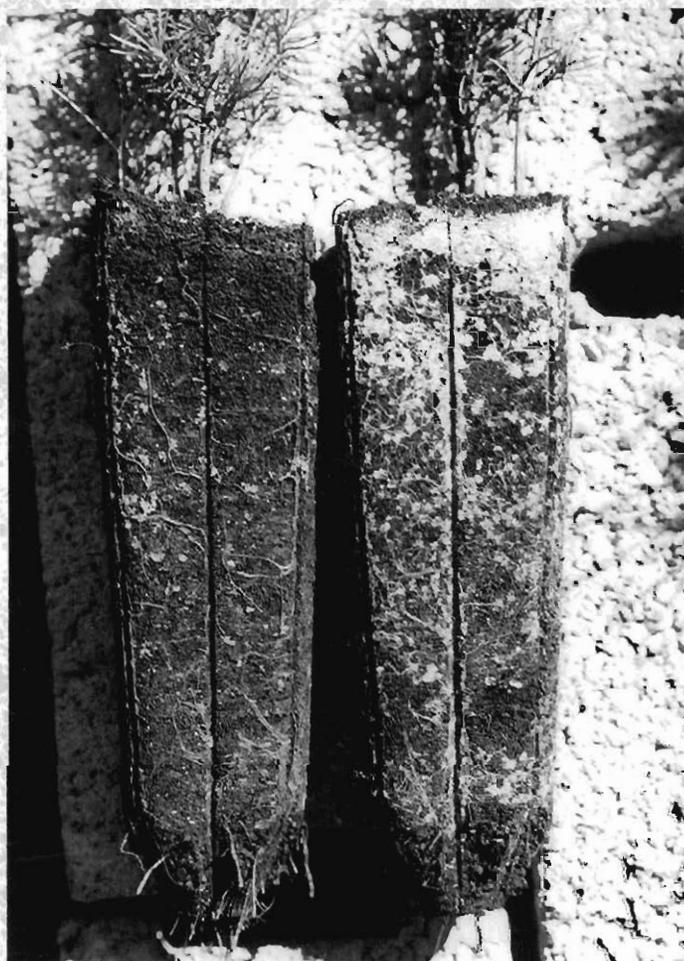


57/98

INFORMACIONES TÉCNICAS

MICORRIZAS EN ESPECIES LEÑOSAS



COMUNIDAD EUROPEA



Consejería de Agricultura y Pesca



JUNTA DE ANDALUCÍA

MICORRIZAS EN ESPECIES LEÑOSAS

© Edita: JUNTA DE ANDALUCÍA. Consejería de Agricultura y Pesca
Dirección General de Información y Gestión de Ayudas

Publica: Dirección General de Investigación y Formación Agraria. Servicio de Publicaciones y Divulgación

Colección: Informaciones Técnicas 57/98

Autores: Pereira Cansino G., Roldán Jiménez I., Herrera Machuca, M. A.

Fotografía e Ilustraciones: Autores

Depósito Legal: SE. 809 - 99

Fotocomposición e Impresión: J. de Haro Artes Gráficas, S. L. Parque Ind. P.I.S.A. Mairena del Aljarafe • Sevilla

MICORRIZAS EN ESPECIES LEÑOSAS

GUILLERMO PEREIRA CANCINO¹
ISABEL ROLDAN JIMÉNEZ²
MIGUEL ANGEL HERRERA MACHUCA²

¹ Universidad de Concepción. Chile

² Universidad de Córdoba. E.T.S.I.A.M.

INDICE

1. ASPECTOS GENERALES DE LAS MICORRIZAS	9
2. IMPORTANCIA DE LAS MICORRIZAS EN LA SELVICULTURA	10
3. TIPOS DE MICORRIZAS	11
3.1. Endomicorrizas	12
3.2. Ectomicorrizas	15
3.3. Ecto-endomicorrizas	17
4. FACTORES QUE INCIDEN EN LA FORMACIÓN DE MICORRIZAS	17
4.1. Grado de dependencia a las micorrizas	17
4.2. Especificidad	18
4.3. Efectividad de la Simbiosis	19
4.4. Condiciones Físico-Químicas del medio	19
4.5. Factores Geológicos y ambientales	20
5. EFECTO DE LAS MICORRIZAS SOBRE LAS PLANTAS	21
5.1. Mejor aprovechamiento por las plantas de los nutrientes disponibles	21
5.2. Mejor aprovechamiento de recursos hídricos	23
5.3. Situación de estrés por exceso de salinidad	24
5.4. Mayor resistencia a concentraciones de metales pesados	24
5.5. Mejora de condición sanitaria	25
5.6. Cambios morfológicos y fisiológicos en las raíces y tejidos radicales	26
6. TÉCNICAS DE ESTUDIOS DE MICORRIZAS	26
6.1. Toma de muestras de raíces micorrizadas	26
6.1.1. Limpieza de raíces	27
6.1.2. Extracción de raíces del suelo	27
6.2. Aclarado y tinción de las raíces micorrizadas	28
6.2.1. Aclarado de las raíces micorrizadas	28
6.2.2. Tinción de las raíces micorrizadas	29
6.3. Evaluación de las colonizaciones micorrizas	30
6.3.1. Evaluación de las micorrizas arbusculares	30
6.3.2. Evaluación de las ectomicorrizas	30
7. ESTUDIO DE MICORRIZAS EN ALGUNAS ESPECIES DE INTERÉS PARA REFORESTACIÓN DE TIERRAS AGRARIAS	31
8. PERSPECTIVAS FUTURAS DE LAS MICORRIZAS	34
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1. ASPECTOS GENERALES DE LAS MICORRIZAS

El término micorriza que deriva del griego *Mycos* (Hongo) y *Rhiza* (Raíz) (Harley y Smith, 1983), se debe al botánico alemán A.B. Frank quien, en 1885 lo utilizó por primera vez, para describir la existencia de raíces colonizadas por hongos (Harley, 1959; Trappe y Fogel, 1977; Harley y Smith, 1983; Barreno, 1991).

Las micorrizas se pueden definir como asociaciones simbióticas mutualísticas, entre raíces de plantas y determinados hongos del suelo, en las que ambos componentes de la asociación se benefician mutuamente (Harley, 1959; Azcón-Aguilar y Barea, 1980; Ocampo, 1980a; Harley y Smith, 1983; Allen, 1989; Pritchett, 1991; Gianinazzi y Azcón-Aguilar, 1991). Esta relación hongo-planta ha sido objeto de intensos estudios en las últimas décadas del presente siglo, llegándose a la conclusión de que las micorrizas son una parte integral de la planta con un importante papel en el crecimiento y desarrollo del vegetal (Linderman, 1988; Barreno, 1991).

La mayoría de las plantas que viven en la superficie terrestre tienen la facultad de establecer esta simbiosis (Harley y Smith, 1983; Barea, 1991; Allen, 1991; Gianinazzi, 1991; Linderman, 1994); en caso de no formar micorrizas, un gran número de especies vegetales, entre éstas, las arbóreas no podrían sobrevivir (Trappe y Fogel, 1977; Pritchett, 1991). Las condiciones de mutualismo llegan a estar tan acentuadas en las micorrizas, que se puede decir, de acuerdo con Gerdemann (1968), Azcón-Aguilar y Barea (1980), Honrubia *et al.* (1992; 1997) que la mayoría de las plantas cuando crecen en condiciones naturales son organismos dobles en el sentido de que el órgano a través del cual absorben agua y nutrientes está constituido por la raíz y el hongo simbiote que vive con ella.

Es importante mencionar también, que se han descrito efectos negativos transitorios o prolongados de las micorrizas sobre el crecimiento de las plantas. Los efectos transitorios del crecimiento probablemente se deban a la competencia entre la planta y el hongo por el fotosintato en los estados iniciales de la colonización, cuando el hongo consume carbohidratos sin aportar aún beneficios, o bien cuando las condiciones de la fotosíntesis no son óptimas en cuanto intensidad lumínica y temperatura (Smith, 1974; Crush, 1976; Smith, 1980; Bowen, 1981; Cooper, 1984; Roldán 1985). Esta situación ocurre por lo general algunas semanas después de la emergencia de las plántulas mientras se produce la colonización intrarradical y dura hasta que tiene lugar el crecimiento de las hifas en el suelo y la planta hospedadora comienza a beneficiarse de los aportes nutricionales del hongo micorrícico (Gianinazzi-Person y Azcón-Aguilar, 1991). Los efectos negativos prolongados en el crecimiento de la planta pueden originarse cuando la fotosíntesis está limitada, o bien, cuando las plantas micorrizadas crecen en sitios de alta fertilidad. En tal situación, la raíz por sí sola es capaz de absorber nutrientes en forma adecuada para un buen crecimiento de la planta, mientras el hongo micorrícico sólo le significa costes metabólicos para ésta (Gianinazzi-Person y Azcón-Aguilar, 1991).

En cuanto a la morfología de las micorrizas ésta varía entre las especies vegetales y cada especie tiende a tener grupos característicos de hongos capaces de formar micorrizas (Pritchett, 1991). Esta situación se evidencia especialmente en las ectomicorrizas, en las cuales se manifiesta una clara especificidad en la simbiosis hongo-planta (Dighton y Mason, 1985; Gardner, 1986; Miller, 1991; Molina *et al.*, 1991). En cambio en las micorrizas del tipo endotrófica, la especificidad no es tan clara pudiendo, en algunos casos, un propágulo colonizar un amplio rango de plantas hospedadoras, de esta forma el mismo hongo puede estar formando simbiosis con una planta herbácea y simultáneamente hacerlo con una leñosa (Stribley y Snellgrove, 1985; Molina *et al.*, 1991; Miller, 1991)

La acción beneficiosa de los hongos mutualísticos a sus macrosimbiontes y por tanto la importancia de la simbiosis micorrícica, se refleja en varios sentidos: aumento en la absorción de agua y nutrientes minerales, mayor crecimiento y supervivencia de la mayoría de las plantas en campo, protección frente a infecciones de organismos patógenos y estrés ambiental (Harley, 1959; Hacskaylo, 1967; Marx, 1971; Voigt, 1971; Trappe y Fogel, 1977; Harley y Smith, 1983; García-Garrido y Ocampo 1988a; Gianinazzi, 1991; Trappe *et al.*, 1991; Honrubia *et al.*, 1992; Brundrett *et al.*, 1996). Al mismo tiempo se ha observado aumento en la movilización de los nutrientes por medio de la intemperización biológica (Pritchett, 1991) y una mayor longevidad de las raíces (Trappe y Fogel, 1977; Harley y Smith, 1983).

2. IMPORTANCIA DE LAS MICORRIZAS EN LA SELVICULTURA

La importancia de las asociaciones micorrícicas, se observó por primera vez, en algunos programas de reforestación realizados en diversas partes del mundo en los cuales se plantaron árboles exóticos en ausencia de los hongos simbióticos naturales. En estos casos las plantaciones fracasaban parcial o totalmente hasta que se introducían los hongos micorrícicos adecuados (Daniel *et al.*, 1985; Pritchett, 1991). Al respecto Hoffman y Mitchel (1986), sugieren que el éxito de la propagación de *Acacia saligna* en Sudáfrica estuvo asociado con la escasa actividad micorrícica. En este mismo sentido, Honrubia *et al.*, (1992), afirman que al utilizar especies vegetales dependientes de las micorrizas, en programas de forestación, estas fracasarán si no se introducen micorrizas con inóculos adecuados, cuando en el ambiente natural no existen los organismos pertinentes.

Las razones del declive de la población de hongos micorrícicos puede ser diversa, pero entre estas generalmente se encuentran procesos de degradación, en muchos casos asociados a condiciones de restricciones hídricas propias de zonas semiáridas y áridas. Los cambios de vegetación realizados en forma artificial (agricultura) y la aplicación de fertilizantes y pesticidas pueden reducir ostensiblemente la población de hongos micorrícicos originalmente existentes (Allen, 1991).

Otros procesos, estrechamente relacionados, a tener en consideración son la disminución de masas forestales y el aumento de la desertización (Roldán y Barea, 1987). Al

eliminar la cubierta vegetal se produce una desestabilización de la superficie edáfica, quedando sometida ésta a la erosión, en estos casos no sólo se pierden partículas inertes de suelo sino que también propágulos de hongos. La restauración de estos ecosistemas degradados no consiste únicamente en el establecimiento de plantas, sino que requiere una adecuada difusión de nutrientes, tanto horizontalmente, por influencia de las raíces superficiales, micorrizas y deposiciones eólicas, como en sentido vertical, por acción de especies vegetales de raíz profunda con sus respectivas asociaciones microbianas (Allen y Allen, 1988). En la recuperación de estos ambientes, en los cuales la acción del hombre y/o la naturaleza han eliminado los microorganismos del suelo, es donde cobra mayor importancia la acción benéfica de las micorrizas (Daft y Nicolson, 1974; Zajicek *et al.*, 1987; Jasper *et al.*, 1989).

Desde un punto de vista evolutivo la presencia de micorrizas también **es importante**, dado que estas inciden en la estructura y mecanismos de interacción **entre las plantas** (Allen, 1991). Al respecto Herrera *et al.* (1993), afirman que el tipo de hongo micorrícico presente en el suelo pueden influir en la capacidad competitiva de las especies **vegetales**. La ausencia de ellos podría condicionar que sólo aquellas especies **vegetales que no** necesitan de la simbiosis micorrícica para desarrollarse puedan crecer en este **tipo de ambiente**. Allen (1984), señala que las micorrizas incrementan la diversidad de plantas en comunidades sucesionales tempranas. Del mismo modo Janos (1981), **indica** como las micorrizas incrementan la diversidad en las comunidades de árboles tropicales.

Las especies vegetales que usualmente constituyen los bosques suelen ser bastante dependiente de las micorrizas para lograr un desarrollo adecuado (Janos, 1980a). **Es** más, de acuerdo con Janos (1980b), gran parte de las plantas por él estudiadas **eran** micotróficas obligadas, siendo las micorrizas vesículo arbusculares el tipo más **habitual** encontrado. Este tipo de micorrizas suelen ser muy poco específicas respecto a **la planta** hospedadora (Harley y Smith, 1983; Molina *et al.*, 1991; Miller, 1991), **sin embargo**, y dado que cada especie vegetal se relaciona mejor con determinadas especies **de hongos** se producen selecciones indirectas de los hongos micorrícicos por parte de **las plantas** que integran el bosque (Janos, 1980a). Por el contrario, en las micorrizas ectotróficas el hongo suele ser específico de una o muy pocos **tipos de plantas** (Dighton y Mason, 1985; Gardner, 1986; Miller, 1991; Molina 1991). **Estos hechos tienen una** considerable repercusión desde el punto de vista ecológico y evolutivo de **los bosques** en relación con las micorrizas Roldán y Barea, 1987; Allen, 1991).

3. TIPOS DE MICORRIZAS

En la actualidad se reconocen siete tipos diferentes de micorrizas (Tabla 1): Endomicorrizas, Ectomicorrizas, Ecto-endomicorrizas, Arbutoides, Monotropoides, Ericoides y Orquideoides (Harley y Smith, 1983; Bagyaraj, 1989; **Molina et al.**, 1991; Honrubia *et al.*, 1992; Brundrett *et al.* 1996). Pero, en general, **por la importancia** relativa que presentan, se las agrupa en tres grandes tipos: Ectomicorrizas (micorrizas ectotróficas), endomicorrizas (micorrizas endotróficas), y ecto-endomicorrizas (Ocampo, 1980a, Pritchett, 1991).

Tabla 1. Tipos de micorrizas de acuerdo con Harley y Harley, (1987), modificado por Honrubia, et al., (1992).

	MVA	ECM	Ectendo	Arbutoides	Monotropoides	Ericoides	Orquidioides
Hifas septadas	+	+	+	+	+	+	+
Hifas aseptadas	+	+					
Hifas en el interior de las células corticales	+	-	+	+	+	+	+
Presencia de manto fúngico	-	+	+ ó -	+	+	-	-
Red de Hartig	-	+	+	+	+	-	-
Hifas en forma de tirabuzón (coils)							
En el interior de las células	+	-	+	+	-	+	+
Haustorios dicotómicos	+	-	-	-	-	-	-
Haustorios no dicotómicos	-	-	-	-	+	-	+ ó -
Vesículas en el interior de las células	+ ó -						
Hongos simbiostes	Zigomic.	Basidiomic. Ascomic. Zigomic.	Basidiomic.	Basidiomic.	Basidiomic.	Ascomic.	Basidiomic.
Plantas hospedadoras	Briófitos. Pteridof. Gimnosp.	Gimnosp. Angiosp.	Gimnosp. Angiosp.	Ericales	Monotrop.	Ericales	Orchidaceae
			Angiosp.				

Notas: + = Presencia; - = Ausencia; Zigomic. = Zigomicetos; Basidiomic. = Basidiomicetos; Ascomic. = Ascomicetos, Gimnosp. = Gimnosperma; Monotrop. = Monotropoides; Pteridof. = Pteridófitos; Angiosp. = Angiosperma.

3.1. Endomicorrizas

Este tipo de micorriza es el más extendido en el planeta, se encuentra en todos los climas que permiten el desarrollo vegetal (Azcón-Aguilar y Barea, 1980; Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1986). De acuerdo con Nicolson (1975), este tipo de simbiosis es el más antiguo. Según registros fósiles, las plantas terrestres más primitivas presentaban estructuras similares a las actuales endomicorrizas.

Las endomicorrizas se encuentran tanto en suelos agrícolas como forestales, y son comunes en la mayoría de las familias de angiospermas y parte de gimnospermas (Pritchett, 1991). Se calcula que el 90% de las plantas tienen micorrizas endotróficas (Honrubia et al., 1992). Este tipo de micorrizas se caracterizan por la presencia de hifas inter e intracelulares en el córtex radical, las que penetran en éste, ramificándose desde el punto de penetración (Linderman, 1994). En este tipo de micorrizas no se producen cambios morfológicos apreciables en la estructura externa de la raíz colonizada (Bagyaraj, 1989), pero la fisiología de la planta hospedadora cambia significativamente. Para su identificación es necesario utilizar técnicas de tinción y microscópicas apropiadas (Azcón-Aguilar y Barea, 1980; Perry et al., 1991; Honrubia et al., 1992; Linderman, 1994).



Foto 1. Colonización intercelular de endomicorrizas. Se observa presencia de hifas y de vesículas.

De acuerdo con Trappe (1987), se puede distinguir dos tipos de endomicorrizas según el simbionte que la establezca:

- Endomicorrizas formadas por hongos *Zygomycotina*
- Endomicorrizas formadas por otros hongos (*Ascomycotina* o *Basidiomycotina*).

Las primeras (formadas por hongos *Zygomycotina*), tienen hifas inter e intracelulares aseptadas y desarrollan unas estructuras características, los arbuscúlos. En algunos de estas asociaciones también se forman vesículas, además de los arbuscúlos, por lo que se les denominaba, hasta hace poco, como micorrizas vesículo-arbusculares, o simplemente MVA, o VAM en la literatura inglesa; no obstante la tendencia actual es conocer a estas asociaciones simplemente como micorrizas arbusculares o con sus iniciales MA en español o en lengua inglesa como AM.

Por otra parte las micorrizas formadas por hongos *Ascomycotina* o *Basidiomycotina* tienen hifas inter e intracelulares septadas y en algunos casos desarrollan alrededor de las raíces afectadas una envoltura micelial semejante al manto de las ectomicorrizas (Honrubia et al., 1992).

Las endomicorrizas formadas por hongos *Zygomycotina*, son las más frecuentes dentro de este grupo. Estas micorrizas arbusculares son las más extendidas en el planeta, se han descrito frecuentemente en todos los continentes, incluyendo la Antártida

(Allen, 1991; Ocampo, 1997). La mayoría de las especies vegetales pueden desarrollarlas en sus raíces (Gerdemann, 1975; Ocampo, 1980a; Harley y Smith, 1983; Barea, 1991). En la actualidad se acepta que un 90% de las plantas superiores son susceptibles de formar esta simbiosis (Roldán y Barea, 1987; Honrubia et al., 1992).

Las especies fúngicas responsables de este tipo de simbiosis son unas 125 todas pertenecientes al orden *Glomales* (subdivisión *Zygomycotina*), y están incluidas en los siguientes géneros: *Glomus*, *Sclerocystis*, *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora*.

Clasificación taxonómica de los hongos formadores de MA (Morton y Benny., 1990).

División EUMYCOTA
Grupo: Zygomycotina
Orden: Glomales
Suborden: Glomineae
Familia: *Glomaceae*
Géneros: *Acaulospora*
Entrophospora
Suborden: Gigasporineae
Familia: *Gigasporaceae*
Géneros: *Gigaspora*
Scutellospora

Las hifas se desarrollan tanto fuera de la raíz como dentro de ella. Cuando éstas se desarrollan dentro de la raíz pueden penetrar las células (intracelularmente) o discurrir entre células (intercelularmente), pudiendo ser enteramente de uno u otro tipo, dependiendo de las características de la planta hospedadora (Gray, 1971; Gerdemann, 1975; Ocampo, 1980a). La hifa puede crecer en la epidermis de la raíz, pero no forma un manto de hifas alrededor de ésta (Gray, 1971). El conjunto de hifas externas se extiende en el suelo a más de un centímetro de la raíz, pudiendo alcanzar más de ocho centímetros a partir de ésta; lo cual incrementa el potencial del sistema radical, tanto en el aspecto nutricional como en la absorción de agua; contribuyendo además a mejorar la estructura del suelo, favoreciendo con ello la aireación e infiltración de agua (Linderman, 1994; Rhodes y Gerdemann, 1975).

Un tipo de orgánulo característico de esta simbiosis es el arbúsculo, que son ramificaciones dicotómicas que se producen a partir de una hifa intercelular que penetra en una célula cortical, produciendo el ensanchamiento de la hifa con su posterior ramificación (Gerdemann, 1975; Ocampo, 1980a; Harley y Smith, 1983). Los arbúsculos poseen un núcleo grande con nucleolos prominentes, presentando abundantes gránulos de polifosfatos almacenados en vacuolas individuales, las cuales parecen conservar un tamaño constante y formar una cadena central en las ramas más pequeñas (Cox y Sanders, 1974; Ocampo, 1980a). Las hifas extremas del arbúsculo son muy finas (menores a 0,2 micrones de diámetro),

pudiendo la estructura entera ocupar toda la célula (Tinker, 1975; Gerdermann, 1975). El arbusculo siempre suele estar rodeado por el plasmalema del hospedador (Cox y Sanders, 1974). En esta estructura es donde se produce el intercambio de nutrientes entre las células de la planta y el hongo micorrícico (Gray, 1971; Azcón-Aguilar y Barea, 1980).

Otro elemento de esta simbiosis, son las vesículas que son órganos de reserva de forma esférica, oval o globosa, de formación intercalar o apical en la hifa principal, que pueden estar localizadas intra o intercelularmente, dependiendo ello, de su hospedador y condiciones nutricionales (Harley, 1959; Gerdermann, 1975). Se encuentran ubicadas en las diferentes capas de la corteza de la raíz, aunque también se las puede encontrar en el micelio externo (Harley, 1959).

En el proceso de formación de las micorrizas vesículo arbusculares se reconocen cinco hechos claves: a) activación de los propágulos del hongo que persiste en el suelo; b) estimulación rizosférica del micelio formado; c) unión de las hifas colonizadoras a la superficie de la raíz y formación de los primeros puntos de penetración del hongo; d) progreso de la colonización en la raíz y e) crecimiento del micelio externo en el suelo que la circunda. Los tres primeros constituyen la fase de precolonización, mientras que los dos últimos constituyen a la fase de desarrollo de la micorriza (Barea y Azcón-Aguilar, 1983; Roldán, 1985).

3.2. Ectomicorrizas

Las ectomicorrizas tienen una distribución más limitada entre las especies vegetales y una mayor uniformidad morfológica (Pritchett, 1991). Sólo entre el 3 y 5% de los vegetales establecen este tipo de micorrizas (Trappe, 1987; Barea, 1991); sin embargo, su importancia forestal es enorme no sólo por las familias de plantas con las que forman simbiosis, sino también, por los grupos fúngicos que desarrollan esta simbiosis (Honrubia et al., 1992). Los hongos ectomicorrícicos se asocian con la mayoría de las especies de coníferas y un gran número de especies de frondosas en ambientes templados o mediterráneos, aunque también pueden existir en ambientes tropicales o subtropicales tales como savanas y pluviselvas (Dighton y Mason, 1985; Brundrett et al. 1996). Excepcionalmente algunas especies de herbáceas de familia de *Cyperaceae* y *Polygalaceae* también forman este tipo de asociación (Brundrett et al. 1996).

Como se ha indicado el porcentaje de plantas que forma este tipo de asociación no es cuantioso, sin embargo desde un punto de vista forestal si es de gran trascendencia. Diversas familias con una gran cantidad de géneros de especies forestales han mostrado que establecen este tipo de asociación. Entre las coníferas se pueden destacar las familias de las *Cupressaceae* y de las *Pinaceae* mientras que en las frondosas se han encontrado distintos géneros, con capacidad de formar este tipo de micorrizas, en familias de *Betulaceae*, *Casuarinaceae*, *Fagaceae*, *Juglandaceae*, *Mirtaceae*, *Salicaceae*, *Tiliaceae*, *Ulmaceae*, entre otros (Harley y Smith, 1983).

Ciertas especies son más micotróficas que otras en la medida que obtienen mayores beneficio de las micorrizas. La dependencia de las plantas a las micorrizas se define como el grado en que una planta depende de las condiciones de estar micorrizadas para producir su máximo crecimiento y rendimiento a un nivel dado de fertilidad de suelo (Gerdemann, 1975; Azcón-Aguilar y Barea, 1980).

El factor que contribuye fundamentalmente a la dependencia de las plantas a las micorrizas, es su capacidad de captar el fósforo del suelo, que es el principal elemento implicado en la efectividad y desarrollo de las micorrizas. Así, las especies forestales, menos eficientes en la captación de fosfatos de la solución edáfica, o con una demanda más alta de fósforo, son las más dependientes de la simbiosis (Azcón-Aguilar y Barea, 1980; Menge, 1982; Roldán, 1985; Mosse, 1986).

La morfología y geometría del sistema radical, así como factores de tipo fisiológico o anatómico, también pueden influir en el grado de dependencia de las plantas a las micorrizas (Roldán, 1985; García-Garrido y Ocampo, 1986; Salamanca, 1991). Sin embargo, el grado de dependencia de una planta a la micorrización puede estar influida por factores como tipo de suelos, contenido de fósforo en éste, especie de micorrizas, etc.

4.2. Especificidad

Como se ha señalado anteriormente existen patrones de especificidad acerca de grandes grupos de plantas en relación con tipos de hongos capaces de establecer simbiosis. Sin embargo los grupos de asociación micorrícica deben ser analizados en forma independiente pues si bien es cierto en algunos de ellos la especificidad no es un aspecto de consideración en el establecimiento de la simbiosis (endomicorrizas) en otros si hay una estrecha relación entre hospedador y hongo simbiote, como es el caso de las micorrizas ectotróficas, arbutoides u orquidioides (Allen, 1991)

Los hongos formadores de MA presentan baja especificidad, encontrándose en muchos casos que un propágulo puede llegar a micorrizar un amplio rango de plantas hospedadoras (Harley y Smith, 1983; Molina *et al.*, 1991; Miller, 1991). Teóricamente cualquier hongo formador de micorriza vesículo arbuscular puede colonizar a cualquier planta hospedadora, no obstante, existen grandes diferencias entre los distintos endofitos, tanto en la morfología de la colonización como en el grado de micorrización, que inciden en la efectividad de las micorrizas vesículo arbusculares formadas en una planta determinada (Roldán, 1985).

Al respecto Janos (1980a) sostiene que cada especie vegetal parece compatibilizar mejor con determinados hongos, por ello, se suelen ir produciendo selecciones indirectas de los hongos formadores de MA por parte de las plantas que integran las comunidades vegetales. Es importante mencionar también que algunas propiedades del suelo como pH, nivel de macro y micronutrientes asimilables, pueden influir en

algún grado en la selectividad de los hongos formadores de micorrizas arbusculares (García-Garrido y Ocampo, 1986; Mosse, 1986).

A medida de que hay una mayor especialización en la asociación micorrícica, comienza a aparecer una mayor relación de especificidad (Allen 1991). Incluso en algunos casos el hongo puede colonizar el córtex de determinadas plantas no hospedadoras con un comportamiento parasítico. Esta situación se ha descrito en plantas de *Eucalyptus* colonizados por un hongo micorrícico de pino que ha producido necrosis celular en las células corticales del hospedador, a pesar de que en condiciones naturales con su hospedador compatible formaba una simbiosis normal (Malajzuk et al. 1984).

4.3. Efectividad de la simbiosis

Si bien es cierto que la especificidad en la relación micorrícica es de muy baja importancia en algunos tipos de asociaciones, la efectividad de la simbiosis dependerá en gran medida de la correlación que exista entre el hongo micorrícico y la planta hospedadora (Roldán, 1985; Salamanca, 1991; Pereira, 1997).

La eficiencia de un hongo formador de micorrizas está dada por la capacidad de estimular la captación de nutrientes, lo que se relaciona con la formación de un micelio extenso y bien distribuido en el suelo y la persistencia de sus efectos. Todo esto se logra por la capacidad del hongo de producir colonizaciones extensivas en las nuevas raíces que se van formando, como también, por la eficacia para absorber fosfatos y del tiempo que las hifas permanecen efectivas en el transporte de nutrientes hacia la planta (Roldán, 1985; García-Garrido y Ocampo, 1986).

4.4. Condiciones físico-químicas del medio

Cuando se analiza la formación de micorrizas se debe tener en consideración el efecto de los nutrientes del suelo. Generalmente la colonización de plantas por hongos micorrícicos disminuye cuando se incrementa la fertilidad del suelo (Azcón y Barea, 1980; Ocampo, 1980c; Brundrett et al. 1996). Niveles altos de nitrógeno y fósforo en el suelo pueden llegar a reducir o inhibir el desarrollo de las micorrizas (Mosse, 1973; Gerdemann, 1975; Azcón y Barea, 1980; Ocampo, 1980c; Aziz, et al., 1987; Barea, 1991; Honrubia et al., 1992).

Altas concentraciones de fósforo en las plantas no sólo parecen hacerlas resistentes a la colonización (Mosse, 1973; Amijee et al., 1989), sino que en algunos casos, determinadas concentraciones de este elemento producen una reducción en el crecimiento de las plantas micorrizadas (Ocampo, 1980c).

De acuerdo con Roldán (1985), más que el nivel de fósforo en el suelo interesa la concentración de este elemento en la planta, ya que es el que controla el estableci-

miento y función de las micorrizas. Al respecto Jasper *et al.*, (1989), señalan que cuanto más alta es la concentración de fósforo en una planta, más bajo es el contenido en carbohidratos solubles de la raíz y de sus exudados y en consecuencia es más baja la frecuencia de puntos de entrada del hongo formador de micorriza vesículo arbuscular en la raíz.

Con respecto a la aplicación de nitrógeno, al parecer este elemento inhibe la colonización de por hongos micorrícicos en plantas cultivadas en invernadero y en campo, siendo su efecto depresivo más marcado que el del fósforo (Ocampo y Hayman, 1981, Hayman, 1983).

Otro aspecto a observar es el pH del suelo. La acidez es un factor edáfico que puede influir en gran medida en la distribución de las micorrizas (Siqueira *et al.*, 1984). Las especie de hongos micorrícicos difieren en su tolerancia al pH del suelo (Abbott y Robson, 1985; Allen, 1991; Honrubia *et al.*, 1992; Brundrett *et al.*, 1996). Aquellas especies más tolerantes a la acidez del suelo pueden jugar un papel importante en la adquisición de P para las plantas, especialmente en suelos tropicales.

El pH del medio de crecimiento usado para la propagación de las micorrizas puede afectar la germinación de esporas, crecimiento de las hifas y por ende el desarrollo de algunos hongos micorrícicos (Siqueira *et al.*, 1984; Harley Smith, 1983). Al respecto este último autor afirma que el pH puede tener un efecto directo o indirecto sobre la germinación de las esporas ya que puede afectar la solubilidad de elementos esenciales y de toxinas, además de incidir en el crecimiento de los tubos de germinación.

4.5. Factores biológicos y ambientales

La presencia de microorganismos es un aspecto de notable incidencia en la germinación de las esporas de los hongos micorrícicos, pudiendo tener efectos significativos según el microorganismo involucrado (Azcón y Ocampo, 1981). Se ha observado que la reducción en la efectividad en algunas asociaciones micorrícicas en campo, está asociada a la presencia en estos suelos de microartrópodos, especialmente del orden Collembola (Mc Gonigle y Fitter, 1988). Aunque generalmente estos organismos se asocian desde un punto de vista positivo en relación con los ciclos de nutrientes del suelo, al parecer la continua ingestión del micelio micorrícico puede provocar una disminución de las conexiones hifales, dando incluso origen a una pérdida de producción de biomasa vegetal (Salamanca, 1991).

Entre los factores ambientales, la temperatura del suelo puede incidir en la formación de micorrizas (Harley y Smith, 1983; Van Nuffelen y Schenck, 1984). En general al incrementar la temperatura en el suelo, el porcentaje de colonización aumenta hasta alcanzar un máximo alrededor de los 30°C para luego decrecer, inhibiéndose por completo cuando la temperatura sobrepasa los 40°C (Harley y Smith, 1983).

La luz es otro factor que puede incidir en los procesos de formación de las micorrizas. De acuerdo con Azcón y Barea (1980), cuando las plantas son colocadas en ligera penumbra, la colonización no sufre alteraciones significativas, sin embargo cuando la sombra aumenta, la colonización se reduce drásticamente. Es importante mencionar también que este factor ambiental puede afectar en forma indirecta al proceso de micorrización. En muchos lugares del mundo, entre estos Israel, Australia, Egipto, México, Sudafrica y España, la solarización es una técnica frecuentemente usada para el control de patógenos en el suelo (Baker y Cook, 1974; Borges, 1982). Altas temperaturas alcanzadas en los primeros 30 cm de suelo (36 a 50°C) por periodos prolongados afectan seriamente al proceso de micorrización. Al respecto Harley y Smith, (1983) afirman que sobre los 40°C de temperatura en el suelo la micorrización se inhibe completamente. Es importante destacar también que esporas de resistencias de los hongos micorrícicos pueden sobrevivir a este tipo de tratamientos.

5. EFECTO DE LAS MICORRIZAS SOBRE LAS PLANTAS

Los programas de repoblación forestal, en general responden a políticas territoriales con horizontes de trabajo a largo plazo y en muchos casos que involucran importantes superficies, por lo que se debe tratar de minimizar las posibles causas de fracaso. En la actualidad está cada vez más aceptada la idea de incorporar criterios ecológicos que van desde la selección de especies autóctonas por sus ventajas de adaptación al medio. No obstante, la restauración de ecosistemas no se realiza únicamente con la incorporación de plantas leñosas, sino que en muchos casos se debe restaurar el ambiente microbiano del suelo. También se debe considerar que las plantas usadas en la repoblación forestal, sufrirán una serie de estrés por el efecto del trasplante del vivero a condiciones de campo, por lo que surge la necesidad de desarrollar en vivero, los sistemas radicales para la producción de plantas vigorosas, teniendo la micorrización de aquellas un importante papel a la hora de asegurar la supervivencia de los trasplantes y la salud de las plantas.

5.1. Mejor aprovechamiento por las plantas los nutrientes disponibles

En muchas situaciones las plantas deben hacer frente a situaciones de estrés causada por la infertilidad de los suelos. Tinker (1984), demostró que las micorrizas vesículo arbusculares ayudan a la planta en la adquisición de nutrientes del suelo, especialmente aquellos de baja movilidad tales como P, Zn y Cu; al igual que aquellos iones más móviles como, Ca, K, Fe, Mg, Mn, Cl, B y N. Para ello las plantas han adaptado algunas estrategias tales como: (1) cambio en la capacidad de absorción, (2) modificación de la relación área radicular/área foliar y (3) interacción rizosférica (Barea, 1991). Al parecer las plantas que han evolucionado a hábitats infértiles, tienen una baja capacidad de absorción radicular, debido a la baja disponibilidad y lenta difusión de los nutrientes (Chapin, 1980; Barea, 1991). De acuerdo a las observacio-

nes de Chapin (1980), en este tipo de ambientes, las plantas presentan alta tasa de micorrización, la que al parecer, sería la responsable de la mayor longevidad de las raíces y de la absorción de nutrientes.

No se debe olvidar que el hongo proporciona un aumento de la superficie de absorción del sistema radical de la planta. El micelio fúngico actúa de manera expansiva, a modo de extensiones que aumentan la superficie exploratoria que constituye el sistema radical, constituyendo una superficie adicional de gran eficacia en la absorción de iones de lenta difusión en el suelo. Además estas extensiones son fisiológica y geoméricamente más efectivas que las propias raíces. Las hifas miceliarias por su peculiar forma de nutrición, mediante la emisión de enzimas exógenas, incorporan rápidamente los minerales en su citoplasma y posteriormente los translocan hasta el propio sistema vascular del hospedador (Trappe, 1981). Debido además a que el micelio de un único individuo fúngico puede extenderse a través del suelo grandes distancias, nos encontramos con que muchas plantas, sus micorizas asociadas y las hifas extramatriciales están en estrecho contacto en el suelo (Allen, 1991), así una comunidad de hongos micorrícicos puede física y fisiológicamente conectar bajo tierra diversos hospedadores a través de la red de hifas extramatriciales.

Los mecanismos bioquímicos involucrados en la absorción de fósforo por ecto y endomicorizas y su consiguiente transferencia a las células del hospedador, no están plenamente esclarecidos. Bowen y Theodorou (1973) sugirieron que una de las propiedades de las ectomicorizas es su habilidad para incrementar la solubilización de las formas insolubles de fosfato orgánico del suelo. Callow *et al.* (1978) demostraron que grandes cantidades de ortofosfato tomadas por raíces colonizadas por hongos formadores de micorizas vesículo-arbusculares eran transformados en gránulos de polifosfatos. Cox *et al.* (1980) sugirieron que estos gránulos son rápidamente translocados a través de las hifas del hongo por medio de corrientes citoplasmáticas. Callow *et al.* (1978) sugirieron que el polifosfato podría ser roto en los arbusculos de VAM por una polifosfatasa, liberando fósforo inorgánico, o una polifosfato quinasa, liberando ATP. Los productos liberados por las enzimas son directa o indirectamente usados en la translocación de fósforo inorgánico a través de la interface arbusculo/hospedador.

También se ve incrementada la captación de nitrógeno del suelo en plantas micorrizadas en comparación con las no micorrizadas. Trabajos de Barea, (1991), demostraron que las micorizas utilizan formas de nitrógeno difícilmente utilizables por plantas no micorrizadas. Además con ^{15}N se ha evaluado el efecto de las micorizas favoreciendo indirectamente la fijación de N_2 . Los hongos ectomicorrícicos pueden emplear los recursos de nitrógeno del fondo común (pool) del suelo tanto en forma de nitrógeno orgánico incluyendo proteínas y amino ácidos libres (Alexander, 1983), como en forma de nitrógeno inorgánico incluyendo amonios y nitrato (Alexander, 1983). También tienen la habilidad de convertir el nitrógeno absorbido a formas más rápidamente metabolizables por el hospedador y de transportarlo a través de considerables distancias.

5.2. Mejor aprovechamiento de recursos hídricos

Diversos estudios han puesto de manifiesto que las micorrizas mejoran la relación hídrica de las plantas (Cooper, 1984; Augé *et al.*, 1987; Zajicek *et al.*, 1987; Faber *et al.*, 1991). De esta forma una planta micorrizada respondería de mejor manera al estrés hídrico del suelo (Gerdemann, 1975; Ellis *et al.*, 1985; Safir y Nelsen 1981; Augé *et al.*, 1987; Barea, 1991). Al parecer existe un efecto de las micorrizas en la morfología de la raíz (ramificación radicular, número de meristemas apicales) y anatomía de ésta (lignificación) (Gerdemann, 1975; Marschner, 1995). Ahora bien, este cambio en el balance hídrico de la planta micorrizadas, puede también, ser consecuencia hormonal y de cambios estructurales en la planta hospedadora (Marschner, 1995).

De acuerdo con Cooper, (1984) se puede afirmar que las micorrizas inducen una disminución de la resistencia al transporte de agua en las plantas, es decir, existe un aumento de la conductividad hídrica bajo condiciones de deficiencia de fosfato. Tales efectos pueden estar asociados con cambios en otros parámetros inducidos por las micorrizas, como el mantenimiento de un potencial de agua más elevado en la planta, unos ritmos de transpiración superiores, resistencia estomática más baja, etc. (Gianinazzi-Person y Azcón-Aguilar, 1991). Sin embargo, la adición de P produce efectos similares a las micorrizas, lo que sugiere que los efectos pueden deberse simplemente al mejor estado nutricional de las plantas inducido por la simbiosis (Gianinazzi-Person y Azcón-Aguilar, 1991). Por otra parte, se ha probado que en plantas de no leñosas (micorrizadas y no micorrizadas) con similares estatus nutricional, se producen diferencias en el comportamiento al estrés hídrico (Augé y Stodola, 1990). Al respecto Hardie y Leyton (1981), muestran que la conductividad hídrica y los flujos de agua en raíces de herbáceas son superiores en plantas micorrizadas que en controles a los que se les adicionó fosfatos.

Un aspecto clave en los efectos de las MVA en suelos con bajo potencial de agua en el suelo, es aquel basado en la capacidad de las hifas externas del hongo para captar agua más lejos de la zona de deficiencia que normalmente rodea la raíz en condiciones de sequía. De esta forma las hifas sobrepasarían ese vacío hídrico y conectarían a la planta con el suelo menos deficitario en agua. No obstante, los flujos de entrada de agua a las hifas se han calculado que no sobrepasan los $2,8 \times 10^{-5}$ mg/seg (Allen, 1982), lo que al parecer no justificaría un efecto directo de las micorrizas en la captación de agua (Gianinazzi-Person y Azcón-Aguilar, 1991). Faber *et al.* (1991), han observado transporte de agua en las hifas extrarradicales de MVA, sin embargo, el pequeño diámetro de las hifas (aproximadamente de 2 a 14 micrómetros) requeriría una alta masa de flujo de agua (impracticable) hacia la raíz para hacer una contribución sustancial para satisfacer la transpiración de la planta hospedadora (Marschner, 1995). Tales masas de flujo no sólo serían impracticable, sino que serían incompatibles con la necesidad en el transporte bidireccional que se observan en las hifas.

5.3. Situación de estrés por exceso de salinidad

Es conocido que un exceso de sales solubles en los suelos es un problema, especialmente si se une a estas condiciones de aridez y semiaridez. La consecuencia principal de las plantas que crecen en este tipo de ambiente, es la presencia de síntomas de toxicidad específicos, deficiencias y desbalances nutricionales causando a la vez, dificultades en la captación de agua (Barea, 1991; Gianinazzi-Person y Azcón-Aguilar, 1991). El exceso de Cl por ejemplo disminuye la capacidad de la planta para captar el NO_3 y PO_4 ; un exceso de Na^+ provoca desbalances en la asimilación de Ca^{2+} y Mg^{2+} , lo cual se traduce en una disminución de las tasas de fotosíntesis (Plaut y Grieve, 1988).

Debido a las consecuencias que tiene una elevada salinidad sobre la captación de nutrientes, actividad fotosintética y balance hídrico del vegetal, es importante considerar el posible papel de las micorrizas vesículo arbusculares en este contexto (Gianinazzi-Person y Azcón-Aguilar, 1991). De acuerdo con Hirrel y Gerdemann (1980) y Safir (1994), las micorrizas incrementan la tolerancia de la planta a la salinidad. Esto podría ser explicado en parte al incrementar las plantas micorrizadas la concentración de K^+ , (Allen y Cunningham, 1983). En este tipo de plantas se encuentra una relación de K^+ / Na^+ más alta que las plantas no micorrizadas, lo que resultaría en una protección frente a este tipo de estrés (Gianinazzi-Person y Azcón-Aguilar, 1991).

5.4. Mayor resistencia a concentraciones de metales pesados

La contaminación de metales pesados, lluvias ácidas y biocidas, puede causar problemas de estrés en el ecosistema planta suelo (Barea, 1991). De acuerdo con Gildon y Tinker (1981, 1983), altas concentraciones de metales pesados (Zn, Cu, Ni, y Cd) en el suelo puede reducir o inhibir completamente la colonización micorrícica de las raíces de las plantas. Sin embargo, las micorrizas vesículo arbusculares pueden desarrollar razas capaces de adaptarse a este tipo de ambiente (Mosse *et al.*, 1981; Abbott y Robson, 1991; Sylvia y Williams, 1992). Existe poca evidencia sobre los mecanismos involucrados en la tolerancia de las plantas a este tipo de ambiente. Al respecto Arines *et al.* (1989) y Linderman (1994), sostienen que los materiales tóxicos son excluidos selectivamente o son modificados de alguna manera para impedir el efecto tóxico sobre el crecimiento de las plantas. Recientemente, Pereira y Herrera (1997) han señalado la resistencia a altas dosis de Cu que le proporcionan las micorrizas a plantas de *Eucalyptus*.

De acuerdo con Killham y Firestone (1983), las micorrizas vesículo arbusculares pueden mejorar la toma de elementos tales como el zinc. Esto teóricamente podría suponer que las MVA aumentarían la toxicidad para la planta hospedadora. Sin embargo, la alta efectividad de las MVA en la adquisición y entrega del zinc para la planta se produce en suelos deficitarios de este elemento (Faber *et al.*, 1990; Kothari *et al.*, 1990). Por el contrario, cuando ésta crece en sitios con un alto suministro externo de zinc las MVA inducen bajas concentraciones de este metal en la parte aérea de la

planta, observándose además beneficios en el crecimiento de la planta hospedadora (Gildon y Tinker, 1983; Dueck *et al.*, 1986; Hetrick *et al.*, 1994).

En cuanto a los incrementos en la tolerancia del cobre en plantas inoculadas con MVA es probable que ésta se relacione con una alta retención del Cu en el micelio externo de las raíces de la planta hospedadora (Li *et al.*, 1991).

5.5. Mejora de condición sanitaria

El ataque de organismos patógenos a las plantas puede también ser considerado como una situación de estrés para el desarrollo de éstas. Numerosos estudios han puesto de manifiesto que las micorrizas vesículo arbusculares pueden disminuir la severidad de enfermedades causadas por hongos patógenos, bacterias y nemátodos en las raíces de las plantas (Trappe y Fogel, 1977; Ocampo, 1980c; García-Garrido y Ocampo, 1988; García-Garrido y Ocampo, 1989; Gunjal y Paril, 1992; St-Arnaud *et al.*, 1997). Ello puede ser ejercido mediante distintos mecanismos: a) Balance nutricional: la planta micorrizada al incrementar la absorción de nutrientes se encuentra en mejor situación fisiológica para hacer frente al ataque de organismos patógenos (Graharn y Menge, 1982; Graham y Egel, 1988). b) Protección radicular: Cuando se produce una buena colonización de la planta hospedadora, la micorriza puede actuar directamente protegiendo el sistema radicular. Al respecto Ocampo (1980c) y García-Garrido y Ocampo (1988b), afirman que las MVA están en una posición ecológica única, pues se encuentran tanto dentro de la raíz como fuera de ella. Por lo tanto pueden reforzar las defensas naturales de la raíz frente a la invasión de organismos patógenos compitiendo con ellos para ocupar el nicho ecológico que representa la raíz de la planta hospedadora. Los posibles mecanismos implicados son la competición por sitios de colonización, disminución de azúcares en la raíz, incremento de actividades enzimáticas oxidativas, así como la producción de metabolitos secundarios tales como lignina, fenoles, fitoalexinas, etileno, etc. (Ocampo, 1993).

Algunos de los anteriores mecanismos, o combinaciones de ellos, pueden estar implicado en la disminución de enfermedades radicales en las plantas micorrizadas. Los efectos de las micorrizas sobre otros grupos microbianos varían según las especies del micosimbionte. Las hifas extrarradicales de hongos endomicorrícicos exudan compuestos orgánicos que son sustratos para bacterias y otros microbios del suelo. Estas asociaciones microbios-hifas producen frecuentemente materiales gomosos que cambian la estructura del mismo por formación de pequeños agregados, afectando a la aireación, percolación y estabilidad del suelo. La formación de micorriza en cierto grado altera la presión selectiva de las poblaciones de microorganismos del suelo, algunos de los cuales pueden ser antagonistas de patógenos de las raíces. Harley y Smith (1983) describen diferentes ejemplos, en los que hongos micorrícicos o asociaciones micorrícicas pueden jugar un importante papel en la reducción de problemas patológicos radiculares.

Gran parte de los trabajos en micorrizas arbusculares se han centrado en el estudio sobre la interacción entre la micorriza y nematodos, hongos y virus fitopató-

genos, también se ha estudiado la interacción entre hongos endomicorrícicos y bacterias beneficiosas para la planta como *Rhizobium* cuya colonización de las raíces se ve favorecida por la colonización de estos hongos (Salamanca, 1991), sin embargo hay pocos trabajos sobre la interacción entre bacterias fitopatógenas y micorrizas (Bagyaraj, 1984; García-Garrido y Ocampo, 1987).

5.6. Cambios morfológicos y fisiológicos en las raíces y tejidos radicales

Las micorrizas son el resultado de la interacción de ambos simbios, en el caso de las ectomicorrizas la sincronización entre el crecimiento radical y la diferenciación fúngica dan como resultado, en muchos casos, una modificación del sistema de ramificación radicular. Este nuevo patrón de desarrollo, consiste en raíces con un crecimiento restringido (raíces cortas) que tienen la característica de estar micorrizadas y que están dispuestas sobre raíces de mayor envergadura tanto en grosor como en longitud. El crecimiento más lento de parte de las raíces al parecer estaría determinado por la dificultad que tiene el hongo de colonizar tejidos en rápido crecimiento (Brundrett *et al.*, 1996).

Un caso particular sucede con diversas especies del género *Pinus*, en el que las raíces no solamente sufren el anterior comportamiento, sino que tienen un crecimiento dicotómico típico, con ramificaciones apicales perpendiculares al eje principal de la raíz.

Otra estructura muy conocida en las ectomicorrizas es la denominada red de Hartig, que está constituida por un entramado de hifas que rodean el córtex radical permitiendo una enorme superficie de contacto entre ambos simbios (Harley y Smith, 1983).

6. Técnicas de estudios de micorrizas

Diversos parámetros pueden ser evaluados con objeto de aproximarse al entendimiento de este tema. Brundrett *et al.* (1996), entre ellos destaca la medición del peso fresco o seco de las raíces (g/planta); longitud radicular (m/planta); densidad de raíz (m de raíz/l de suelo); largo específico de raíz (m de raíz/g de raíz); órdenes de ramificaciones y frecuencia de ramificaciones laterales; longitud de pelos radicales (mm); frecuencia de pelos radicales (número de pelos radicales/mm de raíz); tasas de crecimiento (mm/día); fenología (cambios de actividad estacionales); periodos de vida (semanas, años); longitud total de raíces micorrizadas (m/planta; m/l de suelo); proporción de raíces micorrizadas (%); biomasa micorrizadas (% de biomasa radicular; mg/kg de suelo); contenido de nutrientes.

6.1. Toma de muestras de raíces micorrizadas

Las raíces a ser analizadas pueden tener diferentes procedencias siendo las más frecuentes de vivero o directamente del campo. En general se considera más ade-

cuado tomar muestras compuestas por una serie de pequeñas submuestras de diferentes sectores, más que a tomar una gran cantidad de un solo lugar. En primer lugar se debe realizar una cuidadosa separación del suelo de las raíces, con objeto de minimizar la pérdida de raíces secundarias. En algunos casos esta tarea es de fácil ejecución como sucede en suelos arenosos, no obstante en suelos arcillosos se debe extremar el procedimiento. La pérdida de raíces finas constituirá una fuente de reducción en la fiabilidad de la posterior evaluación.

6.1.1. Limpieza de raíces

Los procedimientos de limpieza deberán ajustarse a los parámetros que se desean evaluar y la importancia relativa que tendrá mantener más o menos intacto la raíz. En general el procedimiento de lavado de raíces, que se describe a continuación debería ser suficiente.

- Inmersión de los sistemas radicales intactos en un vaso de precipitado o cubo con agua, de acuerdo al volumen de la muestra. Se deberá agitar suavemente con objeto de conseguir la separación del suelo de las raíces.
- Si se necesitan algunas muestras con un mayor grado de limpieza, las raíces libres de partes gruesas de suelo, depositadas sobre un tamiz adecuado pueden ser lavadas con cierta presión de agua.
- En el caso de plantas con raíces laterales finas, que pueden darse en las especies portadoras de ectomicorrizas, se debe prestar una atención particular para evitar su deterioro. Se recomienda lavar cuidadosamente estas raíces sobre un fino tamiz, para evitar las pérdidas de raíces finas que en muchos casos tienen parte importantes estructuras micorrícicas.
- Después de haber eliminado el suelo de las raíces, estas muestras limpias pueden ser mantenidas, por varios días si fuese necesario, en condiciones de humedad dentro de bolsa plásticas a baja temperatura (4 – 5°C). Si se desean conservar se pueden mantener preservadas por meses en viales adecuados en una solución de etanol al 50%.

6.1.2. Extracción de raíces del suelo

En muchos casos los estudios de micorrizas se realizan en condiciones controladas, ya sea invernaderos o cámaras de cultivos, para evitar o reducir los riesgos de contaminación con otros microorganismos. Sin embargo en otros casos, se usan muestras que proceden de plantas cultivadas en campo, de plantaciones forestales o de ecosistemas naturales. En estos casos los aspectos de mayor importancia son poder coleccionar material radicular que sea lo suficientemente joven para tener micorrizas y por otra parte que no esté contaminado por raíces de otras plantas.

Dentro del protocolo de actuación en la toma de muestras de raíces de Brundrett et al. (1996) se destacan las siguientes etapas.

- Se debe realizar una excavación con especial cuidado de que no se pierdan las raíces finas de la especie de interés. Asimismo, se deben eliminar los sistemas radicales de otras especies que estén en la muestra de suelo. Frecuentemente al tomar muestras de arbustos o árboles se deben realizar exploraciones del suelo de cierta profundidad para conseguir raíces finas.
- Se deberían tomar muestras de diferentes individuos de la misma especie con objeto de apreciar posibles diferenciaciones entre grados de colonizaciones micorrícicas. Si es posible, incluso sería diferenciar las muestras si se han tomado de habitats diferentes.
- Se debe realizar una adecuada determinación de la especie analizada, incluso señalando que tipo de referencia para determinar la especie se utilizó.
- Se recomienda realizar tomas de muestra a lo largo de diferentes estaciones del año. Se han observado fluctuaciones en la presencia de determinadas estructuras de las micorrizas a lo largo del año.

6.2. Aclarado y tinción de las raíces micorrizadas

En muchos casos algunas de las estructuras de las micorrizas pueden ser observadas directamente con las muestras en condiciones naturales. Esto sucede con las estructuras externas de las ectomicorrizas, no sucede lo mismo con las estructuras micorrícicas internas que se dan tanto en las micorrizas arbusculares como en las ectomicorrizas. Se han probado diferentes métodos de aclarado de raíces, que tienen como objetivo la eliminación de contenidos celulares y de pigmentos de la pared celular de la planta, por medio de agentes químicos. Después de realizada esta actividad es posible a través de la aplicación de una tinción diferencial apreciar las diferentes estructuras tanto fúngicas, de la planta como simbióticas.

6.2.1. Aclarado de las raíces micorrizadas

Las raíces que van a ser aclaradas deben estar libres de suelo por lo que deben de haber pasado la etapa de lavado. Se debe tener en consideración que la solución de aclarado, normalmente una solución de KOH, debe estar en un volumen tal que sea suficiente para que las raíces estén sumergidas. Las raíces no deberían estar formando una trama espesa en la solución de aclarado. También para facilitar la tarea en muchos casos las raíces antes de ser aclaradas son cortadas en secciones que normalmente van de 2 a 5 cm. Se debe tener especial atención al uso del KOH por su efecto cáustico en contacto con la piel.

En resumen, las fases del aclarado son las siguientes a pesar de que frecuentemente se deben realizar pequeñas modificaciones, especialmente respecto a tiempos de aplicación del tratamiento, de acuerdo a las especies involucradas.

- Se sumergen las raíces cortadas, libres de suelo dentro de un tubo de ensayo, o cualquier otro tipo de contenedor que resista alta temperatura. Las raíces se cubren con una solución de KOH al 10%. Normalmente las masas de raíces que se decoloran en forma eficiente no pasan de 1 a 2 g. Si se dispone de mayor material se debería utilizar un segundo contenedor. Es fundamental que cada muestra este perfectamente identificada para evitar posibles confusiones en las etapas siguientes.
- Las muestras se someten a ebullición en baño maría. Los tiempos de permanencia normalmente son entre 60 a 90 minutos, dependiendo esto de la lignificación del material. Como una alternativa al baño maría se ha utilizado con buenos resultados autoclaves en los que se dejan las muestras entre 15 a 20 minutos a 121° C.
- En algunas especies a pesar del tratamiento con KOH pueden permanecer algunos pigmentos fenólicos. En estos casos se realiza un segundo aclarado. Una vez que a las muestras se les ha sometido a un lavado con agua para eliminar los restos de KOH, se les aplica agua oxigenada (H_2O_2). El H_2O_2 utilizada tiene una concentración al 10% (v/v). Normalmente una aplicación de H_2O_2 , a baño maría por 30 minutos es suficiente en la mayoría de las especies. Después de este tiempo las raíces son lavadas en agua y están en condiciones de ser teñidas.

6.2.2. Tinción de las raíces micorrizadas

Existen diversas tinciones diferenciales utilizadas en el estudio de las micorrizas. Se describirá una de ellas, que ha sufrido algunas modificaciones, dada la toxicidad de algunos de los componentes iniciales: La tinción descrita corresponde a la utilización de Azul Tripán modificada de Phillips y Hayman (1970). En este caso, al igual que en el anterior se deberá disponer de tubos de ensayos o de recipientes de vidrio resistentes a altas temperaturas.

- Las raíces que proceden del aclarado y que han sido lavadas en agua se sumergen en una solución de HCl (0,1N), a temperatura ambiente, por 3 a 5 minutos. En algunos casos este tiempo puede ser de hasta 7 minutos si la muestra está muy lignificada.
- Después de este tiempo, se elimina el HCl, sin enjuagar las raíces.
- A las raíces, que no se han enjuagado, se les aplica una solución de Azul Tripán (0,05% diluido en Acido láctico), en suficiente cantidad para que cubra

a las muestras. Estas muestras se llevan a ebullición, en condiciones de baño maría, durante 10 minutos, a pesar de que el tiempo final recomendado para cada caso estará en relación directa con la especie involucrada.

- Una vez teñidas las raíces estas pueden observarse al microscopio, pudiendo mantenerse en buenas condiciones en ácido láctico.

6.3. Evaluación de las colonizaciones micorrícicas

Frecuentemente es necesario evaluar los niveles de colonización de micorrícica, tareas que se realizan, a nivel microscópico después de haber aclarado y teñido las raíces. Conforme a las características diferenciales de las micorrizas arbusculares y ectomicorrizas se describirán brevemente sistemas de evaluación para cada uno de estos dos casos.

6.3.1. Evaluación de las micorrícicas arbusculares

- Normalmente una de las primeras mediciones que se llevan a cabo está basado el método descrito por Giovannetti y Mosse (1980). En este método se lleva a cabo la evaluación sobre una placa de Petri, provista en su base de un sistema de cuadrículas. Las raíces se colocan en la cuadrícula y se cuentan las intersecciones establecidas entre las raíces y los ejes de las cuadrículas.
- La proporción de raíces micorrizadas respecto a las no colonizadas se puede establecer comparando el número de intersecciones en uno y otro caso. Para establecer la longitud de raíz, debe aplicarse un factor de corrección derivado de la longitud total de las cuadrículas y la superficie de la placa.
- Los autores del método recomiendan que se realicen varias mediciones de cada una de más muestras para obtener un dato medio representativo.
- También se ha sugerido la utilización de tramos de colonización, que pueden estar representados por diferentes niveles de porcentajes de colonización. No obstante este sistema está sujeto a fuertes niveles de subjetividad.

6.3.2. Evaluación de las ectomicorrizas

En este tipo de asociación diversas características micorrícicas pueden observarse sin necesidad de tinción. Entre estas el color, textura, grosor, ramificaciones pueden diferenciar una raíz micorrizada de otra que no lo esté. No obstante estructuras internas no son posibles de observar a no ser de una tinción especial, este es el caso de la Red de Hartig.

Entre las evaluaciones que se pueden llevar a cabo se encuentran las siguientes:

- Evaluación de longitud de raíz micorrizada y no micorrizada. En este caso se puede usar el método de la gradilla antes indicado o simplemente midiendo la raíz asociando a esta medida el número de zonas micorrizadas presentes.
- En algunas especies como puede suceder en las del género *Pinus*, en donde hay grandes variaciones en la producción de ramificaciones radiculares, es necesario aplicar algún factor de corrección como el índice de densidad de ramificación.
- Las raíces de ectomicorrizas frecuentemente se evalúan contando los ápices radiculares modificados. Este valor se expresa normalmente por longitud de raíz o por volumen de suelo.

7. ESTUDIO DE MICORRIZAS EN ALGUNAS ESPECIES DE INTERÉS PARA REFORESTACIÓN DE TIERRAS AGRARIAS

Se ha iniciado en el Departamento de Ingeniería Rural, de la Universidad de Córdoba, una serie de estudios con objeto de poner a punto la tecnología de micorrizas para especies de interés en la repoblación de tierras agrarias en Andalucía.

Con este objeto se han tomado plantas de distintos viveros forestales de Andalucía y se ha tratado de evaluar la condición micorrícica. Las plantas se mantuvieron en las mismas condiciones de producción que tenían en el vivero hasta el momento de la preparación para su análisis.

Dentro de las frondosas se analizó tanto ejemplares de encina como de alcornoque. Sobre estas plantas no es de gran utilidad la utilización de aclarado y posterior tinción, por que se sometió a un análisis de superficie. Estas especies forman ectomicorrizas y se analizaron del siguiente modo.

El cepellón completo de las plantas se colocó bajo un esteromicroscopio para observar el desarrollo del micelio en las raíces y otras estructuras micorrícicas como las características alteraciones morfológicas que presentan las raíces infectadas o la ausencia de pelos radiculares absorbentes. Se tuvo especial cuidado de estudiar la totalidad del cepellón. Las observaciones se evaluaron mediante un sistema de puntuación con el que, aunque de manera subjetiva, obtener un porcentaje de micorrización.

En un principio se dividieron las categorías de uno a cinco, de menor a mayor grado de desarrollo de la colonización, pero a medida que avanzaba el estudio se ha creído tal vez de mayor operatividad, dividir la clasificación sólo en tres niveles, de esta forma a pesar de tener una menor desagregación de efectos de la micorrización, la transmisión de la tecnología podría ser de mayor facilidad para el viverista.

A continuación se describen algunas variaciones a los métodos de aclarado y tinción

- Las raíces de acebuche y las raíces gruesas de algarrobo se mantuvieron al baño maría en KOH durante una hora y media, las raíces finas de algarrobo sólo durante una hora.
- Las raíces de algarrobo se sumergen en H_2O_2 al 10% durante 30 minutos al baño maría.
- Se añade HCl 0,1 N durante 7 minutos a temperatura ambiente en ambas especies.

La cuantificación del grado de infección en ambas especies se llevó a cabo por medio del método no sistemático del portaobjeto y del método sistemático del transecto lineal que se describen a continuación:

En el Método del portaobjeto, se seleccionan al azar segmentos de raíces de la muestra ya teñida y se disponen en grupos de a 10 sobre un portaobjetos para ser observados en el microscopio. No se utilizaron menos de 30 segmentos de raíces para cada muestra. En estos casos los que se evalúa es presencia o ausencia de colonización.

El método del transecto lineal de las cuadrículas, se aplica de parecida forma a como se ha descrito anteriormente, no obstante en este caso la información es fundamental para poder evaluar objetivamente la colonización en las micorrizas arbusculares. Esta es la razón por la que aparece, este método, como un elemento imprescindible en el análisis de la MA.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS DE LAS MICORRIZAS

La asociación micorrícica ha sido ampliamente estudiada en las últimas décadas. Sin embargo a pesar de ser una asociación conocida desde hace más de cien años y de las investigaciones realizadas, todavía tiene una serie de aspectos no bien desarrollados. Uno de estos aspectos es la transferencia de los resultados de las investigaciones hacia la aplicación en el campo. Se están dando pasos en esa dirección aunque todavía se debe avanzar más. Las micorrizas no son la solución a los problemas de la forestación, sin embargo pueden contribuir en muchos casos a optimizar los resultados de ambiciosos programas forestación que son frecuentemente de alto coste por los grandes espacios que ocupan y por dilatados periodos de tiempo que emplean.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBOTT, L. K. & A. D. ROBSON. 1985. The effect of soil pH on the formation of VA mycorrhizas by two species of *Glomus*. Aust. J. Soil Res. **23**: 253-261.
2. ALEXANDER, I.; N. AHMAD & L.S. SEE. 1992. The role of mycorrhizas in the regeneration of some Malasyan forest trees. Phil. Trans. R. Soc. Lond. **335**: 379-388.
3. ALLEN, E. B. & G. L. CUNNINGHAM. 1983. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizae on *Distichlis specata* under tree salinity levels. New Phytol. **97**: 269-276.
4. ALLEN, E. B. 1989. The restoration of disturbed arid landscapes with special reference to mycorrhizal fungi. J. Arid Environ. **17**: 279-286.
5. ALLEN, M. F. 1982. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae on water movement through *Bouteloua gracilis* (H.B.K) Lag ex Steud. New Phytol. **91**: 191-196.
6. ALLEN, M. F. 1991. The ecology of mycorrhizae. Cambridge University Press. Cambridge. 184 pp.
7. AMES, R.N.; C.P.P. REID; L.K. PORTER; & C. CAMBARDELLA. 1983. Hyphal uptake and transport of nitrogen from two ¹⁵N-labelled sources by *Glomus mosseae*, a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus New Phytologist. **95**: 381-396.
8. AMIJEE, F.; P. B. TINKER & D. P. STRIBLEY. 1989. The development of endomycorrhizal root system. New Phytol. **111**: 435-446.
9. ARINES, J.; A. VILARIÑO & M. SAINZ. 1989. Effect of different inocula of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on manganese content and concentration in red clover (*Trifolium pratense* L) plants. New Phytol. **112**: 215-219.
10. AUGÉ R. M.; K. A. SCHEKEL & R. L. WAMPLE. 1987. Leaf water and carbohydrate status of VA mycorrhizal rose exposed to drought stress. Plant Soil. **99**: 291-302.
11. AUGÉ, R. M. & A. J. STODOLA, 1990. An apparent increase in symplastic water contributes to greater turgor in mycorrhizal roots of droughted *Rosa* plants. New Phytol. **115**: 285-295.
12. AZCÓN-AGUILAR, C. & J. M. BAREA. 1980. Micorrizas. Investigación y Ciencia. **47**: 8-16.
13. BAGYARAJ, D. J. 1989. Mycorrhizas. En: Tropical rain forest ecosystems. Biogeographical and ecological studies. Ed: H. Lieth y M. J. A. Werger. Elsevier. Nueva York. pp: 537-546.
14. BAKER, K. F & R. J. COOK. 1974. Biological control of plant pathogens. Freeman. San Francisco. 433 pp.
15. BAREA, J. M. 1991. Vesicular-Arbuscular mycorrhizae as modifiers of soil fertility. Advances in Soil Science. **15**: 1-40.
16. BARRENO, E. 1991. Conferencia inaugural. Seminario de la Universidad Internacional Menéndez Pelayo. "Biotecnología forestal: Micorrizas, bosques, erosión y agricultura". Valencia. pp: 1-7.
17. BORGES, L. V. 1982. Solarizacilón do solo novo metodo de pasteurizacao do solo. Rev. Cienc. Agrar. **5**: 1-15.
18. BOWEN, G. D. 1981. Fungus and epidemiological factors in the mycorrhizal response. En: FAO/IAEA Consult. Met. Use Isotopes Stud. Nutrient Availability Food Crops Endomycorrhizas. Viena. pp. 85-102.

19. BRUNDRETT, M; N. BOUGHER; T. GROVE & N. MALAJCZUK. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ACIAR. Canberra. 374 pp.
20. CALLOW, J. A; L. C. CAPACCIO; G. PARISH & P. B. TINKER, 1978. Detection and estimation of polyphosphate in vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytol.* **80**: 125-134.
21. CHAPIN, F. S. 1980. The mineral nutrition of wild plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **11**: 33-260.
22. COOPER, K. M. 1984. Physiology of VA mycorrhizal association. En: Powell C.L. y Bagyaraj, D.J. Ed.: VA mycorrhiza. CRC Press. Boca Ratón. Florida. pp: 155-186.
23. COX, G. & F. E. SANDERS. 1974. Ultrastructural of the host-fungal interface in a vesicular arbuscular mycorrhiza. *New Phytol.* **73**: 901-902.
24. CRUSH, J.R. 1976. Endomycorrhizas and legumen growth in some soils of the Mackenzie Basin, Canterbury, New Zealand. *Agric. Res.* **19**. 473-476.
25. DAFT, M. J. & T. H. NICOLSON. 1974 Arbuscular mycorrhizas in plants colonizing coal wastes in Scotland. *New Phytol.* **73**:1129-1138.
26. DANIEL, P. W.; J. W. HELMS & F. S. BACKER. 1985. Principios de silvicultura. McGraw-Hill. México. 492 pp.
27. DIGHTON, J. & P. A. MASON. 1985. Mycorrhizal dynamic during forest tree development. En: Developmental biology of higher fungi. Ed.: D. Moore, L. A. Cas-selten, D. A. Wood and J. C. Frankland. Cambridge University Press. Cambridge. pp: 117-139.
28. DUECK, T. A.; P. VISSER; W. H. ERNST & H. SCHURST. 1986. Vesicular mycorrhizae decrease Zn-toxicity to grasses growing in Zn polluted soil. *Soil Bio. Biochem.* **18**: 331-333.
29. ELLIS J. R.; H.J. LARSEN & M. G. BOOSALIS. 1985. Drought resistance of wheat plants inoculated with vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Plant Soil.* **86**: 369-378.
30. FABER, B. A; ZASOSKI, R. J. MUNNS, D. N & K. CHACKEL. 1991. A method for measuring hyphal nutrient and water uptake in mycorrhizal plants. *Can. J. Bot.* **69**: 87-94.
31. GARCÍA-GARRIDO, J. M & J. A. OCAMPO. 1988b. Interacción entre *G. mosseae* y *Pseudomonas syringae* en la rizósfera de plantas de tomate. *An. Edafol Agro-biol.* Tomo **XLVII**: 1679-1685.
32. GARCIA-GARRIDO, J. M. & J. A. OCAMPO. 1988a. Interaction between *Glomus mosseae* and *Erwinia carotovora* and its effects on the growth of tomato plants. *New Phytol.* **110**: 551-555.
33. GARCÍA-GARRIDO, J. M & J. A. OCAMPO. 1988b. Interacción entre *G. mosseae* y *Pseudomonas syringae* en la rizósfera de plantas de tomate. *An. Edafol Agro-biol.* Tomo **XLVII**: 1679-1685.
34. GARCIA-GARRIDO, J. M. & OCAMPO, J. A. 1989. Effect of VA mycorrhizal infection of tomato on damage caused by *Pseudomonas syringae*. *Soil Biol. Biochem.* **21**:165-167.
35. GARDNER, I. C. 1986. Mycorrhizae of actinorrhizal plants. *MIRCEN Journal.* **2**: 147-160.
36. GERDEMANN, J. W. 1968. Vesículo arbuscular mycorrhiza and plant growth. *Ann. Rev. Phytopathol.* **6**: 397-418.

37. GIANINAZZI-PEARSON, V. & S. GIANINAZZI. 1986. The physiology of improved phosphate nutrition in mycorrhizal plants. En: *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*. Ed.: V. Gianinazzi-Pearson, S. Gianinazzi. INRA Paris. pp: 101-109.
38. GIANINAZZI-PERSON, V. & C. AZCÓN-AGUILAR. 1991. Fisiología de las micorrizas vesículo-arbusculares. In: Olivares, J. & Barea, J. M: *Fijación y movilización biológica de nutrientes*. C.S.I.C. **II**: 175-201.
39. GILDON, A. & P. B. TINKER. 1981. A heavy metal tolerant strain of mycorrhizal fungus. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **77**: 648-649.
40. GILDON, A. & P. B. TINKER. 1983. Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants: I. The effects of heavy metals on the development of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytol.* **95**: 247-261.
41. GILDON, A. & P. B. TINKER. 1983. Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants: I. The effects of heavy metals on the development of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytol.* **95**: 247-261.
42. GIOVANNETTI, M & B. MOSSE. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in roots. *New Phytol.* **84**: 489-500.
43. GRAHAM, J. M & J. A. MENGE. 1982. Influence of vesicular arbuscular mycorrhizae and soil phosphorus on tane-all disease of wheat. *Phytopathology.* **72**: 95-101.
44. GRAHAM, J. M & D. S. EGEL. 1988. Phytophthora root rot development on mycorrhizal and phosphorus-fertilized nonmycorrhizal sweet orange seedlings. *Plant Dis.* **72**: 611-616.
45. GRAY, L. E. 1971. Physiology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. En: *mycorrhizae*. Ed.: E. HacsKaylo. pp: 145-150.
46. GUNJAL, S. & P. L. PARIL. 1992. Mycorrhizal control of wilt in casuariana. *Agroforestry Today*. April-June issue. 14-15.
47. HACSKAYLO, E. 1967. Mycorrhizae: Indispensable invasions by fungi. *Agricultural science review.* **5**: 13-20.
48. HARDIE, K., & L. LEYTON, 1981. The influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on growth and water relations of red clover. I. In phosphate deficient soil. *New Phytol.* **89**: 599-608.
49. HARLEY, J. L. & SMITH, S.E. 1983. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press. Londres. 483 pp.
50. HARLEY, J. L. 1959. *The Biology of mycorrhiza*. Plant science monographs. Ed.: N. Polunin. Londres. 233 pp.
51. HARLEY, J. L. 1959. *The Biology of mycorrhiza*. Plant science monographs. Ed.: N. Polunin. Londres. 233 pp.
52. HAYMAN, D. S. 1983. The physiology of vesicular-arbuscular endomycorrhizal symbiosis. *Can. J. Bot.* **61**: 944-963.
53. HETRICK, B. A. D; G. W. T. WILSON & D. A. H. FIGGE. 1994. The influence of mycorrhizal symbiosis and fertilizer amendments on establishment of vegetation in heavy metal mine spoil. *Environ. Pollut.* **86**: 171-179.
54. HIRREL, M. C., & J. W. GERDEMANN. 1980. Improved growth of onion and bell pepper in saline soils by two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Proc. Soil Sci. Soc. Am.* **44**: 654-655.

55. HONRUBIA, M., G. DÍAZ & A. GUTIERREZ. 1997. Micorrización controlada de *Pinus halepensis* en vivero en función del tipo de inóculo y técnicas de cultivo. I Congreso Forestal Hispano Luso. Tomo III: 301-306.
56. HONRUBIA, M.; P. TORRES; G. DÍAZ & A. CANO. 1992. Manual para micorrizar plantas en viveros forestales. Ministerio de Agricultura, pesca y alimentación. ICONA. Madrid. 47 pp.
57. JANOS, D. P. 1980a. Mycorrhizae influence tropical succession. *Biotropica*. **12**: 56-64.
58. JASPER D. A; L. K. ABBOTT & A. D. ROBSON. 1989. Hyphae of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus maintain infectivity in dry soil, except when the soil is disturbed. *New Phytol.* **112**: 101-107.
59. KILLHAM, K & FIRESTONE. 1983. Vesicular-arbuscular mycorrhizal mediation of grass response to acid and heavy metal deposition. *Plant Soil*. **72**: 39-48.
60. KOTHARI, S. K; H. MARSCHNER & V. ROMHELD. 1990. Direct and indirect effects of VA mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms on acquisition of mineral nutrients by maize (*Zea mays* L.) in a calcareous soil. *New Phytol.* **116**: 637-645.
61. LI, X. L.; H. MARSCHNER & E. GEORGE. 1991. Acquisition of phosphorus and copper by VA-mycorrhizal hyphae and root-to-shoot transport in white clover. *Plant Soil*. **136**: 49-57.
62. LINDERMAN, R. G. 1994. Role of VAM fungi in biocontrol. En: *Mycorrhizae and Plant Health*. Ed.: L. Pflieger y R. G. Linderman. APS Press. Minnesota. pp: 2-25.
63. MARSCHNER, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Second edition. Academic Press. Londres. 889 pp.
64. MARX, D. H. 1971. Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infections. En: *Mycorrhizae*. Ed.: E. HacsKaylo. Washington. 255 pp.
65. Mc GONIGLE, T. P. & A. H. FITTER. 1988 Ecological consequences of arthropod grazing on VA mycorrhizal fungi. *Procced. of the Royal Society of Edinburgh*. **94B**: 25-32.
66. MENGE, J. A. 1982. Effect of soil fumigants and fungicides on vesicular-arbuscular fungi. *Phytopathology*. **72**: 1125-1132.
67. MILLER, C. O. 1971. Cytokinin production by micorrhizal fungi. En: *Mycorrhizae*. Ed.: E. HacsKaylo. Washington. pp: 168-174.
68. MOLINA, R; H. MASSICOTTE & J. TRAPPE. 1991. Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses community-ecological consequences and practical implications. En: *Mycorrhizal Functioning: an Integrative Plant Fungal Process*. Ed.: M. Allen. Chapman & Hall.
69. MOLINA, R; H. MASSICOTTE & J. TRAPPE. 1991. Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses community-ecological consequences and practical implications. En: *Mycorrhizal Functioning: an Integrative Plant Fungal Process*. Ed.: M. Allen. Chapman & Hall.
70. MORTON, J.B. & G.L. BENNY. 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order Glomales, two new suborders, Glomiales and Gigasporinae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae. With an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon* **37**: 471-491.

71. MOSSE, B. 1973. Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Annu. Rev. Phytopathology* **11**: 171-195.
72. MOSSE, B. 1986. Mycorrhiza in a sustainable agriculture. *Biol. Agric. Hortic.* **3**: 191-209.
73. OCAMPO, J. A. & D. S. HAYMAN. 1981. Influence of plant interactions on vesicular-arbuscular mycorrhizal infection. II. Crop rotations and residual effects of non-host plants. *New Phytol.* **87**: 333-343.
74. OCAMPO, J. A. 1980a. Micorrizas VA. I. Características generales. *Anales de edafología y agrobiología*. Tomo **XXXIX**: 351-365.
75. OCAMPO, J. A. 1980b. Micorrizas VA. II. Efecto sobre el crecimiento de las plantas. *Anales de edafología y agrobiología*. Tomo **XXXIX**: 1049-1069.
76. OCAMPO, J. A. 1980c. Micorrizas VA. III. Ecología. *Anales de edafología y agrobiología*. Tomo **XXXIX**: 1071-1078.
77. OCAMPO, J. A. 1993. Influence of pesticides on VA mycorrhizae. En: *Pesticides interactions in crop production. Beneficial and deleterious effects*. Ed.: Jack Altman. *Plant Pathology and Weed Science*. Colorado. pp: 214-222.
78. PEREIRA, G. E. & M. A. HERRERA. 1997. Micorrizas vesículo arbusculares en *Eucalyptus camaldulensis*: Efecto en el crecimiento de plántulas. I Congreso Forestal Hispano Luso. Tomo **III**: 509-514.
79. PERRY, D. A.; M. P. AMARANTHUS, J.G. BORCHERS, S.L. BORCHERS & R.E. BRANINERD. 1991. Bootstrapping in Ecosystems: Internal interactions largely determine productivity and stability in biological systems with strong positive feedback. *Bioscience*. **39**: 230-237.
80. PLAUT, Z. & C. M. GRIEVE, 1988. Photosynthesis of salt-stressed maize as influenced by Ca:Na ratios in the nutrient solution. *Plant Soil*. **105**: 283-286.
81. PRITCHETT, W. L. 1991. Suelos forestales. Propiedades, conservación y mejoramiento. Editorial Limusa. México. 634 pp.
82. PRITCHETT, W. L. 1991. Suelos forestales. Propiedades, conservación y mejoramiento. Editorial Limusa. México. 634 pp.
83. RHODES, L. H. & J. W. GERDEMANN. 1975. Phosphate uptake zones of mycorrhizal and nonmycorrhizal onions. *New Phytol.* **75**: 555-561.
84. ROLDÁN-FAJARDO, B. E. & J. M. BAREA. 1987. Micorrizas VA en árboles y arbustos. *Anales de Edafología*. Tomo **XLVI**: 229-246.
85. SAFIR, G. R. & C.E. NELSEN. 1981. Water and nutrient uptake by vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. En *Mycorrhizal associations and crop production*. Eds. R Myers. New Brunswick pp: 25-81.
86. SAFIR, G. R. 1994. Involvement of cropping systems, plant produced compounds and inoculum production in the functioning of VAM Fungi. En: *Mycorrhizae and plant health*. Ed.: F. L Pflieger and R. G. Linderman. APS Press. Minnesota. pp: 239-259.
87. SALAMANCA, C. P. 1991. Estudio sobre las simbiosis microbio-Planta (Micorrizas y Rhizobium-Leguminosas) en la revegetación de suelos en zonas áridas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. 170 pp.
88. SIQUEIRA, J. O.; D. H. HUBBELL A. W. MAHMUD. 1984. Effect of liming on spore germination, germ tube growth and root colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* **76**: 115-124.

89. SKINNER, M.F. & G.D. BOWEN. 1974. The penetration of soil by micelial strands of ectomycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*. **6**: 57-61.
90. SMITH, S. E. 1974. Mycorrhizal fungi. *Crit. Rev. Microbiol.* **3**: 275-313.
91. ST-ARNAUD, M; C. HAMEL; B. VIMARD; M. CARON & J. A. FORTIN. 1997. Inhibition of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* in the non-VAM species *Dianthus carophyllus* by co-culture with *Tagetes patula* companion plants colonized by *Glomus intraradices*. *Can. J. Bot.* **75**: 998-1005.
92. STRIBLEY, D. P & R. C. SNELGROVE, 1985. Physiological changes accompanying mycorrhizal infection in leek. En: *Proceedings of 6th North American Conference on Mycorrhizae*. Ed.: R. Molina. Oregon.
93. SYLVIA, D. M. & S. E. WILLIAMS. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and environmental stress. En: *VA Mycorrhizae in sustainable agriculture*. ED.: G. J. Bethlenfalvay y R.G. Linderman. ASA. Madison, WI. pp: 101-124.
94. TINKER, P. B. 1975. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizas on higher plants. *Sym. Soc. Exp. Biol.* **29**: 325-350.
95. TRAPPE, J. M. & R. D. FOGEL. 1977. Ecosystematic funtions of mycorrhizae. En: *The belowground ecosystem: A synthesis of plant-associated processes*. Ed.: U.S. Department of Agriculture. Colorado. pp: 205-214.
96. TRAPPE, J. M. 1987. Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint. En: *Ecophysiology of VA mycorrhizal plants*. Ed. Safir G.R. CRC Press. Boca Raton. pp: 5-25.
97. VAN NUFFELEN, M & N. C. SCHENCK. 1984. Spore germination, penetration, and root colonization of six species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on soybean. *Can. J. Bot.* **62**: 624-628.
98. VOIGT, G. K. 1971. Mycorrhizae and nutrient mobilization. En: *Mycorrhizae*. Ed.: E. HacsKaylo. Washington. pp: 122-131.
99. ZAJICEK J. M.; B. A. DANIELS HETRICK & M. L. ALBRECHT. 1987. Influence of drought stress and mycorrhizae on growth of two native forbs. *J Am. Soc. Hortic. Sci.* **112**: 454-459.

