



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

**Efecto de la simbiosis micorrícica y del aumento
del CO₂ atmosférico sobre el ciclo vital, la
producción y la calidad del fruto de leguminosas
consumidas en la dieta humana**

Trabajo de Investigación

Master en Biodiversidad, Paisajes y Gestión Sostenible

Marilyn Quezada Salirrosas

Pamplona, 27 de agosto de 2019



Universidad de Navarra
Facultad de Ciencias

La Prof. D. Nieves Goicoechea Preboste CERTIFICA que el presente trabajo ha sido
realizado por Marilyn Quezada Salirrosas,

Prof. D. Nieves Goicoechea Preboste

Pamplona, 27 de agosto de 2019

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVO.....	4
MATERIAL Y METODOS.....	5
Diseño experimental y condiciones de crecimiento.....	5
Fenología de las plantas y parámetros de crecimiento.....	6
Determinaciones bioquímicas en semillas de <i>Pisum sativum</i> y <i>Faba bean</i> y en frutos de <i>Phaseolus vulgaris</i>	6
Obtención del extracto vegetal para medir azúcares solubles totales, proteínas solubles totales, prolina y almidón.....	6
Azúcares solubles totales (AST).....	6
Proteínas solubles totales (PST).....	6
Prolina.....	7
Almidón.....	7
Determinación de fenoles solubles totales (FST).....	7
Obtención del extracto vegetal para medir fenoles solubles totales.....	7
Análisis de FST.....	7
Análisis estadístico de los datos.....	7
RESULTADOS Y DISCUSION.....	8
Parámetros de crecimiento.....	8
Fenología de las plantas.....	11
Calidad del fruto.....	13
CONCLUSIONES.....	17
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	17

Resumen

Los escenarios del previsto cambio climático pueden perjudicar el rendimiento de los cultivos y la calidad de los alimentos. Después de los cereales, las legumbres son el cultivo más importante desde el punto de vista agrícola para la alimentación animal y humana. Las leguminosas pueden establecer asociación simbiótica con diferentes microorganismos edáficos, entre ellos los hongos micorrízico-arbusculares. El objetivo del presente estudio fue comprobar si la simbiosis micorrízica, la concentración de CO₂ en la atmósfera o la combinación de estos dos factores pueden ejercer una influencia significativa en el crecimiento vegetativo, el ciclo vital y la calidad del fruto de tres leguminosas (*Pisum sativum*, *Phaseolus vulgaris* y *Vicia faba*) ampliamente consumidas en la dieta humana. Los resultados mostraron que, tanto la inoculación micorrízica como la concentración de CO₂ en el aire, afectaron el ciclo vital, el crecimiento vegetativo y la calidad del fruto de las tres leguminosas estudiadas. La simbiosis micorrízica de las leguminosas puede promover su crecimiento e incrementar la calidad nutricional de los frutos, pero este efecto beneficioso estaría condicionado por la especie de leguminosa y los factores ambientales. La interacción más significativa entre los tres factores incluidos en nuestro trabajo (tipo de leguminosa, nivel de CO₂ en el aire y presencia o ausencia de simbiosis micorrízica) afectó fundamentalmente a los contenidos en proteínas solubles totales y compuestos fenólicos en semillas o frutos, lo cual sugiere que los cultivadores deberían seleccionar las leguminosas más adecuadas para cada situación ambiental en aras de obtener productos de alta calidad nutricional.

Palabras clave: ciclo vital, crecimiento, guisante, frijoles, hongos micorrízicos arbusculares, calidad del fruto.

Abstract

The scenarios of the anticipated climate change can impair crop yield and food quality. After cereals, legumes are the most important crop from an agricultural point of view for animal and human food. Legumes can establish symbiotic association with different edaphic microorganisms, including mycorrhizal-arbuscular fungi. The objective of the present study was to verify whether mycorrhizal symbiosis, the concentration of CO₂ in the atmosphere or the combination of these two factors can exert a significant influence on the vegetative growth, the life cycle and the quality of the fruit of three legumes (*Pisum sativum*, *Phaseolus vulgaris* and *Vicia faba*) widely consumed in the human diet. The results showed that, both mycorrhizal inoculation and the concentration of CO₂ in the air, affected the life cycle, vegetative growth and fruit quality of the three legumes studied. The mycorrhizal symbiosis of legumes can promote their growth and increase the nutritional quality of the fruits, but this beneficial effect would be conditioned by the species of legume and environmental factors. The most significant interaction between the three factors included in our work (type of legume, level of CO₂ in the air and presence or absence of mycorrhizal symbiosis) fundamentally affected the contents of total soluble proteins and phenolic compounds in seeds or fruits, which suggests that growers should select the most suitable legumes for each environmental situation in order to obtain products of high nutritional quality.

Keywords: arbuscular mycorrhizal fungi, beans, growth, life cycle, pea, quality of the fruit.

INTRODUCCIÓN

El cambio climático es uno de los principales problemas ambientales a los que todos los países se enfrentan a mediano y largo plazo, por los impactos que está generando y en un futuro podría generar al ser humano y a la sociedad. El cambio climático está dado por ciertos factores ambientales, como los cambios de temperatura, la variación de la disponibilidad del agua y el aumento de CO₂ en el ambiente (Vadez *et al.*, 2011). El cambio climático a nivel global trae efectos negativos en lo que es la agricultura; de acuerdo con los diferentes escenarios contemplados por la Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), se espera que, en los próximos años, la concentración de CO₂ en el aire vaya a aumentar. El CO₂ elevado son producto de las continuas emisiones de las actividades humanas y se tiende a aumentar cada vez más en un futuro (Irigoyen *et al.*, 2014), según los estudios realizados se dice que la concentración de CO₂ en la atmósfera ha aumentado a un ritmo de aproximadamente 1 ppm / año en los últimos 50 años y aumentará a tasas más altas en el futuro (Vadez *et al.*, 2011).

El sistema agrícola actual y la seguridad alimentaria están amenazados por la combinación de diferentes eventos, como el aumento de la población, la necesidad de un desarrollo más sostenible y los impactos del cambio climático. Los escenarios del previsto cambio climático pueden perjudicar el rendimiento de los cultivos y la calidad de los alimentos básicos, ya que pueden alterar su fenología de la floración, la disponibilidad del agua, la fertilidad del suelo, la erosión, el incremento de patógenos, enfermedades y malezas (Mousavi-Derazmahalleh *et al.*, 2018).

El CO₂ elevado se ha demostrado que tiene impactos negativos en la calidad de los productos alimenticios, ya sea en el hierro y el zinc de las plantas, lo que conllevará a un grado deficiente de calidad de productos alimenticios en la dieta humana a nivel mundial, por lo que las deficiencias alimentarias de estos micronutrientes es una problemática de salud pública global importante. Se estima que dos mil millones de personas sufren estas deficiencias nutricionales, lo que provoca una pérdida de 63 millones de vida al año (Hummel *et al.*, 2018).

Después de los cereales, las leguminosas son la familia de cultivos más importante desde el punto de vista agrícola, ya que tienen múltiples aplicaciones, desde forraje para animales y alimentos para acuicultura hasta alimentos para humanos, destacándolos por sus beneficios nutricionales que tienen para la salud, ya que son fuente vital de proteínas y aminoácidos de origen vegetal (Graham y Vance 2003). La familia de las leguminosas es la tercera más grande de las angiospermas y cuenta con 20.000 especies, siendo cientos de ellas utilizadas para la alimentación humana y animal a nivel mundial (Azani *et al.*, 2017). Las leguminosas se comercializan ampliamente para el consumo en la dieta humana, siendo el frijol común el cultivo básico más importante de las leguminosas para la dieta humana en todo el mundo (Hummel *et al.*, 2018). Según la FAO se recomienda que se consuma a diario y como parte de una dieta saludable para

prevenir y controlar las enfermedades crónicas, y para abordar los crecientes problemas mundiales como la obesidad.

La mayoría de las personas dependen de las legumbres como su principal fuente dietética de zinc y hierro. Se ha reportado que las leguminosas tienen concentraciones más bajas de zinc y hierro cuando se cultivan en condiciones de campo a la concentración atmosférica elevada de CO₂. El efecto del cambio climático como podemos afirmar, puede afectar la calidad de las leguminosas por lo que no acumulan los micronutrientes esenciales como el hierro y el zinc sino de elementos antinutricionales como los polifenoles y el ácido fítico, por lo que estos pueden inhibir la biodisponibilidad de estos micronutrientes. Además los impactos del cambio climático en las leguminosas no sólo afecta la calidad de las leguminosas sino también tiene impactos negativos sobre la producción de los cultivos (Hummel *et al.*, 2018).

La familia de las leguminosas tiene facilidad para establecer asociación simbiótica con diferentes microorganismos edáficos, entre ellos destacando a los hongos micorrízico arbusculares (HMA), obteniendo así un beneficio mutuo de ambos. Las leguminosas presentan además simbiosis rizobial, que son exclusivas de éstas. Dentro de los beneficios que ofrecerían dichas simbiosis en aquellas leguminosas es que ofrecería un uso más sostenible de los fertilizantes nitrogenados en los cultivos, debido a su capacidad que tiene para fijar el nitrógeno atmosférico en los nódulos de las raíces simbióticas. La fijación de nitrógeno atmosférico se atribuye a las rizobacterias, mientras que los HMA facilitan la movilización y posterior absorción por la raíz de ciertos elementos minerales del suelo, entre ellos, el P, Fe, Cu y Mn, entre otros. Por lo tanto se podría afirmar que al inocular tanto el *Rhizobium* como a los HMA es más eficaz para promover el crecimiento de las leguminosas (Abd-Alla *et al.*, 2014). La colonización de las raíces de las leguminosas por HMA puede variar la duración de la etapa vegetativa de la planta. Además, en las leguminosas, la interacción de HMA con el CO₂ elevado puede modificar la partición de la biomasa entre diferentes órganos de la planta (Baslam *et al.*, 2012a).

El aumento del CO₂ estimula el crecimiento de las plantas y afecta la calidad del rendimiento (Baslam *et al.*, 2012b), también los efectos del CO₂ elevado en la calidad de las leguminosas dependen mayormente de las interacciones con las bacterias fijadoras de nitrógeno y los HMA (Irigoyen *et al.*, 2014). La simbiosis con HMA a concentraciones elevadas de CO₂ pueden ofrecer una técnica hortícola para mejorar el crecimiento y la calidad de los cultivos en condiciones de invernadero (Baslam *et al.*, 2011, Bettoni *et al.*, 2014).

El objetivo del presente trabajo de investigación fue comprobar si la simbiosis micorrízica, la concentración de CO₂ en la atmósfera o la combinación de estos dos factores pueden ejercer una influencia significativa en el crecimiento vegetativo, el ciclo vital y la calidad del fruto de tres leguminosas (*Pisum sativum*, *Phaseolus vulgaris* y *Vicia faba*) ampliamente consumidas en la dieta humana.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental y condiciones de crecimiento

Se sembraron semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Nassau), guisante (*Pisum sativum* L. cv. Dulce de Provenza) y haba (*Vicia faba* L. cv. Muchamiel) (Semillas Battle, Molins de Rei, Barcelona, España) en un sustrato inerte (perlita). Cuando las plántulas tenían de 2-3 hojas completamente desarrolladas (16 de enero de 2019), se transfirieron a macetas de 2 L (una planta por maceta), que contenían una mezcla de vermiculita, arena y turba (2,5:2,5:1; v:v:v). En total había 16 macetas para cada leguminosa diferente. El sustrato se esterilizó previamente a 100 °C durante 1 hora en tres días consecutivos para eliminar posibles microorganismos presentes principalmente en la turba. Las propiedades de la turba (Floragard, Vilassar de Mar, Barcelona, España) fueron pH 5,2–6,0, 70-150 mg L⁻¹ de nitrógeno, 80-180 mg L⁻¹ de P₂O₅ y 140-220 mg L⁻¹ K₂O. En el momento del trasplante, la mitad de las macetas (ocho con *P. vulgaris*, ocho con *V. faba* y ocho con *P. sativum*) recibieron 4 g de un inóculo de micorriza comercial (TDS-Bioradis Plant, Bioera SLU, Tarragona, España) (+M). El inóculo consistió en una mezcla de cinco hongos micorrízico-arbusculares (HMA) (*Septoglomus deserticola*, *Funneliformis mosseae*, *Rhizophagus irregularis*, *Claroideogloium etunicatum* y *Claroideogloium claroideum*) que contenían alrededor de 100 por gramo de inóculo y una mezcla de rizobacterias perteneciente para el género *Bacillus* (10⁷ ufc por gramo). El inóculo micorrízico se colocó en los 10 cm más superficiales de las macetas para favorecer un contacto temprano entre las raíces y los microorganismos. La mitad de las macetas (ocho con *P. vulgaris*, ocho con *V. faba* y ocho con *P. sativum*) se mantuvieron como controles no micorrizados (-M). A estos controles no micorrizados (-M) se añadió un filtrado con los microorganismos que acompañaban a los HMA (12 mL a cada planta). El filtrado se obtuvo lavando 4 g de inóculo micorrízico con 10 mL de agua destilada a través de una capa de papel de filtro de 15-20 mm de diámetro con capacidad de retención de partículas de 2,5 mm (Whatman 42, GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). Posteriormente, la mitad de las plantas micorrizadas (+M) y de las no micorrizadas (-M) de cada tipo de leguminosa se transfirieron a un invernadero con una concentración ambiental de CO₂ en el aire (ACO₂, establecido en 392 μmolmol⁻¹, media del experimento medido 395 ± 20 μmolmol⁻¹); la otra mitad de plantas micorrizadas (+M) y no micorrizadas (-M) de cada tipo de leguminosa se transfirieron a un invernadero con una concentración elevada de CO₂ en el aire (ECO₂, establecido a 700 μmolmol⁻¹, medida del experimento medido de 710 ± 22 μmolmol⁻¹). Las plantas se cultivaron bajo diferentes concentraciones de CO₂ en el aire durante seis semanas. Las concentraciones atmosféricas de CO₂ se monitorizaron constantemente mediante el uso de un 'Monitor de gas infrarrojo Guardian Plus' (Edinburgh Instruments Limited, Livingston, Reino Unido). Las macetas se rotaron semanalmente en el interior de cada invernadero para eliminar los efectos de borde. Todas las plantas se cultivaron a temperaturas de 25/15 °C (d/n), 50/85% (d/n) de humedad relativa y recibieron luz natural complementada con luz artificial proporcionada por lámparas Osram HQI-TS 400 W/D (Osram GmH, Augsburg, Alemania) hasta obtener una intensidad luminosa mínima de 500–600 μmol

$\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante un fotoperíodo de 14 h. Además, todas las plantas recibieron una vez a la semana 180-200 mL de solución completa de Hoagland (Arnon y Hoagland 1939), que se alternó con agua destilada (180-200 mL, dos veces por semana). Los frutos se cosecharon cuando alcanzaron el tamaño comercial de acuerdo a las indicaciones de los prospectos de las semillas. Una vez cosechados, se conservaron a -80°C hasta su posterior análisis.

Fenología de las plantas y parámetros de crecimiento

Las alturas de las plantas y el número de hojas por planta se registraron en los días 7, 14, 21, 28, 35 y 42 después de transferir las plantas a los invernaderos, es decir, a lo largo de seis semanas. El estadio fenológico se determinó a lo largo de estas seis semanas de acuerdo a la escala BBCH para leguminosas.

Determinaciones bioquímicas en semillas de *Pisum sativum* y *Faba bean* y en frutos de *Phaseolus vulgaris*

Obtención del extracto vegetal para medir azúcares solubles totales, proteínas solubles totales, prolina y almidón

Las extracciones de los compuestos orgánicos se realizaron a partir de 1 g de peso fresco (Pf) de semillas o frutos de las 3 leguminosas, previamente congelados a -80°C . El material vegetal se homogeneizó y trituró con nitrógeno líquido en un mortero previamente enfriado con hielo. Luego se agregaron 10 mL de tampón fosfato potásico 50 mM, $\text{pH} = 7,5$ y los extractos se filtraron a través de 4 capas de gasa. A continuación, se midieron los volúmenes recuperados de cada extracto filtrado y se procedió a su centrifugación a 4°C y 15.500 r.p.m. durante 15 minutos. El sobrenadante de cada extracto se dispensó en tubos Eppendorf, los cuales se conservaron a -20°C . El pellet obtenido también se guardó a -20°C .

Azúcares solubles totales (AST)

El método utilizado fue descrito por Yemm y Willis (1954). Se basó en la utilización del reactivo de antrona, que tiñe la solución de color azul-verde en presencia de azúcares solubles. Se utilizaron 500 μL del sobrenadante y se añadieron 3 mL del reactivo de antrona. Se agitó la mezcla y se dejó a baño termostático a 100°C durante 15 minutos, tras los cuales se enfriaron las muestras y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 620 nm. La recta de calibrado se realizó utilizando glucosa como estándar.

Proteínas solubles totales (PST)

La técnica utilizada es la descrita por Bradford (1976) y se basó en la tinción de las proteínas con Azul de Coomassie G. Se tomó 0,1 mL del sobrenadante extraído y se añadieron 5 mL de Azul de Coomassie G. Se agitó la mezcla y se dejó reposar durante 10 minutos a la oscuridad para que la muestra adquiera el color azul indicativo de la presencia de proteínas. Al cabo de este tiempo, se procedió a la medida de la

absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 630 nm. Se utilizó seroalbúmina bovina como patrón para realizar la recta de calibrado.

Prolina

El método utilizado fue descrito por Paquin y Lechasseur (1979) y se basó en la tinción de la prolina por el reactivo de ninhidrina, confiriendo un color rosa a la solución. Se tomó 1 mL del sobrenadante y se le añadieron 5 mL del reactivo de ninhidrina. Se agitó la mezcla y se colocó en un baño termostático a 100°C durante 45 minutos, tras los cuales se enfrió la muestra. La absorbancia se midió a 515 nm. Se utilizó prolina comercial como patrón para la recta de calibrado.

Almidón

El pellet obtenido tras las extracciones se resuspendió en 2 mL de KOH 1M. Luego se agregaron 2 mL de HCl 1M y por último se agregaron 0,5 mL del reactivo de yodo. La mezcla se llevó a oscuridad durante 15 minutos. La absorbancia se midió a 565 nm. La recta de calibrado se realizó utilizando almidón comercial como patrón.

Determinación de fenoles solubles totales (FST)

Obtención del extracto vegetal para medir fenoles solubles totales

Se tomaron muestras vegetales (semillas de guisante y haba y frutos de frijol) de 0,5 g aproximadamente de Pf, las cuales se pulverizaron con nitrógeno líquido y se mezclaron con 20 mL de metanol al 80%. La muestra se filtró a través de cuatro capas de gasa. A continuación, se midió en un tubo graduado el volumen de extracto recuperado y finalmente se centrifugaron las muestras a 4°C y 15.500 r.p.m. durante 15 minutos. Únicamente se conservaron los sobrenadantes para la determinación de FST.

Análisis de FST

En vasos de precipitados se agregaron 10 mL de agua destilada y 0,5 mL del sobrenadante. A continuación, se añadieron 3 mL de FeCl_3 0,17 M en cada uno de los recipientes. Se agitó todo ello durante 3 minutos. A continuación se añadieron 3 mL de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0,008 M y se volvió agitar la mezcla durante 15 minutos. Pasado este tiempo, se midió la absorbancia a 760 nm. Se utilizó ácido gálico como patrón para la recta de calibrado.

Análisis estadístico de los datos

Los datos sobre las concentraciones de los distintos compuestos orgánicos se sometieron a un análisis estadístico utilizando el programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), versión 21.0 para Windows. Los datos correspondientes a cada compuesto orgánico se sometieron a un ANOVA de tres criterios, que permitió comprobar el efecto de tres factores principales (tipo de legumbre, micorrización y concentración de CO_2 en la atmósfera) y la interacción entre dichos factores. Se calcularon las medias y los errores estándar y, cuando el ratio F era significativo ($P \leq 0,05$) se aplicó un test Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros de crecimiento

Cuando se cultivó en condiciones ambientales de CO₂, la asociación de *P. vulgaris* y *V. faba* con HMA benefició el crecimiento vegetativo de la planta. Esta mejora del crecimiento fue más evidente en *V. faba* que en *P. vulgaris*, en comparación con sus controles no micorrizados (-M). *P. vulgaris* micorrizada (+M) mostró un mayor número de hojas (Figura 1) y mayor altura (Figura 2) a las 5 y 4 semanas, respectivamente, después de transferirlas al invernadero. En el caso de *V. faba*, sólo el número de hojas (Figura 1) fue mayor en las plantas micorrizadas (+M) que en las plantas no micorrizadas (-M), lo que fue evidente a partir de la cuarta semana después de comenzar su crecimiento en el invernadero. En *P. sativum*, la mejora inicial de la altura de la planta (Figura 2), es visible entre las semanas dos y tres después de su transferencia al invernadero, casi desapareció algunas semanas después y el número de hojas fue siempre similar en las plantas no micorrizadas (-M) y micorrizadas (+M).

El efecto beneficioso ejercido por la asociación micorrícica sobre el crecimiento vegetativo de *P. vulgaris* (Figuras 1 y 2) no se observó cuando las plantas se cultivaron bajo condiciones elevadas de CO₂, principalmente debido al mayor crecimiento de las plantas -M bajo estas condiciones de ECO₂. Se encontró un comportamiento similar en el caso de *V. faba*, cuyo número de hojas (Figura 1) aumentó bajo condiciones elevadas de CO₂ cuando las plantas no estaban micorrizadas (-M). Por el contrario, *P. sativum* se benefició de la asociación de micorrizas más a condiciones elevadas de CO₂ que cuando se cultivó bajo concentración ambiente de CO₂: el número de hojas (Figura 1) producidas por las plantas micorrizadas (+M) bajo condiciones elevadas de CO₂ fue claramente mayor que la de las plantas no micorrizadas (-M) desde la cuarta semana después de comenzar su cultivo en una atmósfera enriquecida en CO₂. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Kumari *et al.* (2016), ya que estos autores constataron que una concentración más alta de CO₂ en el aire (550 ppm en su estudio) benefició los parámetros de crecimiento del guisante, si bien los efectos positivos desaparecieron cuando el elevado CO₂ se combinó con altas temperaturas ambientales, interacción más ajustada a las predicciones de cambio climático.

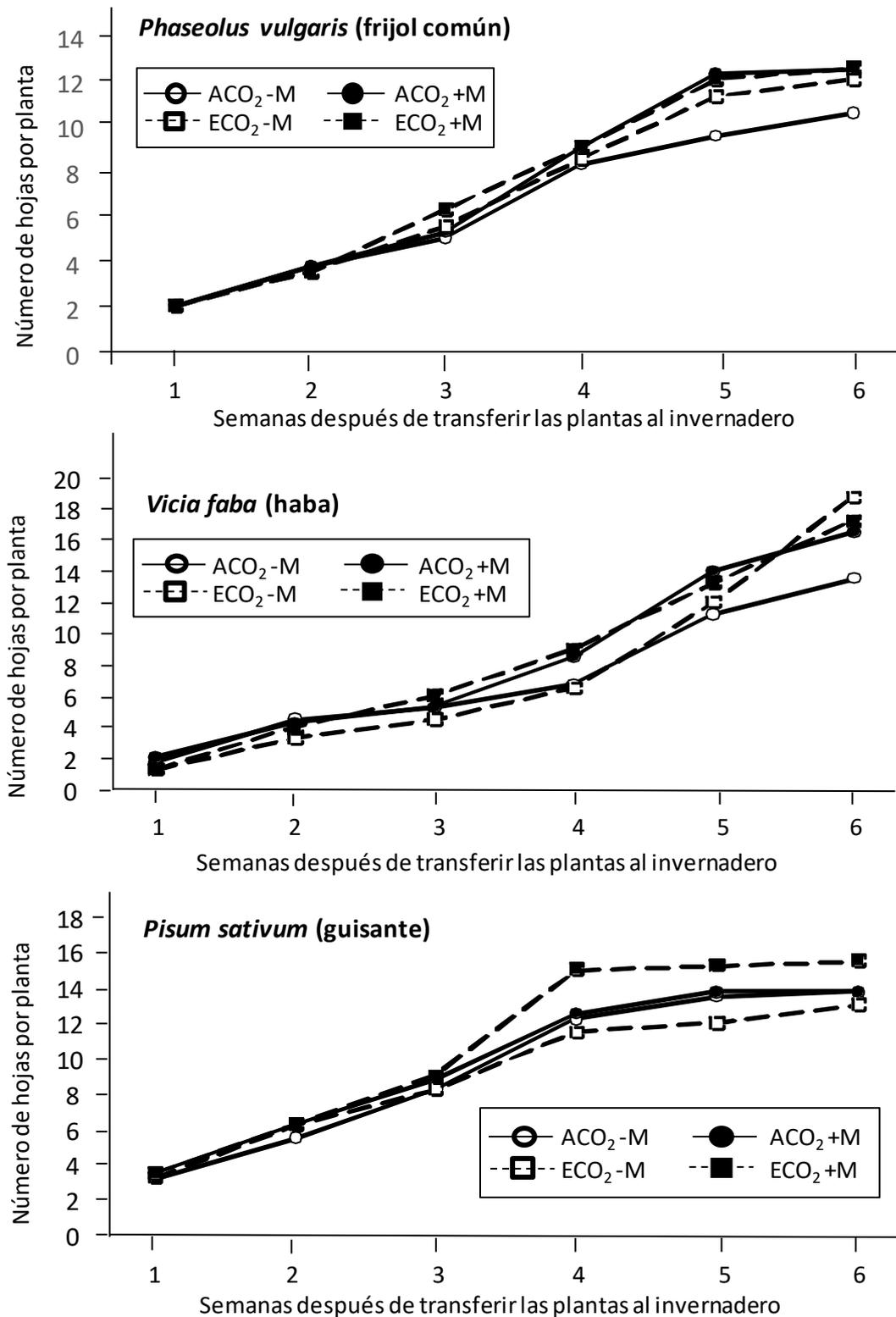


Figura 1. Número de hojas por planta en las tres leguminosas a lo largo de seis semanas de cultivo en invernadero a concentración ambiente (ACO₂) o elevada (ECO₂) de CO₂ en el aire, e inoculadas (+M) o no (-M) con hongos micorrícicos.

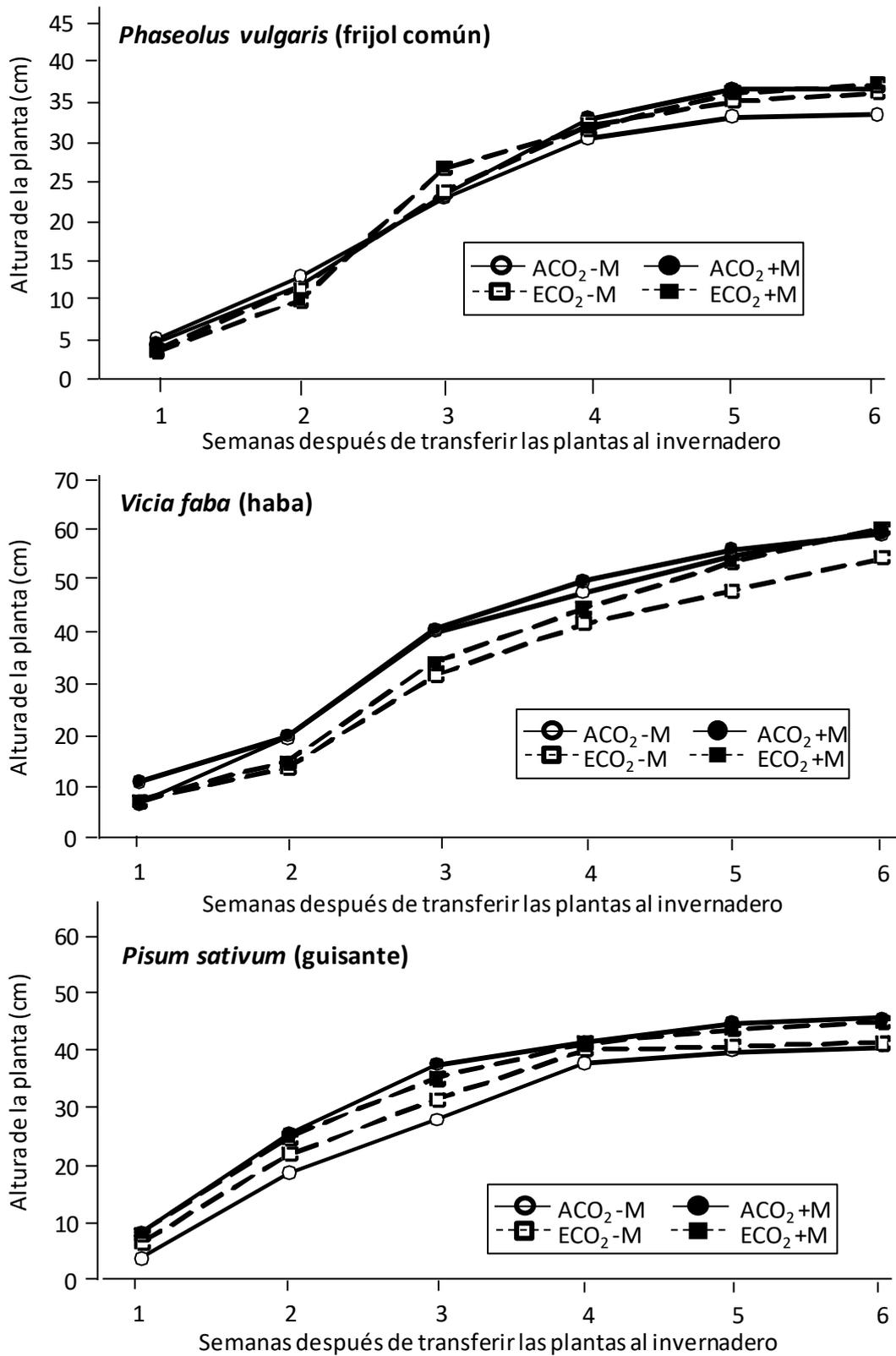


Figura 2. Altura de la planta (cm) de las tres leguminosas a lo largo de seis semanas de cultivo en invernadero a concentración ambiente (ACO₂) o elevada (ECO₂) de CO₂ en el aire, e inoculadas (+M) o no (-M) con hongos micorrícicos.

Fenología de las plantas

La Tabla 1 muestra los porcentajes de las plantas que terminaron el período vegetativo y comenzaron la etapa reproductiva. El ciclo de vida más corto fue el de *P. sativum*. Esta leguminosa comenzó a producir capullos florales 19 días después de iniciar su cultivo en invernadero. Sin embargo, hubo diferencias claras entre los guisantes cultivados en condiciones ambientales de CO₂ o bajo condiciones de CO₂ elevado. La concentración elevada de CO₂ aceleró el inicio de la etapa reproductiva, especialmente en las plantas no micorrizadas (-M). Cuando se cultivó en condiciones de CO₂ ambiente, la inoculación micorrícica (+M) indujo una producción temprana de capullos, flores y frutos (vainas) en *P. sativum*. El frijol común (*P. vulgaris*) comenzó su fase reproductiva casi 10 días más tarde que *P. sativum*. En contraste con *P. sativum*, no observamos ningún efecto claro de la inoculación micorrícica sobre la duración de la etapa vegetativa en *P. vulgaris* cultivada en condiciones ambientales de CO₂. La concentración elevada de CO₂ aceleró ligeramente el ciclo de vida del frijol común. La última leguminosa que comenzó la etapa reproductiva fue *V. faba* y, en este caso, la combinación entre la inoculación micorrícica y el CO₂ atmosférico elevado favoreció la aparición de los primeros frutos (vainas) un mes después de transferir las plantas al invernadero. Los datos de la Tabla 1 muestran que la asociación micorrícica aceleró el ciclo vital del frijol y del guisante, lo cual coincide con las observaciones de Baslam *et al.* (2012a) en otra leguminosa, la alfalfa. No obstante, los datos de la Tabla 1 también demuestran que este efecto de la simbiosis micorrícica desaparece en la leguminosa de ciclo vital más largo, el haba.

Tabla 1. Porcentaje de plantas, inoculadas (+M) o no (-M) con hongos micorrízico arbusculares (HMA) que mostraban capullos (C), flores (F) y/o frutos (vainas, V) cuando se cultivaron a concentración ambiente (ACO₂) o elevada (ECO₂) de CO₂ en la atmósfera.

		Días después de la transferencia al invernadero					
		19	23	27	30	34	42
<i>Pisum sativum</i> (guisante)							
ACO ₂	-M	C: 50%	C: 100% F: 75% V: 50%	V: 75%			
	+M	C: 75%	C: 100% F: 100% V: 75%	V: 100%			
ECO ₂	-M	C: 100%	C: 100% F: 100% V: 100%	V: 100%			
	+M	C: 100% F: 50%	C: 100% F: 100% V: 100%	V: 100%			
<i>Phaseolus vulgaris</i> (frijol común)							
ACO ₂	-M	-	-	C: 100% F: 25%	F: 100%	V: 100%	
	+M	-	-	C: 100% F: 25%	F: 100%	V: 100%	
ECO ₂	-M	-	-	C: 100% F: 75%	F: 100%	V: 100%	
	+M	-	-	C: 100% F: 50%	F: 100%	V: 100%	
<i>Vicia faba</i> (haba)							
ACO ₂	-M	-	-	C: 25%	C: 75% F: 25%	C: 100% F: 75%	F: 100% V: 50%
	+M	-	-	-	C: 50%	C: 25% F: 25%	F: 100% V: 50%
ECO ₂	-M	-	-	C: 25%	C: 50% F: 25%	C: 75% F: 50%	F: 75% V: 50%
	+M	-	-	C: 25% F: 25%	C: 50% F: 50%	C: 50% F: 50% V: 25%	C: 75% F: 50% V: 50%

Calidad del fruto

PST

Los niveles más altos de proteínas se hallaron en las semillas de guisante y de haba, que resultaron ser entre 5 y 15 veces más altos que en el fruto del frijol. De hecho, los resultados del ANOVA para la concentración de PST, mostraron una alta significación ($p \geq 0,001$) para el factor principal ‘tipo de legumbre’. Uno de los motivos por los que las habas están incluidas en la dieta humana y también en la animal es su alto contenido en proteínas, la mayoría de las cuales incluyen globulinas y albúminas. El interés en el perfil proteico de las semillas de haba es tan elevado que algunos estudios recientes han tenido como objetivo identificar en detalle las proteínas de almacén del haba, así como confirmar su estructura y función para utilizar esta información en programas de mejora (Liu *et al.*, 2017). En el guisante, las semillas con mayor valor proteico correspondieron a las plantas no micorrizadas (-M) cultivadas bajo una concentración elevada de CO₂ en el aire (15,12 mg g⁻¹ Pf), lo que contrasta con los resultados obtenidos en las semillas de haba, en las cuales el factor ‘CO₂’ no ejerció un efecto significativo. El efecto del CO₂ elevado sobre la calidad nutricional de las leguminosas difiere marcadamente de acuerdo a los hallazgos de varios estudios: mientras que Baslam *et al.* (2012a) sugirieron mayores contenidos proteicos en alfalfa no micorrizada bajo CO₂ elevado en base al incremento observado en la relación entre la biomasa de las hojas respecto a los tallos, Pal *et al.* (2004) constataron una reducción en la calidad nutricional de las plantas de *Trifolium alexandrium* no asociadas a HMA y cultivadas con atmósfera enriquecida en CO₂. El guisante también fue sensible a la asociación micorrícica, ya que en condiciones de CO₂ ambiente, las plantas micorrizadas (+M) formaron semillas con concentraciones significativamente más altas (11,00 mg g⁻¹ Pf) que aquéllas no micorrizadas (-M) (7,11 mg g⁻¹ Pf). Dado que las plantas de nuestro estudio no presentaban nodulación y, por tanto, no se beneficiaron de la fijación del nitrógeno atmosférico, estos resultados demuestran que los HMA también pueden favorecer la toma de nitrógeno del suelo, algo que recientemente ha constatado Scandellari (2017) al estudiar la nutrición nitrogenada de vides micorrizadas. Los niveles proteicos en el fruto del frijol no se modificaron ni por la concentración de CO₂ en el aire ni por la presencia o ausencia de hongos micorrícicos asociados a las raíces.

Prolina

El nivel más alto de prolina se halló en las semillas de haba procedentes de plantas no micorrizadas (-M), independientemente de la concentración de CO₂ en la atmósfera (1,53 y 1,52 μmoles g⁻¹ Pf en ACO₂ y ECO₂, respectivamente). Este resultado se corresponde con los altos niveles de proteínas encontrados en las semillas de haba. Los resultados del ANOVA para la concentración de prolina también mostraron una alta significación ($p \geq 0,001$) al igual que para las PST, para el factor principal ‘tipo de legumbre’. Al igual que lo observado en semillas de guisante, la concentración de prolina en el fruto del frijol no se modificó por la inoculación de AMF bajo condiciones ambiente de CO₂ y tampoco fue significativamente sensible a los niveles de CO₂ en el aire en plantas no micorrizadas (-M). Sin embargo, mientras que las plantas

micorrizadas (+M) de guisante acumularon menos prolina bajo condiciones elevadas de CO₂, las plantas micorrizadas (+M) de frijol presentaron mayores concentraciones de prolina en fruto bajo condiciones elevadas de CO₂. Unos niveles más altos de prolina podrían proporcionar una ventaja adaptativa a la planta en caso de que ésta se viera sometida a condiciones ambientales adversas, tales como sequía o altas temperaturas, ya que, entre las diversas funciones atribuidas a este aminoácido, figuran su capacidad de osmorregulación y el hecho de ser una fuente de energía y de nitrógeno que ayuda a las plantas a recuperarse tras una situación ambiental que compromete su supervivencia (Aspinall y Paleg, 1981). Desde el punto de vista nutricional, unas semillas o frutos con mayores contenidos en prolina podrían presentar un gusto más amargo (Zhao *et al.*, 2016).

AST

Las concentraciones más altas de AST se encontraron en las semillas de haba de las plantas sin micorrizas (-M) cultivadas a condiciones ambiente de CO₂. De hecho, los resultados del ANOVA para la concentración de AST mostraron una alta significación ($p \geq 0,001$) para el factor principal ‘tipo de legumbre’. En esta legumbre, el incremento de CO₂ en la atmósfera redujo la acumulación de AST en las semillas, tanto de plantas no micorrizadas (-M) como micorrizadas (+M). Los niveles de AST en las semillas de guisante y en los frutos del frijol fueron similares independientemente de la inoculación micorrízica y de la concentración de CO₂ en el aire. Estos hallazgos contrastan con los resultados de Gavito *et al.* (2000) trabajando con *P. sativum*, ya que estos autores indicaron que las plantas asociadas a HMA presentaban mayores tasas de asimilación de carbono bajo condiciones de CO₂ elevado. No obstante, en otras especies hortícolas, como la lechuga, el CO₂ elevado neutralizó el efecto positivo de la micorrización sobre las plantas cultivadas bajo CO₂ ambiente y se sugirió que, en condiciones de alto CO₂, se había potenciado significativamente el sumidero de azúcares hacia el hongo presente en las raíces en aras de su propio crecimiento, lo cual redujo las concentraciones de azúcares en los órganos aéreos de la planta hospedadora (Baslam *et al.*, 2012b).

Almidón

Los niveles de almidón en las semillas de las plantas de haba cultivadas a condiciones ambiente de CO₂ fueron superiores a los hallados en semillas de guisante y frutos de frijol independientemente de sus condiciones de cultivo. De hecho, los resultados del ANOVA para la concentración de almidón, mostraron una alta significación ($p \geq 0,001$) para el factor principal ‘tipo de legumbre’. En el haba, las semillas acumularon cantidades similares de almidón en plantas no micorrizadas (-M) y micorrizadas (+M), si bien el incremento de CO₂ en el aire redujo los niveles de almidón en semillas de plantas micorrizadas (+M) y esto no se correspondió con unos mayores contenidos de AST procedentes de la hidrólisis del azúcar de reserva. Las concentraciones de almidón en los frutos del frijol oscilaron entre los 1,39 mg g⁻¹Pf en los frutos cosechados a partir de plantas micorrizadas (+M) cultivadas bajo concentraciones elevadas de CO₂ y los 1,94 mg g⁻¹ Pf en los frutos de plantas no micorrizadas (-M) cultivadas a condiciones

ambiente de CO₂, pero en ningún caso los valores difirieron significativamente entre tratamientos.

FST

Las plantas necesitan los compuestos fenólicos para su pigmentación, crecimiento y protección frente a estreses ambientales (rayos UV, por ejemplo) y patógenos. Estos compuestos las protegen frente a daños oxidativos y pueden ejercer esta misma función en el cuerpo humano, lo cual añade un valor importante a los alimentos ricos en estos metabolitos secundarios (Fu *et al.*, 2011). Los niveles de FST fueron más altos en las semillas de haba que en las semillas de guisante y los frutos frijol, lo cual concuerda con los niveles más elevados de AST y almidón en las semillas de haba. De hecho, los resultados del ANOVA para la concentración de FST, mostraron una alta significación ($p \geq 0,001$) para el factor principal ‘tipo de legumbre’. La colonización micorrícica puede alterar o incrementar la producción de compuestos fenólicos en la planta hospedadora e incluso promover su acumulación en órganos lejanos a la raíz donde están presentes los HMA (Baslam *et al.*, 2011). Ello es consecuencia de la activación de mecanismos de defensa en la planta en respuesta a la colonización de las raíces por parte de los HMA (García-Garrido y Ocampo, 2002). Esto explicaría por qué las plantas de haba micorrizadas (+M) presentaban mayores niveles de FST en semilla que aquellas no micorrizadas (-M) bajo condiciones de CO₂ ambiente. Sin embargo, esto no sucedió bajo alto CO₂, por lo que una vez más constatamos que los azúcares producidos por las plantas micorrizadas bajo condiciones de alto CO₂ no han quedado en los frutos o semillas a modo de AST, almidón o compuestos secundarios no nitrogenados (fenoles, en nuestro estudio), lo cual refuerza la hipótesis de un fuerte sumidero por parte de las raíces micorrizadas en plantas cultivadas bajo elevado CO₂. A diferencia de lo observado en el haba, los niveles de FST no se vieron afectados ni por la concentración de CO₂ en el aire ni por la presencia o ausencia de hongos micorrícicos asociados a las raíces de las plantas, tanto en semillas de guisante como en frutos de frijol.

Tabla 2. Concentración de proteínas solubles totales (PST), prolina, azúcares solubles totales (AST), almidón y fenoles solubles totales (FST) en semillas de *Pisum sativum* y *Vicia faba* y en frutos de *Phaseolus vulgaris* de plantas no inoculadas (-M) o inoculadas (+M) con hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y cultivadas bajo condiciones de CO₂ ambiente (ACO₂) o elevado (ECO₂) en la atmósfera. Los valores son medias (n = 4) ± errores estándar. Dentro de cada columna, los valores que comparten una o más letras no difieren significativamente (p ≥ 0,05). Pf = peso fresco.

		PST	Prolina	AST	Almidón	FST
		(mg g ⁻¹ Pf)	(μmol g ⁻¹ Pf)	(mg g ⁻¹ Pf)	(mg g ⁻¹ Pf)	(mg g ⁻¹ Pf)
<i>Pisum sativum</i>						
ACO ₂	- M	7,11 ± 0,56 c	0,89 ± 0,04 bcd	9,47 ± 0,51 cd	1,65 ± 0,23 de	239,35 ± 11,06 c
	+ M	11,00 ± 0,58 b	1,15 ± 0,11 b	11,20 ± 0,47 bc	2,45 ± 0,08 bc	293,72 ± 17,44 c
ECO ₂	- M	15,12 ± 3,41 a	1,03 ± 0,07 b	9,73 ± 0,63 cd	2,17 ± 0,08 cd	263,88 ± 25,16 c
	+ M	5,93 ± 0,21 cd	0,72 ± 0,05 cde	9,88 ± 0,82 cd	2,38 ± 0,10 bc	245,67 ± 35,77 c
<i>Vicia faba</i>						
ACO ₂	- M	7,61 ± 0,49 c	1,53 ± 0,19 a	13,70 ± 1,19 a	3,54 ± 1,10 a	722,72 ± 67,44 b
	+ M	6,08 ± 0,71 cd	0,66 ± 0,05 de	13,33 ± 1,19 ab	3,50 ± 0,36 a	1057,08 ± 97,06 a
ECO ₂	- M	4,50 ± 0,75 d	1,52 ± 0,15 a	9,48 ± 0,80 cd	2,92 ± 0,43 ab	993,36 ± 77,20 a
	+ M	6,59 ± 0,54 cd	1,00 ± 0,09 bc	11,01 ± 0,73 c	2,33 ± 0,36 bc	845,51 ± 70,14 b
<i>Phaseolus vulgaris</i>						
ACO ₂	- M	1,31 ± 0,11 e	0,66 ± 0,05 de	7,81 ± 0,52 de	1,94 ± 0,20 cde	301,35 ± 16,96 c
	+ M	1,57 ± 0,24 e	0,43 ± 0,07 e	6,01 ± 0,75 e	1,49 ± 0,08 e	359,23 ± 30,37 c
ECO ₂	- M	1,64 ± 0,19 e	0,49 ± 0,06 e	7,09 ± 0,62 e	1,65 ± 0,05 de	305,71 ± 22,22 c
	+ M	1,30 ± 0,35 e	0,95 ± 0,03 bcd	7,08 ± 0,36 e	1,39 ± 0,14 e	311,32 ± 36,31 c
CO ₂		ns	ns	**	*	ns
AMF		*	**	ns	ns	ns
Tipo de legumbre		***	***	***	***	***
CO ₂ × AMF		***	ns	ns	ns	**
CO ₂ × legumbre		*	*	*	**	ns
AMF × legumbre		**	***	ns	**	ns
CO ₂ × AMF × legumbre		***	***	ns	ns	**

ANOVA: ns = no significativo; * = p ≥ 0,05; ** = p ≥ 0,01; *** = p ≥ 0,001

CONCLUSIONES

En resumen, los factores bióticos (inoculación micorrícica) y ambientales (concentración de CO₂ en la atmósfera) influyeron sobre el crecimiento vegetativo, el ciclo vital y la calidad nutricional de los frutos de las tres leguminosas estudiadas. La simbiosis micorrícica de las leguminosas puede promover su crecimiento e incrementar la calidad nutricional de los frutos, pero este efecto beneficioso estaría condicionado por la especie de leguminosa y los factores ambientales. De acuerdo con nuestros resultados, un incremento de CO₂ en la atmósfera podría revertir los beneficios de los HMA sobre la calidad de las legumbres que se observan en plantas cultivadas bajo las actuales concentraciones de CO₂ en el aire (aproximadamente, 400 ppm). Los resultados del ANOVA mostraron que la interacción más significativa entre los tres factores incluidos en nuestro trabajo (tipo de leguminosa, nivel de CO₂ en el aire y presencia o ausencia de simbiosis micorrícica) afectó fundamentalmente a los contenidos en proteínas solubles totales y compuestos fenólicos en semillas o frutos, lo cual sugiere que los cultivadores deberían seleccionar las leguminosas más adecuadas para cada situación ambiental en aras de obtener productos de alta calidad nutricional. Por otro lado, sería importante incluir en estudios posteriores una doble simbiosis micorriza-bacteria fijadora del nitrógeno atmosférico para comprobar los efectos del elevado CO₂ sobre la calidad nutricional de las legumbres, así como analizar la acumulación de otros metabolitos en semillas y frutos (fitatos, por ejemplo) que pueden reducir la absorción de los minerales presentes en las legumbres ingeridas en la dieta.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd-Alla, M.H., El-Enany, A.-W.E, Nafady, N.A., Khalaf, D.M., Morsy, F.M. (2014). Synergistic interaction of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* and arbuscular mycorrhizal fungi as a plant growth promoting biofertilizers for faba bean (*Vicia faba* L.) in alkaline soil. *Microbiological Research*, 169(1), 49-58.
- Arnon, D.I., y Hoagland, D.R. (1939). A comparison of water culture and soil as media for crop production. *Science*, 89, 512–514.
- Aspinall, D., Paleg, L.G. (1981) Proline accumulation. Physiological aspects. In: Paleg LG and Aspinall D (ed) *Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants* (pp 205–240) Academic Press, New York.
- Azani, N., Babineau, M., Bailey, C.D., Banks, H., Barbosa, A.R., Pinto, R.B., Bruneau, A.(2017). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). *Taxon*, 66, 44–77.

Baslam, M., Garmendia, I., Goicoechea N. (2011). Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) improved growth and nutritional quality of greenhouse-grown lettuce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5504-5515.

Baslam M., Erice G., Goicochea, N. (2012a) Impact of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and atmospheric CO₂ concentration on the biomass production and partitioning in the forage legume alfalfa, *Symbiosis*, 58, 171-181.

Baslam, M., Garmendia, I., Goicoechea, N. (2012b). Elevated CO₂ may impair the beneficial effect of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on the mineral and phytochemical quality of lettuce. *Annals of Applied Biology*, 161, 180-191.

Bettoni, M.M., Mogor, A.F., Pauletti V., Goicoechea, N. (2014). Growth and metabolism of onion seedlings as affected by the application of humic substances, mycorrhizal inoculation and elevated CO₂. *Scientia Horticulturae*, 180, 227-235.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2), 248-254.

Fu, L., Xu, B.T., Xu, X.R., Gan, R.Y., Zhang, Y., Xia, E.Q., Li, H.B. (2011) Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry*, 129, 345–350.

García-Garrido, J.M., Ocampo, J.A. (2002) Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of Experimental Botany* 53, 1377–1386.

Gavito, M.E., Curtis, P.S., Mikkelsen, T.N., Jakobsen, I. (2000) Atmospheric CO₂ and mycorrhiza effects on biomass allocation and nutrient uptake of nodulated pea (*Pisum sativum* L.) plants. *Journal of Experimental Botany*, 51, 1931-1938.

Graham, P.H. y Vance, C.P. (2003) Legume Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiology*, 131, 872-877.

Hummel, M., Hallahan, B.F., Brychkova, G., Ramirez-Villegas, J., Guwela, V., Chataika, B., Curley, E., Mckeown, P.C., Morrison, L., Talsma, E.F., Beebe, S., Jarvis, A., Chirwa, R., Spillane, C. (2018) Reduction in nutritional quality and growing area suitability of common bean under climate change induced drought stress in Africa. *Scientific Reports*, 8(1).

Irigoyen, J.J., Goicoechea, N., Antolín, M.C., Pascual, I., Sánchez-Díaz, M., Aguirreolea, J., Morales, F. (2014) Growth photosynthetic acclimation and yield quality in legumes under climate change simulations: An updated survey. *Plant Science*, 226, 22-29.

Kumari, M., Verma, S.C., Bhardwaj, S.K., Thakur, A.K., Gupta, R.K., Sharma, R. (2016). Effect of elevated CO₂ and temperature on growth parameters of pea (*Pisum sativum* L.) crop. *Journal of Applied and Natural Science* 8, 1941-1946.

Liu, Y., Wu, X., Hou, W., Li, P., Sha, W., Tian, Y. (2017). Structure and function of seed storage proteins in faba bean (*Vicia faba* L.). *3 Biotech* 7, 74.

Mousavi-Derazmahalleh, M., Bayer, P.E., Hane, J.K., Valliyodan, B., Nguyen, H.T., Nelson, M.N., Erskine, W., Varshney, R.K., Papa R., Edwards, D. (2018) Adapting legume crops to climate change using genomic approaches. *Plant, Cell and Environment* 42, 6-19.

Pal, M., Karthikeyapandian, V., Jain, V., Srivastava, A.C., Raj, A., Sengupta, U.K. (2004) Biomass production and nutritional levels of berseem (*Trifolium alexandrinum*) grown under elevated CO₂. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 101, 31-38.

Paquin, R., y Lechasseur, P. (1979). Observations sur une méthode de dosage de la proline libre dans les extraits des plantes. *Canadian Journal of Botany* 57(18), 1851-1854.

Scandellari, F., (2017). Arbuscular mycorrhizal contribution to nitrogen uptake of grapevines. *Vitis* 56, 147-154.

Vadez, V., Berger, J.D., Warkentin, T., Asseng S., Ratnakumar, P., Poorna Chandra Rao, K., Gaur, P.M., Munier-Jolain, N., Larmure, A., Voisin, A.S., Sharma, H.C., Pande, S., Sharma, M., Krishnamurthy, L., Zaman, M.A. (2011). Adaptation of grain legumes to climate Change: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32(1), 31-44.

Yemm, E.W., y Willis, A.J. (1954). The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemistry Journal*, 57(3), 508-514.

Zhao, C.J., Schieber, A., Gänzle, M.G. (2016) Formation of taste-active amino acids, amino acid derivatives and peptides in food fermentations - A review. *Food Research International* 89, 39-47.