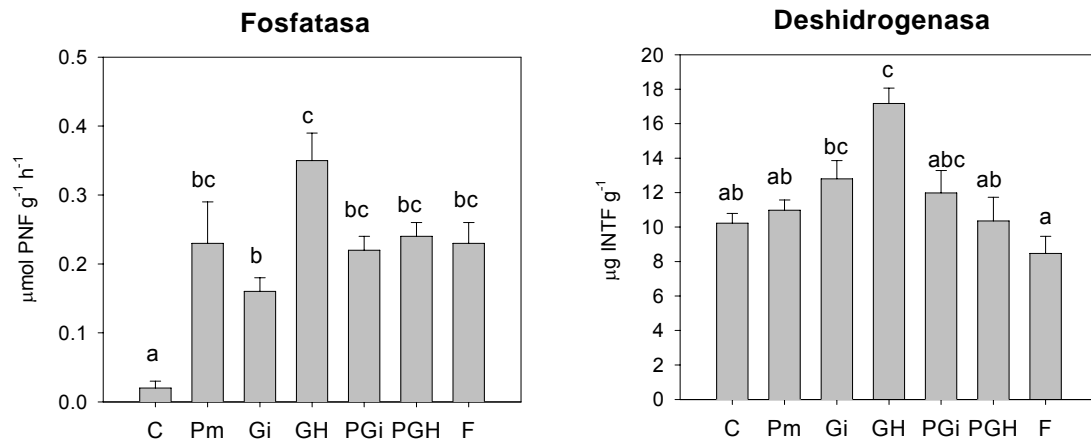


Figura 3: Actividades enzimáticas del suelo rizosférico después de dos meses desde la plantación (n = 5). C, control; F, fertilizado; Gi, inoculado con *G. intraradices*; GH, inoculado con una mezcla de hongos micorrícicos, Pm, inoculado con *P. mendocina*, PGi, inoculado con *G. intraradices* y *P. mendocina*, PGH, inoculado con una mezcla de hongos micorrícicos y *P. mendocina*. Los valores que comparten letra no difieren estadísticamente según el test DMS ($p < 0,05$).

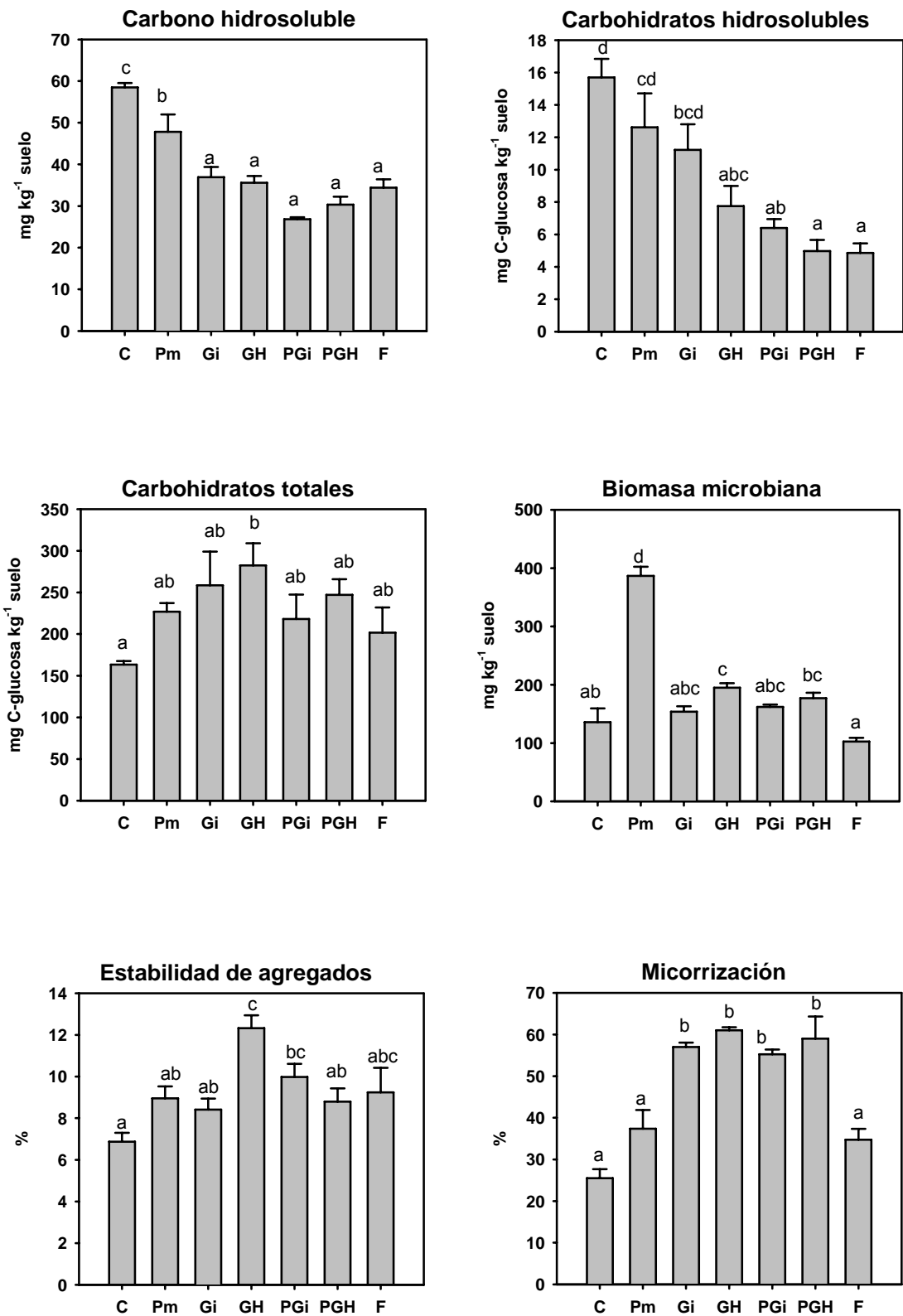


Figura 4: Parámetros del suelo rizosférico después de dos meses desde la plantación (n = 5). C, control; F, fertilizado; Gi, inoculado con *G. intraradices*; GH, inoculado con una mezcla de hongos micorrícicos, Pm, inoculado con *P. mendocina*, PGi, inoculado con *G. intraradices* y *P. mendocina*, PGH, inoculado con una mezcla de hongos micorrícicos y *P. mendocina*. Los valores que comparten letra no difieren estadísticamente según el test DMS (p<0,05).