

Tesis de Posgrado

Interacción entre hongos saprófitos del suelo y micorrizas vesículo-arbusculares

McAllister, Claudia Beatriz

1992

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

McAllister, Claudia Beatriz. (1992). Interacción entre hongos saprófitos del suelo y micorrizas vesículo-arbusculares. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2507_McAllister.pdf

Cita tipo Chicago:

McAllister, Claudia Beatriz. "Interacción entre hongos saprófitos del suelo y micorrizas vesículo-arbusculares". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1992. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2507_McAllister.pdf

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

INTERACCION ENTRE HONGOS SAPROFITOS DEL SUELO Y MICORRIZAS
VESICULO-ARBUSCULARES

Tesis presentada por la Licenciada
CLAUDIA BEATRIZ Mc ALLISTER
para optar al título de
Doctora en Ciencias Biológicas

Directores: Dra. Alicia M. Godeas
Dr. Juan A. Ocampo

Tesis.
2507
ej. 2.

1992

La presente Tesis Doctoral ha sido subvencionada por CONICET, dentro del proyecto "Acción de los hongos en suelos cultivados y no cultivados de la Pcia. de Buenos Aires", y por la DGICYT dentro del proyecto "Estudios ecofisiológicos sobre los procesos de micorrización y micropropagación y su aplicación conjunta para la producción optimizada de plantas de aguacate y chirimoyo"

Al finalizar esta Tesis Doctoral, quiero agradecer sinceramente a todos los que, a uno y otro lado del Atlántico, han colaborado en la realización del trabajo.

En especial, deseo agradecer a los directores de esta Tesis: a la Dra. Alicia Godeas, por su apoyo desde el principio, y su afecto de siempre, y al Dr. Juan Antonio Ocampo, cuya dedicación y preocupación han hecho, entre otras cosas, que esta Tesis llegara a buen puerto, y en buen tiempo.

A mis compañeras de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, de la U.B.A, por los buenos momentos compartidos y su recuerdo constante.

A mis compañeros de la U.E.I. de Microbiología, y, en general, a los amigos que he encontrado en la Estación Experimental del Zaidín, porque siempre me han hecho sentir en casa.

Al CONICET, por concederme la beca que inició la investigación de esta tesis.

A la Estación Experimental del Zaidín, representada por su Director, Dr. José M. Barea, por facilitarme los medios para concluir este trabajo.

Finalmente, a mis padres y hermanos, y a Tomás, por animarme y ayudarme a seguir.

INDICE

I. INTRODUCCION	Pag.
Hongos de suelo.....	1
Influencia ambiental.....	2
La rizósfera.....	4
Sistema planta-microorganismos.....	6
Micoflora rizosférica.....	7
El equilibrio biológico: interacciones.....	8
Interacciones que promueven el crecimiento	
-Comensalismo.....	9
-Mutualismo o simbiosis.....	10
Relaciones que inhiben el crecimiento	
-Competencia.....	10
-Amensalismo.....	11
-Antibiosis.....	11
-Fungistasis o micostasis.....	11
-Micoparasitismo.....	12
Micorrizas.....	14
Hongos formadores de MVA.....	15
Dinámica de la colonización VA.....	18
Fase de latencia	18
Fase logarítmica de crecimiento.....	19
Fase de estabilización.....	20
Cuantificación de la colonización.....	20
Anatomía y morfología de las MVA.....	22
Morfología de estructuras fúngicas	
extraradicales.....	22
Morfología de estructuras fúngicas	
intraradicales.....	25
-Hifas intracelulares en la	
capa externa de la corteza.....	25
-Hifas intercelulares.....	26
-Arbúsculos.....	27
-Vesículas.....	28
Morfología y función de las interfases	
hongo-hospedante.....	28

Fisiología de la simbiosis VA.....	32
Fisiología del P.....	32
Fisiología del C.....	34
Captación de N y otros nutrientes.....	35
Alteración de las relaciones hídricas y	
Resistencia a la salinidad.....	37
Efectos fisiológicos no nutricionales.....	37
Susceptibilidad de la planta a la colonización VA..	38
Reconocimiento y compatibilidad en el	
exterior de la raíz.....	39
Desarrollo del hongo en la raíz.....	41
Control del desarrollo de la colonización VA...	43
Interacción entre MVA y microorganismos del suelo...	47
Efecto micorrizósfera.....	47
Interacciones en la micorrizósfera.....	48
Interacciones MVA-hongos patógenos.....	52
Interacciones MVA-hongos saprobios.....	54
II. OBJETIVO E INTERES DEL TRABAJO.....	57
III. MATERIALES Y METODOS.....	60
1. Parte general	
1.1. Aislamiento de hongos saprófitos de rizósfera	
y rizoplano de plantas de maíz y <i>Brassica</i>	60
1.2. Inoculación de hongos saprófitos.....	62
1.3. Obtención de exudados fúngicos.....	64
1.4. Obtención de suelos desprovistos de	
propágulos de micorriza.....	64
1.5. Obtención de inóculo de hongos formadores de	
micorrizas vesículo-arbusculares.....	65
1.5.1 Inoculación de hongos MVA.....	65
1.6. Plantas y condiciones de cultivo.....	66
1.7. Aislamiento y esterilización de	
esporas de <i>G. mosseae</i>	68

1.7.1. Obtención de esporocarpos.....	68
1.7.2. Obtención de esporas.....	69
1.7.3. Esterilización superficial de esporas VA.....	70
1.7.4. Siembra y germinación de esporas.....	71
1.8. Cuantificación del micelio.....	72
1.8.1. Análisis estadístico de los datos.....	72
1.9. Determinaciones generales.....	73
1.9.1. Determinación del peso seco.....	74
1.9.2. Determinación de la longitud de raíz micorrizada.....	74
-Tinción de raíces micorrizadas.....	74
-Cuantificación de la micorrización....	75
-Detección de la actividad Succinato Deshidrogenasa (SDH) en hongos VA.....	76
1.9.3. Cuantificación de la micorriza con actividad SDH.....	77
1.10. Determinación de la población de hongos saprófitos en suelo.....	77
1.10.1. Obtención de la muestra para el recuento de hongos saprófitos.....	78
1.11. Obtención de extractos radicales de plantas hospedantes y no hospedantes, inoculadas o no con <i>G.mosseae</i>	78
1.12. Determinación de la longitud total de hifas presente en suelo.....	79
1.12.1 Lectura de las películas de agar.....	80
1.12.2. Distribución de los diámetros hifales en el material.....	80

2. Ensayos específicos

- 2.1. Efecto de hongos saprófitos inoculados a distintos tiempos sobre la micorrización de plantas hospedantes y no hospedantes con *Glomus mosseae*.....81
 - 2.1.1. Ensayos en maceta.....81
 - 2.1.2. Ensayos en tubo.....82
- 2.2. Ensayos con esporas.....83
 - 2.2.1. Efecto de la germinación de esporas VA sobre el desarrollo de hongos saprófitos en cultivo axénico.....83
 - 2.2.2. Efecto de la inoculación de hongos saprófitos sobre la germinación de esporas VA en cultivo axénico.....83
 - 2.2.2.1. Germinación de esporas de *G. mosseae* sobre agar-agua, en presencia de hongos saprófitos.....83
 - 2.2.2.2. Germinación de esporas de *G. mosseae* sobre agar-agua tamponado con MES, en presencia de hongos saprófitos.....84
 - 2.2.2.3. Germinación de esporas de *G. mosseae* sobre agar-agua, en presencia de exudados fúngicos.....84
 - 2.2.2.4. Producción de compuestos estimuladores o inhibidores volátiles, por hongos saprófitos.....85
- 2.3. Ensayos con extractos radicales de plantas hospedantes y no hospedantes inoculadas o no con el endofito VA.....87
 - 2.3.1. Efecto de los distintos extractos radicales sobre el desarrollo de hongos saprófitos en cultivo axénico.....87

2.3.2. Efecto de los distintos extractos radicales sobre la germinación de esporas de hongos saprófitos en cultivo axénico.....	87
2.4. Detección de sustancias fungitóxicas en extractos de raíces.....	88
IV. RESULTADOS.....	90
Aislamiento y selección de hongos saprófitos.....	90
Efecto de los distintos hongos saprobios sobre el desarrollo y la micorrización de plantas de maíz, lechuga y <i>B. campestris</i> inoculadas con <i>G. mosseae</i> .	
- <i>Aspergillus niger</i>	94
- <i>Trichoderma koningii</i>	96
- <i>Alternaria alternata</i>	98
- <i>Fusarium equiseti</i>	99
- <i>Fusarium solani</i>	101
Efecto de la inoculación de <i>Glomus mosseae</i> sobre la población de hongos saprófitos en la rizósfera de plantas de maíz, lechuga y <i>Brassica</i>	
- <i>Aspergillus niger</i>	118
- <i>Trichoderma koningii</i>	119
- <i>Alternaria alternata</i>	119
- <i>Fusarium equiseti</i>	120
- <i>Fusarium solani</i>	121
Efecto de la inoculación de hongos saprófitos sobre la micorrización de plantas de maíz en cultivo axénico.....	137
Efecto de la inoculación de <i>G. mosseae</i> sobre la población de hongos saprobios en la rizósfera de plantas de maíz en cultivo axénico.....	143

Determinación de la longitud total de micelio y distribución de diámetros hifales en la rizósfera de plantas de maíz y <i>B.campestris</i>	149
Efecto de la germinación de esporas de <i>G. mosseae</i> sobre el desarrollo de las colonias de hongosaprófitos..	152
Efecto de la inoculación de hongos saprófitos sobre la germinación y crecimiento saprofítico de esporas de <i>G. mosseae</i> en agar-agua.....	153
Efecto de los exudados fúngicos producidos por los hongos saprobios sobre la germinación y crecimiento saprofítico de esporas de <i>G. mosseae</i>	161
Efecto de los compuestos volátiles producidos por hongos aprófitos sobre la germinación y el crecimiento hifal de esporas de <i>G.mosseae</i>	165
Efecto de los extractos radicales de plantas de maíz, lechuga y <i>B. campestris</i> , inoculadas y no inoculadas con <i>G. mosseae</i> , sobre el desarrollo de las colonias de hongos saprófitos.....	173
Efecto de los diferentes extractos radicales sobre la germinación de las esporas de hongos saprófitos....	179
Detección de sustancias fungitóxicas en extractos radicales de <i>B. campestris</i>	181
V. DISCUSION.....	183
VI. CONCLUSIONES.....	202

INTRODUCCION

INTRODUCCION

HONGOS DE SUELO

Las bacterias constituyen el grupo de microorganismos más abundante en el suelo. A pesar de la preponderancia numérica de las bacterias, los hongos, debido a su mayor tamaño, son los que aportan la mayor parte del protoplasma microbiano total en suelos cultivados y con buena aireación.

Este dominio en masa, es el resultado del gran diámetro y extensa trama de filamentos fúngicos.

La presencia fúngica se evidencia especialmente en las capas orgánicas de suelos forestales, pero los ambientes ácidos en general tienen en los hongos los mayores agentes de descomposición.

Numerosas investigaciones han demostrado que un suelo fértil puede contener de 10 a 100 metros de filamentos fúngicos activos por gramo de suelo (Alexander, 1977).

Se han desarrollado diversas técnicas para el estudio de la flora fúngica del suelo, si bien ninguna de ellas permite describir adecuadamente la composición genérica total, la masa de hifas vegetativas en el suelo, o las capacidades bioquímicas de la población.

La aproximación que más frecuentemente se utiliza es el recuento de placas, por dilución de suelo. Las poblaciones estimadas por esta técnica son seriamente criticadas por beneficiar a aquellos géneros que esporulan abundantemente, a la vez que es incapaz de reconocer la naturaleza activa o de reposo de la unidad que ha originado la colonia (Montégut, 1960). Sin embargo, sigue siendo un método muy útil a la hora de controlar el desarrollo de una población conocida, inoculada previamente.

Las dos formas habituales de colonización de un sustrato

por hongos son la saprofítica y la parasítica (Curl y Truelove, 1986).

La habilidad saprofítica competitiva de un hongo, es una medida del éxito que éste puede tener en la colonización competitiva de un sustrato.

Los hongos pueden utilizar una gran variedad de fuentes carbonadas, desde azúcares simples, como hexosa o pentosa, hasta moléculas más complejas como ácidos orgánicos, disacáridos, almidón, pectina, celulosa, grasas, y lignina, molécula particularmente resistente a la degradación bacteriana.

El N que utilizan frecuentemente proviene de amonio o nitrato, aunque también pueden utilizar proteínas, ácidos nucleicos, u otros complejos orgánicos nitrogenados.

Los hongos del suelo habitan un entorno complejo, y sus características nutricionales y fisiológicas determinarán en gran medida su habilidad para convivir en el medio en que crecen. Por lo tanto, no sólo la función, sino la misma existencia de una especie en el suelo está condicionada por su versatilidad nutricional y bioquímica.

INFLUENCIA AMBIENTAL

Dada su nutrición heterotrófica, la distribución fúngica está determinada, generalmente, por la disponibilidad de sustratos carbonados oxidables.

El número de hongos filamentosos en suelo varía directamente con el contenido de materia orgánica utilizable, pero este grupo tiene una presencia importante aún en áreas con bajo contenido de materia orgánica.

Se ha comprobado que la aplicación de sustratos orgánicos altera la composición de la flora fúngica, afectando la dominancia relativa de géneros como *Penicillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Mucor* (Alexander, 1977).

El pH es otra de las variables ecológicas que gobiernan la actividad y composición de la flora.

La población microbiana en áreas de pH bajo está dominada por hongos, siendo los responsables de gran parte de las transformaciones bioquímicas en estos habitats.

La aplicación de fertilizantes inorgánicos puede modificar la abundancia de hongos filamentosos, como consecuencia de la acidificación del medio mas que por la adición de nutrientes.

El agua del suelo tiene un efecto directo sobre la abundancia y funciones de los hongos. Su capacidad de catalizar cambios químicos en el suelo puede llegar a anularse completamente a bajos contenidos de agua.

A través de los exudados radicales, los hongos rizosféricos pueden padecer indirectamente el stress hidrico de la planta, aunque su respuesta no es tan rápida ni evidente como en bacterias (Curl y Truelove, 1986).

La mayoría de los hongos son mesofílicos, siendo el crecimiento termofílico muy poco frecuente.

El efecto de la temperatura sobre la actividad microbiana parece estar indirectamente controlado por el crecimiento de la planta y la cantidad y calidad de los exudados (Griffin, 1972; Curl y Truelove, 1986).

La dominancia de un determinado grupo fúngico esta generalmente relacionada con el tipo de cobertura vegetal (Jooste, 1966; Rovira *et al*, 1979).

Algunos géneros están asociados con comunidades vegetales definidas, mientras que otros no parecen afectarse por la naturaleza de la vegetación. Los hongos del primer tipo suelen ser la respuesta microbiológica a excreciones radicales específicas o a constituyentes químicos de los tejidos en descomposición.

Los Fungi Imperfecti contribuyen con el mayor número de géneros y especies a la comunidad fúngica del suelo

(Alexander, 1977; Domsch *et al.*, 1980).

A pesar de las diferencias que pueden observarse en la composición de la flora fúngica, pueden hacerse algunas generalizaciones ecológicas.

Mientras algunos géneros suelen aparecer con más frecuencia en ciertos climas, existe un grupo de hongos "cosmopolitas", que en mayor o menor proporción difícilmente están ausentes en una muestra de suelo sometida a estudio: *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Trichoderma spp.*, *Mucor spp.* y *Rhizopus spp.* Estos hongos presentan, además, un activo crecimiento y una esporulación abundante.

La clasificación ecológica de Garret (1970) agrupa a los hongos de suelo en saprófitos de suelo y hongos que infectan raíz.

Los hongos que comunmente colonizan la materia orgánica, como son *Aspergillus spp.*, *Trichoderma spp.*, *Fusarium spp.*, *Mucorales* y otros, se reconocen, generalmente, como saprófitos obligados, aunque pueden ser patógenos de semillas, o atacar raíces de plantas debilitadas por situaciones de stress físico (Alexander, 1977).

LA RIZOSFERA

Hiltner introdujo por primera vez el término rizósfera en 1904, para referirse a la región del suelo con mayor actividad microbiana, que se halla rodeando la raíz.

De acuerdo con varios autores (Balandreau y Knowles, 1978; Dommergues, 1978; Mosse, 1975), la rizósfera puede dividirse en tres zonas: a) **rizósfera externa** o **suelo rizosférico**: comprende la región del suelo que rodea la raíz, en íntimo contacto con ella. A esta zona es a la que se refieren los estudios clásicos sobre rizósfera. b) **rizoplana**: constituida por la superficie de la raíz y los microorganismos que viven en ella. c) **endorrizósfera**: formada

por el tejido cortical de la raíz, invadido y colonizado por microorganismos saprofiticos y simbióticos.

La intensa actividad microbiana observada en la rizósfera puede explicarse por el beneficio nutritivo que los microorganismos obtienen de compuestos orgánicos e inorgánicos liberados por las raíces activas, así como de las células corticales y epidérmicas en descomposición (Rosberg *et al*, 1981; Tesarova y Simek, 1987; Vancura, 1988).

Esto explica la relación inversa entre el número de microorganismos en el suelo, y las sucesivas distancias de la superficie radical (Newman y Watson, 1977; Tesarova y Simek, 1987; Van Egeraat, 1979).

La raíz influye sobre el número, tipo y actividad de virtualmente todos los grupos que componen la microflora común en suelos rizosféricos, así como aquellas asociaciones simbióticas con la raíz.

Los simbioses son más dependientes de la raíz o el rizoplano que otros miembros de la flora rizosférica (Curl y Truelove, 1986), pero antes de iniciar la relación simbiótica se hallan bajo la influencia del suelo y los microorganismos que lo habitan.

Hasta hace poco tiempo, no se consideraba la posibilidad de que el comportamiento de las raíces se pudieran modificar por la microflora asociada. A medida que ha ido mejorando el conocimiento de las interacciones complejas que ocurren en la rizósfera se ha hecho necesario revisar y modificar algunos de los conceptos existentes relacionados con los mecanismos de funcionamiento de la raíz.

El crecimiento de la planta y su desarrollo están controlados, en gran medida, por el suelo que rodea a la raíz, un entorno que la planta ayuda a crear a través de la amplia variedad de compuestos orgánicos que libera. Hale y colaboradores (1981) clasifican estos materiales en exudados, secreciones, mucílagos, mucigeles y lisados.

Numerosos de estos compuestos, de bajo peso molecular, son volátiles a presión y temperatura ambiente, por lo que son capaces de difundir a través del suelo y afectar la actividad microbiológica aún a considerable distancia de la rizósfera (Linderman y Gilbert, 1975). Estos compuestos volátiles difieren de otros exudados que tienden a concentrarse cerca de la raíz, siendo frecuentemente metabolizados por los organismos rizosféricos antes de que puedan difundir (Minchin y Mc Naughton, 1984).

Se sabe con certeza que la presencia de microorganismos en la rizósfera aumenta la exudación radical (Prikryl y Vancura, 1980). Se estima que la microflora "normal" del suelo puede incrementar las pérdidas por raíz hasta en un 100% (Barber y Martin, 1976). Este flujo de fotosintatos por raíz, debido a la microflora del suelo pueden alcanzar hasta el 40% del CO₂ fijado (Whipps y Lynch, 1985), por lo que debe considerarse un factor de importancia en el balance de C de las plantas.

SISTEMA PLANTA - MICROORGANISMOS

Las poblaciones microbianas de la raíz forman parte de un sistema o asociación que puede denominarse **sistema planta-microorganismos**.

Este sistema se caracteriza por un equilibrio dinámico, cuyas fluctuaciones pueden abarcar períodos cortos, inducidos por los ritmos de exudación, o fluctuaciones largas y más progresivas, asociadas al ciclo de crecimiento de la planta (Dommergues, 1978).

La microflora rizosférica puede favorecer el desarrollo de la planta, ya que: 1) produce sustancias que estimulan el crecimiento, 2) contribuye a una estructura edáfica más estable, 3) libera elementos en formas orgánicas a través de la mineralización, y 4) puede formar parte de asociaciones

simbióticas.

Los metabolitos producidos por los microorganismos del suelo influyen no solo sobre las plantas, sino también sobre la formación de relaciones entre los mismos organismos rizosféricos (Vancura y Jandera, 1986).

Se ha observado que numerosos microorganismos con capacidad de producir diferentes fitohormonas *in vitro*, son frecuentemente aislados de la rizósfera.

El etileno es un componente común de la atmósfera del suelo, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Es un producto de la actividad microbiana, que alcanza en el suelo la concentración suficiente para afectar a otros microorganismos (Drew y Lynch, 1980; Vancura y Jandera, 1986).

La microflora del suelo también es responsable de la producción de fitotoxinas, sustancias que, a muy bajas concentraciones, son capaces de inhibir el crecimiento y desarrollo de las plantas (Vancura y Jandera, 1986).

La actividad enzimática en suelo rizosférico es generalmente mayor que en suelo libre de raíces. Las plantas y microorganismos producen, indistintamente, estas enzimas.

MICOFLORA RIZOSFERICA

En contraste con su efecto sobre las bacterias, las raíces no alteran apreciablemente la cantidad total de hongos, estimulando, sin embargo, la colonización de ella por géneros fúngicos específicos. La influencia es selectiva con respecto al tipo de organismo, más que al número total de ellos (Alexander, 1977).

Indudablemente, la contribución más importante de las plantas a la micoflora rizosférica es la provisión de productos de excreción y tejidos en descomposición, que sirven como fuente de energía, C, N o factores de

crecimiento.

Contrariamente a la idea generalizada de que el rizoplano está completamente cubierto por microorganismos, usualmente sólo del 4-10 % de la superficie radicular está ocupada por los mismos (Bowen, 1980), a excepción de las ectomicorrizas, donde las raicillas laterales pueden estar totalmente cubiertas por hongos.

La colonización del tejido cortical y epidérmico de la raíz por organismos no patogénicos es dispersa en raíces jóvenes, haciéndose más abundante al envejecer la raíz (Paul y Clark, 1989).

Debido a la inmensa población microbiana que soporta la rizósfera, mucho mayor que la existente en suelo libre de raíces, los fenómenos de antagonismos y competición son mas pronunciados, y sus consecuencias, de mayor interés ecológico.

EL EQUILIBRIO BIOLÓGICO: INTERACCIONES

La composición de la microflora de cualquier habitat está gobernada por el equilibrio biológico resultante de las asociaciones e interacciones de todos los individuos de la población.

Los cambios en el entorno trastornan el equilibrio, pero éste es reestablecido, adaptándose a las nuevas condiciones. Es la planta quien primero reacciona a los cambios producidos en su entorno, de manera tal, que la respuesta que se observa en las comunidades microbianas de la raíz estaría fundamentalmente mediada por ella (Gerhardson y Clarholm, 1986).

El rizoplano está incompletamente ocupado por microorganismos (Bowen, 1980), que forman numerosas comunidades pequeñas, espacialmente discretas. A pesar de esta cobertura incompleta de la raíz, existen interacciones entre los microorganismos que la habitan, ya que éstos

tienden a ocupar los lugares más favorables.

Estas interacciones complejas usualmente resultan en la supresión de algunas especies, a la vez que aumentan el crecimiento de otras.

El esquema de clasificación de las interacciones más completo y comunmente aceptado es el de Odum (1959), que puede resumirse de la siguiente manera:

		Efectos sobre población A y B	
Interacción		A	B
Positivas	Neutralismo	0	0
	Comensalismo	+	0
	Mutualismo (simbiosis)	+	+
Negativas	Competencia	-	+
	Amensalismo	-	0
	Parasitismo	-	+
	Predación	-	+

Cuando dos individuos o poblaciones muy próximos no interactúan entre sí, se habla de neutralismo, aunque esta situación rara vez ocurre.

Interacciones que promueven el crecimiento

-Comensalismo

Un organismo se beneficia de otro que crece próximo a él, mientras que el otro organismo no recibe beneficio alguno, pero no es dañado por el primero.

Este tipo de interacción puede manifestarse de diversas maneras:

- Un organismo utiliza nutrientes liberados en la transformación microbiana de compuestos o sustratos por otro organismo.
- Un organismo sintetiza un factor de crecimiento esencial

para el otro organismo.

- Un organismo modifica el entorno físico (humedad, pH, CO₂, O₂, potencial osmótico), creando un habitat más favorable para otro individuo.

- Un organismo destruye o neutraliza un factor antimicrobiano (toxina), que inhibía al otro.

-Mutualismo o simbiosis

Varias especies de organismos que viven muy próximos pueden beneficiarse mutuamente.

La simbiosis entre microorganismos del suelo, o entre micro y mesoorganismos no se ha investigado suficientemente con relación al efecto rizosférico.

Teniendo en cuenta el carácter nutricional de la relación simbiótica, es posible que organismos que coexisten en la rizósfera practiquen un tipo de mutualismo periódico.

Relaciones que inhiben el crecimiento

-Competencia

Es la demanda activa de un mismo material o condición por dos o más organismos.

Los microorganismos que habitan un mismo nicho ecológico compartirán ciertas características del microhabitat que ocupan, siendo uno de ellos dominante por tener una mayor habilidad saprofítica competitiva para la colonización del sustrato que comparten (Brian, 1957).

Los microorganismos simbiotes de plantas superiores también están sujetos a la competencia con otros microorganismos rizosféricos hasta que la asociación simbiótica se establece (Curl y Truelove, 1986).

Los microorganismos compiten casi exclusivamente por sustrato en el suelo (Elad, 1988), especialmente dentro de ciertos nichos ecológicos.

-Amensalismo

Otro tipo de relación antagonica en la rizósfera es el amensalismo. El mecanismo en que se funda consiste en que una especie se impone en un determinado habitat por su capacidad para excretar productos que afectan de forma adversa el desarrollo de otros organismos.

Entre los tipos más importantes de amensalismo se encuentran la antibiosis y la fungistasis.

a) Antibiosis

Se trata de un tipo de antagonismo estrechamente relacionado con la competencia, en el que un individuo inhibe a otro por la producción de un metabolito (Baker y Cook, 1982).

Los microorganismos productores de antibióticos mas frecuentes, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Aspergillus* entre otros, son muy abundantes en la rizósfera y rizoplano de cultivos y malezas.

Gran parte del interés en el estudio de la antibiosis se centra en la interferencia que este tipo de fenómenos pueden producir en el establecimiento y actividad de *Rhizobium*, hongos micorrizicos, y patógenos de plantas.

Es razonable pensar que las sustancias antimicrobianas aumenten la capacidad de sus productores de colonizar la superficie radical y competir por nutrientes y espacio en la rizósfera. Baker y Snyder (1980), sugieren que la efectividad de estos compuestos se limita a un área inmediata.

b) Fungistasis o micostasis

Mientras una estimulación directa del crecimiento, por aumento del contenido de nutrientes en la zona radical, parece la explicación más satisfactoria para el incremento de la población bacteriana en la rizósfera, sólo justifica parcialmente el comportamiento observado en hongos.

Un alto porcentaje de los hongos presentes en el suelo, se encuentran en forma de propágulos inactivos. La germinación de estos propágulos rara vez está limitada por la falta de nutrientes. La razón de esta inactividad es la presencia, casi universal, de un factor inhibidor o fungistático en los suelos naturales (Dobbs et al., 1960).

Esta fungistasis no es específica, y es de origen microbiano, ya que desaparece con la esterilización del suelo. Está determinada por una combinación de antibiosis y deficiencia de nutrientes, producida por competencia (Paul y Clark, 1989). Pavlica y colaboradores (1978) sostienen que distintas especies de *Trichoderma*, reconocidas por su producción de antibióticos no volátiles, producirían sustancias volátiles que contribuyen a la fungistasis del suelo.

Curiosamente, hasta el momento no se ha citado información sobre fungistasis hacia hongos VA en suelo (Azcon Aguilar et al, 1981).

-Micoparasitismo

Se ha estudiado extensamente en las especies de *T. harzianum* y *T. hamatum*, capaces de parasitar las especies patógenas *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*. Este sistema permite demostrar el papel de la lisis en el biocontrol de patógenos.

El micoparasitismo comienza después de que las hifas del micoparásito entran en contacto físico con las hifas del hospedante. El contacto en algunos casos puede implicar un proceso previo de reconocimiento (Elad, 1988).

-Depredación

Este tipo de antagonismo consiste en el ataque directo de un microorganismo a otro con un fin nutricional.

La depredación puede o no implicar la ingestión de la

presa. Este último es el caso de los hongos, que al ser depredadores líticos, destruyen la presa por emisión de enzimas líticas antes de asimilar los productos de la lisis.

MICORRIZAS

Una de las simbiosis mutualistas más extendidas son las micorrizas, formadas por asociación de plantas y hongos del suelo. Alrededor del 80% de las especies vegetales conocidas forman asociación con algún tipo de hongo micorrizico. El beneficio en la asociación es mutuo y repercute en la mejor nutrición de la planta, principalmente fosforada, y del hongo, a partir de compuestos fotoasimilados de la planta hospedante.

Las micorrizas se dividen tradicionalmente en tres grupos morfológicamente distintos en cuanto a la mayor o menor penetración de las células radicales. Las Ectomicorrizas las forman exclusivamente especies arbóreas y se caracterizan por un gran desarrollo del micelio en la superficie de la raíz hospedante, la cual pueden llegar a estar completamente englobada en un manto fúngico. Algunas hifas del manto penetran entre los espacios intercelulares de las células más externas de la raíz, formando una red intercelular.

El segundo tipo, y mayoritario, lo constituyen las denominadas endomicorrizas, caracterizadas por el menor desarrollo fúngico en la superficie de la raíz y una colonización importante de las células corticales. Esta colonización no causa cambios morfológicos aparentes en la raíz. Se distinguen tres tipos de endomicorrizas, diferenciados según el patrón de infección y de plantas hospedantes. Estos tipos son: ericoides, orquidales y vesiculo-arbusculares (en adelante MVA).

El último tipo, ectendomicorrizas, presenta una forma intermedia de las dos anteriores, con una cubierta superficial de hifas y una penetración intra e intercelular de las células corticales. La forman un limitado número de

plantas y hongos poco conocidos.

La simbiosis MVA está caracterizada por la colonización de hifas aseptadas y multinucleadas provenientes de otras raíces o de grandes esporas (pueden alcanzar un tamaño de 500 μm) que se encuentran en el suelo. El desarrollo fúngico varía en detalle según el hospedante, pero en la mayoría de las asociaciones la hifa se diferencia para formar arbuscúlos intracelulares y vesículas tanto intra como intercelulares. La hifa se extiende considerablemente fuera de la raíz, por lo que el hongo posee parte interna y externa.

Esta asociación tiene una larga historia evolutiva, su ubicuidad y la forma de explorar el suelo sugieren que ha sido necesaria, durante el periodo Silúrico, para la colonización de la tierra por plantas acuáticas sin verdadera raíz. De hecho se conocen fósiles de micorrizas VA provenientes de los periodos Devónico y estratos subsiguientes. Desde entonces plantas y hongos VA (formadores de micorrizas VA) han evolucionados conjuntamente, lo que ha dado lugar a que se establezcan una serie de dependencias entre ambos simbioses. De este modo, muchas plantas requieren estar micorrizadas para alcanzar su crecimiento óptimo, y, por otro lado, no se ha conseguido que hongos VA completen su ciclo de vida en ausencia de la planta hospedante, por lo que se consideran simbioses fisiológicamente obligados.

HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS VESICULO-ARBUSCULARES

Los hongos VA son componentes habituales de la rizosfera, encontrándose en todos los ambientes, incluso en aquellos que han sufrido algún deterioro (Mosse, *et al*, 1981). La imposibilidad actual de obtenerlos en cultivo axénico en ausencia de la planta hospedante dificulta el estudio de su biología.

Las esporas de los hongos VA son los propágulos más característicos y los criterios taxonómicos se basan en la morfología, germinación y desarrollo de tubos germinativos de éstas.

Recientemente (Morton, 1990) ha propuesto una clasificación de hongos VA que incluye un solo orden dividido en dos subordenes, en función de relaciones evolutivas existentes, originados a partir de un ancestro arbuscular común, y dos nuevas familias: Acaulosporaceae y Gigasporaceae.

División **EUMYCOTA**

Grupo: **Zygomycotina**

clase: **Zygomycetes**

orden: **Glomales**

Suborden: **Glomineae**

Familia: **Glomaceae**

Géneros: *Glomus*

Sclerocystis

Familia: **Acaulosporaceae**

Generos: *Acaulospora*

Entrophospora

Suborden: **Gigasporineae**

Familia: **Gigasporaceae**

Géneros: *Gigaspora*

Scutellospora

Los géneros *Glomus* y *Sclerocystis* producen esporas de resistencia (Clamidosporas) con paredes gruesas, originadas asexualmente en los extremos de hifas vegetativas (Walker, 1987). En *Sclerocystis* las esporas se encuentran dentro de cuerpos fructíferos, denominados esporocarpos, dispuestas de forma periférica alrededor de un eje central. En el género *Glomus* las clamidosporas pueden estar o no incluidas en esporocarpos y nacen a partir de una hifa sustentora más o menos recta (Gerdemann y Trappe, 1974).

Las familias Gigasporaceae y Acaulosporaceae incluyen géneros formadores de azigosporas, esporas similares a zigosporas pero en las que no se ha observado origen sexual (Morton, 1988). *Gigaspora* difiere de *Scutellospora* en que la primera no posee ninguna pared interna flexible en las azigosporas, mientras que *Scutellospora* posee al menos una. En *Acaulospora* las azigosporas se forman lateralmente a partir de la hifa que sostiene la espora madre, mientras que en *Entrophospora* las azigosporas se forman dentro del cuello de la hifa. Tanto en *Acaulospora* como en *Entrophospora* las azigosporas se forman por la migración del contenido de la espora madre previamente desarrollada y de corta duración por lo que normalmente, carece de hifa sustentora (Morton, 1988), no así *Gigaspora* y *Scutellospora*, que tienen un suspensor similar a un gametangio (Gerdemann y Trappe, 1974).

Las esporas de hongos VA son unidades biológicas preprogramadas, en estado de quiescencia. Precisan activarse para desencadenar los procesos normales de su biología celular y las funciones metabólicas necesarias para su germinación y crecimiento del micelio (Siqueira, 1987). No se conocen los mecanismos de activación e inicio de la germinación, aunque las esporas contienen todos los factores biológicos requeridos. Se cree que no poseen los sistemas genéticos y metabólicos para su crecimiento continuo y

esporulación, a menos que se asocien a células de raíces vivas (Hepper, 1984; Siqueira, 1987).

DINAMICA DE LA COLONIZACION VA

El proceso y desarrollo de la colonización de la raíz por hongos VA sigue una curva sigmoideal típica, en la que se observa una fase de latencia, fase logaritmica de crecimiento y desarrollo, y una fase de estabilización.

Fase de latencia

Esta fase está causada por el tiempo requerido para la germinación de esporas, crecimiento del micelio y su penetración en la raíz.

Los principales propágulos de hongos VA del suelo son las esporas, fragmentos de raíz de plantas micorrizadas y masas de micelio fúngico.

Las esporas germinan en condiciones favorables de temperatura y humedad, si bien se han descrito una serie de factores que afectan este proceso. Así, se produce una estimulación de la germinación inducida por exudados radicales (Graham, 1982) o inhibición por sustancias volátiles de plantas no susceptibles de formar micorrizas (El Atrach, *et al*, 1989). Otros factores, como la población de microorganismos del suelo también pueden afectar el ritmo de germinación de esporas, ya sea por inducción directa (Azcón-Aguilar, *et al*, 1986), o por degradación de compuestos tóxicos del suelo (Azcón-Aguilar, *et al*, 1986).

El micelio proveniente de la germinación de esporas, de raíces colonizadas o de masa fúngica que se encuentra de forma independiente en el suelo (Ocampo y Hayman, 1981; Warner y Mosse, 1980), parece tener un crecimiento errático, no dirigido, hasta alcanzar la rizósfera de la planta, donde

como se mencionará mas adelante, procesos de reconocimiento y compatibilidad harán posible o no la penetración.

Fase logaritmica de crecimiento y desarrollo.

Esta fase está directamente asociada con la formación de un micelio extenso en el suelo con capacidad para penetrar la raíz. El número de propágulos del suelo es un factor determinante para la extensión y velocidad de la colonización, así como la velocidad de inicio de las primeras colonizaciones (Daft y Nicolson, 1969; Rich y Bird, 1974). Las colonizaciones iniciales tienen una gran importancia en la aceleración de la respuesta de crecimiento en plantas cultivadas. Con un incremento en el número de propágulos se consigue un mayor porcentaje de colonización. Sin embargo existe un nivel de saturación de inóculo, por encima del cual no se consigue incrementar los niveles de colonización de la raíz (Carling *et al*, 1979; Smith y Walker, 1981). No se conoce cual es la causa de esta saturación, pues el potencial de inóculo no solo está definido por la cantidad de propágulos sino también por su competitividad en el suelo frente a otros microorganismos y por la capacidad de extensión de la colonización en el interior de la raíz, la cual puede ser diferente según el tipo de planta a colonizar. Diferentes especies de hongos VA difieren entre si en su velocidad de extensión en el interior de la raíz y en la extensión de colonización independientemente de la dosis de inóculo (Daniels *et al*, 1981).

La velocidad de desarrollo de la colonización, la especie de hongo y el nivel total de colonización pueden ser factores importantes en la efectividad ó en la dependencia de la planta a la micorriza.

El desarrollo de la colonización de la raíz comienza con la hifa de penetración que crece y se ramifica en los

espacios intercelulares, y constituye lo que se ha denominado "unidad de infección" (Wilson, 1984).

Las hifas crecen intercelularmente en las capas más externas del parénquima cortical pudiendo formar circunvoluciones u ovillos de función no definida. En las zonas internas de la corteza el hongo se desarrolla de forma intracelular dando lugar a la estructura más característica en esta simbiosis, los arbúsculos. En un estadio posterior se forman las vesículas, que se suponen que actúan como órganos de reserva, y cuya composición es, fundamentalmente, lipídica.

A medida que se generaliza la colonización se produce el desarrollo de hifas del hongo VA en el suelo, provenientes de la raíz colonizada. Esta extensa red de micelio externo es capaz de explorar un volumen de suelo adicional, al que no pueden acceder las raíces por sí solas (Abbot y Robson, 1985).

Fase de estabilización.

La planta estabiliza el nivel de colonización en un período de tiempo que difiere en las distintas especies. Rara vez sobrepasa el 85% de la longitud total de la raíz. No se conocen las causas que determinan esta estabilización, pero al igual que toda la dinámica de la colonización, la VA depende de las condiciones extrínsecas del sistema radical y de las condiciones ambientales en que se encuentra.

CUANTIFICACION DE LA COLONIZACION VA

Prácticamente todos los estudios que se realizan con MVA requieren una observación o cuantificación de la colonización en alguna etapa de la investigación.

La mayoría de las medidas de la colonización se basan en

la determinación de la proporción de tejido del hospedante susceptible de micorrizarse (corteza primaria), ocupado por el hongo. Otra forma de medida, es la determinación directa de la proporción de tejido fúngico presente en la raíz. Esta se mide dosando glucosamina colorimetricamente (Hepper, 1977), como estimación de la quitina presente. Este método da una buena correlación con el nivel de tejido colonizado, pero para relacionar los resultados de este ensayo con la masa fúngica se requiere una calibración del método para cada endofito. Sólo se utiliza en ensayos llevados a cabo en condiciones estériles y cuando se requiere una medida muy precisa.

Otro método (Becker y Gerdemann, 1977) se basa en la medida del pigmento amarillo que se forma en las raíces colonizadas de algunas plantas (cebolla y maíz). Pero no todas las especies de plantas forman este pigmento y el método no es siempre satisfactorio.

Cuando la colonización se mide estimando la proporción de la corteza primaria ocupada por el hongo, las mediciones se hacen en base a las observaciones del material teñido. El método de tinción más común es el descrito por Phillips y Hayman (1970).

Para la cuantificación de la colonización VA se han utilizado varios métodos, de estos los más comunes son la estimación de la colonización de raíces montadas en portaobjetos y observadas al microscopio (Nicolson, 1960), o la estimación del porcentaje de longitud de raíz en las líneas de una placa cuadrículada (Giovannetti y Mosse, 1980).

Si bien, estos métodos de cuantificación de la colonización permiten la estimación del micelio que ocupa la raíz de la planta, no permiten determinar el nivel de funcionalidad del mismo. Por ello se ha desarrollado un método de estimación de la cantidad de micelio metabólicamente activo, en base a la determinación de la

actividad succinato deshidrogenasa fúngica mediante técnicas histoquímicas (MacDonald y Lewis, 1978).

ANATOMIA Y MORFOLOGIA DE LAS MVA

Los cambios anatómicos y citológicos causados por hongos VA en la raíz hospedante no son apreciables a simple vista.

Solo la presencia, en ciertas Liliáceas y en maíz, de pigmento amarillo, soluble en agua (Gerdemann, 1961) y la disminución en longitud y número de los pelos radicales, son características morfológicas macroscópicas que parecen relacionadas con la micorrización.

La colonización micorrízica solo tiene lugar en la epidermis ó exodermo y en el parénquima cortical de la raíz primaria. Nunca hay colonización en la endodermis, en el cilindro vascular central, ni en las regiones meristemáticas. (Bonfante-Fasolo, 1984). Sin embargo se han descrito algunos cambios inducidos por la micorrización a nivel de organización celular del meristemo apical y cilindro vascular. La micorrización parece detener la actividad meristemática por decrecimiento del índice mitótico, formándose un tejido parenquimatoso en los ápices radicales. (Fusconi et al., 1986).

En la simbiosis MVA cabe distinguir dos fases: fase de desarrollo fúngico extraradical, fase de desarrollo intraradical.

Morfología de estructuras fúngicas extraradicales

El desarrollo extraradical de hongos VA varía en función del tipo de suelo, planta y especie fúngica.

La fase extraradical está representada por las clamidosporas y micelio externo. Las clamidosporas de la mayoría de hongos VA poseen una pared gruesa con dos capas

distintas en arquitectura. Una observación importante es el hecho de que algunas esporas de hongos VA poseen un modelo helicoidal de estructuración de su pared. Este modelo de pared parece ser el resultado de un sistema oscilatorio y una actividad rítmica y puede interpretarse como un registro temporal de la actividad celular (Vian y Roland, 1987). Este tipo de organización en la pared no se ha descrito para ningún hongo, exceptuando hongos VA (Bonfante-Fasolo y Schubert, 1987), aunque si se ha puesto de manifiesto en células vegetales de algas y en cubiertas celulares de crustáceos e insectos. La regularidad de deposición en capas y la organización en fibras paralelas o helicoidal de la quitina son características variables en las distintas esporas de especies fúngicas VA. El contenido citoplasmático de las esporas es denso y rico en gránulos lipídicos.

Las hifas externas poseen un tamaño variable, oscilando entre 2 y 27 μm de diámetro (Nicolson, 1959). Estas hifas pueden ser de paredes gruesas o delgadas. Las hifas de pared gruesa son de color amarillento, aseptadas y poseen proyecciones angulares unilaterales típicas (Nicholson, 1959; Mosse, 1959). A partir de estas hifas de pared gruesa pueden desarrollarse ramificaciones laterales de pared delgada y septadas. Las paredes celulares de estas hifas se caracterizan porque poseen una textura fibrilar y están constituidas por proteínas, polisacáridos y sobre todo por quitina (Bonfante-Fasolo y Grippiolo, 1982; Bonfante-Fasolo, 1988). Poseen un citoplasma con núcleos, mitocondrias y un retículo endoplasmático rico en ribosomas (Bonfante-Fasolo y Grippiolo, 1982). Frecuentemente poseen un sistema de vacuolas bien desarrollado y aparecen con un contenido denso a los electrones parecido a los gránulos de polifosfato que aparecen en las hifas intraradicales. (Bonfante-Fasolo, 1984).

Cuando la hifa externa entra en contacto con la raíz

puede engrosarse apicalmente, formando una estructura parecida a un apresorio, y a veces puede ramificarse en forma de abanico antes de penetrar en la raíz (Gianinazzi-Pearson *et al*, 1980). El número de puntos de entrada que pueden formar es variable en función de las condiciones ambientales y de la edad de la raíz. La hifa no penetra los meristemas apicales y la colonización suele tener lugar entre 0.5 y 1 mm a partir del extremo de la raíz (Mosse, y Hepper, 1975).

La hifa puede penetrar la raíz por varias vías (Bonfante-Fasolo, 1984).

- Directamente a través de la pared de un pelo radical o una célula epidérmica. Se ha observado que la hifa que penetra se estrecha en el punto de penetración, recuperando posteriormente su tamaño normal (Grippiolo, 1981; Kinden y Brown, 1975).

- La hifa, originada en el apresorio, puede atravesar los espacios vacíos entre células muertas de la capa externa de la raíz y entrar en la primera capa de células intactas, formando un ovillo o circunvolución intracelular (Scannerini y Bonfante-Fasolo, 1983).

- La hifa penetra entre las células epidérmicas y se extiende intercelularmente (Gianinazzi-Pearson *et al*, 1981).

En la elección de una u otra vía de penetración parece influir la anatomía de la raíz. De igual modo la extensión de la hifa en el interior de la raíz parecer depender del tipo de planta y de hongo que la coloniza (Abbot, 1982).

Morfología de estructuras fúngicas intraradicales.

Hifas intracelulares en la capa externa de la corteza.

La capa externa de la corteza de la raíz se coloniza, a menudo, por hifas intracelulares que forman circunvoluciones dentro de la célula hospedante. Son hifas lineales sin ningún tipo de ramificación. La formación de circunvoluciones es un fenómeno común a las raíces micorrizadas de muchas plantas y producido por la mayoría de especies de hongos VA. La hifa puede formar una circunvolución intracelular en la primera célula que coloniza, pasando posteriormente a otra capa de células vecinas, y formando nuevas circunvoluciones. También puede ocurrir que la hifa penetre la primera célula sin formar circunvolución y las forme en las células vecinas. (Bonfante-Fasolo, 1984). El tamaño de la hifa intracelular depende del tipo de hongo y su comportamiento en la capa externa de células corticales, posiblemente, influenciado por el hospedante (Abbott, 1982).

Estudios realizados con microscopio de transmisión revelan que el núcleo de la célula vegetal aparece cercano a la hifa intracelular. Esta hifa contiene pequeños núcleos, vacuolas que contienen gránulos densos, gotas lipídicas, gránulos de glucógeno y una pared con disposición fibrilar rica en polisacáridos alcalinos solubles (Bonfante-Fasolo, 1984).

La colonización de la célula por parte de la hifa se caracteriza por la invaginación del plasmalema de la célula hospedante, de tal forma que nunca hay una invasión del citoplasma por parte del hongo. El plasmalema hospedante y la pared fúngica están siempre separados por una matriz osmófila de material fibrilar que se hace continua con la pared celular de la célula vegetal y con morfología similar a esta (Gripiolo, 1981).

Durante el paso de célula a célula la hifa atraviesa la pared e invagina la membrana de la célula hospedante sin afectar al citoplasma (Bonfante-Fasolo y Grippiolo, 1982).

Cuando el hongo alcanza la zona media del parénquima cortical se extiende de modo intercelular a lo largo de la raíz paralelamente al eje principal de ésta.

Hifas intercelulares.

La hifa intercelular proveniente de una circunvolución o de una hifa de penetración, se extiende, dilatando los espacios intercelulares, a lo largo de las capas intermedias del parénquima cortical. Su diámetro es variable (2 a 6 μm) y a veces se encuentran agrupadas en paquetes de 3 o 4. La pared celular de estas hifas es delgada en la zona de crecimiento y se vuelve más gruesa y con textura fibrilar cuando la hifa envejece (Bonfante-Fasolo, 1988). Se han descrito interconexiones entre las hifas intercelulares, tanto de tipo H, cohesión perpendicular entre dos hifas que se extienden paralelamente, como división de una hifa en dos ramas que se extiende posteriormente de forma paralela (Abbot y Robson, 1979).

Las hifas intercelulares contienen pequeños núcleos, mitocondrias, gránulos densos rodeados de membrana, grandes vacuolas, gránulos de α -glucógeno y gránulos lipídicos.

Una característica de las hifas intercelulares y troncos arbusculares es que a veces aparecen orgánulos con aspecto de bacteria en su protoplasma. Incluso se han descrito características de estos orgánulos que hacen sospechar que sean organismos en estado citobiótico (McDonald, *et al.*, 1982). Sin embargo, no se conoce el papel y función de estas partículas, siendo necesario su aislamiento y cultivo.

Arbúsculos

En las capas interiores del parenquima cortical la hifa intercelular penetra las células corticales dando lugar a un sistema complejo de hifas ramificadas, denominado arbúsculo. El arbúsculo se origina a partir de una rama de la hifa intercelular, el tronco arbuscular, que penetra en la célula hospedante, se ramifica sucesivamente en forma dicotómica y da lugar a ramas que proliferan en pequeñas hifas con terminales cortos bifurcados. Las ramificaciones arbusculares causan una invaginación del plasmalema hospedante y se encuentran siempre rodeado de éste. La pared de las hifas arbusculares es fina y con una estructura amorfa donde desaparece la organización fibrilar de la quitina y solo aparecen residuos monoméricos de N-acetilglucosamina (Bonfante-Fasolo, 1983; Kinden y Brown, 1975).

Las hifas arbusculares contienen numerosos núcleos, mitocondrias, gránulos de glucógeno, gotas lipídicas, abundantes cuerpos polivesiculares y gránulos densos dentro de pequeñas vacuolas. Entre estos gránulos se han encontrado niveles altos de fósforo y calcio (Cox, *et al*, 1980). Además se ha encontrado una gran actividad fosfatasa y ATPasa en estas zonas (Gianinazi, *et al*, 1979; Marx, *et al*, 1982).

La pared celular de los arbúsculos se va haciendo más delgada conforme se aleja del tronco arbuscular. Estudios citoquímicos han puesto de manifiesto la presencia de proteínas y polisacáridos en dicha pared.

El arbúsculo es la estructura más significativa en la simbiosis VA. Desde el punto de vista funcional, como sitio de intercambio de metabolitos, y desde el punto de vista estructural, ya que los arbúsculos son elementos decisivos para la identificación de una colonización fúngica como micorriza VA.

La vida media de un arbúsculo es de 4 ó 5 días, después de este tiempo las ramas arbusculares se deterioran y

colapsan (Cox y Tinker, 1976). El deterioro comienza por las ramificaciones más pequeñas y se caracteriza por la pérdida y desorganización de su contenido citoplasmático, la pérdida de integridad de la membrana y el colapso de las paredes celulares.

Vesículas.

Las vesículas son cuerpos globosos originados por un ensanchamiento intercalar o terminal de la hifa. Las vesículas pueden ser inter ó intracelulares, variando en tamaño y en número dependiendo del hongo VA.

No se han determinado las fases de desarrollo de las vesículas, pero sí se conoce que inicialmente su protoplasma contiene numerosos núcleos, glucógeno y vacuolas con gránulos densos y que en estado maduro presentan en su interior grandes gotas lipídicas. La pared está constituida por varias capas con diferente densidad a los electrones.

Su función es desconocida, si bien el alto contenido lipídico y el incremento en número en raíces viejas o muertas, hace suponer una función de reserva (Bonfante-Fasolo, 1984). No obstante, existen indicaciones que apoyan el papel de vesículas como propágulos de hongos VA (Bierman y Linderman, 1983).

Morfología y función de las interfases hongo-hospedante

Un requisito imprescindible para que se lleve a cabo un intercambio de nutrientes entre simbioses es el desarrollo de una interfase, cuyas características morfológicas y funcionales hacen posible el transporte de nutrientes. La interfase, formada entre los dos miembros de la asociación está constituida por componentes de pared de ambos: las paredes celulares y las membranas plasmáticas. Puede variar en estructura y organización durante las distintas fases de

desarrollo de la interacción simbiótica.

En la mayoría de los casos de relación simbiótica, las interacciones entre los miembros que la forman están localizadas a nivel del apoplasto. Cuando el microsimbionte penetra un órgano hospedante, coloniza el apoplasto, si la colonización es intercelular, o bien coloniza la región apoplástica dentro de la pared celular hospedante, pero fuera del protoplasto, si la colonización es intracelular. La formación de la interfase conlleva una serie de modificaciones que afectan a todos sus componentes. Por un lado hay una modificación del apoplasto, que afecta su permeabilidad y la transferencia de nutrientes. De este modo, en las infecciones de plantas por parásitos biotrofos, se produce una deposición de material de pared celular y cambios en los componentes de pared que incrementan la resistencia de la planta a la infección y reducen la transferencia unidireccional (planta-parásito) de nutrientes.

En el caso de asociaciones mutualistas hay una reducción de material de pared en la interfase intracelular, sobre todo en las zonas más directamente implicadas en el intercambio de nutrientes.

Por otro lado, las membranas plasmáticas que intervienen en la interfase sufren también modificaciones, por un lado incrementan el área de contacto mediante invaginación, y por otro, se redistribuyen las enzimas que participan en el intercambio de sustancias y el mantenimiento de la interfase, tales como ATPasas y fosfatasa neutras, que se concentran en la zona de contacto.

Cuando el hongo se encuentra en la fase intercelular hay un contacto directo entre sus paredes y las de las células radicales. En esta fase no hay respuesta evidente a la presencia de la hifa, si bien se han observado alteraciones de la laminilla media (Gianinazzi-Pearson, *et al*, 1981).

Cuando el hongo es intracelular la interfase hongo-

planta está formada por la pared fúngica, el plasmalema de la célula hospedante y una matriz de material osmófilo rico en polisacáridos y proteínas (Gianinazzi-Pearson *et al*, 1981).

Las características de esta interfase varían según la situación del hongo. En los tejidos radicales externos, donde se desarrollan circunvoluciones intracelulares la pared de la hifa es relativamente gruesa y quitinosa, con una estructuración fibrilar, y está separada del plasmalema hospedante por una matriz interfacial parecida a la pared primaria que actúa como barrera física que separa hongo y planta. Es una interfase que se asemeja a la que se establece con la hifa intercelular.

El contenido citoplasmático de las células hospedantes cambia poco en respuesta a la colonización (Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1988). En cambio las células corticales parenquimáticas que contienen los arbuscúlos experimentan cambios apreciables. El contenido citoplasmático se incrementa, disminuyen las vacuolas, los granos de almidón desaparecen, los orgánulos celulares son más numerosos, el sistema de membrana se incrementa y el plasmalema del hospedante prolifera rodeando las ramas de la hifa, creando así una mayor superficie de contacto celular entre ambos componentes de la simbiosis (Cox y Tinker 1976). Esta situación celular es propia de una intensa actividad metabólica, asociada a una intensa actividad transcripcional en el núcleo de la célula hospedante (Berta, *et al*, 1986).

A medida que la hifa fúngica se ramifica en el protoplasto del hospedante, la interfase hongo-hospedante se modifica y se hace más compleja. La pared celular fúngica se simplifica y se hace más fina a lo largo del arbuscúlo. El material de pared depositado por la célula hospedante disminuye en la matriz interfacial que rodea las zonas más finas de las hifas arbusculares, por lo que el apoplasto entre hongo y plasmalema de la célula hospedante se reduce y

se establece una unión estrecha entre las superficies celulares de ambos simbioses. A lo largo del plasmalema del hospedante que rodea las ramas arbusculares aparece específicamente localizadas las fosfatasa neutras, cuya actividad es característica en la síntesis de polisacáridos (Jeanmaire, *et al*, 1985). Además aparecen gran cantidad de vesículas de membrana con contenido fibrilar cuya función parece estar relacionada con la síntesis de pared celular (Dexheimer, *et al*, 1985).

Tanto la actividad de fosfatasa neutras como las vesículas de membrana permanecen en las zonas de senescencia de las hifas arbusculares, donde el material del hospedante se acumula alrededor de los restos celulares fúngicos. Por tanto, es lógico pensar que, el plasmalema del hospedante, que rodea la hifa arbuscular, tiene una actividad formadora de pared, pero los procesos de depósito y organización de pared se afectan por la hifa que está creciendo activamente (Dexheimer *et al*, 1985). Los precursores de la pared formados o la hidrólisis localizada de material de pared podrían suministrar una fuente suplementaria de carbohidratos al hongo VA.

A lo largo del plasmalema de las ramas arbusculares activas se ha detectado actividad ATPásica, lo que indica la posibilidad de un transporte activo de solutos dentro del hongo. También se ha detectado actividad de fosfatasa alcalinas en las hifas arbusculares, que parece estar relacionada con el mecanismo de transporte activo de fósforo desde el hongo a la planta. En las ramas arbusculares jóvenes se ha detectado la presencia de fosfatasa ácidas cuya función parece relacionada con el proceso de elongación y crecimiento de la hifa (MacDonald y Lewis, 1978).

El plasmalema de la célula hospedante que se desarrolla alrededor de las ramas arbusculares posee una intensa actividad ATPásica en comparación con el plasmalema

periférico, no relacionado directamente con el arbusculo (Dexheimer et al, 1982). Este desarrollo localizado de actividad ATPásica sugiere la posibilidad de un transporte activo de solutos (Harley y Smith, 1983). La actividad ATPásica desaparece en el plasmalema hospedante que rodea las hifas arbusculares senescentes.

Tras la degeneración y senescencia de las estructuras arbusculares, la célula hospedante recupera su aspecto normal (Harley y Smith 1983).

FISIOLOGIA DE LA SIMBIOSIS MVA

La formación de la simbiosis MVA supone la alteración fisiológica de la planta cuyo efecto más apreciable es una mejor nutrición de la misma, principalmente fosforada, con la consiguiente repercusión en el crecimiento e incremento de biomasa. Lógicamente esta asociación mutualista supone también, efectos positivos sobre el hongo VA, el cual recibe los compuestos carbonados necesarios para su desarrollo a partir de la planta, los cuales provienen de la actividad fotosintética de la misma.

Aunque las principales alteraciones fisiológicas de la planta hospedante son de tipo nutricional, existen otras modificaciones como la alteración de las reducciones hídricas y resistencia a salinidad, cambios morfológicos y resistencia a condiciones de stress, que no parecen deberse a causas nutricionales.

A continuación se analizan las principales repercusiones fisiológicas que, sobre las plantas hospedantes, origina el establecimiento de la asociación MVA:

Fisiología del fósforo.

El ión fosfato es muy lento en su desplazamiento en el

suelo y suele encontrarse en concentración baja (Bieleski, 1973), por tanto, es muy poco el fósforo total del suelo disponible para las plantas.

La captación de fósforo por la raíz origina una zona de deficiencia de este elemento alrededor de ella. Las hifas externas de la micorriza son capaces de crecer y desarrollarse más allá de esta zona de deficiencia, con lo que proporcionan a la raíz un incremento en sitios de absorción de fósforo y la capacidad de explorar un volumen mayor de suelo, superando los problemas de disponibilidad y deficiencia mencionados (Hayman, 1983)

La fisiología del P en micorrizas VA se puede dividir en tres fases: captación, transporte por las hifas y transferencia a las células hospedantes a nivel arbuscular.

La captación de P por las hifas fúngicas se puede describir en términos de los parámetros enzimáticos de Michaelis-Menten (Beevers y Burns, 1980).

Dos son las características que definen esta captación: gran afinidad en la absorción cuando la concentración de P en el suelo es baja, y una gran capacidad de captación debido al incremento de puntos absorbentes (consecuencia de una mayor área de captación) cuando existe disponibilidad del ión.

Se supone que la entrada del ión fosfato a la hifa se realiza por un mecanismo activo acoplado a la translocación de H^+ dependiente de una ATPasa de membrana (Smith y Smith, 1990).

El fósforo captado del suelo es transportado por las hifas fúngicas en forma de gránulos de polifosfato, osmóticamente inactivos. Estos gránulos de polifosfato, libres o incluidos en vacuolas, son formados por polifosfoquinasas específicas situadas en las hifas externas y viajan en dirección a la raíz movidos por corrientes citoplasmáticas (flujo + ciclosis) (Cappacio y Callow, 1982). Existe un mecanismo de control según la disponibilidad de P

en el suelo, mediante el cual se fija el P o se libera de los gránulos de polifosfato, en este mecanismo intervienen fosfatasa alcalina asociadas a las vacuolas del hongo (Gianinazzi-Pearson y Azcón-González, 1991).

Los gránulos de polifosfato no aparecen en la ramas finas arbusculares, lo que indica que han sido degradados previamente. El fosfato liberado y acumulado en el citoplasma fúngico, pasa de forma pasiva al apoplasto interfacial (Gianinazzi *et al*, 1979), de donde es captado por el hospedante mediante mecanismos activos dependientes de energía.

Fisiología del carbono.

Los compuestos carbonados requeridos por el hongo VA para su crecimiento y desarrollo son proporcionados por la planta hospedante y provienen de su actividad fotosintética. Alteraciones en el proceso de fotosíntesis repercuten en el desarrollo de la colonización VA (Hayman, 1974, Ocampo y Barea, 1982).

Los compuestos carbonados transferidos son metabolizados rápidamente por el hongo y convertidos fundamentalmente en lípidos y glucógeno (Cooper, 1984).

Aunque en un principio no se encontró trealosa ni manitol, en hongos VA, recientemente (Bécard *et al*, 1990), se ha detectado trealosa en esporas e hifas de hongos VA asociados a raíces. La transferencia de azúcares desde el hospedante se manifiesta en la desaparición de almidón de las células colonizadas, y se ha observado un incremento en actividad invertasa en raíces colonizadas (Dixon *et al*, 1988).

Todavía no está clara el proceso de intercambio de P y azúcares a nivel de la interfase arbuscular. Probablemente se trate de un transporte activo mediado por actividad ATPasa y

extrusión de H^+ , pero no se conoce con certeza la naturaleza de los azúcares transportados, la identidad de los transportadores, ni la estequiometría del proceso. En 1975, Woolhouse propuso un modelo según el cual la captación por el hongo de carbohidratos, provenientes del hospedante, está acoplada a la liberación de P por la hifa; y el mecanismo de intercambio es un sistema antipor azúcar-P.

Recientemente se propone un modelo según el cual el transporte de azúcares (sacarosa u otras hexosas) de la planta a la interfase es pasivo, al igual que el de P del hongo a dicha interfase. Mientras que el transporte de P y azúcares hacia la célula hospedante e hifa respectivamente se realizaría de forma activa y mediada por actividad ATPasa ligada a la extrusión de protones (Smith y Smith, 1990). También se ha propuesto un modelo de intercambio basado en un translocador de P y triosas fosfato unido a membranas, similar al existente en el cloroplasto.

Según este modelo el P proveniente de la hidrólisis de gránulos de polifosfato se acumula en la interfase y es translocado por triosas fosfato provenientes de la célula hospedante. La hidrólisis de estas triosas-P origina triosas no cargadas que son captadas de forma activa por el hongo y P transportado activamente hacia la planta. Los niveles de P y triosas-P de la matriz interfacial controlarían el funcionamiento de todo el sistema (Schwab *et al*, 1991).

Es complicado verificar los modelos postulados, sin embargo sí está claro que la micorrización altera la tasa fotosintética de la planta y provoca un incremento en la transferencia de fotosintato, representado por un incremento en la superficie de membrana celular y del flujo de fotosintato del simplasto al apoplasto radical. En estos efectos podrían intervenir de manera activa las hormonas vegetales, cuyos niveles se alteran en los tejidos vegetales colonizados (Allen, *et al*, 1982).

Captación de N y otros nutrientes.

Las plantas micorrizadas poseen una mejor nutrición nitrogenada que las plantas no micorrizadas. En el caso de plantas leguminosas noduladas, el efecto de las micorrizas sobre la nutrición nitrogenada parece estar mediado por la estimulación de la fijación simbiótica, ya sea por la mejor nutrición fosforada (Barea, 1990), por la captación de elementos limitantes de la fijación simbiótica, tanto Fe como Mo (Rai, 1988), o por el efecto directo sobre la actividad de los nódulos (Ames, 1987).

Se ha encontrado también un incremento en la captación de compuestos nitrogenados en plantas micorrizadas (Barea *et al.*, 1989a y b), posiblemente de amonio, por ser este un ión de poca movilidad en el suelo en comparación con el nitrato.

Estudios enzimológicos han puesto de manifiesto que la asimilación de amonio por micorrizas se debe a la actividad glutamina sintetasa/glutamato sintasa, aunque también se ha encontrado actividad glutamato deshidrogenasa (Smith 1990).

Otros nutrientes de baja movilidad en el suelo como Zn, Cu, S, K, Fe se han encontrado en concentraciones más altas en plantas micorrizadas respecto a no micorrizadas. Este efecto parece independiente al producido por una mejor nutrición fosforada (Cooper, 1984).

Se ha sugerido que las micorrizas poseen la capacidad de amortiguar los efectos de la alta concentración de los iones pesados en el suelo, protegiendo a la planta del efecto nocivo de los mismos (Koomen *et al.*, 1990).

La adquisición de Ca asociado a gránulos de polifosfato, posiblemente cumple un doble papel: 1) compensar la fuerte carga aniónica de los gránulos de poli-P, y 2) participar en la transferencia de P, por un lado estimulando las fosfatasas alcalinas (Gianinazzi-Pearson, 1978) y por otro participando en el mantenimiento de la integridad de las membranas

plasmáticas asociadas a la zona de transferencia de nutrientes.

También se ha sugerido que las micorrizas poseen mayor capacidad de captar aniones, tales como Br^- y Cl^- , necesarios en el mantenimiento del pH interno de la planta, la regulación del cual se hace de forma distinta en plantas micorrizadas (Buwalda *et al.*, 1983).

Alteración de las relaciones hídricas y resistencia a la salinidad

Las micorrizas vesículo-arbusculares alteran las relaciones hídricas de las plantas, confirmando a estas una mayor resistencia al stress hídrico y a la salinidad. Esta resistencia puede deberse a: la captación de agua por las hifas o al efecto indirecto dado por la mejor nutrición del vegetal (Cooper, 1984). También se especula con la posibilidad de una alteración fisiológica inducida en el vegetal que le confiere una mayor resistencia a la sequía y a los efectos nocivos de la salinidad.

Efectos fisiológicos no nutricionales

El balance hormonal en plantas micorrizadas se altera respecto a plantas no micorrizadas, tanto en cuanto a cantidad como distribución en los tejidos vegetales. La auxina posiblemente influya en la formación de arbusculos (Gunze y Hemessy, 1980) al igual que las citoquininas cuya actividad en hojas y raíz se incrementa en plantas micorrizadas (Allen *et al.*, 1980).

La alteración de los niveles de distribución de fitohormonas en plantas micorrizadas puede tener gran importancia en los procesos de compatibilidad estructural entre simbiosis así como en el crecimiento y desarrollo de

la planta como respuesta a la colonización fúngica.

Otros aspectos fisiológicos, dados por la mejor nutrición, causada por la micorrización, son: la protección frente al ataque de microorganismos patógenos y un mayor beneficio en la interacción con microorganismos beneficiosos del suelo (García-Garrido, 1987).

SUSCEPTIBILIDAD DE LAS PLANTAS A LA COLONIZACIÓN VA.

La susceptibilidad de las plantas a la micorrización VA va a depender de los siguientes aspectos:

-Que haya un reconocimiento entre simbioses. Esto implica una serie de interacciones entre planta y hongo.

- Que exista un nivel de compatibilidad de los genomas de ambos simbioses.

-Que exista un cierto grado de especificidad.

La especificidad en sentido estricto no existe en la asociación VA, tanto desde el punto de vista del hongo como de la planta. Un mismo sistema radical puede ser colonizado simultáneamente por varias especies fúngicas y alternativamente, un mismo hongo puede colonizar simultáneamente raíces de varias especies vegetales (Harley y Smith, 1983).

Hay especies vegetales que no son susceptibles de micorrizarse (Harley y Harley, 1987; Newman y Reddell, 1987) y dentro de las susceptibles, distintas especies, e incluso distintas variedades de una misma especie, pueden mostrar un grado diferente de susceptibilidad (Azcón y Ocampo, 1981).

En un mismo sistema radical también hay variación en cuanto a susceptibilidad, pues hay raíces del sistema que se colonizan y otras no (Harley y Smith, 1983).

Factores como el poder colonizador del hongo y la dependencia de la planta de la micorrización van a incidir en

la susceptibilidad de la planta (Anderson, 1988). Sin olvidar que las condiciones ambientales tienen también influencia en el desarrollo de la simbiosis micorriza VA.

El nivel de colonización VA que puede soportar una planta hospedante viene definido por su genotipo y por el del hongo colonizador, pues distintas especies fúngicas difieren en su grado de colonización sobre un mismo hospedante (Lackie *et al*, 1987). De igual modo la compatibilidad en la asociación micorriza VA no es resultado de un simple proceso de reconocimiento, ni va a depender de la acción de un solo gen, sino que va a depender de una serie de interrelaciones complejas entre simbiosites. La diversidad de tipo y efectividad de las micorrizas VA apoyan esta idea (Anderson, 1988); al igual que el hecho del dinamismo de la asociación y su complejidad.

Reconocimiento y compatibilidad en el exterior de la raíz.

A nivel de la rizosfera pueden tener lugar procesos encaminados a promover el contacto hongo planta y facilitar así la formación de la simbiosis. En esta zona del suelo el desarrollo de microorganismos, cuya acción influye directa o indirectamente sobre la planta, esta potenciado por la propia raíz. Algunos de estos microorganismos ejercen una acción activadora de la germinación de esporas de hongos VA (Azcón-Aguilar., 1986), y afectan positivamente el desarrollo del micelio (Vidal Domínguez, 1991).

No existen indicaciones claras de que las raíces de la planta influyan en la germinación y desarrollo de micelio de hongos VA mediante mensajeros químicos. Estos mensajeros pueden ser exudados solubles ó volátiles, y ejercerían una acción de proliferación y ramificación de los tubos germinativos (exudados solubles) (Phillips y Tsau, 1990) y una atracción de los mismos hacia la raíz (exudados

volátiles) (Koske, 1982). A continuación de la atracción de los tubos germinativos se produce un incremento rápido de la ramificación de las raíces de la planta en respuesta a un simple contacto, sugiriendo que la respuesta esta mediada por un mensajero asociado a la superficie del tubo germinativo. La estimulación de la producción de raíces originaría nuevos sitios potenciales de colonización (Glenn *et al*, 1988; Gemma y Koske, 1988). Queda todavía mucho por aclarar sobre la naturaleza y papel que juegan los exudados radicales en los procesos de colonización de la raíz por hongos VA. Uno de los compuestos importantes en los fenómenos de reconocimiento en plantas son los fenoles, de los cuales sin embargo no hay estudios de su participación en los procesos de micorrización a nivel de la rizósfera.

A nivel del rizoplano el hongo puede formar un apresorio sobre la raíz y penetrarla, o bien puede necesitar de un crecimiento en la superficie de la misma antes de penetrar. No se ha descrito adhesión o unión estrecha entre la hifa y la pared del hospedante (Gianinazzi-Pearson, 1984). Sin embargo cuando se establece contacto entre células, la penetración de la raíz va precedida por la formación de un haustorio, más o menos definido, indicando un reconocimiento celular en esta etapa inicial de formación de la micorriza (Bonfante-Fasolo, 1984). Por otro lado, este contacto inicial origina un crecimiento acelerado del micelio del hongo (Glenn *et al*, 1988; Becard y Piché, 1989), lo que apoya la idea del intercambio de señales de reconocimiento en estas primeras etapas.

La mayor parte de las penetraciones de la raíz tienen lugar a pocos mm del extremo apical, pero una ramificación de la hifa de penetración puede colonizar una zona de la raíz lejana a la apical (Glenn *et al*, 1985). Esto sugiere que la penetración del extremo apical posibilita la penetración de una zona de la raíz que antes no respondió a la colonización.

Definir las zonas de iniciación de colonización es imprescindible en el estudio de la susceptibilidad, ya que factores como producción de exudados y organización de pared celular varían a lo largo de la raíz, y son factores implicados en dicha susceptibilidad.

Un componente de la superficie de la pared celular vegetal, las lectinas, participan activamente en los procesos de reconocimiento planta-microorganismos (Anderson, 1988), sin embargo no hay muchos estudios que apunten a la participación de estos compuestos en el reconocimiento de hongos VA. Tan solo se ha observado, que las aglutinas (lectina específica para N-acetilglucosamina) se une a la pared celular del hongo VA *Glomus fasciculatum* (Bonfante-Fasolo, 1982).

Desarrollo del hongo en la raíz.

Tras la penetración del hongo en la raíz hospedante, por los mecanismos ya mencionados, se desarrolla en ella de forma intercelular e intracelular, con la formación de las estructuras e interfases también descritas anteriormente.

No está aclarado el mecanismo de penetración intracelular de las hifas fúngicas en las células hospedantes. Se han establecido diferentes hipótesis al respecto (Harley, 1986):

- Penetración mecánica de las células hospedantes.
- La penetración solo ocurre en células con pared celular en formación y las hifas previenen la polimerización de los precursores de pared.
- En la penetración de células hospedantes participan enzimas líticas capaces de desorganizar y permeabilizar la pared celular hospedante.

La primera hipótesis por si sola no puede explicar el proceso de penetración, ya que es un mecanismo inespecífico

no compatible con el estado evolutivo de la simbiosis. Sirva como ejemplo el hecho de que el hongo no penetra por heridas producidas en las raíces (Harley y Smith, 1983).

Con respecto a la segunda hipótesis, hay que considerar el hecho de que la pared del ápice de la hifa en desarrollo está en contacto con la matriz interfacial, la cual se compone de proteínas y polisacáridos provenientes del hospedante, similares a los de la pared celular primaria por lo que se piensa que son paredes en desarrollo (Bonfante-Fasolo, 1984), y la hifa previene que estos compuestos polimericen y lleguen a formar la pared (Harley, 1986). Sin embargo, una vez que la hifa ha penetrado la raíz tiene un desarrollo longitudinal en dirección tanto acrópeta como basípeta, independientemente del estadio en que se encuentren las paredes celulares de la raíz. Por otro lado, tanto circunvoluciones como arbúsculos tienen un período de vida corto y después de su desaparición la misma célula hospedante puede ser invadida de nuevo y desarrollar otra circunvolución o arbúsculo (Bonfante-Fasolo, 1984).

La participación de enzimas hidrolíticas de pared en los procesos de penetración del hongo en las células hospedantes es un tema difícil de resolver debido a las características simbióticas de la asociación micorrízica. La compatibilidad de la simbiosis supone un gran control de la producción de estas enzimas que deben ser segregados a bajo nivel y afectar de forma muy localizada la pared celular con el fin de no dañar de forma grave dicha pared, lo que originaría una respuesta de rechazo de la planta. Se ha comprobado que estructuras fúngicas poseen actividad pectinásica (García Romera *et al.*, 1991), y mediante pruebas indirectas se ha observado que las pectinasas pueden estar involucradas en los mecanismos de penetración de hongos VA (García Romera *et al.*, 1990). Existen otras evidencias indirectas de la participación de enzimas hidrolíticos en los procesos de

penetración, ya que observaciones al microscopio electrónico han puesto de manifiesto que la penetración parece llevar consigo alguna degradación del material del hospedante que sugiere la existencia de una destrucción enzimática de la pared celular. La existencia de restos de laminilla media en las zonas donde se desarrollan las hifas intercelulares sugieren la existencia de una acción enzimática sobre la pared celular (Bonfante-Fasolo, 1984; Kinden y Brown, 1975).

Control del desarrollo de la colonización VA.

Durante el desarrollo del hongo en la raíz del hospedante tienen lugar una serie de modificaciones anatómico-fisiológicas que afectan a componentes celulares de ambos simbioses y cuya consecuencia es la creación de una asociación compatible a nivel celular y funcional. Las paredes celulares tanto fúngica como vegetal participan de modo activo en el desarrollo de estructuras compatibles. La pared fúngica, relativamente gruesa y quitinosa, se va haciendo más delgada y desorganizada, llegando incluso a alcanzar un alto grado de simplificación en las ramas más finas del arbusculo, que es donde se centra fundamentalmente la fisiología de la simbiosis. De igual forma la pared vegetal se adapta a la situación simbiótica, principalmente en la zona de contacto intracelular donde desaparece como tal y aparece una matriz interfacial fibrosa cuyos componentes son sintetizados por el hospedante como respuesta a la colonización. Estos componentes varían en su disposición a lo largo de las ramas arbusculares y se sugiere que pueden servir como fuente carbonada suplementaria para el hongo VA (Schwab *et al*, 1991).

Por otro lado se han apreciado modificaciones inducidas en el hospedante a nivel de alteraciones en el ritmo de mitosis y por tanto del ciclo celular (Fusconi *et al*, 1986) y

de organización de orgánulos celulares: plastidios, núcleo y organización de cromatina, vacuolas y membranas (Fusconi *et al.*, 1986; Bonfante-Fasolo, 1987). Una modificación importante es el desarrollo de membrana plasmática alrededor de las ramas arbusculares con incremento en actividades enzimáticas, principalmente fosfatasa y ATPasa, importantes para explicar el intercambio de nutrientes a este nivel.

Todas estas modificaciones son el resultado de un permanente diálogo entre los genomas de los dos simbioses y consecuentemente origina en su integración morfológica y compatibilidad funcional, requisitos imprescindibles para el éxito de la asociación.

Trabajos recientes han puesto de manifiesto cambios en la expresión proteica durante el establecimiento de la simbiosis ectomicorrizica (Hilbert y Martín 1988).

En la simbiosis MVA también se han puesto de manifiesto proteínas asociadas al estado simbiótico (Dumas *et al.*, 1989). Incluso se han encontrado polipéptidos específicos de la simbiosis MVA que tienen reacción inmunológica cruzada con nodulinas. (Wyss *et al.*, 1990). Por otro lado, plantas mutantes espontánea o químicamente ofrecen resistencia genética a formar micorrizas VA. La expresión del carácter *myc*⁻ parece estar asociado con el carácter *nod*⁻ y al menos 3 genes intervienen en la colonización VA (Duc *et al.*, 1989).

Todas estas investigaciones no son más que el primer paso del estudio de las interacciones moleculares de identificación de genes responsables del diálogo entre simbioses en micorrizas. Sin embargo la dificultad es grande pues no es posible disponer del hongo en cultivo puro y menos aún de disponer de su material genético en condiciones óptimas de manipulación.

Desde el punto de vista del control de la colonización por parte de la planta, un tema estudiado en los últimos años ha sido la posibilidad de que el hongo VA provoque en la

planta una respuesta de defensa, al igual que la provovan otros microorganismos o situaciones de stress. Los mecanismos de defensa de la planta son generalmente de tres tipos: estructurales, químicos y enzimáticos. Desde el punto de vista estructural no se han encontrado indicios de que sustancias como callosa y suberina, importantes en el control de la infección fúngica en general, participen en el control del hongo VA. Tampoco existen evidencias de que la extensina, proteína estructural de la pared celular vegetal, participe en el control de la colonización fúngica.

Se han estudiado algunas defensas químicas de la planta, tales como la producción de fenoles y fitoalexinas. Sin embargo, no se han encontrado diferencias en el tipo y cantidad de fenoles en plantas micorrizadas y no micorrizadas, y tampoco fue diferente la actividad fenil-amonio-liasa (Codignola *et al.*, 1989). Nunca se ha encontrado fenoles en la matriz interfacial.

Por otro lado, se ha puesto de manifiesto la producción de una fitoalexina (gliceolina) en la asociación VA, aunque a niveles muy bajos y en estadios avanzados de la colonización de la raíz (Morandi *et al.*, 1984). Sin embargo, no se ha detectado la presencia de esta fitoalexina en los estadios iniciales y jóvenes de la colonización de la raíz por hongos VA (Wyss y Wiemken, 1988).

Respecto a los mecanismos enzimáticos de defensa de la planta, recientemente se ha encontrado que proteínas asociadas al estado de simbiosis VA poseen reacción cruzada con proteínas relacionadas con la patogénesis (Dumas *et al.*, 1990).

El estudio de la alteración en la actividad de peroxidasa, marcador bioquímico de interacciones planta-patógenos, ha demostrado que hay un incremento de actividad en la planta micorrizada, en los primeros estadios de colonización, cuando el hongo es principalmente intercelular.

Cuando el hongo penetra las células hospedantes y se establece totalmente la colonización, la actividad peroxidasa es similar a la de plantas no colonizadas (Spanu y Bonfante-Fasolo, 1988).

La actividad quitinasa parece tener un comportamiento similar, y se localiza en los espacios intercelulares, en las vacuolas y alrededor del hongo, pero no en la pared celular fúngica.

Otro mecanismo de control del desarrollo fúngico por parte de la planta es la regulación del flujo de carbono hacia el hongo. La formación de micorrizas requiere de un cierto nivel de nutrientes en las células corticales. La exudación de nutrientes, incrementada cuando se reduce el fosfato en la planta, favorece la micorrización (Graham *et al.*, 1981). La micorrización, con la consecuente mejor nutrición fosforada de la planta, limitaría la permeabilidad de las membranas y disminuiría el flujo de carbono hacia el hongo. Sin embargo se supone que los hongos VA pueden favorecer de forma más directa los intercambios de nutrientes a nivel del plasmalema (Anderson, 1988). La energía necesaria para estos procesos de intercambio la puede proporcionar la ATPasa de membrana de la planta, cuya participación en el intercambio de nutrientes esta demostrada (Marx *et al.*, 1982). La auxinas y otras hormonas producidas por el hongo pueden afectar estos procesos de intercambio, de forma directa o mediada por la alteración del pH. La alteración del pH en las interfases de contacto hongo-planta podría ser un mecanismo regulador del metabolismo de la simbiosis (Anderson, 1988).

INTERACCIONES ENTRE MICORRIZAS Y OTROS MICROORGANISMOS DEL SUELO

EFECTO MICORRIZOSFERA

Cuando los hongos responsables de la micorrización ocupan el cortex radical, las alteraciones fisiológica que producen en el hospedante y la presencia de sus hifas en el entorno, modifican física y químicamente la rizósfera, originando un nuevo ambiente, con características propias, designado como "micorrizósfera" (Rambelli, 1973).

La creación de esta micorrizósfera establecerá un nuevo equilibrio microbiano, producto de la interacción metabólica directa de los microorganismos con las hifas del hongo micorrízico, o por efectos indirectos dados por la planta hospedante.

Los estudios realizados sobre interacciones entre hongos micorrízicos y microflora del suelo, han intentado evaluar las respuestas de la planta a inoculaciones microbianas dentro del fenómeno micorrizósfera.

Dentro de los cambios fisiológicos que acompañan el desarrollo de la micorrización, la alteración de la permeabilidad de la membrana es, sin duda, el de mayor impacto sobre los microorganismos del suelo (Graham *et al.*, 1981).

La permeabilidad de la membrana disminuye a consecuencia de la mejora en la nutrición fosforada (Ratnayake *et al.*, 1978), alterando así la cantidad y calidad de los exudados radicales (Schwab *et al.*, 1983), que afectarán la microflora rizosférica (Curl y Truelove, 1986).

Un componente clave de la micorrizósfera es la presencia de hifas micorrízicas extramatriciales, aún a cierta distancia del hospedante (Berthlenfalvai y Ames, 1987; Graham *et al.*, 1982). Estas hifas extienden la micorrizósfera mucho más allá.

de los límites de la rizósfera de raíces no micorrizadas (Rhodes y Gerdemann, 1978).

INTERACCIONES EN LA MICORRIZOSFERA

Varios autores han reportado diferencias cuali y cuantitativas entre las poblaciones de hongos, actinomicetes y bacterias de suelos micorrizados y no micorrizados (Katznelson et al., 1962; Neal et al., 1964; Neal et al., 1968).

Meyer y Linderman (1986), sin embargo, no observaron diferencias cuantitativas en el total de bacterias de suelos rizosféricos y micorrizosféricos, aunque sí encontraron cambios cualitativos: en la micorrizósfera aumentaban los microorganismos anaerobios facultativos y disminuían las *Pseudomonas* fluorescentes.

Estos cambios cualitativos pueden ser muy importantes para la planta, cuando involucran fijadores de N₂ o fosfobacterias.

Se cree que otros grupos funcionales que afectan el crecimiento vegetal también podrían aumentar su número en la micorrizósfera: productores de hormonas, vitaminas, sideróforos y aún patógenos radicales (Meyer, 1985).

Bagyaraj y Menge (1978) encontraron un incremento de las poblaciones de bacterias y actinomicetes en la rizósfera de plantas inoculadas con *Azotobacter* o MVA. Además, observaron que la inoculación conjunta de estos dos microorganismos aumentaba el crecimiento de la planta.

Estudios posteriores han demostrado que la inoculación dual MVA - bacterias beneficiosas, ya sean bacterias fijadoras de nitrógeno (Bagyaraj y Menge, 1978; Barea et al, 1983; Subba Rao et al, 1985; Tilak, 1985), solubilizadoras de P (Raj et al, 1981; Azcon Aguilar y Barea, 1978) o promotoras del crecimiento (Burr y Caesar, 1983; Meyer y Linderman,

1986), produce un efecto positivo sobre el crecimiento del hospedante.

Otros trabajos recogen efectos beneficiosos de la inoculación de bacterias sobre el desarrollo de plantas micorrizadas (Barea *et al*, 1983; Mayo *et al*, 1986), sin establecer las razones de este resultado. No se descarta que las bacterias utilizadas interaccionen a más de un nivel metabólico.

Las observaciones de Azcon y colaboradores (1978), parecen indicar que el efecto positivo de la inoculación conjunta de hongos VA con bacterias fijadoras de N₂ o fosfobacterias, sería el resultado de la producción bacteriana de fitohormonas, aunque también debe considerarse un efecto mediado por la planta a través de una mayor exudación radical (Azcón-Aguilar y Barea, 1985).

A la vista de estos resultados, De Oliveira y Garbaye (1989), introdujeron el concepto de **microorganismos auxiliares** de la micorrización, al considerar aquellos microorganismos con efecto sinérgico positivo sobre la simbiosis VA. Es importante detectar estos organismos auxiliares para manipularlos en favor de la micorrización VA, ya que la pérdida de organismos auxiliares puede ser tan grave como la pérdida del mismo hongo micorrizico

Si bien los estudios antes mencionados hablan de un efecto favorable de la inoculación de bacterias sobre la micorrización o crecimiento vegetal que deriva de ésta. Davey (1971), en su revisión, menciona la existencia de bacterias que podrían tener un efecto negativo sobre el desarrollo de la micorrización. De la misma forma, Krishna y colaboradores (1982) encontraron que *Streptomyces* tenía un efecto supresivo sobre la formación de micorrizas, y su respuesta en la planta. Esto sugiere que muchos fracasos en el establecimiento exitoso de la micorrización, pudieran deberse a competencia microbiana y supresión de la micorrización.

Dentro de los trabajos sobre interacción MVA-bacterias, algunos estudios se han centrado en la posible resistencia de plantas micorrizadas a la acción de bacterias patógenas.

Algunos resultados obtenidos son realmente alentadores: la inoculación de hongos VA logró disminuir la severidad de la enfermedad causada por *Pseudomonas solanacearum* en tomate (Halos y Zorrilla, 1979). Así mismo, la micorrización de plantas de tomate con *Glomus mosseae* antes o al mismo tiempo que su inoculación con las bacterias patógenas *Erwinia carotovora* y *Pseudomonas syringae*, resultó la protección de la planta contra la enfermedad, a la vez que provocó una disminución de las poblaciones de las bacterias patógenas en la micorrizósfera (García-Garrido y Ocampo, 1987, 1988 y 1989).

En los últimos años, se ha estudiado la influencia de distintos factores sobre el desarrollo "in vitro" de los hongos responsables de la micorrización VA, con el fin de lograr su crecimiento independiente (Azcon-Aguilar *et al.*, 1991; Hepper, 1984; Siqueira, 1987).

En muchos casos el problema del desarrollo *in vitro* de estos hongos se plantea desde la misma germinación, que puede ser baja, errática y frecuentemente muy lenta (Daniels y Graham, 1976; Hardie, 1985; Hepper y Smith, 1976).

Se han investigado factores físicos, químicos y biológicos, y, entre estos últimos, la estimulación que los microorganismos rizosféricos pudieran ejercer sobre la germinación y desarrollo saprofitico de esporas VA, ya que la germinación de éstas frecuentemente aumenta en placas contaminadas con hongos o bacterias.

Los primeros datos fueron aportados por Mosse (1959) y Mejstrik (1965). Mas tarde, Daniels y Trappe (1980) y Barea y Azcon-Aguilar (1982) destacaron la estimulación directa que la microbiota del suelo parecía ejercer sobre los estadios saprofiticos preinfectivos de *G. mosseae*.

Placas contaminadas con *Streptomyces orientalis* presentaban una mayor tasa de germinación de esporas, aparentemente a través de algún compuesto volátil no identificado, producido por este actinomicete (Mugnier y Mosse, 1987).

Mosse (1959) y Daniels y Trappe (1980) explicaron de forma opuesta la unánimemente reconocida reducción de la germinación y crecimiento hifal de *Gigaspora spp.* en medio estéril (Wilson, 1984). Mientras la primera atribuye el efecto a la falta de sustancias estimulantes producidas por la microflora, los segundos sostienen que ésta actuaría metabolizando autoinhibidores en la espora. Una tercera hipótesis prescinde del efecto-microorganismo, atribuyendo la inhibición a un exceso de nutrientes resultante de la esterilización (Wilson, 1984).

Becard y Piché (1989), al considerar el efecto de exudados y volátiles radicales sobre el crecimiento saprófito de hifas MVA, encontraron una fuerte estimulación de la elongación hifal por CO₂.

Esta dependencia de CO₂ mostrada por *Gigaspora margarita* parece lógica, considerando que la mayoría de las reservas de C en esporas MVA está como lípidos (Beilby, 1980; Jabaji-Hare, 1988).

En general los exudados radicales influyen sobre el crecimiento hifal y la colonización VA (Azcón y Ocampo, 1984; Ferguson y Menge, 1982; Graham *et al.*, 1981), aunque no mejoran la germinación de esporas.

Por lo tanto, aunque el efecto CO₂ también puede ser la razón de la estimulación del crecimiento saprofítico por algunos microorganismos (Vidal-Domínguez, 1991), éstos parecerían actuar además a otros niveles aún no estudiados.

Interacciones MVA - Hongos patógenos

Si bien la bibliografía ofrece un número considerable de trabajos sobre la interacción entre hongos VA y bacterias, la información sobre la interacción hongos VA - hongos del suelo se ha orientado fundamentalmente al estudio de patógenos de plantas y síntomas de la enfermedad en el hospedante.

Los últimos años han mostrado un creciente interés de los investigadores por demostrar el potencial de las micorrizas en el control de enfermedades.

Los resultados obtenidos hasta ahora son muy diversos, aún para un mismo patógeno: mientras plantas de soja micorrizadas con *Glomus caledonium* o *G. mosseae* fueron más resistentes a *Phytophthora megasperma* (Chou y Schmitthenner, 1974; Woohead *et al.*, 1977), este patógeno provocaba un daño mayor en plantas colonizadas con una especie clamidospórica de Endogonaceae, llegando a matar hasta un tercio de las plantas micorrizadas (Ross, 1972). El gran tamaño de las esporas del endofito utilizado (probablemente *Glomus*) dañaría la raíz haciéndola más susceptible al patógeno.

En el caso de *Phytophthora parasítica*, la micorrización VA parecía proteger de la enfermedad a plantas de cítricos, alfalfa y palta, sólo a bajas concentraciones del patógeno (Davis *et al.*, 1978).

Finalmente, no se observó interacción entre MVA y *Phytophthora fragaria* en *Fragaria vesca*, ni entre el endofito y *Phytophthora palmívora* en papaya (Baath y Hayman, 1984; Ramirez, 1974).

Similar variedad de resultados han podido observarse en la combinación hongos VA - *Phytophthora cinnamomi* (Bartschi *et al.*, 1981; Davis *et al.*, 1978; Matare y Hatting, 1978).

Los resultados de la micorrización VA sobre *Fusarium oxysporum*, parecen depender del endofito inoculado. La micorrización de plantas de tomate con *Glomus etunicatum*

aumenta la penetración y desarrollo del patógeno (Mac Graw y Schenck, 1981), mientras que *G. mosseae*, *Glomus intraradices*, *Glomus fasciculatum* y *Glomus tenuis* reducen la severidad de la infección, cualquiera sea el nivel de la población de *F. oxysporum* (Chakravarty y Mishra, 1986). Esta tolerancia al marchitamiento, estaría dada por un aumento de la lignificación radical en plantas micorrizadas (Dehne y Schonbeck, 1975).

G. intraradices afectó la población de *F. oxysporum*, con distinta intensidad según el sustrato en el que se inocularon (Caron *et al.*, 1985).

La colonización VA de raíces de cebolla y cebada aumenta su resistencia al ataque de *Pyrenochaeta terrestris* en un caso y *Bipolaris sorokiniana*, en el otro, siempre que la población del patógeno sea baja (Becker, 1976; Boyetchko y Tewari, 1990). En ambos casos el efecto observado parece ser el resultado de una acción directa de las micorriza VA sobre el hongo patógeno.

Plantas micorrizadas resultaron más resistentes al stress provocado por *Thielaviopsis basicola*, a la vez que inhibieron la producción de clamidosporas por el patógeno (Baltruschat y Schonbeck, 1975; Tosi *et al.*, 1988).

El ataque de *Verticillium dahliae* en algodón fue mas severo en plantas micorrizadas, probablemente debido a mayor aporte de P provocado por el hongo VA (Davis *et al.*, 1979).

En tomate, en cambio, la colonización VA no mostró efecto alguno sobre *Verticillium* (Baath y Hayman, 1983).

Cuando endofitos VA se inocularon antes o junto con *Sclerotium rolfsii*, *Phytium ultimum*, *cylindrocarppon destructans* y *Cochliobolus sativus*, fueron capaces de reducir la intensidad de la enfermedad, incrementando significativamente la supervivencia de las plantas (Dehn y Dehne, 1986; Krishna y Bagyaraj, 1983).

En un trabajo reciente, Goncalves y colaboradores (1991)

observaron que la inoculación de *Glomus macrocarpa* en plantas de *Vicia faba* retrasaba la aparición de los síntomas de la enfermedad provocada por *Fusarium solani*. Ambos hongos competirían por los mismos sitios de infección en la raíz, siendo dominante aquel que primero coloniza el tejido, en este caso el endofito VA (Muchovej et al., 1991).

Interacción MVA - Hongos saprófitos

Sigue siendo deficiente la información sobre la interacción entre hongos responsables de la micorrización y hongos no patógenos de la rizósfera.

A pesar de ello, son muy pocos los investigadores que han enfrentado estos dos organismos en la rizósfera del hospedante.

Uno de los primeros trabajos en este sentido fue el de Paget (1975), quien comprobó que la inoculación conjunta de *Cylindrocarpon destructans* y *Endogone* producía un aumento en el peso seco de plantas de *Fragaria*, aun cuando el saprófito disminuía el porcentaje de micorrización de la raíz. Paget basó estos resultados en la capacidad de *Cylindrocarpon* de solubilizar P.

Aunque se tiende a pensar, debido a su fama de excelente antagonista, que *Trichoderma spp* tiene un efecto negativo sobre los hongos formadores de micorrizas VA (Camporota, 1985; Chu Wu, 1981, Cook y Baker, 1983), Calvet (1990) encontró que la inoculación dual *Trichoderma aureoviride* - *Glomus sp.* incrementaba el porcentaje de infección VA y el crecimiento de plantas de *Tagetes erecta*.

Es posible que el efecto de los hongos saprófitos sobre la infección VA se dé en la fase extramatricial, minimizándose con el tiempo, una vez que la infección se desarrolla dentro de la raíz hospedante.

Hepper (1979) observó que la actinomicina-D, inhibidor

específico de mRNA, provocaba la emisión de tubos de germinación muy poco ramificados, a partir de esporas de MVA germinadas "in vitro".

La inoculación de *Penicillium decumbens* y *Aspergillus fumigatus* provocaron un efecto similar en esporas de *Glomus mosseae*, lo que podría sugerir que estos saprófitos serían productores de antibióticos (Calvet, 1990).

Estos hongos también resultaron inhibidores de la infección VA en plantas de *Tagetes erecta* al inocularse en su sustrato original (Calvet, 1990).

Anteriormente se describieron inhibiciones de las micorrizas VA en suelo no esterilizado (Wilson et al, 1989), aunque pocos hongos saprófitos se ensayaron como agentes inhibidores identificados y de origen conocido.

Sylvia y Schenk (1983) describieron un efecto negativo significativo de algunos contaminantes de los géneros *Fusarium*, *Penicillium*, y *Trichoderma*, sobre la germinación de *Glomus clarum*, aunque no distinguían cual era el efecto concreto de cada hongo.

Calvet (1990), trabajando con varias especies saprófitas aisladas de composts, obtiene las tasas más altas de germinación de esporas de *Glomus*, con 4 cepas de *Trichoderma*, y las más bajas las observa en placas inoculadas con *Aspergillus fumigatus*.

Además de acelerar la germinación de esporas VA, algunos hongos del suelo serían capaces de aumentar el crecimiento hifal y la producción de esporas vegetativas (Azcón-Aguilar et al, 1986 a y b).

En un estudio reciente, la inoculación de semillas de leguminosa con células de levaduras vivas o muertas provocaba un aumento significativo de la colonización endofítica de raíces. Tanto la infección VA, como el número de vesículas, arbuscúlos y esporas en rizósfera era mayor cuando se inoculaban células vivas (Singh et al, 1991).

St. John y colaboradores (1983) sostienen que la micorrización VA es estimulada por un compuesto volátil, posiblemente etileno, producto de la microflora fúngica.

Vidal-Domínguez (1991) plantea un posible efecto del CO₂ en los resultados obtenidos en la germinación de esporas de *G. mosseae* en presencia de *Acremonium curvulum* y *Phoma lavellei*.

Aunque existen pruebas de la estimulación o inhibición del desarrollo del hongo VA, en condiciones axénicas, por hongos saprófitos, no existen, como se ha mencionado anteriormente, trabajos que estudien la interacción entre estos dos microorganismos a nivel de la rizósfera.

OBJETIVO E INTERES

OBJETIVO E INTERÉS DEL TRABAJO

El hombre se enfrenta actualmente con importantes retos a su capacidad de reacción: mayor producción de alimentos para sostener una población en constante crecimiento, protección del medio ambiente, y racionalización del uso de las reservas no renovables.

El incremento en el rendimiento de la producción agrícola ha ido unido a un consumo exponencial de las fuentes de energía, especialmente el petróleo, utilizado en la fabricación de pesticidas y fertilizantes, prácticas agrícolas y manejo de los alimentos obtenidos.

La mayoría de los suelos no poseen cantidades suficientes de fósforo asimilable para mantener un adecuado crecimiento de las plantas. Más aún, muchos suelos son fijadores de fosfato, condicionando la obtención de cosechas óptimas a la aplicación de dosis considerables de fertilizantes fosforados.

Las micorrizas VA, simbiontes mutualistas de las raíces de la mayoría de las plantas, poseen un micelio altamente eficaz en la búsqueda, captación y translocación de fosfato hacia la planta, de manera tal que, un correcto uso de la micorrización puede representar un ahorro decisivo en fertilizantes fosforados. Esto implica importantes beneficios económicos, si tenemos en cuenta que sólo el 25 % del fertilizante fosforado es absorbido por la cosecha en el año de aplicación, siendo el resto rápidamente fijado por algunos componentes del suelo que lo convierten en formas no disponibles inmediatamente para la planta.

Es por esto que las MVA tienen un gran potencial de aplicación en agricultura intensiva en áreas donde la sequía o la deficiencia de nutrientes determinan que el establecimiento del cultivo signifique un alto costo

económico y/o ecológico.

A pesar de las ventajas que ofrece la micorrización sobre la fertilización tradicional, su aplicación intensiva aún está limitada por la imposibilidad de producir inóculo a gran escala, así como por la falta de una adecuada tecnología para su aplicación.

Se considera, sin embargo, que aún superada esta importante limitación, la aplicación y manejo de hongos VA sólo será posible cuando se comprendan completamente las interrelaciones entre estos hongos, los exudados radicales y los microorganismos no simbióticos de la rizósfera.

Parece existir cierta actividad entre los hongos responsables de la micorrización VA y otros microorganismos comunes en la rizósfera, que puede afectar el crecimiento de la planta en condiciones experimentales y naturales. Cualquiera de estos efectos involucraría la fase externa del endofito en forma directa, en tanto que la parte interna, en estrecho contacto con el hospedante sólo sería afectada indirectamente, a través de la planta.

Estas interacciones pueden resultar en fenómenos de antagonismo o sinergismo, según la formación y actividad de las MVA.

Por esto, es importante identificar las cepas beneficiosas para cada situación de crecimiento, verificando su compatibilidad y eficiencia combinada con el objeto de poder emplearla en condiciones agrícolas reales, como una forma de optimizar la inoculación de las micorrizas VA.

No es exagerado considerar la pérdida de estos microorganismos auxiliares, tan grave como la pérdida del mismo endofito VA.

Estos microorganismos pueden jugar un papel aún más importante en aquellas situaciones de invernadero en donde se requiere una desinfección del suelo previa a la inoculación de MVA. En estos casos la introducción simultánea de

microorganismos auxiliares puede ser la base de un resultado satisfactorio, ya que colonizadores seleccionados y eficaces cubrirían el vacío biológico creado por la desinfección.

Es también un objetivo importante el aislamiento e identificación de microorganismos inhibidores de la micorrización, así como de las condiciones en que esta inhibición se produce, con el fin de evitar posibles fracasos en el establecimiento de la simbiosis hongo-raíz.

Es evidente la imposibilidad de controlar la composición microbiana total de la rizósfera, dada la naturaleza estocástica de la infección de nuevas raíces. Sin embargo, sí parece posible controlar la población de ciertos microorganismos particulares, en especial aquellos que permitan un aumento de la población de simbioses beneficiosos.

La presente tesis es un aporte al conocimiento de la micorrizósfera, a través del estudio de la interacción de hongos responsables de la micorrización VA, y cepas aisladas e identificadas de hongos saprófitos frecuentes en la rizósfera y el rizoplano de plantas hospedantes y no hospedantes.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

1. PARTE GENERAL

1.1. Aislamiento de hongos saprófitos de rizósfera y rizoplano de plantas de maíz y *Brassica*

El aislamiento de estos hongos se realizó mediante el lavado de muestras de suelo y raíz de las plantas mencionadas, en un aparato diseñado por Widden y Bisset (1972). Este aparato se compone de varios tubos acrílicos, divididos en 3 secciones mediante filtros sucesivos de malla metálica y luz decreciente del superior al inferior.

Las muestras, de aproximadamente 5 gr de suelo rizosférico o raíz (peso fresco), se colocaron en el compartimento superior de cada tubo.

Los tubos acrílicos se llenaron de agua estéril, haciéndose burbujear intensamente las muestras con aire durante 3 minutos. Al cabo de este tiempo, los tubos se vaciaron y se completaron nuevamente con agua estéril.

Esta operación se repitió 30 veces, cantidad de lavados necesarios para eliminar completamente la contaminación superficial, según una curva de lavados realizada previamente.

En total se lavaron 4 muestras de suelo y 8 muestras de raíz de cada planta.

Luego del último lavado, las muestras se pusieron a secar en cajas de Petri con papel de filtro estéril.

Para el suelo rizosférico se obtuvieron en cada caso 3 submuestras, correspondientes a los distintos tamaños de partícula retenidos en las mallas metálicas.

Una vez secos, el suelo y las raíces se traspasaron esterilmente a cajas de Petri con medio nutritivo MEA + antibióticos (estreptomycina y tetraciclina) según el siguiente procedimiento:

Suelo: Pequeñas partículas de suelo se colocaron directamente sobre el agar nutritivo, en los extremos de un cuadrado imaginario.

Se sembraron 4 cajas de Petri por cada uno de los tres tamaños de partícula obtenidos.

Raíces: Los segmentos de raíz lavados se esterilizaron superficialmente antes de sembrarse en las cajas.

El método de esterilización utilizado fué:

- 1 min. en etanol:agua 1:1 (V/V)
- 2 min. en lavandina:agua 1:2(V/V)
- 1 min. en etanol 95 %

Una vez esterilizados estos segmentos se cortaron en fragmentos de unos 3 mm de longitud y se sembraron sobre el medio MEA, según el diseño usado para las partículas de suelo.

Las cajas de Petri se incubaron a 28 °C durante 5 días, al cabo de los cuales, los hongos crecidos a partir de las partículas sembradas se repicaron esterilmente en tubos de ensayo con MEA en pico de flauta.

Las cepas aisladas se determinaron a nivel de especie en los medios nutritivos indicados para cada caso, con la ayuda de las claves pertinentes (Booth, 1971; Carmichael *et al*, 1980; Ellis, 1971; Raper y Fenell, 1965; Raper y Thom, 1949; Rifai, 1969; Von Arx, 1961; Zycha, 1969).

Se calculó la frecuencia de aparición de cada especie, a fin de seleccionar las más frecuentes para los trabajos posteriores.

Los hongos finalmente elegidos se mantuvieron en tubos con MEA en pico de flauta, mediante repiques periódicos, conservándose a 4 °C hasta su utilización.

Medios de cultivo utilizados para Hongos Saprófitos

Agar Extracto de Malta (MEA)

Extracto de Malta	20 gr
Agar	15 gr
Peptona	2 gr
Glucosa	20 gr
Agua Destilada	1000 ml

Agar Papa Glucosado (APG)

Papa	300 gr
Agar	20 gr
Glucosa	10 gr
Agua Destilada	1000 ml

Ambos medios se esterilizaron en autoclave a 115 ° C, durante 30 minutos.

Para el aislamiento de los hongos saprófitos se agregó al medio MEA un 1 % de la siguiente solución de antibióticos:

Estreptomicina	0,5 %
Clorotetraciclina	0,25 %

1.2. Inoculación de hongos saprófitos

Los hongos saprófitos seleccionados según 1.1, se inocularon en los ensayos en tubo y maceta, en suspensión acuosa en agua destilada estéril.

Para ello, los hongos se inocularon esterilmente en cajas de Petri con medio APG, y se incubaron a 28 °C durante una semana, con el fin de asegurar una esporulación abundante.

Al cabo de ese tiempo se procedió a la cosecha de las esporas, que se realizó en condiciones de esterilidad, agregando agua destilada a las cajas Petri y poniendo en

suspensión los conidios con la ayuda de un rastrillo de vidrio.

La suspensión obtenida se filtró luego a través de una tela de nylon, con el objeto de retener los restos de micelio.

La densidad de esporas por ml de agua se determinó con la ayuda de una Cámara de Neubauer, ajustándose a la densidad deseada para la inoculación, mediante diluciones con agua destilada estéril, de manera tal que 1 ml de la suspensión contuviera el total de esporas a inocular.

Las concentraciones utilizadas fueron las siguientes:

	Maceta (conidios x ml ⁻¹)		
	maíz	<i>Brassica</i>	lechuga
<i>T. koningii</i>	7,5 10 ⁵	7,5 10 ⁵	7,0 10 ⁵
<i>A. alternata</i>	5,0 10 ⁵	5,0 10 ⁵	4,7 10 ⁵
<i>F. equiseti</i>	5,5 10 ⁵	5,5 10 ⁵	6,0 10 ⁵
<i>F. solani</i>	5,7 10 ⁵	5,7 10 ⁵	4,3 10 ⁵
<i>A. niger</i>	6,7 10 ⁵	6,7 10 ⁵	4,5 10 ⁵

	Tubo (conidios x ml ⁻¹)	
	Maíz (10 ensayo)	Maíz (20 ensayo)
<i>T. koningii</i>	2,2 10 ⁴	2,3 10 ⁴
<i>A. alternata</i>	1,8 10 ⁴	1,7 10 ⁴
<i>F. equiseti</i>	1,7 10 ⁴	1,3 10 ⁴
<i>F. solani</i>	1,3 10 ⁴	1,2 10 ⁴
<i>A. niger</i>	2,7 10 ⁴	2,2 10 ⁴

En la maceta, cada ml de suspensión agregado se repartió en tres partes, que se inocularon al azar junto a las raíces.

A cada planta control se le adicionó 1 ml de agua destilada estéril.

En todos los casos se utilizaron suspensiones recién

preparadas, para evitar posibles alteraciones en la concentración de conidios por daño o germinación de los mismos.

1.3. Obtención de exudados fúngicos

Cada hongo saprófito se inoculó esterilmente en frascos Erlenmeyer de 250 ml de capacidad, conteniendo 100 ml de medio líquido papa-glucosado.

Luego de la siembra, los Erlenmeyers se pusieron a incubar a 28 °C, con agitación continua, durante 48 horas.

Al cabo de este tiempo, el medio nutritivo, con abundante desarrollo de micelio fúngico, se centrifugó durante 10 minutos, a 1000 x g (centrífuga Martin Christ), filtrando tres veces el sobrenadante obtenido. La primera vez con filtro de papel, y las dos siguientes a través de membrana Millipore de 0,45 µ.

Luego de la última filtración con membrana Millipore, esta vez en condiciones de esterilidad, los exudados obtenidos estaban listos para ser utilizados.

Los exudados que no se aplicaron inmediatamente se conservaron a - 20 °C, para su uso posterior.

1.4. Obtención de suelos desprovistos de propágulos de micorriza

Para todos los ensayos en maceta se utilizó suelo mezclado con arena de cuarzo, libre de nutrientes, en la proporción 1:9 (V/V), con el objeto de mejorar su textura y facilitar la posterior recuperación de las raíces.

Esta mezcla se tinalizó a vapor fluente, una hora, durante tres días consecutivos. Mediante este tratamiento se eliminan los propágulos de los hongos formadores de micorrizas y otros microorganismos del suelo.

1.5 Obtención de inóculo de hongos formadores de micorrizas vesículo-arbusculares

Para todos los ensayos realizados en esta tesis se utilizó *Glomus mosseae* como hongo formador de micorrizas VA.

Se seleccionó esta especie, por su abundancia en habitats cultivables, y la fácil disponibilidad de inóculo total y esporocarpos en cantidad. Es importante tener en cuenta que la falta de inóculo adecuado suele ser la principal limitación en la investigación de este tipo de endofitos.

El inóculo utilizado procedió siempre de la colección de la Estación Experimental del Zaidín (Granada).

Para su obtención, se inocularon esporas de *G. mosseae* en la rizósfera de plántulas de alfalfa (*Medicago sativa*) cultivadas en una mezcla de suelo:arena estéril (5:2, V/V), en condiciones controladas de invernadero.

Al cabo de 4 - 6 meses, y luego de determinar una micorrización adecuada, se eliminó la parte aérea, y el suelo en el que se desarrolló la micorriza se conservó en bolsas plásticas a 5 ° C, durante varios meses antes de ser utilizado.

En este suelo se desarrollaron hifas (micelio originado a partir de la raíz colonizada), esporas y esporocarpos. Cada una de estas fracciones son generadoras potenciales de biomasa fúngica, capaz de colonizar una raíz susceptible, en presencia de la cual se repetirá el ciclo, única forma de reproducción del microsimbionte.

1.5.1 Inoculación de hongos MVA

El inóculo de *G. mosseae* utilizado, obtenido de la forma antes descrita, presentaba las siguientes características: 79 % de micorrización de raíces, 6 esporocarpos gr^{-1} de suelo y

28 esporas gr^{-1} de suelo.

Para los ensayos en maceta siempre se utilizó inóculo-suelo, con los distintos propágulos infectivos del hongo VA.

Las dosis aplicadas (aproximadamente 5 gr), se consideraron más que suficientes para producir micorrización VA en una planta susceptible, de forma que el volumen de inóculo no fuese, en ningún caso, factor limitante para la infectividad del hongo VA ensayado.

El método de inoculación empleado fué el mismo en todos los casos, y consistió en situar el inóculo aproximadamente 0,5 cm por debajo de las semillas.

1.6 Plantas y condiciones de cultivo

Las plantas utilizadas en los ensayos de interacción fueron dos hospedantes: maíz (*Zea mays*) y lechuga (*Lactuca sativa*), y una no hospedante: *Brassica campestris*.

Tanto los granos de maíz, como las semillas de lechuga y *Brassica*, se esterilizaron en superficie con hipoclorito de sodio (25 gr de Cl activo/litro), durante 15 minutos. Pasado este tiempo, se lavaron 5 veces con agua estéril, para eliminar completamente el esterilizante, y se dejaron en imbibición en agua estéril durante dos horas.

En los ensayos en maceta, granos o semillas se sembraron directamente sobre la superficie de la mezcla suelo:arena, adicionada o no con inóculo VA, según el caso. El alto porcentaje de germinación observado evitó la utilización de germinadores.

El número de granos y semillas sembrados siempre excedió en dos unidades a las plantas que posteriormente completarían el ensayo.

Una vez producida la germinación, se dejaron crecer las plántulas durante una semana, al cabo de la cual se extrajeron las sobrantes, dejando aquellas que presentaban un

desarrollo homogéneo.

Para realizar los ensayos en tubo, donde el sustrato era arena:vermiculita estéril (1:1, V/V), se eligieron los granos de maíz ya germinados, según la siguiente rutina: primero se los esterilizó en superficie, luego se los dejó imbibir, y por último se pusieron a germinar esterilmente, en cajas de Petri con un disco de papel de filtro humedecido con agua destilada. Estas cajas se mantuvieron a 28 °C, durante dos días.

Las plántulas que poseían una radícula de aproximadamente 1 cm se consideraron aptas para ser transplantadas esterilmente a tubo.

El sistema de cultivo, mantenido inalterable a lo largo de los ensayos, se realizó en invernadero, con condiciones controladas de luz, temperatura y humedad (450 uE. m⁻² s⁻²; 400 -700 nm; 16/8 horas luz/oscuridad; 25/18 °C día/noche y 60-70 % H.R.). Las macetas se colocaron al azar, rotándolas cada semana, de forma que todas ellas ocuparan las distintas posiciones posibles sobre la mesada, con el objeto de eliminar diferencias posicionales.

Las plantas se regaron por capilaridad. Este sistema de riego permite mantener el suelo adecuadamente húmedo, sin alterar sus propiedades físicas.

A partir de la tercera semana de crecimiento, las plantas se fertilizaron semanalmente, mediante el agregado de 10 ml/maceta de una solución nutritiva (Hewitt, 1952), carente de fósforo.

Solución de Hewitt (1952)

	gr/100 ml	para 1 l.
NO ₃ K	3,03	5 ml
(NO ₃) ₂ Ca	7,08	10 ml
SO ₄ Mg.7H ₂ O	1,84	10 ml
EDTA Fe (II)	0,25	5 ml
SO ₄ Mn.7H ₂ O	0,22	0,5 ml
SO ₄ Cu.5H ₂ O	0,24	0,05 ml
SO ₄ Zn.2H ₂ O	0,29	0,05 ml
BO ₃ H ₃	1,86	0,05 ml
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,03	0,05 ml
Agua		970 ml

El pH se reguló a 7 con una solución de NaOH 10%.

En los ensayos en tubo, en los que se utilizó arena:vermiculita (1:1, V/V) como soporte, se empleó esta solución nutritiva diluida al 50 %, y adicionada con 0,5 mg de P/litro. Una vez ajustado su pH a 7, se añaden 7 ml de solución nutritiva a cada tubo, antes de su esterilización en autoclave a 120 ° C, durante 20 minutos.

1.7. Aislamiento y esterilización de esporas de *G. mosseae*

En todos los ensayos con esporas se utilizaron clamidosporas endocárpicas de *G. mosseae*, obtenidas siguiendo la metodología que se describe a continuación.

1.7.1. Obtención de esporocarpos

Para el aislamiento de esporocarpos se empleó la técnica de tamizado húmedo y decantación, descrita por Gerdemann y

Nicolson (1963). Para ello, se preparó una suspensión de 50 - 100 gramos de suelo rizosférico procedente de una maceta stock, con alta densidad de inóculo, en aproximadamente 1 litro de agua.

Luego de dejar decantar durante unos segundos, se hizo pasar la suspensión por un juego de tamices de distinto tamaño de poro, de mayor a menor.

En el primer tamiz, de 700 μ , quedan retenidos fragmentos de raíces y restos de materia orgánica. En el segundo, de 250 μ se recogen los esporocarpos y fragmentos de micelio, que suelen llevar esporas ectocárpicas. Finalmente, el de malla más pequeña, de 100 μ de luz, retiene esporas sueltas.

Para la extracción de los esporocarpos se resuspendió en agua la fracción retenida en el tamiz de 250 μ , vertiéndose sobre una placa plástica translúcida, con surcos concéntricos excavados, semejante a la descrita por Doncaster (1962).

Estos surcos evitan el desplazamiento de los esporocarpos facilitando su recolección, mediante una pinzas de punta muy fina, bajo lupa, a 30 o 40 aumentos.

Los esporocarpos recogidos se transfirieron a cajas de Petri con papel de filtro humedecido, y se mantuvieron así durante 4 semanas a 4 $^{\circ}$ C. Esta estratificación mejora la germinación posterior de las esporas (Hepper y Smith, 1976).

1.7.2. Obtención de esporas

En el momento de la esterilización, luego del tratamiento con frío, se procede a la disección de los esporocarpos bajo lupa, con la ayuda de unas agujas de disección.

Las esporas extraídas se depositan sobre papel de filtro húmedecido, mediante pipeta capilar. De esta misma forma las esporas se transfieren 2 o 3 veces de papel de filtro, con

abundante agua, a fin de eliminar los restos de esporocarpo adheridos a su pared.

Las esporas limpias, con buen aspecto y tamaño uniforme se sometieron a esterilización superficial.

1.7.3. Esterilización superficial de esporas VA

Se utilizó el método descrito por Mosse (1962), que propone la siguiente solución esterilizante:

Cloramina-T	1 gr
Estreptomicina	0,01 gr
Tween 80	gotas
Agua destilada	50 ml

El proceso de esterilización de las esporas se realizó siempre en filtros de papel Whatman Nº 1, en los que se colocaban 120 - 150 esporas sobre un filtro de papel.

50 ml de la solución esterilizante pasaron a través de una unidad Millipore adaptable a jeringa, cayendo sobre las esporas. La solución se dejó actuar sobre ellas durante 20 minutos, y a continuación se hicieron tres lavados con agua estéril, de 10 minutos cada uno.

Para los ensayos de micorrización de plantas en tubo, se utilizó un inóculo constituido sólo por esporas, que se preparó de la siguiente manera: lotes de 50 esporas extraídas de los esporocarpos y seleccionadas por su aspecto uniforme, se colocaron sobre cuadrados de papel tisú humedecido, de aproximadamente 1,5 cm², los que luego se plegaron, cerrando las esporas en su interior.

Estos "paquetes" de esporas, se colocaron en la unidad Millipore sobre un disco de papel filtro, y se esterilizaron siguiendo el mismo procedimiento usado para esterilizar esporas aisladas.

1.7.4. Siembra y germinación de esporas

Una vez esterilizadas superficialmente, las esporas se llevaron a una caja de Petri con agua estéril, y desde ésta se transfirieron, mediante pipeta capilar estéril, a cajas de Petri de 9 cm de diámetro, con 10 ml. de agar:agua 1 % (Bacto-agar Difco) pH 7 (esterilización: en autoclave, durante 20 minutos a 120 °C).

Como el crecimiento de los hongos saprófitos inoculados simultaneamente con las esporas VA puede inducir cambios en el pH del medio (Vidal-Domínguez, 1990), un grupo de ensayos se llevó a cabo en cajas de Petri con agar:agua tamponada con MES (ácido 2-(N-monofolin) etano sulfónico) 10 mM. Este compuesto no ejerce ningún efecto significativo sobre la germinación o el desarrollo del micelio de hongos VA (Carr y Hinkley, 1985).

La composición del medio tamponado era la siguiente:

MES	0,195 gr
NaOH 1 M	0,876 ml
NaCl 1 M	0,124 ml
Bacto-agar Difco	1 gr
Agua destilada	100 ml

El medio, cuyo pH quedó automáticamente ajustado a 7, mediante el agregado de NaOH 1M y NaCl 1M, en las cantidades indicadas (Perrin y Dempsey, 1974), se esterilizó a 120 °C, durante 20 minutos.

Se utilizó un medio carente de nutrientes, pues se ha demostrado que la mayoría de éstos ejerce un efecto inhibitor sobre la germinación de esporas VA (Hepper y Smith, 1976).

Una vez inoculadas las esporas, las cajas de Petri se sellaron con "parafilm", y se incubaron en oscuridad a 25 °C.

El proceso de germinación de las esporas de *G. mossae* se inicia normalmente a partir del tercer día de incubación,

por lo que, a partir de este momento, las esporas se examinaron periódicamente al microscopio, para evaluar el porcentaje de germinación de las mismas, así como el número de esporas vegetativas o secundarias producidas sobre el micelio desarrollado a partir de los tubos germinativos. Además, se hicieron observaciones en los gráficos, sobre el momento de aparición de las primeras esporas secundarias.

Una espora se consideró germinada cuando se detectó la aparición del tubo de germinación, por pequeño que éste fuera. En el recuento se omitieron las esporas que resultaron dañadas durante el proceso de esterilización.

1.8. Cuantificación del micelio

El desarrollo del micelio se evaluó al microscopio óptico, contando el número de intersecciones que las hifas hacían con una cuadrícula de 0,9 mm. Este método está basado en el sistema propuesto por Marsh (1971) para estimar la longitud de raíces mediante la determinación del número de intersecciones que éstas hacen con cualquier sistema de líneas, cuando se distribuyen al azar sobre él.

Previamente las cajas se secaron a una temperatura de 50 - 60 °C, durante el tiempo necesario para que el agar quedase reducido a una capa muy fina, y todas las hifas producidas se encontraran en el mismo plano.

1.8.1. Análisis estadístico de los datos

Los porcentajes de germinación observados en cada tratamiento se sometieron a un test de hipótesis frente a los de sus controles respectivos.

El estadístico "Z" calculado, se comparó con el valor tabulado para un nivel de significación del 5 %.

Con respecto al crecimiento del micelio, la media

obtenida para cada tratamiento también fué sometida a un test de hipótesis frente a la de sus controles.

Los valores del estadístico "t" de Student obtenidos a partir de las muestras, se compararon con los calculados a partir de la curva teórica, para un 5 % de significación.

1.9. Determinaciones generales

En las plantas de maíz se determinó peso seco de la parte aérea, longitud de raíces micorrizadas, y cantidad de estructuras intraradicales por centímetro de raíz micorrizada.

En las plantas de lechuga se determinó peso seco de parte aérea y raíz, longitud de raíz micorrizada, y porcentaje de raíz con actividad SDH fúngica.

En las plantas de *B. campestris*, los parámetros de crecimiento considerados fueron: altura de la planta, y número de silicuas por planta, por describir éstos, mejor que el peso seco, el estado de desarrollo de la planta.

Tanto en los ensayos realizados en maceta como en los realizados en tubo, se determinó periódicamente la población de los hongos saprófitos inoculados en el sustrato, mediante diluciones en placa.

En el caso de maíz y *Brassica* cultivadas en maceta, se tomaron muestras de suelo al finalizar el ensayo, con el fin de determinar la longitud total de hifas presentes en el sustrato.

Según la naturaleza de los ensayos, los datos se analizaron estadísticamente mediante el test de rango múltiple de Duncan (P: 0,05), o se calculó la desviación standard.

1.9.1. Determinación del peso seco

Para esta determinación, antes de pesarse, la parte aérea y las raíces de las plantas de maíz y lechuga, se llevaron a estufa a 65 °C, durante 24 horas.

1.9.2. Determinación de la longitud de raíz micorrizada

1) Tinción de raíces micorrizadas

Se siguió la técnica desarrollada por Phillips y Hayman (1970). Esta tinción permite visualizar claramente las estructuras fúngicas en la raíz, ya que éstas presentan un color azul intenso.

Reactivos: KOH 10 %
 ClH 0,1 N
 Azul Tripán 0,05 % en ácido láctico
 Acido láctico

Procedimiento: 1- Las raíces lavadas y fragmentadas en trozos de aproximadamente 1 cm, se colocan en KOH, y se calientan durante 1 hora a baño maría, a 90 °C, para su clarificación.
2- Se elimina el KOH, y se lavan las raíces tres veces con agua.
3- Se dejan las raíces en ClH durante 2-3 minutos a temperatura ambiente.
4- Se elimina el ClH, y se añade el Azul Tripán en ác. láctico.
5- Se calienta durante 10 min. a baño maría, a 90 °C.
6- Se elimina el Azul Tripán, y se conservan las raíces en ácido láctico.

2) Cuantificación de la micorrización

El porcentaje de longitud de raíz micorrizada se estimó utilizando dos métodos distintos, según el caso:

Método A (Nicolson, 1959)

Se colocan 30 segmentos de raíz, de aproximadamente 1 cm de longitud, sobre un portaobjetos, y se cuantifica la proporción de cada segmento con micelio VA, a 100 aumentos. Del promedio de los valores obtenidos para los 30 fragmentos se obtiene el porcentaje de longitud de la raíz que está micorrizado.

Método B (Giovanetti y Mosse, 1980)

Para este método se utiliza una placa cuadrada de 10 cm de lado, con su superficie dividida en cuadrículas de 1,3 cm². Sobre ella se extienden, al azar, los fragmentos de raíces, previamente teñidos.

Mediante observación a la lupa (30 - 40 x), se pueden distinguir fácilmente los segmentos portadores o no del endofito VA, por el color y morfología diferenciada de las estructuras características del hongo.

Para cuantificar el porcentaje de micorrización se determina el número total de intersecciones de las raíces con la cuadrícula, y el número de intersecciones entre la cuadrícula y fragmentos que contienen el endofito. La relación entre estos dos valores dá directamente el porcentaje de la longitud de raíz micorrizada en cada caso.

Para que los resultados obtenidos tuvieran validez estadística, pudiéndose comparar entre sí, siempre se realizó el promedio de tres lecturas, de al menos 200 intersecciones cada una.

3) Detección de la actividad Succinato Deshidrogenasa (SDH) en hongos VA.

La actividad SDH en el micelio fúngico se detectó utilizando la técnica descrita por Mac Donald y Lewis (1978), basada en la reducción de las sales de tetrazolio (amarillo, soluble) a formazán (violeta, insoluble), a partir de succinato disódico.

Esta tinción nos permite identificar el tejido activo del hongo en la raíz.

Reactivos: Hidrato de cloral 75 % en agua
 destilada
 Acido láctico

Solución incubadora:

1 ml Succinato disódico (2,5 M)
2,5 ml Azul de Tetrazolio (4 mg/ml)
2,5 ml Tris-ClH (0,2 M; pH 7)
1 ml Cl₂ Mg (5 mM)
3 ml Agua destilada

Procedimiento: 1- Se lavan las raíces, y se cortan en trozos de aproximadamente 1 cm de longitud.
2- Se colocan en 2 ml de solución incubadora, y se llevan a estufa a 25 °C, durante 16 - 18 horas.
3- Se elimina la solución incubadora, se añade hidrato de cloral, y se lleva a ebullición a baño maría durante 15 minutos.
4- Se elimina el hidrato de cloral, y se conservan las raíces en ácido láctico.
5- Se montan los segmentos de raíz en un portaobjetos y se observan al microscopio.

1.9.3. Cuantificación de la micorriza con actividad SDH

Se colocan 30 segmentos de raíz, de 1 cm, sobre un portaobjetos y, mediante su observación al microscopio (100 x), se cuantifica la proporción de cada fragmento con las estructuras fúngicas coloreadas en un tono rojizo. Se obtiene así el porcentaje de longitud de raíz con micelio metabólicamente activo. Comparando este valor con el obtenido mediante la tinción con Azul Tripán, podrá conocerse qué proporción de la micorriza observada es activa.

1.10. Determinación de la población de hongos saprófitos en suelo

Con el objeto de controlar la evolución de la población de estos hongos a lo largo del ensayo, cada 15 días se tomaron muestras de suelo para realizar recuentos en placa mediante diluciones.

Para ello, se extrajo de cada tratamiento, una muestra de aproximadamente 5 gr (peso seco) del sustrato de crecimiento, que se introdujo en un tubo conteniendo 20 ml de agua estéril. El tubo con la muestra, se agitó en vortex durante 3 minutos, filtrándose luego a través de una tela de nylon, con el fin de retener las partículas de arena y suelo, así como los fragmentos de micelio.

A partir de la suspensión así obtenida se realizaron 3 diluciones 1:9, y se sembró 0,1 ml de cada dilución en cajas de Petri con 20 ml de medio APG + antibióticos, distribuyendo la suspensión en toda la superficie del medio con la ayuda de un rastrillo de vidrio.

Las cajas se sellaron con "parafilm", y se incubaron a 28 °C, durante 48 horas.

Al cabo de ese tiempo se observaron las cajas, contándose el número de colonias de cada hongo inoculado que

aparecía en las distintas diluciones. A partir de este resultado; y teniendo en cuenta las diluciones realizadas, se pudo obtener el número de propágulos de cada hongo presente en el sustrato.

Para recuperar la muestra original, con el objeto de determinar su peso seco, se filtró la suspensión obtenida a través de un filtro de papel. El suelo retenido en este filtro, más las partículas de suelo y arena separadas en la tela de nylon se secaron en estufa a 105 °C, durante 24 horas, para obtener el peso seco de la muestra utilizada, que permitió standarizar los resultados.

Para cada tratamiento se realizaron 3 diluciones, y se sembraron 3 cajas de Petri por dilución.

1.10.1. Obtención de la muestra para el recuento de hongos saprófitos

Cada muestra de sustrato, a partir de la cual se hicieron las diluciones, provenía de la mezcla en un tubo estéril de 5 submuestras, una por cada repetición del tratamiento.

Cada submuestra se obtuvo, a su vez, de recoger con espátula estéril pequeñas porciones de sustrato, a 1 cm de la superficie, de tres lugares diferentes de la maceta, escogidos al azar.

1.11. Obtención de extractos radicales de plantas hospedantes y no hospedantes, inoculadas o no con *G.mossee*

Se utilizaron plantas de maíz, lechuga y *Brassica* de 8 semanas de crecimiento.

Para la preparación de los extractos de raíz se siguieron dos procedimientos distintos:

- a) Extracción general con tampón Tris-ClH 0,1 M, pH 7.

Las raíces de las plantas, inoculadas y no inoculadas con el endofito VA, se trituraron en mortero con N₂ líquido, para permitir una mejor maceración del tejido, agregándose luego, 3 ml de tampón Tris-ClH (0,1 M; pH 7) por gramo de raíz.

La suspensión obtenida se pasó a través de una gasa y se centrifugó durante 20 min. a 20.000 x g (Sorvall RC5C)

b) Extracción con metanol, para detectar la presencia de fitoalexinas.

1-2 gr de raíces se trituraron en mortero con 25 ml de metanol 70 %. El macerado obtenido se centrifugó a 20.000 x g, durante 10 minutos.

El sobrenadante se concentró en rotavapor a 40 °C, redisolviéndose en 2 ml de metanol 100 %.

Este extracto volvió a concentrarse en rotavapor, y se redisolvió finalmente en 2 ml de metanol puro, siendo de esta forma aplicado en los ensayos.

En ambos casos, los extractos que no se utilizaron inmediatamente, se conservaron a - 20 °C para su uso posterior.

1.12. Determinación de la longitud total de hifas presente en suelo

Esta determinación se llevó a cabo mediante la técnica de Jones y Mollison (1948), modificada por Domsch (1974).

Esta técnica se basa en la lectura, a través de una cuadrícula, de películas de agar realizadas a partir de muestras de suelo, según el siguiente procedimiento:

Las muestras, consistentes en 1 - 2 gr de suelo se conservaron en 50 ml de fijador de Bowin-Holland.

En el momento de preparar las plaquitas, se completó el volumen a 100 ml con agua, y se trituró en licuadora

eléctrica durante 3 minutos.

La suspensión obtenida se mezcló con una solución de agar-agua 1,5 % (Oxoid N° 3), hasta alcanzar una dilución final de 1,25 %.

De cada muestra de suelo se realizaron 10 placas de agar de 0,1 mm de espesor, usando como molde un hemocistómetro o Cámara de Neubauer.

Las plaquitas formadas al solidificar el agar, se colocaron sobre un portaobjetos, realizándose preparados semipermanentes con gelatina-glicerina .

1.12.1 Lectura de las películas de agar

En cada película se realizaron 20 lecturas al azar en microscopio óptico con contraste de fases, con un aumento de 400 x.

La longitud total del micelio se calculó a partir del número de intersecciones que determinaban las hifas observadas, con la cuadrícula del ocular (Olson, 1959).

Para la transformación de los valores obtenidos en metros de micelio/ gr de peso seco de suelo, se consideró el volumen de la plaquita, la dilución de la muestra y el diámetro del campo de lectura, aplicándose la siguiente fórmula:

$$\text{Cant.micelio} = \frac{\text{Nº divisiones del ocular} \times 1.3551724}{\text{Peso seco de la muestra}}$$

1.12.2. Distribución de los diámetros hifales en el material

Se midió el diámetro de 100 hifas individuales, escogidas al azar de cada tratamiento. Los diámetros se dividieron en clases de 1 um cada una, y se calculó el porcentaje de hifas correspondiente a cada clase.

2. ENSAYOS ESPECIFICOS

2.1 Efecto de hongos saprófitos inoculados a distintos tiempos sobre la micorrización de plantas hospedantes y no hospedantes con *Glomus mosseae*

2.1.1. Ensayos en maceta

Se utilizaron macetas de 300 ml , con una mezcla suelo-arena 1:9 (v/v), tratada según se detalló previamente.

En un primer ensayo se empleó una planta hospedante (maíz), y una no hospedante (*Brassica campestris*).

Los 5 hongos saprófitos seleccionados según 1.1 se inocularon en las macetas a 3 tiempos distintos, según el siguiente esquema:

M y H: Hongo MVA y hongo saprófito inoculados al mismo tiempo en plántulas de dos semanas.

M + H: Hongo MVA inoculado en la maceta junto con las semillas, y a las dos semanas, inoculación del hongo saprófito.

H + M: Hongo saprófito inoculado en plántulas de 7 días, y a la semana inoculación de *G. mosseae*.

Para cada uno de estos 3 tiempos se consideraron 4 tratamientos:

- 1- Control no inoculado
- 2- Planta inoculada sólo con hongo saprófito
- 3- Planta inoculada sólo con endofito VA
- 4- Planta inoculada con ambos microorganismos

Las plantas se cosecharon a las 12 semanas de micorrización, haciéndose en cada caso las determinaciones generales antes mencionadas.

Diseño del ensayo: 5 repeticiones / hongo / tratamiento / tiempo de inoculación.

Maíz: 1 planta / maceta.

Brassica: 2 plantas / maceta.

A la luz de los resultados obtenidos con maíz, se repitió este ensayo, utilizando esta vez plantas de lechuga, que son altamente dependientes de la micorrización.

Al igual que en el ensayo anterior, las plantas se cosecharon a las 12 semanas de micorrización.

Diseño del ensayo: idem, con 2 plantas de lechuga / maceta.

En todos los casos, las condiciones de invernadero, riego y fertilización son las descriptas en el apartado 1.6.

2.1.2. Ensayos en tubo

Este tipo de ensayo se llevó a cabo únicamente con plantas de maíz.

Según los resultados obtenidos en maceta, se consideró oportuno realizar este ensayo para dos tiempos de inoculación diferentes:

M y H: Hongo MVA y hongo saprófito inoculados al mismo tiempo sobre plántulas de 1 semana.

M + H: Hongo MVA inoculado en el tubo junto con la plántula de maíz, y a las dos semanas, inoculación del hongo saprófito.

Para cada tiempo de inoculación se realizaron dos tratamientos:

1- Planta inoculada sólo con *G. mosseae*

2- Planta inoculada con ambos microorganismos

Las plantas se cosecharon a las 12 semanas de micorrización, determinándose en cada caso el porcentaje de micorrización, y la población de hongos saprófitos en el sustrato.

2.2. Ensayos con esporas

2.2.1. Efecto de la germinación de esporas VA sobre el desarrollo de hongos saprófitos en cultivo axénico

Se utilizaron cajas de Petri con 10 ml de agar-agua 1 %, pH 7, en las que esporas de *G. mosseae*, previamente esterilizadas en superficie, se situaron en medio perímetro de la periferia de la caja, mientras que el hongo saprófito en cuestión, se inoculó en el centro de la misma.

Una vez que comenzaron a germinar las esporas, se midió periódicamente el diámetro de la colonia del saprófito, con el fin de averiguar la existencia de cierto tropismo o tendencia de este hongo a crecer hacia las esporas en germinación y hacia el micelio desarrollado por ellas.

Diseño: 4 cajas / hongo saprófito, 8 esporas VA / caja.

2.2.2. Efecto de la inoculación de hongos saprófitos sobre la germinación de esporas VA en cultivo axénico

2.2.2.1. Germinación de esporas de *G. mosseae* sobre agar-agua, en presencia de los hongos saprófitos aislados de rizósfera y rizoplano de plantas de maíz y *B. campestris*.

Se utilizaron cajas de Petri de 9 cm de diámetro, con 10 ml de agar-agua 1 % (Bacto-agar Difco), pH 7.

Las esporas de *G. mosseae* se situaron, tras su esterilización, en un extremo de la periferia de la caja de Petri, mientras que el hongo saprófito se inoculó en el extremo opuesto de la misma, de manera tal que las esporas pudieran germinar antes de ser alcanzadas por las hifas del saprófito.

Diseño: 4 cajas de Petri / hongo, 5 esporas VA / caja.

2.2.2.2. Germinación de esporas de *G. mosseae* sobre agar-agua tamponado con MES 10 mM (ácido 2-(N-monofolin) etano sulfónico), en presencia de hongos saprófitos.

Se comprobó con anterioridad que hongos saprófitos de los géneros *Penicillium*, *Mucor* y *Aspergillus*, disminuyen el pH del medio de cultivo en el que crecen. Para poder discernir entre un efecto directo del hongo y un efecto debido a la variación del pH, se pensó en utilizar un tampón eficiente, que pudiera regular el pH, sin afectar negativamente la germinación de las esporas VA, como es el caso de los tampones fosfato.

El medio agar-agua 1 %, con MES 10 mM, se ajustó a pH 7 con NaOH 1M y NaCl 1M, según las cantidades indicadas en el apartado 1.7.4.

Las cajas de Petri, con 10 ml de este medio tamponado, se sembraron siguiendo el esquema utilizado en el ensayo anterior.

Diseño: 3 cajas de Petri / hongo, 5 esporas / caja.

2.2.2.3. Germinación de esporas de *G. mosseae* sobre agar-agua, en presencia de exudados fúngicos.

Las esporas de *G. mosseae* esterilizadas en superficie, se colocaron en el centro de cajas de Petri con 10 ml de agar-agua 1%, pH 7, adicionado con 0,5 ml de exudados fúngicos obtenidos según 1.3.

Como control, se sembraron esporas en cajas con 10 ml de agar-agua 1%, adicionado con 0,5 ml de medio papa glucosado.

Las cajas, una vez sembradas las esporas, se sellaron con "parafilm", incubándose en oscuridad a 25 °C, durante 3 semanas. Diseño: 4 cajas de Petri / hongo, 5 esporas VA / caja.

2.2.2.4. Producción de compuestos estimuladores o inhibidores volátiles, por hongos saprófitos

Puesto que compuestos volátiles producidos por células vegetales (Carr et al, 1985) y por actinomicetes (Mugnier y Mosse, 1987), resultaron estimuladores del crecimiento axénico de los hongos VA, se decidió investigar la posible producción de inhibidores o estimuladores volátiles, por parte de los hongos saprófitos en estudio.

Se realizaron dos tipos de ensayo, que diferían básicamente en el medio de cultivo en el que crecía el hongo saprófito: agar-agua 1%, o MEA. En ambos casos las esporas de *G. mosseae* se pusieron a germinar sobre agar-agua 1% (Bacto-agar Difco), pH 7.

2.2.2.4.1. En el primer ensayo se emplearon cajas de Petri de 9 cm de diámetro, divididas en dos compartimentos mediante un tabique central. Cada hongo saprófito, y las esporas de *G. mosseae* se sembraron en distintos compartimentos de la caja, cada uno conteniendo 5 ml de agar-agua 1%, pH 7. En ambos casos la caja se mantuvo inclinada hasta la solidificación del medio, de forma que éste, en ningún caso, tocara el tabique central. De esta manera se evitaba que los hongos saprófitos, al crecer, superaran el tabique y alcanzaran las esporas.

El hongo saprófito se inoculó en el extremo de su compartimento más distante del tabique, colocándose las esporas de *G. mosseae* esterilizadas, en el extremo opuesto del otro compartimento.

Las cajas se sellaron con "parafilm" e incubaron a 25 °C, en oscuridad, durante dos semanas.

Diseño: 4 cajas de Petri / hongo, 5 esporas / caja.

2.2.2.4.2. En el segundo ensayo, los hongos saprófitos se

hicieron crecer sobre medio MEA, mientras que las esporas VA, al igual que en el ensayo anterior, se pusieron a germinar sobre agar-agua 1 %, pH 7.

En este caso no se consideró conveniente la utilización de cajas compartimentadas, ya que el activo crecimiento de los hongos saprófitos en un medio nutritivo rico, hace que el micelio rápidamente se extienda más allá del tabique, alcanzando las esporas VA antes de que éstas puedan germinar.

Para poder observar los posibles efectos de compuestos volátiles liberados por los hongos saprófitos, antes de que éstos se pusieran en contacto con las esporas, se diseñó el siguiente ensayo:

Se volcaban 10 ml de MEA en cajas de Petri estériles. Una vez solidificado este medio, las cajas se invertían, vertiéndose 10 ml de agar-agua 1 %, pH 7 en las tapas de las mismas.

Las esporas de *G. mosseae*, previamente esterilizadas en superficie, se disponían equidistantes entre sí sobre la fina capa de agar-agua solidificado. Luego, se invertía la caja, y se inoculaba cada hongo saprófito en el centro de la base con medio nutritivo MEA.

Las cajas, en esta posición, cuidando que el hongo saprófito quedara siempre abajo, se sellaban con "parafilm", e incubaban en oscuridad a 25 °C, durante dos semanas.

Diseño: 4 cajas de Petri / hongo, 5 esporas / caja.

En todos los ensayos con esporas VA, los respectivos controles sólo contenían las esporas VA esterilizadas superficialmente.

Periodicamente se controló el número de esporas VA germinadas y la aparición de esporas secundarias, cuantificándose el desarrollo del micelio al finalizar el ensayo.

2.3. Ensayos con extractos radicales de plantas hospedantes y no hospedantes inoculadas o no con el endofito VA

2.3.1. Efecto de los distintos extractos radicales sobre el desarrollo de hongos saprófitos en cultivo axénico

Los ensayos se realizaron sobre medio nutritivo MEA diluido al 10 %.

Cada hongo saprófito se inoculó en el centro de una caja de Petri con 20 ml de medio. Las cajas se mantuvieron a 28 °C durante 24 horas, en el caso de *Trichoderma koningii*, y durante 48 horas en el resto de las especies, tiempo necesario para que las colonias alcanzaran un desarrollo de aproximadamente 1 - 2 cm de diámetro.

Al cabo de este tiempo, y en condiciones de esterilidad, se perforó el agar de cada caja con un sacabocado de 7 mm de diámetro, formando 7 pocillos equidistantes entre sí, y dispuestos a 5 mm del borde externo de la colonia fúngica.

En cada pocillo se colocaron 40 µl de cada uno de los extractos radicales previamente preparados (2 extractos / planta), y un control constituido por 40 µl del extractante utilizado (tris-ClH y metanol puro, respectivamente).

Las cajas se sellaron con "parafilm", y se incubaron a 28 °C durante 24 horas, al cabo de las cuales se observó la presencia o no de halo de inhibición.

Diseño: 3 cajas de Petri / hongo / tipo de extractante.

2.3.2. Efecto de los distintos extractos radicales sobre la germinación de esporas de hongos saprófitos en cultivo axénico

Se empleó el mismo medio de cultivo utilizado en el ensayo anterior.

Las cajas de Petri con 20 ml de medio sólido, se

sembraron con 0,1 ml de una suspensión acuosa de conidios de cada hongo saprófito, preparada según 1.2.

Esta suspensión se distribuyó homogéneamente sobre la superficie del agar, con la ayuda de un rastrillo de vidrio. A continuación se perforaron los pocillos, de igual forma que en el ensayo anterior, disponiéndolos en los extremos de un heptágono imaginario, situado en el centro de la caja.

En cada pocillo se agregaron 40 µl de cada extracto y un control de 40 µl del extractante correspondiente en cada caso.

Las cajas se sellaron e incubaron a 28 °C, controlando la germinación de esporas a las 24 horas y 48 horas, observando la aparición o no de halo de inhibición.

2.4. Detección de sustancias fungitóxicas en extractos de raíces

En base a los resultados obtenidos en 2.3.2., se procedió a realizar el siguiente ensayo, con el objeto de detectar las sustancias fungitóxicas presentes en los extractos radicales. Para ello se realizaron cromatografías en sílica-gel TLC, en láminas de 10 x 20 cm y 0,2 mm de espesor (Sil G-60, Merck).

Diseño de las placas: se las dividió longitudinalmente en porciones de 2 cm cada una, dejando siempre 1 cm libre en cada extremo, a modo de orillo.

Las porciones centrales correspondían a los extractos radicales, destinándose las dos más externas a los controles de cada extractante.

Sobre la placa de sílica-gel así preparada se sembraron 40 µl de cada extracto, gota a gota, utilizando una micropipeta, y con la ayuda de un secador eléctrico, a fin de concentrarlos. En cada extremo de la placa, y siguiendo el mismo procedimiento se sembraron 40 µl de la sustancia

utilizada para preparar los extractos.

Una vez sembradas, las placas se pusieron a correr en cubeta de cromatografía.

Se utilizó un diluyente polar consistente en cloroformo:metanol:acetona:agua en las proporciones: 25:50:10:3,5.

Al cabo de algunas horas, una vez que el frente alcanzó el extremo opuesto de la placa, ésta se dejó secar al aire, observándose la aparición de distintas manchas con lámpara de fluorescencia.

Una vez seca, se pulverizó sobre la placa una suspensión de conidios en solución en extracto de malta 5 %.

Las placas pulverizadas con los conidios se incubaron en cajas de polipropileno recubiertas de papel de filtro humedecido (cámara húmeda), a 28 °C, durante 72 horas, controlándose diariamente la germinación y desarrollo del micelio.

Las zonas de inhibición sobre la placa indican la presencia de productos fungitóxicos, o la conversión a productos de descomposición que serían fungitóxicos.

Diseño: 1 placa / hongo. Sólo se hizo con aquellas combinaciones hongo-extracto que habían presentado halo de inhibición en los ensayos en caja de Petri.

RESULTADOS

RESULTADOS

AISLAMIENTO Y SELECCION DE HONGOS SAPROFITOS.

Se aislaron un total de 231 cepas de hongos, de las cuales 109 correspondieron a la rizósfera y rizoplano de maíz, y 122 a la rizósfera y rizoplano de *Brassica campestris*.

Las figuras 1 y 2, que representan la frecuencia de aparición de las distintas especies determinadas, muestran que el 33 % de las cepas aisladas de la rizósfera de maíz corresponden a *Aspergillus niger*, mientras que *Trichoderma koningii* constituyó cerca del 23 % de las mismas, y un 30 % del total de cepas encontradas en la rizósfera de *Brassica campestris*, donde además *Fusarium equiseti* y *Trichoderma viride* fueron relativamente frecuentes.

En el rizoplano de maíz, el muestreo realizado indicó una marcada preponderancia de *Fusarium solani*, que representó casi el 35 % de los aislamientos, mientras que *Fusarium oxysporum* correspondió al 17 % de éstos.

F. equiseti, *Alternaria alternata* y *Rhizopus stolonifer* fueron las especies más frecuentes en el rizoplano de *B. campestris*.

En base a estos resultados, se escogieron los siguientes hongos de suelo para los ensayos de interacción con *Glomus mosseae*:

- A. niger*
- A. alternata*
- F. equiseti*
- F. solani*
- T. koningii*

Todos estos hongos se consideraron saprófitos de rizósfera y rizoplano, pues ninguno de ellos figura como

patógeno de alguna de estas plantas para nuestro país (Fernandez Valiella, 1978).

Si bien Farr y colaboradores (1989) mencionan a *A. alternata*, *F. solani* y *F. equiseti* como patógenos de raíces de maíz en los Estados Unidos, los ensayos previos que hemos realizado, inoculando una concentración alta de conidios de estos hongos, no mostraron, en ningún caso, efecto negativo sobre la raíz y, en general, tampoco afectaron el desarrollo de las plantas.

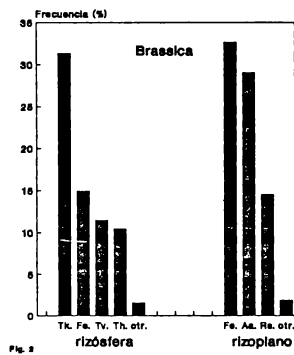
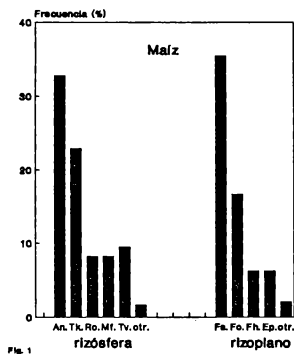


Fig. 1: Frecuencia de aparición de distintos hongos
saprófitos en los aislamientos realizados a partir
de suelo de rizósfera y rizoplano de plantas de maíz.

An= *Aspergillus niger*
Tk= *Trichoderma koningii*
Ro= *Rhizopus oryzae*
Mf= *Mucor fragilis*
Tv= *Trichoderma viride*
Fs= *Fusarium solani*
Fo= *Fusarium oxysporum*
Fh= *Fusarium heterosporum*
Ep= *Epicoccum purpurascens*
otr= otros hongos con frecuencia igual o inferior al
1 %.

Fig. 2: Frecuencia de aparición de distintos hongos
saprófitos en los aislamientos realizados a partir
de suelo de rizósfera y rizoplano de *Brassica*
campestris.

Tk= *Trichoderma koningii*
Fe= *Fusarium equiseti*
Tv= *Trichoderma viride*
Th= *Trichoderma harzianum*
Aa= *Alternaria alternata*
Rs= *Rhizopus stolonifer*
otr= otros hongos con frecuencia igual o inferior al
1 %.

EFFECTO DE LOS DISTINTOS HONGOS SAPROFITOS SOBRE EL DESARROLLO Y LA MICORRIZACION DE PLANTAS DE MAIZ, LECHUGA Y *B. campestris* INOCULADAS CON *G. mosseae*.

- *Aspergillus niger*.

La tabla 1 muestra el efecto de la aplicación de *A. niger*, en los distintos tiempos, sobre el peso seco de las 3 plantas ensayadas.

En el caso de maiz, las plantas inoculadas sólo con *A. niger* presentaron un peso similar a los controles no inoculados, mientras que aquellas en las que se introdujo *G. mosseae* en la rizósfera, tuvieron pesos significativamente mayores.

De las inoculaciones duales *A. niger* - *G. mosseae* resultaron plantas con incrementos de peso similares a los obtenidos sólo con el endofito, cuando éste se inoculó al mismo tiempo o dos semanas antes que el hongo saprófito.

Si, en cambio, *A. niger* se aplicaba al sustrato antes que el endofito, los valores obtenidos eran menores, y muy similares a los de plantas inoculadas sólo con *A. niger*.

En plantas de lechuga, los controles no inoculados, y las plantas inoculadas sólo con el hongo saprófito presentaron pesos secos similares. Por el contrario, la presencia de *G. mosseae* en la rizósfera de estas plantas se reflejó en un aumento significativo de sus pesos respecto al control (tabla 1).

La aplicación de ambos microorganismos a la misma maceta produjo dos efectos diferentes: aquellas plantas en las que ambos microorganismos se inocularon al mismo tiempo, o cuando *A. niger* se agregó 1 semana antes que el endofito, tuvieron pesos secos significativamente menores que el control micorrizado, y similares a los de plantas no inoculadas. Muy distinto fue el resultado observado al

agregar *A. niger* al suelo una vez que la micorriza VA ya se había establecido. En este caso el peso de las plantas fué similar al de aquellas inoculadas sólo con *G. mosseae*.

Dadas las características particulares de *B. campestris*, que desarrolló su ciclo fenológico en el tiempo que duró el ensayo, se estimó más oportuno considerar la altura de las plantas como parámetro de comparación entre los distintos tratamientos, por ser éste mejor indicador del grado de desarrollo de la planta, que el peso seco de la misma.

Como muestra la Tabla 1, no se aprecian diferencias significativas entre las alturas alcanzadas por plantas sin inocular y plantas inoculadas con cada microorganismo por separado.

La inoculación dual *A. niger* - *G. mosseae*, sin embargo, produjo en los 3 tiempos de inoculación, un considerable aumento de la altura de las plantas.

Los porcentajes de micorrización observados son similares en las raíces de maíz (tabla 2); tanto en la inoculación simultánea de ambos microorganismos, como en la siembra de *G. mosseae* 2 semanas antes que el saprófito como en los controles de micorrización.

En el tercer tratamiento, en el que *A. niger* se inoculó antes que *G. mosseae*, la micorrización VA de la raíz se vió significativamente disminuída.

La calidad de la infección VA, evaluada como cantidad de estructuras intraradicales por cm de raíz, fué similar para los tres tiempos de inoculación en el caso de vesículas y unidades de infección, mientras que el número de arbusculos por cm de raíz fué sensiblemente mayor cuando *G. mosseae* se inoculó primero (Tabla 2).

La cantidad de estructuras intraradicales de las MVA corresponde a valores estandarizados, que permiten su comparación independientemente del grado de colonización alcanzado por la raíz.

En las raíces de plantas de lechuga, los dos tipos de tinciones realizadas (Tabla 3), indican que la inoculación de *A. niger* al mismo tiempo o 1 semana antes que *G. mosseae*, provoca un importante descenso de la micorrización que puede superar, como se observa en el último caso, el 75%.

Si bien la tinción tradicional de Phillips y Hayman, indica que la inoculación del saprófito dos semanas después de *G. mosseae* no afecta el nivel de micorrización de la raíz, que se mantiene similar al control, la técnica de tinción de la SDH muestra una sensible disminución de los porcentajes de infección VA, lo que indica que cerca del 40 % de la micorrización observada no es efectiva.

En ningún caso la presencia de *G. mosseae* en el sustrato de crecimiento de *Brassica* produjo la micorrización de sus raíces, aunque sí provocó un oscurecimiento de éstas.

Si bien este efecto se observó siempre que el endofito se introdujo en la rizósfera, no se encontró que alguno de los tiempos de inoculación ensayados presentara este fenómeno más marcado que otro.

Trichoderma koningii

En la tabla 4 se observa el efecto de la inoculación de *T. koningii* sobre el desarrollo de las tres plantas ensayadas.

La aplicación de *T. koningii* a la rizósfera de plantas de maíz y lechuga no afectó el crecimiento de las plantas, las que resultaron con pesos secos similares a los controles respectivos.

La inoculación de *G. mosseae*, en cambio, incrementó en todos los casos el tamaño de las plantas.

La presencia de ambos microorganismos en el sustrato produjo un aumento del peso seco de las plantas cuando *T. koningii* se inoculó dos semanas después de *G. mosseae*. El

incremento observado fue similar al observado en plantas en las que sólo se inoculó *G. mosseae*.

En los otros dos tiempos de inoculación, las plantas de maíz y lechuga cosechadas tuvieron pesos secos similares a sus controles sin inocular.

Las plantas de *Brassica* no presentaron diferencias significativas respecto a los controles, en las inoculaciones de cada microorganismo por separado, ni cuando *T. koningii* se aplicó al suelo al mismo tiempo o dos semanas después que el endofito VA (Tabla 4).

La inoculación del hongo saprófito una semana antes que *G. mosseae*, en cambio, resultó en plantas significativamente más altas que los controles no inoculados.

T. koningii provocó la disminución de la micorrización VA de raíces de maíz en los tres tiempos en que se aplicó (Tabla 5). Esta disminución fue más drástica cuando el hongo saprófito se agregó al suelo antes o al mismo tiempo que *G. mosseae*, alcanzando valores inferiores al 4 % de longitud de raíz micorrizada. En ambos casos, este menor porcentaje de infección estuvo acompañado por una disminución de la cantidad de arbusculos y vesículas por centímetro de raíz. Cuando *T. koningii* se inoculó en la rizósfera antes o al mismo tiempo que el endofito VA, se observó además, un importante descenso del número de unidades de infección.

El efecto de la inoculación dual *T. koningii*-*G. mosseae* sobre la micorrización de raíces de lechuga fué similar al observado en plantas de maíz: la aplicación de *T. koningii* al mismo tiempo o una semana antes que *G. mosseae* produjo una disminución de la micorrización que fue gradual y menos drástica, siendo más marcada cuando *T. koningii* se inoculó antes que *G. mosseae* (Tabla 6).

La tinción SDH de raíces de lechuga mostró una disminución significativa del porcentaje de longitud de raíz micorrizado respecto a la tinción tradicional en las plantas

en las que *G. mosseae* se inoculó antes que *T. koningii*.

En ningún tratamiento la presencia de *G. mosseae* en el sustrato de crecimiento de *B. campestris* produjo micorrización de la raíz, si bien se observó un apreciable oscurecimiento de las mismas.

Alternaria alternata

Los efectos de la inoculación de *A. alternata* sobre el peso seco de las plantas ensayadas se exponen en la tabla 7.

Las plantas de maíz y lechuga respondieron en forma similar, tanto a la aplicación del endofito o del hongo saprófito por separado, como a la inoculación conjunta de los dos microorganismos.

Ambos hospedantes tuvieron un incremento significativo de sus pesos secos cuando *G. mosseae* se introdujo en el sustrato de crecimiento. Este aumento se mantuvo cuando *A. alternata*, se inoculó después del endofito.

Para los otros tiempos de inoculación, la aplicación del hongo saprófito disminuyó el peso seco de las plantas, presentando valores semejantes al control sin inocular, cuando *A. alternata* se agregó antes que *G. mosseae*, y algo mayores cuando ambos microorganismos se inocularon al mismo tiempo. En este último caso, el peso seco de las plantas de maíz fué menor que el de las plantas inoculadas sólo con *G. mosseae*, aunque significativamente superior al de los controles sin inocular.

El efecto de la inoculación de los distintos microorganismos en la rizósfera de plantas de *Brassica* (Tabla 7), indica que, mientras la aplicación de *A. alternata* o *G. mosseae* por separado no afectó de ninguna manera el desarrollo de las plantas, la inoculación conjunta de ambos microorganismos produjo, en los tres tiempos en los que se inoculó el saprófito, un aumento significativo de la altura

de las plantas. Este aumento fué aún más marcado cuando *A. alternata* se aplicó una semana antes que el endofito VA.

Los porcentajes de longitud de raíz micorrizada para plantas de maíz y lechuga se muestran en las Tablas 8 y 9.

Los resultados observados muestran que la presencia de *A. alternata*, en los distintos tiempos de inoculación, produjo efectos similares sobre la infección VA de ambas plantas hospedantes.

La aplicación de *A. alternata* al mismo tiempo o antes que *G. mosseae*, disminuyó la micorrización de las raíces de maíz y lechuga. Esta disminución fué notablemente más drástica, cuando el saprófito ya estaba en la rizósfera al tiempo de inocular *G. mosseae*. En el caso del maíz, la infección VA se redujo casi un 80 % respecto al control, presentando, además, una menor densidad de estructuras intraradicales en la raíz colonizada.

Los porcentajes de micorrización de la raíz de lechuga (Tabla 9), se mantuvieron similares sólo cuando el saprófito se aplicó después de *G. mosseae*, si bien la tinción de la actividad SDH de la raíz muestra que un tercio de la micorrización observada en las raíces de lechuga es inactiva.

Ninguna de las plantas de *Brassica* inoculada con *G. mosseae* desarrolló infección VA en sus raíces, las que, sin embargo, se oscurecieron siempre que *G. mosseae* se encontraba en el sustrato.

Fusarium equiseti

El efecto de la inoculación de *F. equiseti* sobre el peso seco de las tres plantas ensayadas, en presencia o no de *G. mosseae*, se recoge en la Tabla 10.

El aumento del peso seco alcanzado por las plantas de maíz como resultado de la micorrización VA, sólo se mantuvo cuando *F. equiseti* se inoculó en la rizósfera dos semanas

después de *G. mosseae*. Cuando *F. equiseti* se inoculó antes o al mismo tiempo que *G. mosseae* los pesos secos de las plantas de maíz fueron similares a los alcanzados por plantas control sin inocular, o inoculadas sólo con el hongo saprófito.

El efecto de la inoculación de *F. equiseti* y *G. mosseae* sobre plantas de lechuga fué similar al observado en maíz: la aplicación de *F. equiseti* al sustrato cuando el endofito ya estaba establecido, no afectó el desarrollo de las plantas, las que presentaron pesos secos similares a su control micorrizado (Tabla 10). La inoculación de *F. equiseti* antes o al mismo tiempo que *G. mosseae*, en cambio, resultó en plantas con pesos secos significativamente menores.

Si bien la inoculación de plantas de *Brassica* con *F. equiseti* o *G. mosseae* por separado no produjo diferencias en el desarrollo de estas plantas respecto al control sin inocular, la aplicación de ambos microorganismos, en los tres tipos de inoculación ensayados, resultó en plantas significativamente más altas que aquellas no inoculadas.

Los datos de porcentaje de micorrización indican que *F. equiseti* afectó la colonización VA de las raíces de maíz cuando se inoculó al mismo tiempo, o una semana antes que el endofito. Produciendo, en este último caso una disminución de la micorrización cercana al 50 % (Tabla 11), y una infección con menor cantidad de vesículas por centímetro de raíz micorrizada.

La aplicación de *F. equiseti* al sustrato cuando el endofito ya estaba establecido, no afectó el porcentaje de colonización VA de las raíces de lechuga (Tabla 12), mientras que la inoculación de *F. equiseti* antes o al mismo tiempo que *G. mosseae*, produjo una disminución significativa del porcentaje de longitud de raíz micorrizada. La aplicación de *F. equiseti* una semana antes o al mismo tiempo que *G. mosseae*, provocó una disminución drástica del porcentaje de

infección VA con actividad SDH.

Fusarium solani

En la Tabla 13 se observa que, si bien la inoculación de *F. solani* por sí sola no produjo diferencias significativas en el peso seco de las plantas de maíz, respecto a los controles no inoculados, la aplicación de este saprófito junto con *G. mosseae*, resultó en plantas con pesos secos muy similares a los de plantas micorrizadas solamente, en los tres tiempos de inoculación considerados (Tabla 13).

La inoculación de *F. solani* en la rizósfera de lechuga antes o al mismo tiempo que *G. mosseae*, produjo plantas con pesos secos significativamente menores a los obtenidos sólo con la inoculación del endofito.

La aplicación de *F. solani* una vez que *G. mosseae* se hallaba en el sustrato, produjo plantas con pesos secos similares al control de micorrización.

En plantas de *Brassica*, la inoculación de cada microorganismo por separado, *F. solani* o *G. mosseae*, no afectó en modo alguno el desarrollo de las plantas, las que presentaron alturas similares a sus controles no inoculados (Tabla 13).

La aplicación de ambos microorganismos a la rizósfera de *Brassica* en los tres tiempos de inoculación, resultó en plantas significativamente más altas.

F. solani no afectó, en ningún caso, la infección VA de raíces de maíz, que mantuvo siempre valores similares a su control (Tabla 14).

La inoculación de *G. mosseae* antes que el hongo saprófito no produjo un aumento cuantitativo de la infección VA, sin embargo, en este tratamiento se observó un mayor número de arbusculos y unidades de infección por centímetro de raíz colonizada.

Cuando el hongo saprófito se inoculó antes o al mismo tiempo que *G. mosseae* en la rizósfera de plantas de lechuga, se encontró una disminución significativa del porcentaje de micorrización VA de la raíz, que fué más marcada cuando *F. solani* se aplicó al suelo antes que el endofito (Tabla 15).

En los tres casos toda la infección VA cuantificada resultó efectiva.

La tinción y observación de las raíces de *B. campestris* confirmó que no hubo infección VA en ningún caso en que *G. mosseae* se inoculó al sustrato de crecimiento de las plantas.

TABLA 1. Peso seco (parte aérea) de plantas de maíz (*Z. mays*) y lechuga (*L. sativa*), y altura de plantas de *Brassica* en presencia o ausencia de *G.mosseae* e inoculadas o no con *A. niger* según los distintos tiempos de inoculación

Tiempos de inoculación	Tratamientos	Peso seco (mg)		altura (cm)
		Maíz	Lechuga	<i>Brassica</i>
M y An.	C	690 a	0.38 a	26.4 a
	An.	747 a	0.48 a	22.3 a
	M	1095 b	0.78 b	23.5 a
	M + An.	954 b	0.34 a	42.0 b
M + An.	C	658 a	0.46 a	24.8 a
	An.	755 a	0.46 a	24.5 a
	M	1116 b	0.86 b	23.4 a
	M + An.	1017 b	0.82 b	35.0 b
An.+ M	C	690 a	0.38 a	26.4 a
	An.	744 a	0.48 a	26.3 a
	M	1095 b	0.78 b	23.5 a
	M + An	810 a	0.46 a	47.3 b

C= control no inoculado

An= plantas inoculadas con *A. niger*

M= plantas inoculadas con *G. mosseae*

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Letras distintas dentro de una columna indican diferencia significativa

(P= 0,05).

Tabla 2. Porcentaje de longitud de raíz micorrizada, y cantidad de estructuras intraradicales por cm de raíz de plantas de maíz (*Z. mays*) en presencia de *G. mosseae*, e inoculadas o no con *A. niger*, en los distintos tiempos de inoculación.

Tiempo de inoculación	Tratamientos	% de long. de raíz micorriz.	vesículas	arbúsculos	unidades de infección
M y An.	M	40.4 a	5.5 a	48.1 a	0.22 a
	M + An.	36.5 a	3.7 a	64.6 a	0.24 a
M + An.	M	38.7 a	6.7 a	50.7 a	0.23 a
	M + An.	43.8 a	4.1 a	91.2 a	0.23 a
An. + M	M	40.4 a	5.5 a	48.1 a	0.22 a
	M + An.	25.1 b	4.8 a	55.4 a	0.28 a

M y An igual que Tabla 1.

Letras distintas dentro de una columna indican diferencia significativa ($P=0,05$).

Tabla 3. Porcentaje de longitud de raíz micorrizada y porcentaje de raíz micorrizada con actividad SDH en plantas de lechuga (*L. sativa*), en presencia de *G. mosseae* e inoculadas o no con *A. niger*, en los distintos tiempos de inoculación.

Tiempo de de inoculación	Tratamientos	% de long. de raíz micorrizada	% de long. de raíz con actividad SDH
M y An.	M	84.4 a	86.0 a
	M + An.	31.6 b	33.3 b
M + An.	M	76.2 a	80.3 a
	M + An.	81.6 a	48.0 c
An. + M	M	84.4 a	86.0 a
	M + An.	16.8 c	24.7 b

M y An. igual que Tabla 2.

Letras distintas dentro de una columna indican diferencia significativa ($P = 0,05$).

TABLA 4. Peso seco (parte aérea) de plantas de maíz (*Z. mays*) y lechuga (*L. sativa*), y altura de plantas de *Brassica* en presencia o ausencia de *G.mosseae* e inoculadas o no con *T. koningii* según los distintos tiempos de inoculación

Tiempos de inoculación	Tratamientos	Peso seco (mg)		altura (cm)
		Maiz	Lechuga	<i>Brassica</i>
M y Tk.	C	690 a	0.38 a	26.4 a
	Tk.	670 a	0.48 a	21.8 a
	M	1095 b	0.78 b	23.5 a
	M + Tk.	750 a	0.32 a	26.1 a
M + Tk.	C	658 a	0.46 a	24.8 a
	Tk	644 a	0.42 a	23.5 a
	M	1116 b	0.86 b	23.4 a
	M + Tk.	980 b	0.84 b	21.4 a
Tk.+ M	C	690 a	0.38 a	26.4 a
	Tk.	570 a	0.24 a	26.1 a
	M	1095 b	0.78 b	23.5 a
	M + Tk.	718 a	0.40 a	47.3 b

C= control no inoculado

Tk= plantas inoculadas con *T. koningii*.

M= Plantas inoculadas con *G. mosseae*

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Letras distintas dentro de una columna indican diferencia significativa

(P= 0,05).

Tabla 5. Porcentaje de longitud de raíz micorrizada, y cantidad de estructuras intraradicales por cm de raíz de plantas de maíz (*Z. mays*) en presencia de *G. mosseae*, e inoculadas o no con *T. koningii*, en los distintos tiempos de inoculación.

Tiempo de inoculación	Tratamientos	% de long. de raíz micorriz.	vesículas	arbúsculos	unidades de infección
M y Tk.	M	40.4 a	5.5 a	48.1 a	0.22 a
	M + Tk.	3.9 b	0.7 b	4.1 b	0.02 b
M + Tk.	M	38.7 a	6.7 a	50.7 a	0.23 a
	M + Tk.	21.0 c	3.1 a	38.8 a	0.13 a
Tk. + M	M	40.4 a	5.5 a	48.1 a	0.22 a
	M + Tk.	3.7 b	0.5 b	2.2 b	0.01 b

Tk y M igual Tabla 4.

Letras distintas dentro de una columna indican diferencia significativa ($P= 0,05$).

Tabla 6. Porcentaje de longitud de raíz micorrizada y porcentaje de raíz micorrizada con actividad SDH en plantas de lechuga (*L. sativa*), en presencia de *G. mosseae* e inoculadas o no con *T. koningii*, en los distintos tiempos de inoculación.

Tiempo de inoculación	Tratamientos	% de long. de raíz micorrizada	% de long. de raíz con actividad SDH
M y Tk.	M	84.4 a	86.0 a
	M + Tk.	37.3 b	40.1 b
M + Tk.	M	76.2 a	80.3 a
	M + Tk.	72.3 a	38.6 b
Tk. + M	M	84.4 a	86.0 a
	M + Tk.	26.3 b	18.3 c

Tk. y M igual que Tabla 5.

Letras distintas dentro de una columna indican diferencia significativa ($P= 0,05$).

TABLA 7. Peso seco (parte aérea) de plantas de maíz (*Z. mays*) y lechuga (*L. sativa*), y altura de plantas de *Brassica* en presencia o ausencia de *G.mosseae* e inoculadas o no con *A. alternata* según los distintos tiempos de inoculación

Tiempos de inoculación	Tratamientos	Peso seco (mg)		altura (cm)
		Maíz	Lechuga	<i>Brassica</i>
M y Aa.	C	690 a	0.38 a	26.4 a
	Aa.	695 a	0.42 a	23.7 a
	M	1095 b	0.78 b	23.5 a
	M + Aa.	870 c	0.50 a	32.2 b
M + Aa.	C	658 a	0.46 a	24.8 a
	Aa.	710 a	0.42 a	24.5 a
	M	1116 b	0.86 b	23.4 a
	M + Aa.	980 b	0.74 b	37.3 bc
Aa.+ M	C	690 a	0.38 a	26.4 a
	Aa.	698 a	0.48 a	29.8 a
	M	1095 b	0.78 b	23.5 a
	M + Aa.	730 a	0.46 a	45.7 c

C= Control no inoculado

Aa= Plantas inoculadas con *A. alternata*.

M= Plantas inoculadas con *G. mosseae*.

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Letras distintas dentro de una columna indican diferencia significativa (P= 0,05).

Tabla 8. Porcentaje de longitud de raíz micorrizada, y cantidad de estructuras intraradicales por cm de raíz de plantas de maíz (*Z. mays*) en presencia de *G. mosseae*, e inoculadas o no con *A. alternata*, en los distintos tiempos de inoculación.

Tiempos de inoculación	Tratamientos	% de long. de raíz micorriz.	vesículas	arbúsculos	unidades de infección
M y Aa.	M	40.4 a	5.5 a	48.1 a	0.22 a
	M + Aa.	25.6 b	5.2 a	57.1 a	0.24 a
M + Aa.	M	38.7 a	6.7 a	50.7 a	0.23 a
	M + Aa.	33.7 a	4.6 a	31.5 a	0.21 a
Aa. + M	M	40.4 a	5.5 a	48.1 a	0.22 a
	M + Aa.	4.7 c	0.2 b	6.1 b	0.05 b

M y Aa igual que Tabla 7.

Letras distintas dentro de una columna indican diferencia significativa ($P= 0,05$).

Tabla 9. Porcentaje de longitud de raíz micorrizada y porcentaje de raíz micorrizada con actividad SDH en plantas de lechuga (*L. sativa*), en presencia de *G. mosseae* e inoculadas o no con *A. alternata*, en los distintos tiempos de inoculación.

Tiempo de inoculación	Tratamientos	% de raíz micorrizada	% de raíz con actividad SDH
M y Aa.	M	84.4 a	86.0 a
	M + Aa.	43.3 b	29.6 b
M + Aa.	M	76.2 a	80.3 a
	M + Aa.	80.3 a	45.2 c
Aa. + M	M	84.4 a	86.0 a
	M + Aa.	31.0 b	26.8 b

M y Aa. igual que Tabla 8.

Letras distintas dentro de una columna indican diferencia significativa ($P=0,05$)

TABLA 10. Peso seco (parte aérea) de plantas de maíz (*Z. mays*) y lechuga (*L. sativa*), y altura de plantas de *Brassica* en presencia o ausencia de *G.mosseae* e inoculadas o no con *F. equiseti* según los distintos tiempos de inoculación

Tiempos de inoculación	Tratamientos	Peso seco (mg)		altura (cm)
		Maíz	Lechuga	<i>Brassica</i>
M y Fe.	C	690 a	0.38 a	26.4 a
	Fe.	713 a	0.42 a	28.7 a
	M	1095 b	0.78 b	23.5 a
	M + Fe.	790 a	0.28 a	35.4 b
M + Fe.	C	658 a	0.46 a	24.8 a
	Fe.	730 a	0.40 a	19.9 a
	M	1116 b	0.80 b	23.4a
	M + Fe.	1010 b	0.68 b	33.0 b
Fe.+ M	C	690 a	0.38 a	26.4 a
	Fs.	650 a	0.48 a	28.2 a
	M	1095 b	0.78 b	23.5 a
	M + Fe.	720 a	0.34 a	35.6 b

C= Control sin inocular

Fe= Plantas inoculadas con *F. equiseti*.

M= Plantas inoculadas con *G. mosseae*.

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Letras distintas dentro de una columna indican diferencia significativa (P= 0,05).

Tabla 11. Porcentaje de longitud de raíz micorrizada, y cantidad de estructuras intraradicales por cm de raíz de plantas de maíz (*Z. mays*) en presencia de *G. mosseae*, e inoculadas o no con *F. equiseti*, en los distintos tiempos de inoculación.

Tiempos de inoculación	Tratamientos	% de long. de raíz micorriz.	vesículas	arbúsculos	unidades de infección
M y Fe.	M	40.4 a	5.5 a	48.1 a	0.22 a
	M + Fe.	30.5 b	3.6 a	52.2 a	0.24 a
M + Fe.	M	38.7 a	6.7 a	50.7 a	0.23 a
	M + Fe.	32.7 a	3.2 a	47.8 a	0.10 a
Fe. + M	M	40.4 a	5.5 a	48.1 a	0.22 a
	M + Fe.	17.2 b	0.5 b	29.3 a	0.19 a

M y Fe igual que Tabla 10.

Letras distintas dentro de una columna indican diferencia significativa ($P=0,05$).

Tabla 12. Porcentaje de longitud de raíz micorrizada y porcentaje de raíz micorrizada con actividad SDH en plantas de lechuga (*L. sativa*), en presencia de *G. mosseae* e inoculadas o no con *F. equiseti*, en los distintos tiempos de inoculación.

Tiempo de inoculación	Tratamientos	% de raíz micorrizada	% de raíz con actividad SDH
M y Fe.	M	84.4 a	86.0 a
	M + Fe.	21.9 b	20.7 b
M + Fe.	M	76.2 a	80.3 a
	M + Fe.	69.4 a	68.3 a
Fe. + M	M	84.4 a	86.0 a
	M + Fe.	29.2 b	9.3 b

M y Fe. igual que Tabla 11.

Letras distintas dentro de una columna indican diferencia significativa ($P= 0,05$).

TABLA 13. Peso seco (parte aérea) de plantas de maíz (*Z. mays*) y lechuga (*L. sativa*), y altura de plantas de *Brassica* en presencia o ausencia de *G. mosseae* e inoculadas o no con *F. solani* según los distintos tiempos de inoculación

Tiempos de inoculación	Tratamientos	Peso seco (mg)		altura (cm)
		Maíz	Lechuga	<i>Brassica</i>
M y Fs.	C	690 a	0.38 a	26.4 a
	Fs.	780 a	0.52 a	23.4 a
	M	1095 b	0.78 b	23.5 a
	M + Fs.	970 b	0.62 a	36.9 b
M + Fs.	C	658 a	0.46 a	24.8 a
	Fs.	716 a	0.49 a	26.1 a
	M	1116 b	0.86 b	23.4 a
	M + Fs.	1050 b	0.94 b	31.3 b
Fs.+ M	C	690 a	0.38 a	26.4 a
	Fs.	690 a	0.52 a	27.7 a
	M	1095 b	0.78 b	23.5 a
	M + Fs.	985 b	0.49 a	51.1 c

C= Control no inoculado

Fs= Plantas inoculadas con *F. solani*.

M= Plantas inoculadas con *G. mosseae*

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Letras distintas dentro de una columna indican diferencia significativa (P= 0,05).

Tabla 14. Porcentaje de longitud de raíz micorrizada, y cantidad de estructuras intraradicales por cm de raíz de plantas de maíz (*Z. mays*) en presencia de *G. mosseae*, e inoculadas o no con *F. solani*, en los distintos tiempos de inoculación.

Tiempos de inoculación	Tratamientos	% de long. de raíz micorriz.	vesículas	arbúsculos	unidades de infección
M y Fs.	M	40.4 a	5.5 a	48.1 a	0.22 a
	M + Fs.	32.8 a	3.7 a	28.6 a	0.15 a
M + Fs.	M	38.7 a	6.7 a	50.7 a	0.23 a
	M + Fs.	50.6 a	6.1 a	135.2 b	0.60 b
Fs. + M	M	40.4 a	5.5 a	48.1 a	0.22 a
	M + Fs.	31.4 a	3.4 a	39.6 a	0.20 a

M y Fs igual que Tabla 13.

Letras distintas dentro de una columna indican diferencia significativa ($P = 0,05$).

Tabla 15. Porcentaje de longitud de raíz micorrizada y porcentaje de raíz micorrizada con actividad SDH en plantas de lechuga (*L. sativa*), en presencia de *G. mosseae* e inoculadas o no con *F. solani*, en los distintos tiempos de inoculación.

Tiempo de inoculación	Tratamientos	% de raíz micorrizada	% de raíz con actividad SDH
M y Fs.	M	84.4 a	86.0 a
	M + Fs.	51.6 b	42.7 b
M + Fs.	M	76.2 a	80.3 a
	M + Fs.	81.2 a	75.0 a
Fs. + M	M	84.4 a	86.0 a
	M + Fs.	28.5 c	21.7 c

M y Fs igual que Tabla 14.

Letras distintas dentro de una columna indican diferencia significativa ($P= 0,05$).

EFEECTO DE LA INOCULACION DE *Glomus mosseae* SOBRE LA POBLACION DE HONGOS SAPROFITOS EN LA RIZOSFERA DE PLANTAS DE MAIZ, LECHUGA Y BRASSICA.

Aspergillus niger

El seguimiento de la población del saprófito en la rizósfera de plantas de maíz inoculadas y no inoculadas con *G. mosseae* muestra que *A. niger* disminuyó drásticamente, a partir de la 3a. semana, en aquellos tratamientos en los que *A. niger* se inoculó al mismo tiempo o después que el endofito (Fig. 3).

Cuando *A. niger* se inoculó al sustrato antes que *G. mosseae*, se observaron poblaciones similares a las alcanzadas por el control en la 3a. y 12a. semana), mientras que en la 7a. semana la población de *A. niger* disminuyó significativamente respecto a su control sin micorrizar.

La población de *A. niger* en la rizósfera de lechuga se comportó de forma similar a lo observado en la rizósfera de maíz: descendió significativamente a partir de la 3a. semana cuando el saprófito se inoculó al mismo tiempo o dos semanas después que *G. mosseae*. Cuando se inoculó antes que el endofito, la población final de *A. niger*, obtenida en el recuento realizado a la 12a. semana, resultó similar a su control sin micorrizar, si bien en la 7a. semana se observó un descenso significativo respecto al control (Fig. 4).

En los tres tiempos de inoculación considerados, la población de *A. niger* en la rizósfera de plantas de *Brassica* disminuyó significativamente a partir del primer muestreo (3a. semana), alcanzando valores mínimos al finalizar el ensayo (Fig. 5).

Trichoderma koningii

La evolución de la población de *T. koningii* en la micorrizósfera de maíz se muestra en la Fig. 6. *T. koningii* se mantuvo similar a su control, cuando se inoculó antes que *G. mosseae*.

Cuando *T. koningii* y *G. mosseae* se inocularon al mismo tiempo, la población del saprófito se mantuvo dentro de los niveles alcanzados por el control sin micorrizar hasta la 7a. semana, a partir de la cual se produjo una disminución significativa de *T. koningii* en el sustrato.

La inoculación de *T. koningii* una semana después del endofito, provocó una disminución de la población del saprófito a partir de la 3a. semana, alcanzando niveles mínimos en el último muestreo realizado.

En la rizósfera de lechuga, *T. koningii* evolucionó en forma similar a su control cuando se inoculó al mismo tiempo o antes que *G. mosseae* (Fig. 7).

La inoculación de *T. koningii* una vez que el endofito ya estaba establecido en la rizósfera, evidenció una reducción considerable de la población del saprófito en la última semana.

La población de *T. koningii* en la rizósfera de *Brassica* no resultó afectada por la presencia del endofito VA en ninguno de los tres tiempos de inoculación ensayados (Fig. 8).

Alternaria alternata

Los controles periódicos de la población de *A. alternata* en los ensayos realizados en invernadero, mostraron respuestas diferentes a la aplicación del endofito en la rizósfera de maíz y lechuga.

A. alternata, en ningún caso logró establecerse en la

rizósfera de maíz (Fig. 9). Los resultados obtenidos con la técnica de dilución de la muestra de suelo y siembra en placa, indican que, en ninguno de los tres tiempos de inoculación probados, se encontraron estructuras de reproducción.

En la rizósfera de lechuga, en cambio, la población de *A. alternata* mostró niveles similares a su control en los tres tratamientos ensayados (Fig. 10).

Un comportamiento similar se observó en la rizósfera de *Brassica*, donde la población de *A. alternata* evolucionó en forma paralela a los controles, presentando en los tres tratamientos niveles muy bajos de la población a partir de la tercera semana (Fig. 11).

Fusarium equiseti

La figura 12 muestra que el establecimiento de *G. mosseae* en las raíces de maíz no afectó el desarrollo de la población de *F. equiseti* en su rizósfera, en ninguno de los ensayos en los que se combinaron ambos microorganismos.

Así mismo, en ningún caso la presencia de *G. mosseae* en las raíces de lechuga afectó la población de *F. equiseti* en la rizósfera (Fig. 13).

En cuanto a la población de este saprófito en el sustrato de crecimiento de plantas de *Brassica*, la inoculación de *G. mosseae* antes o después del saprófito no afectó de ninguna manera la evolución de *F. equiseti* en la rizósfera (Fig. 14). Cuando ambos microorganismos se inocularon al mismo tiempo, la población de *F. equiseti* se mantuvo similar a su control a partir de la 7a. semana, si bien el muestreo realizado a la 3a. semana mostró un descenso significativo de la población del saprófito en la inoculación dual.

Fusarium solani

Los recuentos periódicos de la población de *F. solani* mostraron una evolución similar en las macetas inoculadas sólo con *F. solani*, y cuando el saprófito se inoculó al mismo tiempo o antes que *G. mosseae* (Fig. 15).

Cuando el endofito se aplicó al sustrato antes que *F. solani*, en cambio, la población del saprófito descendió drásticamente a partir de la tercera semana, mostrando desde entonces niveles significativamente más bajos que su control.

En la rizósfera de lechuga, la población de *F. solani* resultó afectada sólo cuando el endofito VA se inoculó antes que el hongo saprófito (Fig. 16). En este caso, la población de *F. solani* sufrió una disminución significativa, mientras que en los otros dos tiempos de inoculación la población del saprófito se mantuvo dentro de los niveles alcanzados por sus respectivos controles.

La figura 17 muestra la evolución de la población de *F. solani* en la rizósfera de *Brassica*, en los distintos tratamientos.

Los resultados indican que, en los tres casos, la población de *F. solani* alcanzó, al cabo de las once semanas del ensayo, valores similares en las plantas inoculadas y no inoculadas con el endofito VA.

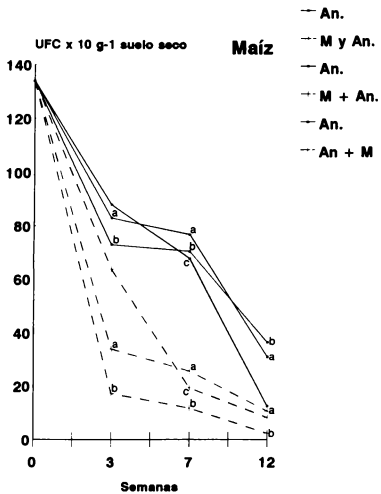


Figura 3

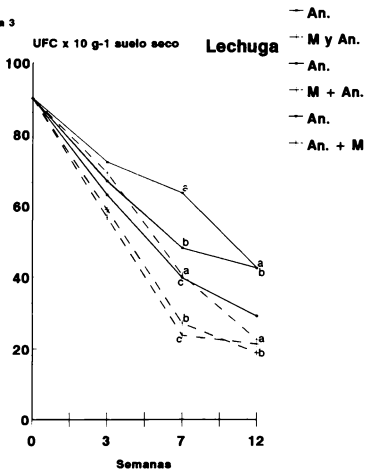


Figura 4

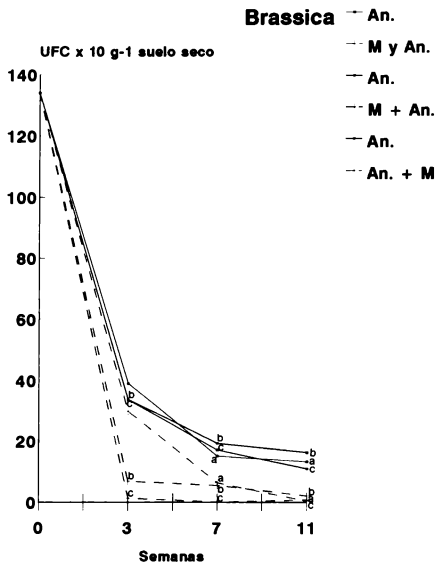


Fig. 5

Fig. 3: Evolución de la población de *A. niger* en la rizósfera de plantas de maíz, en presencia o ausencia (control) de *G. mosseae*.

La presencia de letras iguales a determinado tiempo indica diferencia significativa entre cada tratamiento y su control a dicho tiempo.

Fig. 4: Evolución de la población de *A. niger* en la rizósfera de plantas de lechuga, en presencia o ausencia (control) de *G. mosseae*.

Las diferencias significativas dentro de cada tratamiento se indican igual que en la Fig. 3.

Fig. 5: Evolución de la población de *A. niger* en la rizósfera de plantas de *B. campestris*, en presencia o ausencia (control) de *G. mosseae*.

Las diferencias significativas dentro de cada tratamiento se indican igual que en la Fig. 4.

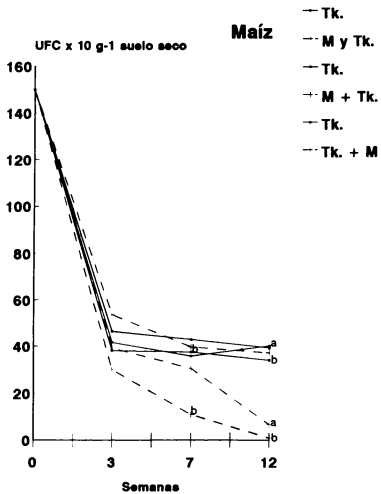


Fig. 6

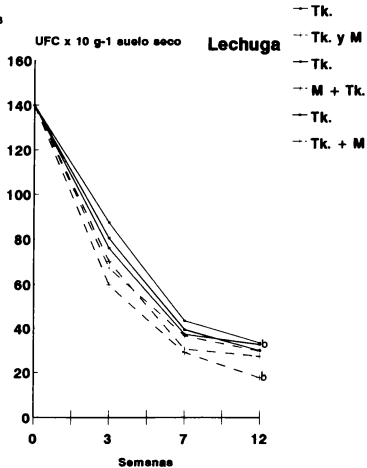


Fig. 7

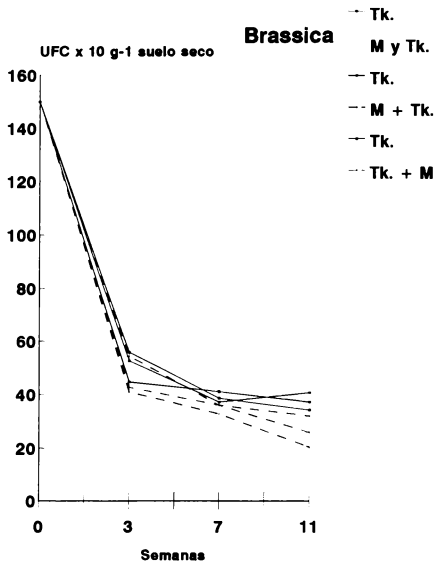


Fig. 8

Fig. 6: Evolución de la población de *T. koningii* en la rizósfera de plantas de maíz, en presencia o ausencia (control) de *G. mosseae*.

La presencia de letras iguales a determinado tiempo indica diferencia significativa entre cada tratamiento y su control a dicho tiempo

Fig. 7: Evolución de la población de *T. koningii* en la rizósfera de plantas de lechuga, en presencia o ausencia (control) de *G. mosseae*.

Las diferencias significativas dentro de cada tratamiento se indican igual que en la Fig. 6.

Fig. 8: Evolución de la población de *T. koningii* en la rizósfera de plantas de *B. campestris*, en presencia o ausencia (control) de *G. mosseae*.

Las diferencias significativas dentro de cada tratamiento se indican igual que en la Fig. 6.

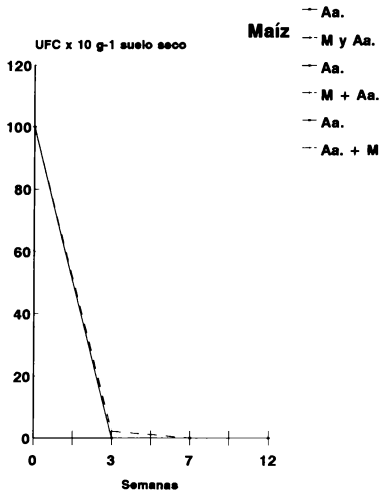


Fig. 9

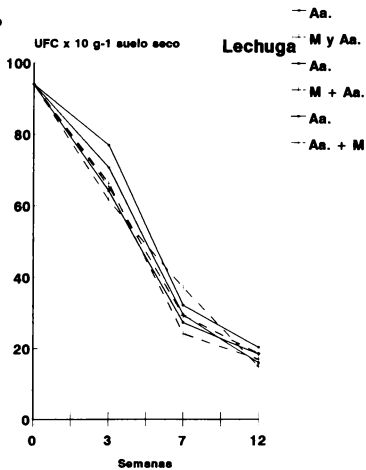


Fig. 10

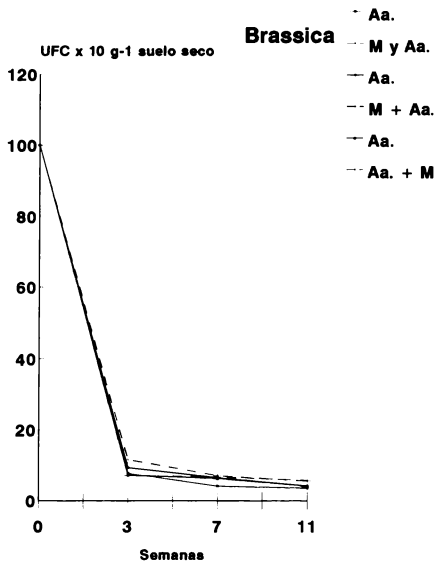


Fig. 11

Fig. 9: Evolución de la población de *A. alternata* en la rizósfera de plantas de maíz, en presencia o ausencia (control) de *G. mosseae*.

La presencia de letras iguales a determinado tiempo indica diferencia significativa entre cada tratamiento y su control a dicho tiempo.

Fig. 10: Evolución de la población de *A. alternata* en la rizósfera de plantas de lechuga, en presencia o ausencia (control) de *G. mosseae*.

Las diferencias significativas dentro de cada tratamiento se indican igual que en la Fig. 9.

Fig. 11: Evolución de la población de *A. alternata* en la rizósfera de plantas de *B. campestris*, en presencia o ausencia (control) de *G. mosseae*.

Las diferencias significativas dentro de cada tratamiento se indican igual que en la Fig. 9.

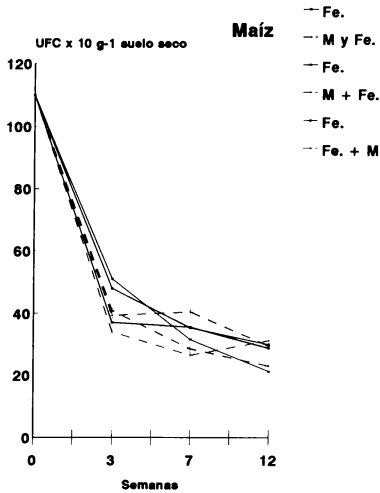
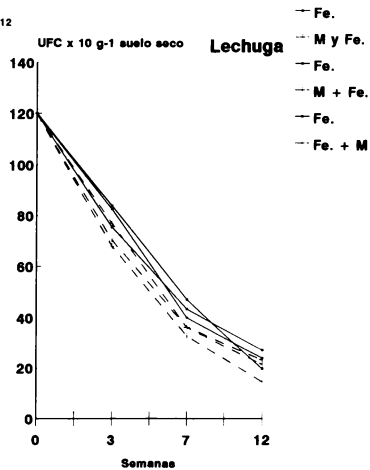


Fig. 12



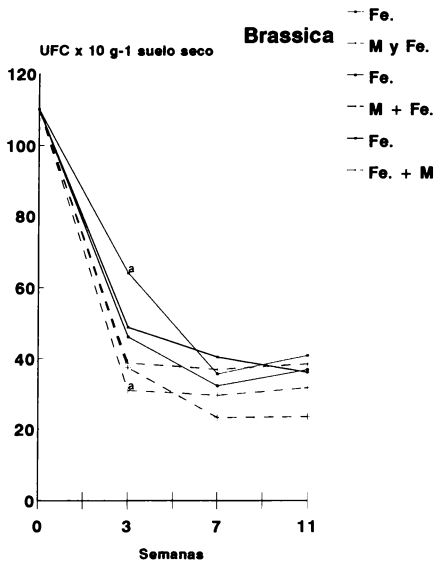


Fig. 14

Fig. 12: Evolución de la población de *F. equiseti* en la rizósfera de plantas de maíz, en presencia o ausencia (control) de *G. mosseae*.
La presencia de letras iguales a determinado tiempo indica diferencia significativa entre cada tratamiento y su control a dicho tiempo.

Fig. 13: Evolución de la población de *F. equiseti* en la rizósfera de plantas de lechuga, en presencia o ausencia (control) de *G. mosseae*.
Las diferencias significativas dentro de cada tratamiento se indican igual que en la Fig. 12.

Fig. 14: Evolución de la población de *F. equiseti* en la rizósfera de plantas de *B. campestris*, en presencia o ausencia (control) de *G. mosseae*.
Las diferencias significativas dentro de cada tratamiento se indican igual que en la Fig. 12.

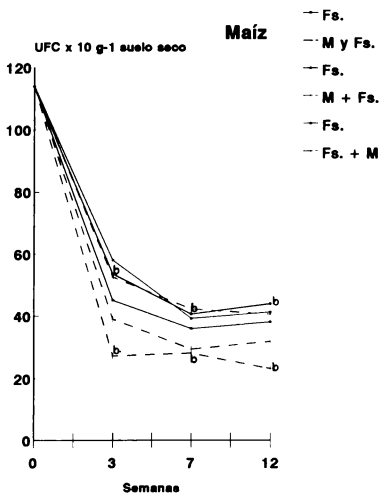


Fig. 15

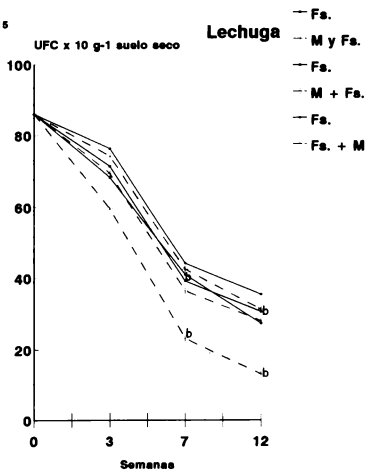


Fig. 16

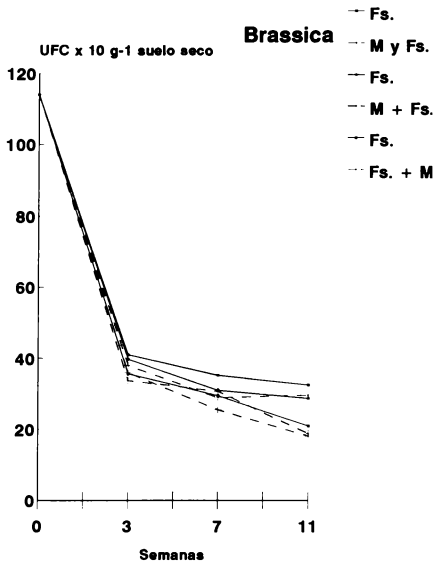


Fig. 17

Fig. 15: Evolución de la población de *F. solani* en la rizósfera de plantas de maíz, en presencia o ausencia (control) de *G. mosseae*.
La presencia de letras iguales a determinado tiempo indica diferencia significativa entre cada tratamiento y su control a dicho tiempo.

Fig. 16: Evolución de la población de *F. solani* en la rizósfera de plantas de lechuga, en presencia o ausencia (control) de *G. mosseae*.
Las diferencias significativas dentro de cada tratamiento se indican igual que en la Fig. 15.

Fig. 17: Evolución de la población de *F. solani* en la rizósfera de plantas de *B. campestris*, en presencia o ausencia (control) de *G. mosseae*.
Las diferencias significativas dentro de cada tratamiento se indican igual que en la Fig. 15.

EFEECTO DE LA INOCULACION DE HONGOS SAPROFITOS SOBRE LA MICORRIZACION DE PLANTAS DE MAIZ EN CULTIVO AXENICO.

A. niger, *T. koningii*, *A. alternata* y *F. equiseti* provocaron una disminución significativa de la micorrización VA de las raíces, cuando se inocularon en los tubos al mismo tiempo que *G. mosseae*, si bien, la reducción de la infección VA que produjo *F. equiseti* fué menor que la observada en los otros tres hongos (Tablas 16, 17, 18 y 19).

F. solani fué el único hongo saprófito inoculado que no afectó el porcentaje de micorrización VA de las raíces de maíz (Tabla 20).

El recuento de las estructuras intraradicales de *G. mosseae* indicó que la introducción de cualquiera de los hongos saprófitos resultó en infecciones VA con menor número de vesículas por cm de raíz. La densidad de arbusculos y unidades de infección, sin embargo se redujo ante la presencia de *A. niger*, *T. koningii* o *A. alternata* en el sustrato (Tablas 16, 17 y 28), permaneciendo constante cuando se agregó cualquiera de las dos especies de *Fusarium* (Tablas 19 y 20).

En todos los casos la inoculación de los hongos saprófitos dos semanas después de *G. mosseae* no afectó la colonización de las raíces por el endofito, la que resultó similar al control, tanto en porcentaje de micorrización como en cantidad de estructuras intrarradicales.

Tabla 16. Porcentaje de longitud de raíz micorrizada de plantas de maíz (*Z. mays*), en cultivo axénico en tubo, en presencia de *G. mosseae* e inoculadas o no con *A. niger*, en dos tiempos distintos de inoculación

Tiempo de inoculación	Tratamientos	% de long. de raíz micorriz.	vesículas	arbúsculos	unidades de infección
M y An.	M	64.3 a	1.7 a	140.1 a	4.0 a
	M + An.	14.6 b	0.8 b	62.6 b	1.8 b
M + An.	M	56.4 a	2.7 a	112.7 a	2.4 a
	M + An.	46.2 a	1.6 a	89.6 a	1.9 a

An= plantas inoculadas con *A. niger*

M= plantas inoculadas con *G. mosseae*

Letras distintas dentro de una columna indican diferencia significativa ($P= 0,05$).

Tabla 17. Porcentaje de longitud de raíz micorrizada de plantas de maíz (*Z. mays*), en cultivo axénico en tubo, en presencia de *G. mosseae* e inoculadas o no con *T. koningii*, en dos tiempos distintos de inoculación.

Tiempo de inoculación	Tratamientos	% de long. de raíz micorriz.	vesículas	arbusculos	unidades de infección
M y Tk.	M	64.3 a	1.7 a	140.1 a	4.0 a
	M + Tk.	7.5 b	0.7 b	52.9 b	1.2 b
M + Tk.	M	56.4 a	2.7 a	112.7 a	2.4 a
	M + Tk.	45.8 a	2.2 a	76.9 a	2.0 a

Tk= Plantas inoculadas con *T. koningii*.

M= Plantas inoculadas con *G. mosseae*

Letras distintas dentro de una columna indican diferencia significativa (P= 0,05).

Tabla 18. Porcentaje de longitud de raíz micorrizada de plantas de maíz (*Z. mays*), en cultivo axénico en tubo, en presencia de *G. mosseae* e inoculadas o no con *A. alternata*, en dos tiempos distintos de inoculación.

Tiempo de inoculación	Tratamientos	% de long. de raíz micorriz.	vesículas	arbusculos	unidades de infección
M y Aa.	M	64.3 a	1.7 a	140.1 a	4.0 a
	M + Aa.	14.4 b	0.6 b	60.7 b	2.2 b
M + Aa.	M	56.4 a	2.7 a	112.7 a	2.4 a
	M + Aa.	46.1 a	2.4 a	88.4 a	1.6 a

Aa= Plantas inoculadas con *A. alternata*

M= Plantas inoculadas con *G. mosseae*

Letras distintas dentro de una columna indican diferencia significativa (P= 0,05).

Tabla 19. Porcentaje de longitud de raíz micorrizada de plantas de maíz (*Z. mays*), en cultivo axénico en tubo, en presencia o ausencia de *G. mosseae* e inoculadas o no con *F. equiseti*, en dos tiempos distintos de inoculación.

Tiempo de inoculación	Trata- mientos	% de long. de raíz micorriz.	vesículas	arbúsculos	unidades de infección
M y Fe.	M	64.3 a	1.7 a	140.1 a	4.0 a
	M + Fe.	41.4 b	1.1 a	89.0 a	1.9 a
M + Fe.	M	56.4 a	2.7 a	112.7 a	2.4 a
	M + Fe.	51.6 a	1.6 a	103.1 a	1.5 a

Fe= Plantas inoculadas con *F. equiseti*

M= Plantas inoculadas con *G. mosseae*

Letras distintas dentro de una columna indican diferencia significativa (P= 0,05).

Tabla 20. Porcentaje de longitud de raíz micorrizada de plantas de maíz (*Z. mays*), en cultivo axénico en tubo, en presencia de *G. mosseae* e inoculadas o no con *F. solani*, en dos tiempos distintos de inoculación.

Tiempo de inoculación	Tratamientos	% de long. de raíz micorriz.	vesículas	arbusculos	unidades de infección
M y Fs.	M	64.3 a	1.7 a	140.1 a	4.0 a
	M + Fs.	62.9 a	0.4 b	113.8 a	2.6 a
M + Fs.	M	56.4 a	2.7 a	112.7 a	2.4 a
	M + Fs.	55.7 a	1.9 a	93.1 a	1.9 a

Fs= Plantas inoculadas con *F. solani*

M= Plantas inoculadas con *G. mosseae*

Letras distintas dentro de una columna indican diferencia significativa (P= 0,05).

EFEECTO DE LA INOCULACION DE *G. mosseae* SOBRE LA POBLACION DE HONGOS SAPROFITOS EN LA RIZOSFERA DE PLANTAS DE MAIZ EN CULTIVO AXENICO.

El efecto de la presencia del endofito VA en la rizósfera sobre la población del saprófito fué diferente según el hongo inoculado, y el tiempo de inoculación.

Las poblaciones de *A. niger* y *T. koningii* (Tablas 21 y 22), se mantuvieron dentro de los valores observados en sus respectivos controles, cuando se inocularon al sustrato al mismo tiempo que *G. mosseae*.

Si la aplicación de estos hongos se producía luego de dos semanas de la aplicación de *G. mosseae*, el recuento de las unidades formadoras de colonias mostró una disminución significativa de la población.

Ni *F. equiseti*, ni *F. solani* se afectaron por la presencia de *G. mosseae* en la rizósfera, en ninguno de los dos tiempos de inoculación ensayados (Tablas 24 y 25).

A. alternata (Tabla 23) sufrió una disminución drástica de su población en los dos tratamientos, inoculado y no inoculado con el endofito, y tiempos de aplicación, llegando aún a desaparecer por completo, según el recuento realizado siguiendo la técnica descrita en 1.10.

Por el contrario, si se repetía el recuento, pero esta vez sin filtrar la suspensión obtenida a partir de la muestra, a través de la tela de nylon, la siembra en cajas de Petri mostró la presencia del hongo en el control, y un descenso significativo de su población cuando se inoculó al sustrato dos semanas despues de *G. mosseae*.

Tabla 21. Unidades formadoras de colonias (UFC) de *A. niger* por gramo de sustrato de crecimiento de plantas de maíz (*Z. mays*) en cultivo axénico, inoculadas o no con *G. mosseae* en dos tiempos distintos de inoculación.

Tiempos de inoculación	Tratamientos	UFC x 10 gr ⁻¹ suelo después de (semanas)	
		0 semana	10 semana
M y An.	An.	135	37.9± 8.1
	M + An.	135	23.2± 6.1
M + An.	An.	108	36.4±11.2
	M + An.	108	18.6± 3.8

An. y M igual que tabla 16.

Cada valor es la media de 5 repeticiones mas su desviación standard.

Tabla 22. Unidades formadoras de colonias (UFC) de *T. koningii* por gramo de sustrato de crecimiento de plantas de maíz (*Z. mays*) en cultivo axénico, inoculadas o no con *G. mosseae* en dos tiempos distintos de inoculación.

Tiempos de inoculación	Tratamientos	UFC x 10 gr ⁻¹ suelo después de (semanas)	
		0 semana	10 semana
M y Tk.	Tk.	110	41.5±11.6
	M + Tk.	110	32.8± 9.6
M + Tk.	Tk.	98.8	29.4± 8.8
	M + Tk.	98.8	8.7± 4.3

Tk. y M igual que Tabla 17.

Cada valor es la media de 5 repeticiones mas su desviación standard.

Tabla 23. Unidades formadoras de colonias (UFC) de *A. alternata* por gramo de sustrato de crecimiento de plantas de maíz (*Z. mays*) en cultivo axénico, inoculadas o no con *G. mosseae* en dos tiempos distintos de inoculación.

Tiempos de inoculación	Tratamientos	UFC x 10 ⁶ gr ⁻¹ suelo después de (semanas)	
		0 semana	10 semana
M y Aa.	Aa.	88.2	5.2± 6.8
	M + Aa.	88.2	0.0± 0.0
M + Aa.	Aa.	87.4	3.1± 2.9
	M + Aa.	87.4	6.2± 5.7

An. y M igual que Tabla 18.

Cada valor es la media de 5 repeticiones mas su desviación standard.

Tabla 24. Unidades formadoras de colonias (UFC) de *F. equiseti* por gramo de sustrato de crecimiento de plantas de maiz (*Z. mays*) en cultivo axénico, inoculadas o no con *G. mosseae* en dos tiempos distintos de inoculación.

Tiempos de inoculación	Tratamientos	UFC x 10 gr ⁻¹ suelo después de (semanas)	
		0 semana	10 semana
M y Fe.	Fe.	86.5	20.8± 9.3
	M + Fe.	86.5	31.6± 6.9
M + Fe.	Fe.	65.7	26.5± 8.6
	M + Fe.	62.7	18.6± 5.6

Fe. y M igual que Tabla 19.

Cada valor es la media de 5 repeticiones mas su desviación standard.

Tabla 25. Unidades formadoras de colonias (UFC) de *F. solani* por gramo de sustrato de crecimiento de plantas de maíz (*Z. mays*) en cultivo axénico, inoculadas o no con *G. mosseae* en dos tiempos distintos de inoculación.

Tiempos de inoculación	Tratamientos	UFC x 10 gr ⁻¹ suelo después de (semanas)	
		0 semana	10 semana
M y Fs.	Fs.	66.2	23.6±12.0
	M + Fs.	66.2	29.2± 9.3
M + Fs.	Fs.	62.7	18.5± 8.6
	M + Fs.	62.7	9.8± 6.3

Fs. y M igual que Tabla 20.

Cada valor es la media de 5 repeticiones mas su desviación standard.

DETERMINACION DE LA LONGITUD TOTAL DE MICELIO Y LA DISTRIBUCION DE DIAMETROS HIFALES EN LA RIZOSFERA DE PLANTAS DE MAIZ Y *Brassica campestris*.

La Tabla 26 muestra los resultados de longitud total de micelio obtenidos por la técnica de Jones y Mollison (1948) modificada (1979), así como la distribución de diámetros hifales observada en la rizósfera de plantas de maíz. De todos los hongos ensayados, sólo *A. niger*, cuando se inoculó antes que *G. mosseae*, mostró un incremento significativo de la longitud de total de micelio. *T. koningii*, *A. alternata*, *F. equiseti* y *F. solani* presentaron valores similares a los controles de micorrización y de cada hongo saprófito.

Si bien la cantidad total de micelio no varió en estos cuatro hongos, se observó una distribución diferente de los diámetros hifales, que en todos los casos fué similar al control de cada hongo saprófito.

Las observaciones en la rizósfera de *B. campestris* (Tabla 27), muestran un desarrollo hifal muy pobre por parte de *G. mosseae* en comparación con los valores alcanzados por los distintos hongos saprófitos, inoculados individual o conjuntamente con *G. mosseae*, en los distintos tiempos ensayados.

La distribución de los diámetros hifales muestra una importante disminución de las hifas de más de 3 μ de diámetro, en favor de hifas de menor calibre, para todos los hongos saprófitos, y en los tres tiempos de inoculación considerados.

Tabla 26. Longitud total de micelio y distribución de diámetros hifales en la rizósfera de plantas de maíz inoculadas o no con *G. mosseae*, en presencia o ausencia de los distintos hongos saprófitos.

Tratamientos	Longitud total de micelio (mts/g suelo seco)	Distribución de diámetros hifales (%)			
		<2 μ	2-3 μ	3-4 μ	>4 μ
M	0.51±0.16	1.2	24.3	57.8	16.7
An.	0.40±0.10	8.2	81.6	7.9	2.3
M y An.	0.65±0.21	6.8	73.1	20.1	
M + An.	0.70±0.23	7.6	63.8	23.2	5.4
An.+ M	0.72±0.18	10.0	65.8	24.2	
M	0.51±0.16	1.2	24.3	57.8	16.7
Tk.	0.49±0.11		42.4	57.6	
M y Tk.	0.64±0.10		44.3	43.6	12.1
M + Tk.	0.71±0.15		41.9	47.9	10.2
Tk.+ M	0.69±0.13		52.2	29.5	18.3
M	0.51±0.16	1.2	24.3	57.8	16.7
Aa.	0.45±0.12	21.1	86.5	2.4	
M y Aa.	0.58±0.10	12.6	62.0	21.1	
M + Aa.	0.59±0.20	15.5	47.6	36.9	
Aa.+ M	0.48±0.16	7.4	72.6	20.0	
M	0.51±0.16	1.2	24.3	57.8	16.7
Fe.	0.65±0.15	80.7	15.1	4.2	
M y Fe.	0.68±0.13	35.8	50.5	14.7	
M + Fe.	0.59±0.15	32.8	50.4	13.2	3.6
Fe.+ M	0.61±0.10	61.5	28.1	10.4	
M	0.51±0.16	1.2	24.3	57.8	16.7
Fs.	0.61±0.10	41.8	58.2		
M y Fs.	0.72±0.14	23.2	43.3	33.5	
M + Fs.	0.86±0.20	32.5	40.2	27.3	
Fs.+ M	0.69±0.17	19.2	50.5	30.3	

Tabla 27. Longitud total de micelio y distribución de diámetros hifales en la rizósfera de plantas de *B. campestris* inoculadas o no con *G. mosseae*, en presencia o ausencia de los distintos hongos saprófitos.

Tratamientos	Longitud total de micelio (mts/g suelo seco)	Distribución de diámetros hifales (%)			
		<2 μ	2-3 μ	3-4 μ	>4 μ
M	0.15±0.08	3.3	38.3	58.4	
An.	0.67±0.14	24.1	72.5	3.4	
M y An.	0.48±0.13	8.8	91.2		
M + An.	0.39±0.11	11.3	80.5	8.2	
An.+ M	0.34±0.10	12.1	75.5	9.0	
M	0.15±0.08	3.3	38.3	58.4	
Tk.	0.47±0.18	23.9	68.7	7.4	
M y Tk.	0.42±0.16	19.0	73.7	5.2	2.1
M + Tk.	0.39±0.12	9.3	84.2	6.5	
Tk.+ M	0.36±0.11	13.8	86.2		
M	0.15±0.08	3.3	38.3	58.4	
Aa.	0.54±0.16	95.1	3.6	1.3	
M y Aa.	0.42±0.15	80.9	9.2	0.9	
M + Aa.	0.37±0.12	78.2	17.7	4.0	
Aa.+ M	0.35±0.12	82.5	12.9	4.5	
M	0.15±0.08	3.3	38.3	58.4	
Fe.	0.58±0.15	72.3	24.8	2.9	
M y Fe.	0.56±0.12	89.5	7.4	3.1	
M + Fe.	0.79±0.25	83.2	12.6	4.2	
Fe.+ M	0.39±0.13	87.4	10.1	2.5	
M	0.15±0.08	3.3	38.3	58.4	
Fs.	0.68±0.18	83.1	16.9		
M y Fs.	0.63±0.16	74.3	25.7		
M + Fs.	0.65±0.13	78.9	18.5	2.6	
Fs.+ M	0.58±0.18	84.9	12.4	2.7	

EFFECTO DE LA GERMINACION DE ESPORAS DE *G. mosseae* SOBRE EL DESARROLLO DE LAS COLONIAS DE HONGOS SAPROFITOS.

Los hongos saprófitos crecieron en todas direcciones, erráticamente, sin tener en cuenta la posición de las esporas de *G. mosseae*, dispuestas en medio perímetro de la caja de Petri.

La germinación de esporas del endofito VA, cultivadas en el mismo medio, no afectó ni la velocidad ni el tipo de crecimiento de las colonias saprófitas.

EFFECTO DE LA INOCULACION DE HONGOS SAPROFITOS SOBRE LA GERMINACION Y CRECIMIENTO SAPROFITICO DE ESPORAS DE *G. mosseae* EN AGAR-AGUA.

El recuento periódico de las esporas germinadas en cada caja permitió detectar un efecto inhibitor de *A. niger*, *T. koningii*, *A. alternata* y *F. equiseti*. La tasa de germinación de las esporas VA disminuyó significativamente a partir del 13er día de incubación (Fig. 18).

T. koningii produjo una inhibición más marcada y más rápida que los otros hongos ensayados. El efecto inhibitor se puso de manifiesto de forma significativa a partir del 10o. día de incubación.

F. solani fué el único saprófito ensayado que no afectó negativamente la germinación de las esporas de *G. mosseae* a lo largo de todo el ensayo.

La figura 19 muestra que el crecimiento del micelio a partir de las esporas germinadas en cajas inoculadas con *A. niger* fué significativamente menor que los controles, no apareciendo, en ningún momento, esporas secundarias en el micelio VA.

Por el contrario, la inoculación de *F. solani* y *F. equiseti* produjo un incremento significativo del crecimiento hifal de *G. mosseae*, con formación de esporas vegetativas en el micelio, al 10o. y 13er. día de incubación respectivamente.

Si bien *T. koningii* provocó la aparición temprana de esporas secundarias, el desarrollo del micelio, en este caso, fué similar al control.

Por último, la inoculación de *A. alternata* en las cajas de Petri no afectó el crecimiento del micelio a partir de las esporas germinadas, ni estimuló la formación

de esporas vegetativas.

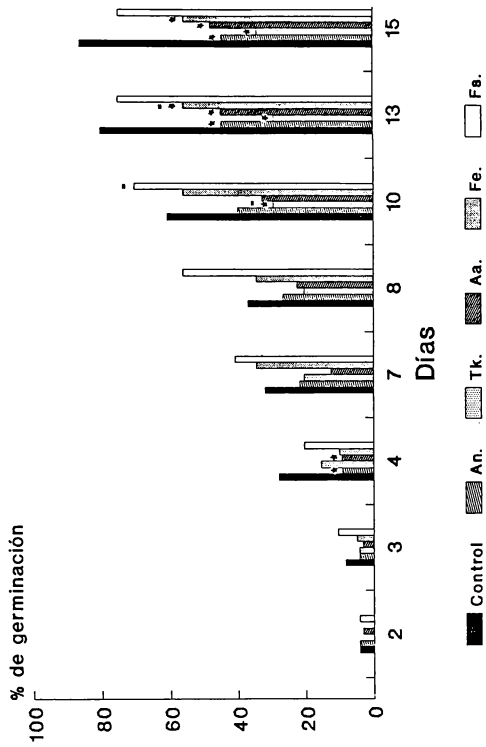
En los tratamientos controles no se observó la aparición de esporas secundarias durante el ensayo.

En todos los casos, los datos comparados se limitan a 15 días de incubación, teniendo en cuenta que, para tiempos más largos el micelio de algunos hongos saprófitos contactaba con las hifas de *G. mosseae*.

La observación del crecimiento de *T. koningii* por encima de ese tiempo permitió comprobar que no se producía hiperparasitismo de las hifas del hongo saprófito sobre las hifas del endofito VA.

En las figuras 20 y 21 se observa que el efecto inhibitor de *A. niger*, *T. koningii*, *A. alternata* y *F. equiseti* sobre la germinación de esporas (Fig. 20) y el crecimiento del micelio (Fig. 21) de *G. mosseae* en agar-agua tamponado con MES, fué similar al observado en agar-agua.

Las cajas inoculadas con *A. niger* presentaron, en este caso, una mayor tasa de germinación respecto al ensayo anterior, aunque siempre menor que el testigo (Fig. 20). Asimismo, el micelio desarrollado a partir de estas esporas sufrió una reducción significativa respecto a su control, sin producir en ningún momento esporas vegetativas (Fig. 21).



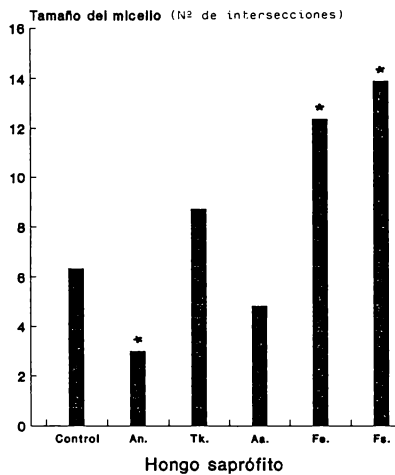


Fig. 19

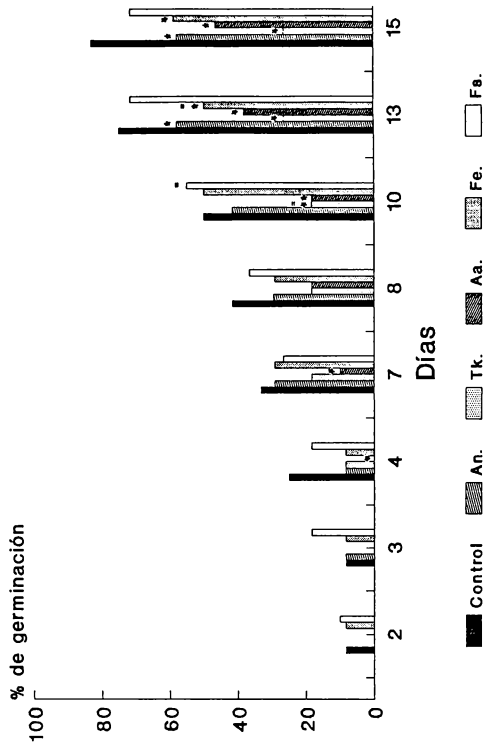
Fig. 18: Porcentaje de germinación de esporas de *G. mosseae* en agar-agua en presencia o ausencia (control) de hongos saprófitos.

* indica diferencia significativa ($P=0,05$ %) respecto al control.

= indica el momento de aparición de esporas secundarias.

Fig. 19: Desarrollo del micelio producido por esporas de *G. mosseae* en agar-agua, en presencia o ausencia (control) de hongos saprófitos.

* igual que Fig. 18.



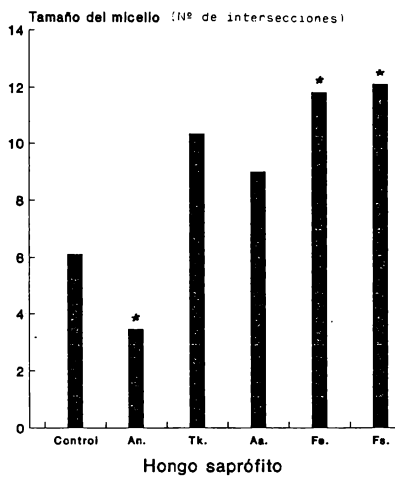


Fig. 21

Fig. 20: Porcentaje de germinación de esporas de *G. mosseae* en agar-agua tamponado con MES, en presencia o ausencia (control) de hongos saprófitos.

* indica diferencia significativa ($P=0,05$ %) respecto al control.

= indica el momento de aparición de esporas secundarias.

Fig. 21: Desarrollo del micelio producido por esporas de *G. mosseae* en agar-agua tamponado con MES, en presencia o ausencia (control) de hongos saprófitos.

* igual que Fig. 20.

EFFECTO DE LOS EXUDADOS FUNGICOS PRODUCIDOS POR LOS HONGOS SAPROFITOS SOBRE LA GERMINACION Y CRECIMIENTO SAPROFITICO DE ESPORAS DE *G. mosseae*.

La presencia de exudados fúngicos de *A. niger*, *T. koningii* y *A. alternata* en cajas con agar-agua provocó una importante disminución de los porcentajes de germinación de esporas de *G. mosseae* a partir de los 10 días de incubación (Fig. 22). Sin embargo, ninguna de las dos especies de *Fusarium* afectó la germinación de esporas VA a través de sus exudados.

La figura 23 representa el efecto de los distintos exudados fúngicos sobre el crecimiento saprofitico del micelio VA a los 15 días de incubación. *F. equiseti* y *F. solani* produjeron una estimulación significativa del desarrollo hifal de *G. mosseae* a través de sus exudados, mientras que la aplicación de exudados de *A. niger*, *T. koningii* o *A. alternata* al medio resultó en crecimientos hifales similares al control.

En los tratamientos en los que sólo se inoculó *G. mosseae* no aparecieron esporas secundarias, sin embargo, en los tratamientos en que se aplicaron exudados de *T. koningii*, *F. equiseti* o *F. solani* se observó la formación de esporas secundarias a los quince días de incubación.

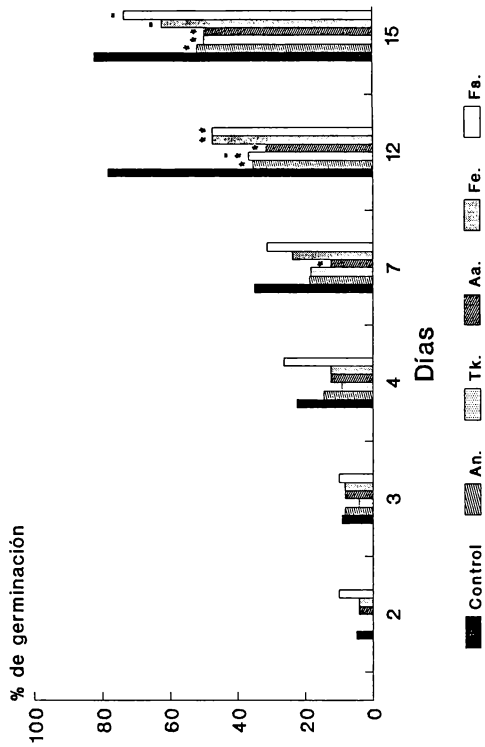


Fig. 22

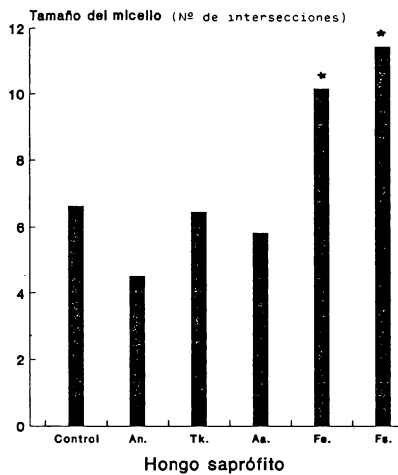


Fig. 23

Fig. 22: Porcentaje de germinación de esporas de *G. mosseae* en agar-agua, en presencia o ausencia (control) de exudados producidos por hongos saprófitos.

* indica diferencia significativa ($P=0,05$ %) respecto al control.

= indica el momento de aparición de esporas secundarias.

Fig. 23: Desarrollo del micelio producido por esporas de *G. mosseae* en agar-agua, en presencia o ausencia (control) de exudados producidos por hongos saprófitos.

* igual que Fig. 22.

EFFECTO DE LOS COMPUESTOS VOLATILES PRODUCIDOS POR HONGOS SAPROFITOS SOBRE LA GERMINACION Y EL CRECIMIENTO HIFAL DE ESPORAS DE *G. mosseae*.

Los resultados del ensayo realizado en caja dividida, con agar-agua como medio de crecimiento a cada lado de la caja, se recogen en la figura 24.

Los compuestos volátiles producidos por *A. niger*, *T. koningii*, *A. alternaria* y *F. equiseti*, causaron un descenso estadísticamente significativo del porcentaje de esporas germinadas a los 20 días de incubación, mientras que *F. solani* no produjo efecto alguno sobre la germinación de esporas.

En cuanto al desarrollo del micelio a partir de las esporas de *G. mosseae* (Fig. 25), los resultados obtenidos, cuando ambos microorganismos crecían sobre agar-agua, mostraron que la inoculación de *F. solani* provocó una estimulación del desarrollo del micelio, mientras que el crecimiento hifal en presencia de *A. niger* fué sensiblemente menor.

Los valores de longitud de micelio VA observados en esporas germinadas en presencia de *A. alternata*, *T. koningii* y *F. equiseti* fueron similares al control.

La inoculación de *T. koningii*, *F. equiseti* y *F. solani* en el otro compartimento aceleró la formación de esporas secundarias, las que pudieron observarse por primera vez a los 10 días de incubación en el caso de *T. koningii* y *F. solani*, y a los 13 días en *F. equiseti*.

Sin embargo, cuando el medio empleado para el crecimiento del saprófito era MEA, el efecto inhibitor sobre la germinación de esporas (Fig. 26) fué generalizado para todos los tratamientos, aún para el inoculado con *F. solani*, que no había mostrado un efecto negativo en

ninguno de los ensayos anteriores.

El efecto de la inoculación del saprófito fué aquí más drástico, llegando, en el caso de *T. koningii*, a reducir la germinación de esporas VA casi en un 70 %.

La inoculación de los hongos saprófitos sobre agar-nutritivo MEA, resultó en una disminución significativa del crecimiento hifal de *G. mosseae*, que en ningún caso produjo esporas vegetativas en el tiempo del ensayo (Fig. 27).

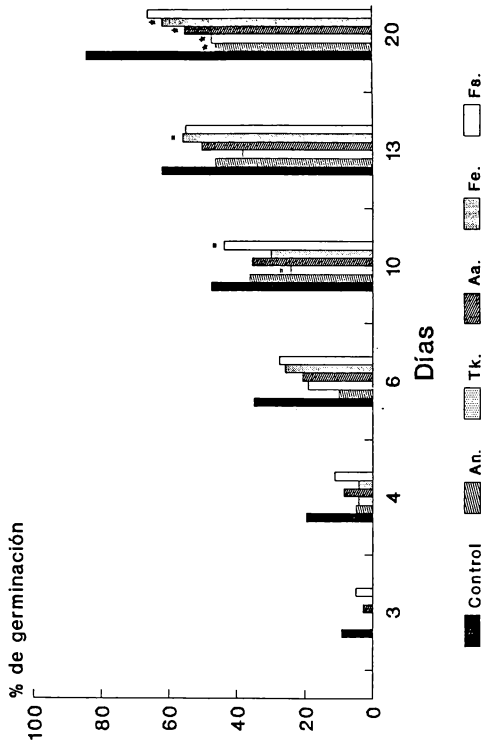


Fig. 24

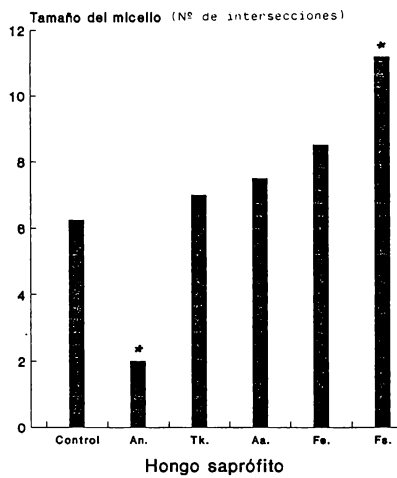


Fig. 26

Fig. 24: Porcentaje de germinación de esporas de *G. mosseae* en agar-agua en presencia o ausencia (control) de compuestos volátiles producidos por hongos saprófitos crecidos sobre agar-agua.
* indica diferencia significativa ($P=0,05$ %) respecto al control.
= indica el momento de aparición de esporas secundarias.

Fig. 25: Desarrollo del micelio producido por esporas de *G. mosseae* en agar agua, en presencia o ausencia (control) de compuestos volátiles producidos por hongos saprófitos crecidos sobre agar-agua.
* igual que Fig. 24.

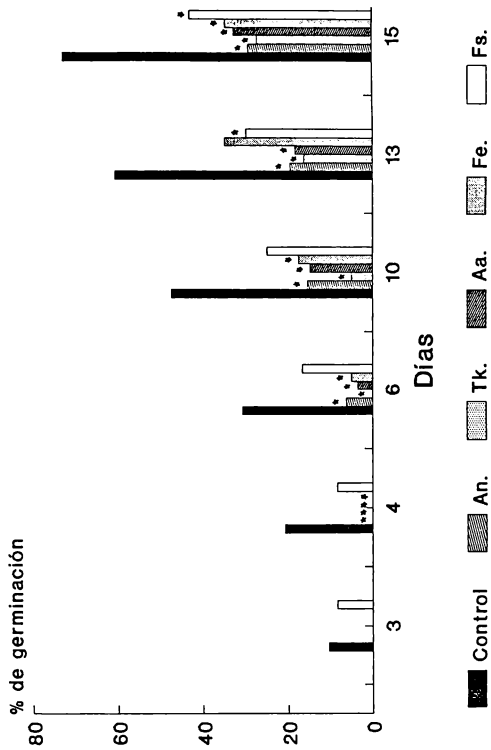


Fig. 26

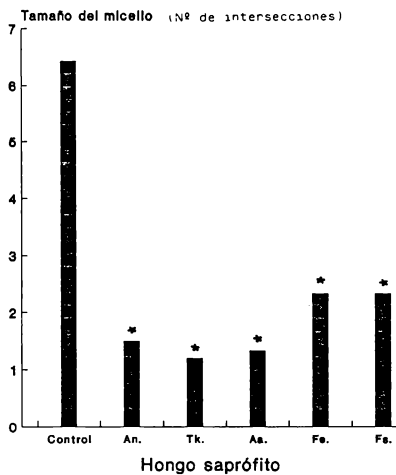


Fig. 27

Fig. 26: Porcentaje de germinación de esporas de *G. mosseae* en agar-agua en presencia o ausencia (control) de compuestos volátiles producidos por hongos saprófitos crecidos sobre medio nutritivo MEA.
* indica diferencia significativa ($P=0,05$ %) respecto al control.
= indica el momento de aparición de esporas secundarias.

Fig. 27: Desarrollo del micelio producido por esporas de *G. mosseae* en agar agua, en presencia o ausencia (control) de compuestos volátiles producidos por hongos saprófitos crecidos sobre medio nutritivo MEA.
* igual que Fig. 26.

EFFECTO DE LOS EXTRACTOS RADICALES DE PLANTAS DE MAIZ (*Z. mays*), LECHUGA (*L. sativa*) Y *B. campestris*, INOCULADAS Y NO INOCULADAS CON *G. mosseae*, SOBRE EL DESARROLLO DE LAS COLONIAS DE HONGOS SAPROFITOS.

Los extractos de raíces de *B. campestris* no inoculadas con *G. mosseae*, preparados con Tris-ClH como tampón de extracción, produjeron inhibición del crecimiento de *A. niger*, *T. koningii* y *A. alternata* (Fig. 28, 29 y 30).

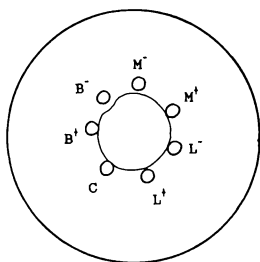
T. koningii y *A. alternata* presentaron un halo de inhibición similar cuando se enfrentaron a los extractos radicales de *Brassica* sin inocular con hongo VA, extraídos con metanol (Fig. 29 y 30).

Los extractos de raíces de lechuga no micorrizadas (Tris-HCl) tuvieron un efecto negativo sobre el desarrollo de la colonia de *A. alternata*, aunque no inhibió el crecimiento de los otros hongos saprófitos (Fig. 30).

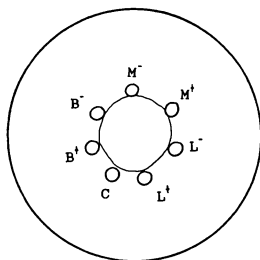
Ninguno de los extractos ensayados afectó el desarrollo del inóculo de *F. equiseti* sobre el medio de cultivo (Fig. 31).

La presencia del extracto preparado a partir de raíces de maíz micorrizadas con *G. mosseae*, utilizando metanol, provocó la formación de un halo de inhibición en el crecimiento hifal de *T. koningii* y *F. solani* (Fig. 29 y 32).

Ni los extractos radicales de maíz y *Brassica* sin inocular, ni los de raíces de lechuga micorrizadas, afectaron el desarrollo de las colonias de ninguno de los hongos saprófitos ensayados.



a)

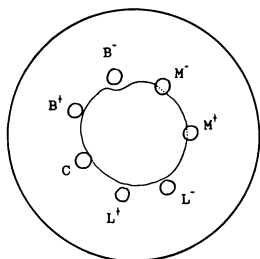


b)

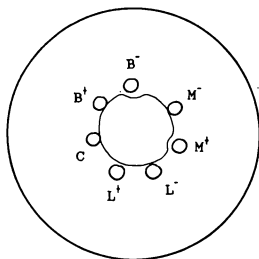
Fig. 28. Crecimiento de *A. niger* en presencia de extractos de raíces de maíz (M), lechuga (L) y *B. campestris* (B), inoculadas (+) y no inoculadas (-) con *G. mosseae*.

a) Extractos preparados con Tris-HCl

b) Extractos preparados con metanol



a)

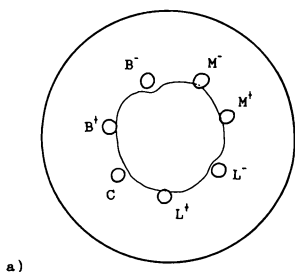


b)

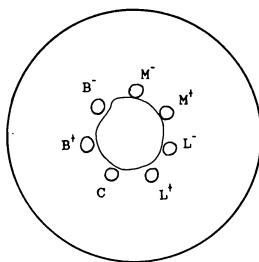
Fig. 29. Crecimiento de *T. koningii* en presencia de extractos de raíces de maíz (M), lechuga (L) y *B. campestris* (B), inoculadas (+) y no inoculadas (-) con *G. mosseae*.

a) Extractos preparados con Tris-HCl

b) Extractos preparados con metanol



a)



b)

Fig. 30. Crecimiento de *A. alternata* en presencia de extractos de raíces de maíz (M), lechuga (L) y *B. campestris* (B), inoculadas (+) y no inoculadas (-) con *G. mosseae*.

a) Extractos preparados con Tris-HCl

b) Extractos preparados con metanol

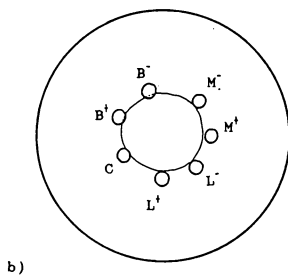
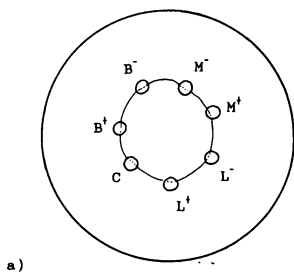
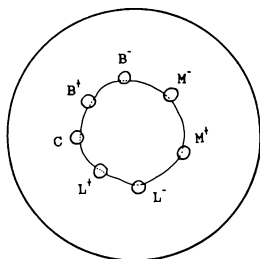
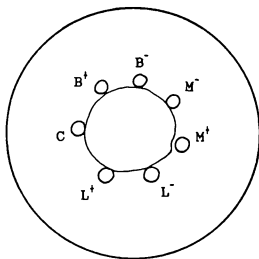


Fig. 31. Crecimiento de *F. equiseti* en presencia de extractos de raíces de maíz (M), lechuga (L) y *B. campestris* (B), inoculadas (+) y no inoculadas (-) con *G. mosseae*.

- a) Extractos preparados con Tris-HCl
 b) Extractos preparados con metanol



a)



b)

Fig. 32. Crecimiento de *F. solani* en presencia de extractos de raíces de maíz (M), lechuga (L) y *B. campestris* (B), inoculadas (+) y no inoculadas (-) con *G. mosseae*.

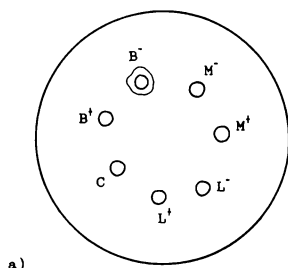
a) Extractos preparados con Tris-HCl

b) Extractos preparados con metanol

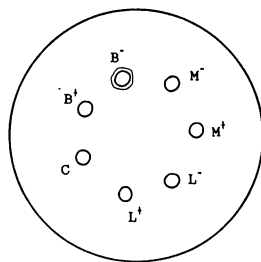
EFFECTO DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS RADICALES SOBRE LA GERMINACION DE LAS ESPORAS DE LOS HONGOS SAPROFITOS.

Los extractos preparados a partir de raíces de *Brassica* no inoculadas con *G. mosseae*, en buffer Tris-HCl o metanol, produjeron inhibición de la germinación de esporas de *A. alternata* en la zona próxima a los pocillos en los que se aplicó el extracto (Fig. 33).

Ninguno de los extractos radicales de maíz, lechuga, y *Brassica* inoculadas con *G. mosseae*, afectaron negativamente la germinación de esporas de los hongos saprófitos estudiados.



a)



b)

Fig. 33. Germinación de esporas de *A. alternata* en presencia de extractos de raíces de maíz (M), lechuga (L) y *B. campestris* (B), inoculadas (+) y no inoculadas (-) con *G. mosseae*.

a) Extractos preparados con Tris-HCl

b) Extractos preparados con metanol

DETECCION DE SUSTANCIAS FUNGITOXICAS EN EXTRACTOS RADICALES
DE *B. campestris*.

La cromatografía en capa fina de los extractos de raíces de *Brassica* no inoculados con el endofito VA, permitió determinar la alta polaridad de las sustancias responsables de la inhibición de la germinación de esporas de *A. alternata* (Fig. 34). La cromatografía de estos extractos, pulverizada luego con esporas de *A. niger* o *T. koningii*, no mostraron en ningún caso zonas de inhibición en la germinación de los conidios, aunque sí se observaron zonas con menor desarrollo del micelio, que coincidieron con manchas muy desplazadas por el solvente de cromatografía.

Los extractos radicales de plantas de maíz inoculadas con *G. mosseae*, produjeron sobre la placa de sílica gel zonas con crecimiento de *A. niger* muy limitado.

Los controles de los extractantes utilizados, Tris-HCl y metanol, corridos en la misma placa cromatográfica no provocaron zonas de inhibición de la germinación.

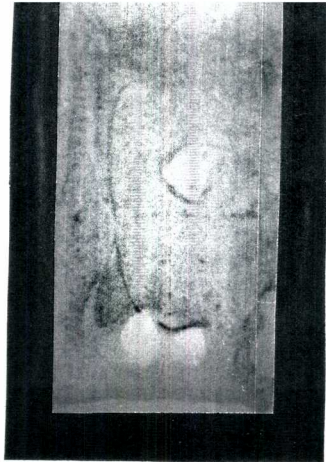


Fig. 34. Germinación de esporas de *A. alternata* sobre cromatografía en capa fina de extractos radicales de plantas de *B. campestris* no inoculadas con *G. mosseae* (B-).

TrHCl: Extractos preparados con Tris-HCl

Met.: Extractos preparados con metanol

DISCUSSION

DISCUSION

Las plantas frecuentemente presentan una mayor resistencia al stress provocado por condiciones físicas o biológicas, y una mayor productividad, cuando sus raíces están colonizadas por endofitos VA (Anderson, 1988).

Estas consecuencias beneficiosas de la micorrización han aumentado el interés por desarrollar estrategias que permitan un mejor uso de estos hongos en el manejo de plantas.

Es importante en este sentido, tener en cuenta que la creación de la micorrizósfera, consecuencia de las alteraciones producidas en la rizósfera por el establecimiento de las micorrizas VA en la raíz, determina un nuevo equilibrio microbiano en el entorno radical (Rambelli, 1973).

La relación entre el hongo VA, simbiote obligado, y la raíz hospedante, sugiere una interacción indirecta entre estos hongos y otros microorganismos de la rizósfera, donde la planta actuaría como intermediaria.

El endofito VA, al establecerse en el interior de la raíz, se asegura el aporte de fotosintatos de la planta, teniendo, con esta fuente de energía, mayores ventajas competitivas sobre otros miembros de la población microbiana del suelo (Read *et al* , 1985).

A pesar de esto, actualmente se considera que la respuesta de la planta hospedante a la micorrización es el resultado neto de la acción del hongo VA, y la de sus asociados microbianos en la rizósfera. Por tanto, el optimizar los efectos beneficiosos de la micorrización VA sobre el crecimiento vegetal, dependerá de la combinación adecuada de MVA-microorganismos rizosféricos.

De Oliveira y Garbaye (1989) resaltan la importancia de la detección y el estudio de los sistemas microbianos

favorables, que actúan como auxiliares de la micorrización, llegando a considerar tan grave la ausencia de estos microorganismos como la del mismo hongo VA.

Estos investigadores matizan el concepto que de "antagonistas" de las micorrizas se le reconoce a estos microorganismos, señalando que del estudio de estas interacciones, casi nulo hasta el presente, surgirán combinaciones favorables, con microorganismos que tengan un efecto sinérgico positivo sobre la colonización VA.

Del aporte en este sentido, que significa el presente trabajo, podemos asegurar que ninguno de los cinco hongos saprófitos ensayados puede considerarse como auxiliar de la micorrización, en el sentido que De Oliveira y Garbaye (1989) asignaron a este término.

Con anterioridad se han descrito inhibiciones de las micorrizas VA en suelo no esterilizado (Wilson et al, 1989), pero se han hecho muy pocos ensayos con hongos saprófitos como agentes inhibidores concretos, identificados y de origen conocido.

En ninguna de las dos plantas hospedantes ensayadas, maíz y lechuga, se observó respuesta positiva de la micorrización y/o desarrollo vegetal a la aplicación de los hongos del suelo en ninguno de los tiempos de inoculación que se han experimentado. Asimismo ninguno de ellos produjo depresión del crecimiento vegetal. Este resultado era de esperar, ya que en la investigación previa de los cinco hongos seleccionados para este trabajo, en la República Argentina, ninguno se considera parásito de las plantas empleadas, (Fernandez Valiela, 1978). Si bien Farr y colaboradores (1989) citan a *A. alternata*, *F. solani* y *F. equiseti* como parásitos de la raíz de plantas de maíz, en ensayos previos en los que se aplicaron altas concentraciones de conidios de estos hongos, no se observó efecto negativo sobre el desarrollo de las raíces ni el de la planta en su

género *Glomus* frente a las sustancias inhibidoras producidas por *Brassica* u otras plantas no susceptibles a la micorrización, si bien esto último requeriría de un estudio más profundo.

CONCLUSIONES

conjunto.

El efecto de la inoculación de los distintos hongos saprófitos sobre el peso seco de las plantas hospedantes sería consecuencia directa de su efecto sobre la micorrización de raíces de estas plantas, ya que los pesos secos disminuyeron siempre que se observó una reducción significativa del porcentaje de colonización VA de sus raíces.

En términos generales, el efecto de estos hongos saprófitos sobre la micorrización depende del tiempo de inoculación de un microorganismo respecto al otro, y de la combinación hongo saprófito-hospedante considerada.

Todos los hongos inoculados en la rizósfera de lechuga afectaron negativamente la micorrización de sus raíces, y en consecuencia el desarrollo vegetal de estas plantas, siempre que *G. mosseae* no se hubiera establecido previamente en la raíz.

Se trataría de un efecto directo del hongo saprófito inoculado, sobre el desarrollo de *G. mosseae* en su estadio saprofitico, antes de colonizar la raíz. Como comentamos anteriormente, una vez producida la micorrización, el endofito VA, dispone de una fuente de energía privilegiada que lo dejaría al margen de la competencia con otros microorganismos de la rizósfera por compuestos carbonados (Read *et al*, 1985).

Esto justificaría los resultados observados, ya que una vez establecido el endofito en la raíz, la inoculación de los hongos saprófitos no afectó negativamente su desarrollo dentro de la misma. No obstante, el hecho de que el porcentaje de longitud de raíz micorrizada no disminuya no significa que el hongo VA permanezca efectivo en su totalidad. Se sabe que factores que afectan negativamente a la planta, al hongo VA, o a ambos, como la aplicación de herbicidas, disminuyen o eliminan la actividad SDH,

indicativa de la actividad metabólica del endofito VA (Ocampo y Barea, 1985; Vierheilig, 1990). Los resultados obtenidos mediante la tinción de la actividad SDH en raíces de lechuga mostraron una disminución del porcentaje de colonización VA activa respecto de la micorrización total observada, al inocular *T. koningii*, *A. niger* o *A. alternata* dos semanas después de *G. mosseae*.

Kinden y Brown (1985) señalan las situaciones de stress que afectan negativamente el estado fisiológico de las hifas intraradicales del endofito, como responsables del tabicamiento y degeneración de éstas, con la consecuente diferencia entre el porcentaje de colonización total de la raíz y el porcentaje de micorrización activa. *T. koningii*, *A. niger* y *A. alternata* provocaron una reacción de este tipo, si bien no sabemos con certeza si se trata de un efecto directo del hongo saprófito sobre las hifas extraradicales, o estaría mediado por la raíz.

Si bien algunos trabajos citan una disminución de la actividad SDH en raíces micorrizadas, provocado por la aplicación de herbicidas (Ocampo y Barea, 1985; Vierheilig, 1990), no se encontraron trabajos que mencionen este efecto como consecuencia de la inoculación de microorganismos.

Aunque el método de cuantificación de la actividad SDH, mediante técnicas histoquímicas, detecta la función metabólica del hongo, la determinación de esta actividad, medida como porcentaje de longitud de raíz micorrizada que posee esta actividad no es un parámetro indicativo de la eficiencia del hongo en términos de crecimiento de la planta hospedante (Kough et al, 1987; Vierheilig, 1990). Esto explicaría el hecho de que no se evidenciaron diferencias de peso seco de las plantas hospedantes, aun cuando la actividad SDH del micelio VA en raíces de lechuga fué significativamente menor que la colonización total de la raíz.

El enfrentamiento entre *G. mosseae*-hongos saprófitos

tuvo una mayor proporción de efectos negativos, sobre la micorrización VA de plantas de lechuga que de maíz. Esto indica que los resultados de la interacción dependerán del hospedante considerado. Tal vez, varíe con la combinación planta hospedante-endofito ensayada, como se ha observado en el caso de la germinación de esporas VA en suelo en presencia de ciertos hongos saprófitos (Sylvia y Schenck, 1983).

Aunque la micorrización VA de raíces de maíz y lechuga disminuyó siempre que se inoculó *A. niger*, *T. koningii*, *F. equiseti* o *A. alternata* antes o al mismo tiempo que *G. mosseae*, los resultados obtenidos en una y otra planta al aplicar *F. solani* a la rizósfera, sugieren que los efectos observados en una determinada combinación endofito VA- hongo saprófito- planta hospedante no se pueden generalizar a otras asociaciones.

F. solani en la rizósfera de lechuga tuvo un comportamiento similar al observado en los otros cuatro hongos, provocando una disminución del porcentaje de colonización de raíces y su consecuente repercusión sobre los pesos secos de las plantas.

En contraste con estos resultados, la aplicación de *F. solani* a la rizósfera de maíz no afectó el porcentaje de micorrización ni el desarrollo vegetal, en ninguno de los tres tiempos de inoculación. Provocando en cambio una colonización que podríamos considerar más activa, por presentar mayor número de arbuscúlos y unidades de infección. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Zambolin y Schenck (1981) con la inoculación conjunta de estos microorganismos en plantas de soja.

Debemos tener en cuenta, que *F. solani* fué aislado de la rizósfera de maíz, donde sería componente habitual de la microbiota. Por esto, resultan más interesantes los efectos que puedan observarse sobre esta planta.

Si bien la coexistencia de *G. mosseae* y *F. solani* en la

rizósfera de maíz no parece producir un fenómeno de competencia entre ambos microorganismos, la inoculación de *G. mosseae* antes que *F. solani*, provocó una disminución considerable de la población de este saprófito, hecho que puede explicarse por el carácter de colonizador primario de la rizósfera que presenta *F. solani*. Cook y Bruehl (1968) comprobaron que la presencia de un microorganismo que coloniza el rizoplano previamente, hace que *F. solani* tenga dificultad para establecerse en el mismo sustrato. A esto debemos agregarle el hecho de que la competencia por carbono sea una causa de la inhibición de la germinación de sus esporas (Elad, 1986).

Los resultados obtenidos con este saprófito, son muy importantes, si tenemos en cuenta que las distintas especies de *Fusarium* patógenas y no patógenas comunmente ocupan el mismo nicho ecológico, siendo ambos, colonizadores exitosos del tejido cortical. Se ha observado, sin embargo, que las cepas no patógenas, competidoras por el sustrato, tienen la habilidad de establecerse prioritariamente en los tejidos, respecto a las patógenas, pudiendo aún desplazarlas como colonizadoras secundarias (Cook y Baker, 1983).

Es evidente la utilidad que puede tener el establecimiento previo de este hongo en la rizósfera, al no afectar la micorrización VA, y evitar la presencia de cepas patógenas de la misma especie.

Los resultados observados con la inoculación de *F. solani* a la rizósfera de maíz pueden explicarse, en parte, teniendo en cuenta que este saprófito no afectó en absoluto la germinación de esporas de *G. mosseae*. En cambio, produjo una ligera estimulación del desarrollo saprofítico del micelio VA en cultivo axénico.

Las sustancias difusibles responsables de esta estimulación serían solubles y volátiles, como lo indican los resultados obtenidos en los distintos ensayos realizados.

Algunos trabajos mencionan un efecto positivo de la presencia de hongos de suelo sobre la germinación y el desarrollo saprofítico de esporas de *G. mosseae* en cultivo axénico (Azcon-Aguilar, 1987; Calvet, 1990; Vidal-Domínguez, 1991). En muchos de estos casos, se ha sugerido que esta estimulación sería el resultado de un incremento de la concentración de CO₂, consecuencia de la actividad de los hongos saprófitos inoculados. El efecto estimulador de la germinación de esporas VA producido por concentraciones moderadas de CO₂, acompañadas de exudados radicuales, fue comprobado por diferentes autores (Becard y Piché, 1989; Lei y Piché, 1990; Le Tacon et al, 1983). Cualquiera que sea la sustancia aportada por los exudados radicuales, no se descarta que *F. solani* pudiera producirlo en su crecimiento "in vitro".

Sin embargo, podría tratarse de la superposición del efecto CO₂ sobre el de sustancias inhibitoras, de forma tal que *F. solani*, al no producir sustancias inhibitoras, solo exhibiría el efecto estimulador del CO₂. En los otros hongos, sin embargo, el efecto positivo del aumento de la concentración de CO₂ estaría enmascarado por el de las sustancias inhibitoras

Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que el crecimiento activo del hongo saprófito en un medio nutritivo más rico, produce una fuerte inhibición de la germinación y el crecimiento del micelio VA (Becard y Piché, 1989).

St. John y colaboradores (1983) sostienen que la micorrización VA es estimulada por un compuesto volátil, producto de la microflora fúngica, posiblemente etileno, Vidal-Domínguez (1991) no pudo confirmar que pequeñas cantidades de esta fitohormona afecten positivamente la germinación y crecimiento de *G. mosseae in vitro*. Cabe la posibilidad de que *F. solani* produjera etileno en cantidad suficiente como para estimular el crecimiento hifal mientras

que en los otros hongos este efecto del etileno estaría enmascarado por la producción de sustancias inhibitoras.

En todos los casos, el crecimiento de los hongos saprófitos en un medio nutritivo muy rico inhibió fuertemente la germinación y el desarrollo hifal a partir de esporas de *G. mosseae*, probablemente por una excesiva producción de etileno, que resultaría tóxica para el endofito VA (Drew y Lynch, 1980).

Vidal-Domínguez (1991), no pudo comprobar la estimulación del desarrollo del micelio VA por pequeñas cantidades de etileno, debido a la dificultad del manejo de cantidades mínimas de esta fitohormona. Aun así, propone que ésta actuaría como modulador de la germinación de las esporas de *G. mosseae*, acelerándola o retrasándola según su concentración en la atmósfera de cultivo.

Este efecto a nivel de espора es fundamental para comprender los resultados que se obtuvieron al inocular *F. solani*, en tubo, al mismo tiempo que *G. mosseae*. En estos ensayos, la interacción del hongo saprófito, directamente, o sus productos, con la espора del endofito VA, resultó decisiva a la hora de determinar un buen nivel de colonización VA en la raíz. *F. solani* fué el único saprófito que no disminuyó drásticamente la micorrización de raíces de maíz en tubo.

Sabemos que, tanto CO₂ como etileno, producidos en exceso, son inhibidores de la germinación y el crecimiento hifal saprofítico de *G. mosseae* "in vitro" (Becard y Piché 1989, Le Tacon *et al.*, 1983, Vidal-Domínguez, 1991).

De los resultados obtenidos se deduce que un compuesto volátil producido en gran cantidad por cualquiera de los cinco hongos saprófitos ensayados al crecer en medio nutritivo muy rico, disminuyó drásticamente la tasa de germinación de esporas y el desarrollo del micelio VA en cajas de Petri.

Como este resultado se observó tanto en *F. solani* como en los restantes hongos apoyó la teoría de que ese compuesto pudiera ser CO₂ o etileno.

La otra especie de *Fusarium* ensayada, *F. equiseti*, no produjo interacción positiva con *G. mosseae*. El efecto observado en este caso sobre la germinación y el desarrollo hifal a partir de las esporas fué moderado. En este caso, parece clara la responsabilidad exclusiva de un compuesto volátil en la inhibición de la germinación de las esporas VA, en tanto que, la estimulación del desarrollo hifal estaría producido por un compuesto soluble. Recordemos que la germinación de las esporas y el crecimiento hifal son dos procesos separados que pueden estimularse o inhibirse por distintos factores. Ambos procesos pueden afectarse por la presencia de microorganismos, aunque de distinta manera (Wilson, 1984). Estos efectos son diferentes entre sí, ya que en muchos casos, se observó una importante inhibición de la germinación de esporas de *G. mosseae*, acompañado por una estimulación del crecimiento hifal de aquellas esporas que superaron la inhibición.

Cook y Baker (1983) proponen un efecto inhibitorio de *T. koningii* sobre la micorrización, basándose en su carácter antagonista y su probada eficacia en el control biológico de hongos patógenos, si bien no aportan datos experimentales al respecto. No se ha probado hasta ahora su antagonismo frente a hongos VA. Los resultados surgidos de nuestro trabajo apoyan, al menos en parte, el supuesto de Cook y Baker (1983). En efecto, la inoculación de *T. koningii* en la rizósfera de maíz y lechuga, provocó una disminución de la colonización VA de las raíces, que fué acompañada de una reducción significativa del desarrollo vegetal, siempre que el saprófito se aplicó antes o al mismo tiempo que el endofito VA. Aunque el efecto observado en ambas plantas hospedantes fué cualitativamente similar, cuantitativamente

resultó diferente, observándose en el caso de maíz un efecto más drástico, que llegó a reducir la colonización en un 85%, además de observarse una colonización con marcada reducción en el número de estructuras intraradicales, que la puede hacer fisiológicamente menos efectiva. Esta diferencia puede estar relacionada con el hecho de que *T. koningii* fué aislado de la rizósfera de maíz, lo que haría que en este ambiente expresara mejor sus potencialidades.

Aunque el micoparasitismo se ha descrito a menudo como el mecanismo de acción antagonista de las especies de *Trichoderma* (Camporota, 1985; Chu y Wu, 1981), éste no fué el mecanismo involucrado en nuestro caso, no solo porque no se observó enrollamiento de hifas de *T. koningii* sobre hifas del endofito, en crecimiento axénico, sino porque el efecto inhibitorio de *T. koningii* sobre *G. mosseae* en estos ensayos se evidenció sólo a nivel de la germinación de esporas VA, no llegando a afectar el desarrollo posterior del micelio a partir de estas esporas.

En base a estos resultados, y sabiendo que esta inhibición no fué provocada por una alteración del pH del medio, podemos pensar que el efecto observado es consecuencia de la producción de alguna sustancia inhibitoria.

Bruce y colaboradores (1984) mencionan la producción de antibióticos hidrosolubles por dos especies de *Trichoderma*, en el control de *Lentinus lepideus*, si bien se sabe que también producen antibióticos volátiles cuyo efecto sería fungistático sobre otras especies de hongos (Chu y Wu, 1981; Pavlica et al, 1978). En particular, *T. koningii* se cita como productor de antibióticos peptídicos (Dennis y Webster, 1971).

En cualquier caso, la inhibición de *T. koningii* sobre la germinación de esporas de *G. mosseae* no sería unicamente consecuencia de la producción de compuestos volátiles, sino también solubles, que no actúan en forma aditiva, pues se

BECARD, G., DONER, L.W., ROLIN, D.B., DOUDS, D.D. y PFEFFER, P.E. 1990. Threalosa, a major storage sugar in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. 8th NACOM. Abstract. pp. 19. Wyoming. USA.

BECARD, G. y PICHE, Y. 1989. Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. App. Environ. Microbiol. 55: 2320-2325.

BECKER, W.N. 1976. Quantification of onion vesicular-arbuscular mycorrhizal and their resistance to *Pyrenochaeta terrestris*. Ph.D. Dissertation. Illinois. Urbana. 72 pp.

BECKER, W.N. y GERDEMANN, J.W. 1977. Colorimetric quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in onion. New Phytol. 78: 289-295.

BEEVERS, R.E. Y BURNS, D.J.W. 1980. Phosphorus uptake, storage and utilization by fungi. Adv. Bot. Res. 8: 128-219.

BEILBY, J.P. 1980. Fatty acid and sterol composition of ungerminated spores of the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora laevis*. Lipids 15: 949.

BERTA, G., FUSCONI, A., SGORBATI, S. TROTTA, A. y SCANNERINI, S. 1986. Preliminary results on the ploidy and fine structure of the nuclei of the host cells in a VA mycorrhiza. Giorn. Bot. Ital. 120: 84-86.

BIELESKI, R.L. 1973. Phosphate pools, phosphate transport and phosphate availability. Ann. Rev. Plant Physiol. 24: 225-252.

observaron tasas de germinación similares tanto en ensayos en placa dividida, como en los realizados sobre agar-agua adicionado con exudados fúngicos de *T. koningii*.

Cualquiera sea la sustancia que produce este hongo, es efectivo solo a nivel de la germinación, pues no alteró el desarrollo hifal de aquellas esporas que, aunque en poca proporción, fueron capaces de superar la inhibición. Este efecto sobre la germinación permite explicar los resultados de la micorrización observados al inocular *T. koningii* en plantas de maíz crecidas en tubo, aunque parece poco probable que sea completamente responsable del efecto observado en maceta. Teniendo en cuenta que en estos ensayos el inóculo VA empleado constaba de raíces micorrizadas, micelio y esporas, la sola inhibición parcial de la germinación de estas últimas no puede provocar una reducción tan brusca de la micorrización de las raíces. Efectivamente, el efecto de sustancias inhibitoras sobre la capacidad de los hongos VA para colonizar la raíz de una planta viene determinada por la naturaleza y el potencial del inóculo VA (El-Atrach *et al*, 1989).

Parece evidente en este último caso, que *T. koningii* afecta el desarrollo hifal del endofito VA, antes de que éste se asocie simbioticamente con la raíz. No pudo observarse efecto negativo de *T. koningii* sobre la colonización VA de raíces de maíz o lechuga, cuando el saprófito se aplicó dos semanas después de *G. mosseae*, es decir, una vez que la simbiosis ya se había establecido.

Como mencionamos reiteradamente, los trabajos relacionados con el estudio de la interacción entre hongos VA y hongos saprófitos del suelo, son muy escasos, y en general incompletos, esto es, sin tener en cuenta aquellos en los que no se identifica el hongo responsable de la interacción. Entre los primeros cabe mencionar que Calvet (1990) trabajando con *Trichoderma aureoviride* y *Trichoderma hamatum*,

describe una importante estimulación de estos hongos sobre la germinación y el crecimiento saprofitico de esporas de *G. mosseae* "in vitro", a la vez que concluye que la interacción entre ambos microorganismos es beneficiosa para el crecimiento de la planta hospedante, en este caso *Tagetes erecta*. Estos resultados contrastan con los obtenidos en el presente trabajo, aunque no podemos descartar el hecho de que el efecto del género *Trichoderma* sobre la micorrización VA de plantas hospedantes dependa de la combinación de especies considerada.

A. alternata, *A. niger* y *F. equiseti* afectaron de forma similar la micorrización de plantas de maíz y lechuga: la colonización VA de raíces disminuyó siempre que estos saprófitos se inocularon antes o al mismo tiempo que *G. mosseae*, permaneciendo, en cambio, constante, siempre que la aplicación de estos hongos se realizó dos semanas después que *G. mosseae*. Nuevamente, el hecho de que el peso seco de las plantas acompañara estos resultados confirma la idea de que *A. alternata*, *A. niger* y *F. equiseti*, al igual que ya comentamos en el caso de *T. koningii*, afectarían el desarrollo vegetal como consecuencia de su efecto sobre la micorriza VA, ya que en ningún caso el saprófito por sí solo produjo depresión del crecimiento.

También en este caso, los hongos saprófitos compiten con *G. mosseae*, en su estado pre-simbiótico, disminuyendo considerablemente su capacidad de colonizar la raíz.

Los resultados obtenidos con la micorrización VA de plantas de maíz en tubo, y los ensayos realizados con esporas en cultivo axénico, señalan a la inhibición de la germinación de esporas VA como uno de los efectos responsables de la menor capacidad infectiva de *G. mosseae*. Esta no parece ser la única causa en el caso de *A. alternata* y *F. equiseti*, aunque sí podría serlo en el caso de *A. niger*, ya que este hongo muestra, además, una importante inhibición del

desarrollo hifal de *G. mosseae* a partir de los tubos de germinación emitidos por las esporas. *A. niger* produciría una sustancia volátil con capacidad de inhibir el crecimiento hifal, mientras que en la inhibición de la germinación podrían intervenir también sustancias solubles. Sigue valiendo en este caso el supuesto de CO₂ o etileno como responsables, siempre que *A. niger* produjera estas sustancias en mayor proporción que los otros hongos saprófitos ensayados.

En los trabajos realizados por Calvet (1990), otra especie de *Aspergillus*, *A. fumigatus*, resultó inhibidora de la germinación "in vitro" de *G. mosseae*, disminuyendo la tasa de germinación de esporas y manteniendo un crecimiento escaso del micelio a partir del tubo germinativo.

Hepper (1979) observó que la actinomicina D, inhibidor específico del mRNA, provocaba la emisión de tubos de germinación prácticamente sin ramificaciones, a partir de las esporas del hongo VA germinadas "in vitro". El efecto producido por *A. fumigatus* mencionado por Calvet, y el encontrado en *A. niger* en el presente trabajo fué muy similar al descrito por Hepper, puesto que el crecimiento hifal fué muy reducido en caja de Petri. Es de suponer que ambas especies de *Aspergillus* producen sustancias con actividad antibiótica muy efectiva sobre *G. mosseae*.

La competencia por sitios de preferencia en el rizoplano se menciona como posible mecanismo de antagonismo entre microorganismos de la rizósfera (Elwood *et al.*, 1980). Sin embargo, estos microorganismos no ocupan toda la superficie del rizoplano, por lo que este mecanismo no se podría justificar en un entorno rizosférico natural. No obstante hay que tener en cuenta que, como consecuencia de la inoculación de los hongos saprófitos en una rizósfera casi estéril se puede producir un incremento de su capacidad competitiva. Por otro lado no hay que descartar la producción por los hongos

saprófitos de sustancias micostáticas que frenen el desarrollo saprofítico de *G. mosseae* (Drew y Lynch, 1980), disminuyendo de esa forma su posibilidad de contacto con la raíz susceptible.

Sabemos que la raíz influye sobre el número, tipo y actividad de casi todos los grupos que componen la microflora común en el suelo que rodea a las raíces (Dommergues, 1986), y que la modificación de la raíz en su asociación simbiótica con un hongo VA, determina la micorrizósfera. Este es el nuevo entorno donde las poblaciones microbianas prevalecientes pueden no corresponder con las establecidas antes de la colonización VA (Rambelli, 1973).

En este sentido, es de esperar que la población de los distintos hongos saprófitos inoculados se vea afectada por la presencia de *G. mosseae*, fundamentalmente, cuando el endofito se aplica al sustrato antes que el hongo saprófito.

Este efecto se observó cuando se inocularon *T. koningii*, *A. niger* y *F. solani*, para las dos plantas hospedantes ensayadas. La explicación a este comportamiento, se basa en el hecho de que la raíz micorrizada sufre algunas modificaciones, siendo, sin duda, la más importante la alteración de la permeabilidad de las membranas, consecuencia de una mejor nutrición fosforada, que puede derivar en variaciones de los exudados radicales producidos por la planta (Graham *et al*, 1981).

Aunque la población de *A. niger* alcanzó finalmente niveles similares a su control cuando se inoculó antes que *G. mosseae*, se estabilizó antes en la rizósfera de las plantas de maíz y lechuga micorrizadas que en las no micorrizadas. Este hecho indica una competencia por parte de *G. mosseae*, en su fase extraradical, sobre el hongo saprófito.

F. equiseti, sin embargo, mantuvo su población constante, en todos los casos, independientemente de la planta utilizada, y del tiempo de inoculación del endofito.

Según los resultados obtenidos con las diluciones de suelo y su siembra en medio rico, *A. alternata* no pudo establecerse, en ningún caso, en la rizósfera de maíz. Sin embargo, la determinación de la longitud total de hifas en la rizósfera, según el método de Jones y Mollison (1948), permite deducir que *A. alternata* sí pudo desarrollarse en la rizósfera de plantas de maíz, en forma de micelio estéril, aunque no pudo esporular en presencia de las raíces de esta planta. En ningún caso, la inoculación de *G. mosseae* pudo revertir esta situación.

A excepción de *A. alternata*, la población de los hongos saprófitos inoculados antes que *G. mosseae* se mantuvo constante en la rizósfera de las plantas ensayadas. La inoculación dual, sin embargo, presenta resultados variables sobre la población saprófita, según el hongo saprófita y la planta hospedante considerada, aunque en ningún caso pudo observarse una estimulación del crecimiento de la población saprófita en la rizósfera. La inoculación conjunta de ambos microorganismos determina una situación de competencia entre ambos que afecta finalmente tanto a la capacidad de *G. mosseae* de micorrizar la raíz, como al desarrollo de la población del hongo saprófita en el sustrato de crecimiento de la planta, aunque sin seguir un patrón general, sino particular para cada combinación endofito-planta-hongo saprófita.

En los ensayos realizados con *Brassica*, se comprobó su condición de planta no hospedante, ya que no pudo observarse micorrización de la raíz, aunque la mayoría de las plantas inoculadas sólo con *G. mosseae* o con este endofito antes que otro hongo mostraron un oscurecimiento de la raíz, síntoma típico de la acumulación de fenoles (Allen et al, 1989), considerado una de las respuestas típicas de incompatibilidad de plantas no hospedantes hacia los endofitos VA (Vierheilig, 1990).

A pesar de esto, para los tres tiempos de inoculación considerados, *A. niger*, *A. alternata*, *T. koningii* y *F. solani* produjeron un mayor desarrollo de las plantas de *Brassica*. Este efecto también se observó cuando *T. koningii* se aplicó al sustrato antes que *G. mosseae*, aunque en los otros dos tiempos de inoculación no produjo ningún efecto sobre el crecimiento de esta crucífera. Estos resultados pueden interpretarse como una respuesta de la planta al aumento de la densidad de microorganismos en su entorno, y producción por parte de los mismos de sustancias que estimulan el desarrollo de la planta.

Es un hecho establecido la capacidad de los microorganismos de la rizósfera para producir fitohormonas, cuyo efecto sobre el crecimiento de las plantas se hace patente como consecuencia de su inoculación masiva (Ocampo, 1976).

Las poblaciones de hongos saprófitos en la rizósfera de plantas de *B. campestris* se mantuvieron, en general, dentro de los niveles alcanzados por plantas no inoculadas.

Sólo *A. niger* en todos los tiempos de inoculación mostró una disminución de la población en el entorno de raíces de *Brassica*.

Si bien algunos autores (Glenn *et al.*, 1988) sostienen que la no susceptibilidad de las crucíferas a la micorrización VA es debida a la falta de sustancias estimuladoras, trabajos recientes parecen reforzar la idea de que esta falta de susceptibilidad está relacionada con el contenido de glucosinolatos de sus raíces (Vierheilig, 1990). La hidrólisis de esos glucosinolatos, (especialmente alquilglucosinolatos), a isotiocianatos, parece jugar un papel importante en la resistencia de las crucíferas a la colonización por hongos VA.

Mithen y colaboradores (1986) comprobaron la toxicidad antifúngica de varios glucosinolatos en combinación con las

enzimas responsables de su hidrólisis.

Estos resultados sugieren que tal vez *A. niger* sea más susceptible que los otros cuatro hongos saprófitos a estos compuestos antifúngicos. Esto determinaría una disminución de su población en todos los casos, que no pudo observarse en el resto de los saprófitos ensayados.

Aunque en algunos ensayos con distintas plantas se observó una disminución de la población saprófita en la rizósfera, los ensayos realizados *in vitro* con esporas de *G. mosseae* confirmaron la ausencia de un efecto directo del hongo VA sobre el crecimiento hifal de los distintos hongos saprófitos en agar-agua.

Por otro lado pocos fueron los extractos radicales capaces de inhibir la germinación de esporas de estos hongos. El más efectivo fué el extracto obtenido a partir de raíces de *Brassica* no inoculadas con *G. mosseae*, con cualquiera de los dos medios de extracción. Este extracto inhibió el desarrollo hifal de *T. koningii* y *A. alternata*, muy fuertemente en el último caso. También pudo observarse cierta inhibición sobre *A. niger*, aunque en este caso sólo cuando el extracto se preparó con Tris-HCl.

Los extractos de raíces de *Brassica* inoculadas con *G. mosseae*, curiosamente no inhibieron el desarrollo hifal de ninguno de los hongos saprófitos.

Aunque menos notable, los extractos radicales de plantas de maíz micorrizadas fueron capaces de inhibir el crecimiento de *F. solani in vitro*.

Las sustancias responsables de la fungistasis no afectan igualmente a las hifas fúngicas que a las esporas. Prueba de ello es que mientras los extractos radicales de *Brassica* inhibieron *in vitro* el desarrollo hifal de *A. alternata*, *T. koningii* y *A. niger*, sólo afectaron en forma similar la germinación de esporas de *A. alternata*. Esta inhibición de la germinación observada en el caso de *A. alternata* contrasta

con los resultados obtenidos en el recuento de la población de este saprófito mediante diluciones de suelo. En estos recuentos, la población de *A. alternata* se mantuvo constante, mientras que se evidenció una fuerte acción fungistática sobre este hongo a nivel de espora y micelio. Hay tres posibles hipótesis que pueden explicar estos mecanismos: 1) las sustancias inhibitoras no son exudadas al medio, en este caso la rizósfera, y es por esto que no se manifiestan hasta no macerar la raíz. La ausencia de difusión de elementos fungitóxicos por las raíces de plantas se han puesto de manifiesto en algunas asociaciones hongo-planta (Ocampo *et al*, 1980 y 1985). 2) Las sustancias responsables de la inhibición se producen en ausencia del hongo saprófito en la rizósfera. Por alguna razón la presencia de estos hongos impide la producción de estas sustancias. Muy probablemente la inoculación de *G. mosseae* en la rizósfera de *Brassica* determina no sólo una alteración del aspecto de las raíces (oscurecimiento), sino de los exudados que éstas producen, dejando de sintetizar, por ejemplo alguna sustancia que resultaba inhibitora de los hongos saprófitos. 3) Al hacer el recuento por dilución y siembra del suelo rizosférico en placa, las esporas de *A. alternata* que se hallan en el suelo están fuera de la influencia de las raíces, diluyéndose la sustancia inhibitora que afecta a las esporas, o bien los elementos fungitóxicos provenientes de las raíces de las plantas que pueden ser absorbidos por las partículas del suelo (El-Atrach *et al*, 1989; Ocampo *et al*, 1985), por lo que no se observó este efecto al sembrar las diluciones en placa.

Del estudio preliminar de las sustancias inhibitoras presentes en los extractos de *Brassica*, podemos resaltar: a) se trataría de compuestos muy polares, descartándose lípidos neutros y polares, así como esteroides y b) la posible utilidad de *A. alternata* como modelo para determinar la sensibilidad de hongos formadores de MVA pertenecientes al

GARCIA-ROMERA, I., GARCIA-GARRIDO, J.M., MARTINEZ-MOLINA, E. y OCAMPO J.A. 1990. Possible influence of hydrolitic enzymes on vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of alfalfa. *Soil Biol. Biochem.* 22: 149-152.

GARCIA-ROMERA, I., GARCIA-GARRIDO, J.M. y OCAMPO, J.A. 1991. Pectolytic enzymes in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *FEMS Microbiology Letters.* 78: 343-346.

GARRET, S.D. 1970. "Pathogenic root infecting fungi". Cambridge Univ. Press. Cambridge.

GEMMA, J.N., KOSKE, R.E. 1988. Pre-infection interactions between roots and the mycorrhizal fungus *Gigaspora gigantea*: Chemotropism of germ-tubes and root, growth response. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 91: 123-132.

GERDEMANN, J.W. 1961. A species of *Endogone* from corn causing vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Mycologia* 53: 254.

GERDEMANN, J.W. y NICOLSON, J.H. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet-sieving and decanting. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 46: 235-244.

GERDEMANN, J.W. y TRAPPE, J.M. 1974. The *Endogonaceae* in the Pacific Northwest. *Mycologia Memoir.* 5: 76.

GERHARDSON, B. y CLARHOLM, M. 1986. Microbial communities on plant roots. En "Microbial Communities in Soil". FEMS Symposium Nº 33. Eds. A.Kjoller y L.H.Sorensen. Elsevier.

GERHARDSON, B. y CLARHOLM, M. 1986. Microbial communities on plant roots. pp. 19-34, en: "Microbial Communities in

Soil". FEMS Symposium Nº 33. Eds. V. Jensen, A. Kjoller y L.H. Sorensen. Elsevier.

GIANINAZZI, S., GIANINAZZI-PEARSON, V. y DEXHEIMER, J. 1979. Ultrastructural localization of acid and alkaline phosphatase in onion roots infected by *Glomus mosseae*. *New Phytol.* 82: 127-132.

GIANINAZZI-PEARSON, V. 1984. Host-fungus specificity, recognition and compatibility in mycorrhizae. En: "Genes involved in Microbe-plant interactions". Eds. D.P.S. Verma y Th. Hohn. pp 225-253. Springer-Verlag, New York.

GIANINAZZI-PEARSON, V. y AZCON-GONZALEZ, C. 1991. Fisiología de las micorrizas vesículo-arbusculares. En: "Fijación y movilización biológica de nutrientes".II. Fijación de Nitrógeno y Micorrizas. pp. 175-202. Eds. J.López-Gorgé, J. Olivares y J.M. Barea. CSIC. Madrid.

GIANINAZZI-PEARSON, V. y GIANINAZZI, S. 1978. Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza.II. Soluble alkaline phosphate specific to mycorrhizal infection in onion roots. *Physiol. Plant Pathol.* 12: 45-53.

GIANINAZZI-PEARSON, V. y GIANINAZZI, S. 1988. Morphological integration and functional compatibility between symbionts in vesicular-arbuscular endomycorrhizal associations. En: "Cell to cell Signals in Plant, Animal and Microbial Symbiosis". Eds. S. Scannerini et al. pp. 73-84. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin.

GIANINAZZI-PEARSON, V., MORANDI, D., DEXHEIMER, J. y GIANINAZZI, S. 1981. Ultrastructural and ultracytochemical features of a *Glomus tenuis* mycorrhiza. *New Phytol.* 88: 633-639.

GIANINAZZI-PEARSON, V., TROUVELOT, A., MORANDI, D. y MAROCKE, R. 1980. Ecological variations in endomycorrhizas associated with wild raspberry populations in the Vosges region. *Acta Oecologia Plant.* 1: 111-119.

GIOVANNETTI, M. y MOSSE, B. 1980. An evaluation of technics for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84: 489-500.

GLENN, M.G., CHEW, F.S. y WILLIAMS, P.H. 1985. Hiphal penetration of *Brassica* (Cruciferae) roots by a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol.* 99: 463-472.

GLENN, M.G., CHEW, F.S. y WILLIAMS, P.H. 1988. Influence of glucosinolate content of *Brassica* (Cruciferae) roots on growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 110: 217-225.

GONCALVES, E.J., MUCHOVEJ, J.J. y MUCHOVEJ, R.M.C. 1991. Effect of kind and method of fungicidal treatment of bean seed on infections by the mycorrhizal fungus *Glomus macrocarpum* and by the pathogenic fungus *Fusarium solani*. I. Fungal and plant parameters. *Plant and Soil* 132: 41-46.

GRAHAM, J.H. 1982. Effect of the citrus root exudates on germination of clamidospores of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus epigeum*. *Mycologia* 74: 831-835.

GRAHAM, J.H., LEONARD, R.T. y MENGE, J.A. 1981. Membrane-mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. *Plant Physiol.* 68: 548-552.

GRAHAM, J.L., LINDERMAN, R.G. y MENGE, J.A. 1982. Development of external hyphae by different isolates of

mycorrhizal *Glomus* spp. in relation to root colonization and growth of Troyer citrange. *New Phytol.* 91: 183-189.

GRIFFIN, D.M. 1972. Types of microbial interactions. En: "Ecology of Soil Fungi". Chapman y Hall, Londres.

GRIPPIOLO, R. 1981. II processo di un fungo vescicolo-arbuscolare. I. Osservazioni ultrastrutturali sulla penetrazione del fungo da cellula a cellula nella radice. *Allionia* 24: 49.

GUNZE, C.M.B. y HENNESSY, C.M.R. 1980. Effect of host-applied auxin on development of endomycorrhiza in cowpeas. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 74: 247.

HALE, M.G., MOORE, L.D. y GRIFFIN, G.J. 1981. Factors affecting root exudation and significance for the rhizosphere ecosystems. En: "Biological and Chemical Interactions in the Rhizosphere". Symp. Proc. Ecol. Res. Comm., Swed. nat Sci. Res. Council., Estocolmo, pp. 43-71.

HALOS, P.M. y ZORRILLA, R.A. 1979. Vesicular-arbuscular mycorrhizae increase growth and yield of tomatoes and reduce infection by *Pseudomonas solanacearum*. *Philipp. Agric.* 62: 309.

HARDIE, K. 1985. The effect of removal of extraradical hyphae on water uptake by vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *New Phytol.* 101: 677-684.

HARLEY, J.L. 1986. Mycorrhizal studies: past and future. En: *Mycorrhizae: physiology and genetics*. Proc. 1st. European Symposium on Mycorrhizae. Dijon, Francia.

HARLEY, J.M. y HARLEY, E.L. 1987. A check list of mycorrhiza in the British flora. *New Phytol.* 105: 1-102.

- HARLEY, J.L. y SMITH, S.E. 1983. "Mycorrhizal Symbiosis". Academic Press, London, New York.
- HAYMAN, D.S. 1974. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza, VI. Effect of light and temperature. *New Phytol.* 73: 71-80.
- HEPPER, C.M. 1977. A colorimetric method for estimating vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *Soil Biol. Biochem.* 9: 15-18.
- HEPPER, C.M. 1979. Germination and growth of *Glomus caledonium* spores: the effects of inhibitors and nutrients. *Soil Biol. Biochem.* 11: 269-277.
- HEPPER, C.M. 1984. Isolation and culture of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. En "VA Mycorrhiza" (Eds. C.LL.Powell y D.J.Bagyaraj), pp. 95-112. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- HEPPER, C.M. y SMITH, G.A. 1976. Observations on the germination of *Endogone* spores. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 66: 189-194.
- HEWITT, E.J. 1952. Sand and water culture methods in the study of plant nutrition. *Tech. Comm. Farham. Roy. Bucks Comm. Agric. Bur.* 22.
- HILBERT, J.L. y MARTIN, F. 1988. Regulation of gene expression in ectomycorrhizas. I. Protein changes and the presence of ectomycorrhiza specific polypeptides in the *Pisolithus-Eucalyptus* symbiosis. *New Phytol.* 110: 339-346.
- JABAJI-HARE, S.H. 1988. Lipid and fatty acid profiles of some vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi: contribution to taxonomy. *Mycologia* 80: 622-629.

JEANMAIRE, C., DEXHEIMER, J., MARX, C., GIANINAZZI, S. y GIANINAZZI-PEARSON, v. 1985. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection on the distribution of neutral phosphatase activities in root cortical cells. *J. Plant Physiol.* 119: 285-293.

JONES, P.C.T. y MOLLISON, J.E. 1948. A technique for the quantitative estimation of soil microorganisms. *Jour. Gen. Microb.* 2: 54-69.

JOOSTE, W.J. 1966. The effect of different crop sequences on the rhizosphere fungi of wheat South African. *Journal of Agricultural Science* 9: 127-136.

KATZNELSON, H. ROUATT, J.W. y PETERSON, E.A. 1962. The rhizosphere effect of mycorrhizal and nonmycorrhizal roots of yellow birch seedlings. *Can. J. Bot.* 40: 377-382.

KINDEN, D.A. y BROWN, M.F. 1975. Electron microscopy of vesicular-arbuscular mycorrhiza of yellow poplar. I. Characterisation of endophytic structures by scanning electron microscopy. *Can. J. Microbiol.* 21:989-993.

KINDEN, D.A. y BROWN, M.F. 1985. Electron microscopy of vesicular-arbuscular mycorrhiza of yellow poplar. II. Intracellular hyphae and vesicles. *Can. J. Bot.* 21: 1768-1780.

KOONEN, I., Mc GRATH S.P. y GILLER, K.E. 1990. Mycorrhizal infection of clover in delayed in soils contaminated with heavy metals from past sewage sludge applications. *Soil Biol. Biochem.* 22: 871-873.

KOSKE, R.E. 1982. Evidence for a volatile attractant from plants roots affecting germ tubes of a VA mycorrhizal fungus. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 79: 305-310.

KOUGH, J.L., GIANINAZZI-PEARSON, V. y GIANINAZZI, S. 1987. Depressed metabolic activity of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi after fungicide application. *New Phytol.* 106: 707-715.

KRISHNA, K.R. y BAGYARAJ, D.J. 1983. Interaction between *Glomus fasciculatum* and *Sclerotium rolfsii* in peanut. *Can. J. Bot.* 61: 2349-2351.

KRISHNA, K.R., BALAKRISHNA, A.N. y BAGYARAJ, D.J. 1982. Interactions between a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and *Streptomyces cinnamomeus* and their effects on finger millet. *New Phytol.* 92: 401-405.

LACKIE, S.M., GARRIOCK, M.L., PETERSON, R.L. y BOWLEY, S.R. 1987. Influence of host plant on the morphology of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus versiforme* (Daniels y Trappe) Berch. *Symbiosis.* 3: 147-158.

LEI, J. y PICHE, Y. 1990. Nutrient uptake and its role in the *in vitro* culture of the VA mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. 8th NACOM. Abstract p. 181. Wyoming, U.S.A.

LE TACON, F., SKINNER, F.A. y MOSSE, B. 1983. Spore germination and hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus mosseae* (Gerdemann y Trappe), under decreased oxygen and increased carbon dioxide concentrations. *Can. J. Microbiol.*, 29: 1280-1285.

LINDERMAN, R.G. 1988. Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect. *Phytopathology* 78 (3): 366-371.

LINDERMAN, R.G. y GILBERT, R.G. 1975. Influence of volatiles of plant origin on soil borne plant pathogens. En: "Biology and Control of Soil-borne Plant Pathogens", Bruehl, G.W. Ed. Am. Phytopathol. Soc. St. Paul, Minn. pp 90-99.

Mac DONALD, R.M. y LEWIS, M. 1978. The occurrence of some acid-phosphatases and dehydrogenases in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *G. mosseae*. *New Phytol.* 80: 135-141.

Mc GRAW, A.C. y SCHENCK, N.C. 1981. Effects of two species of VA-mycorrhizal fungi on the development of *Fusarium* wilt tomato. *Phytopathology* 71: 894.

MARSH. B.A.B. 1971. Measurement of length in random arrangements of lines. *J. Appl. Ecol.* 8: 265.

MARX, C., DEXHEIMER, J. GIANINAZZI-PEARSON, V. y GIANINAZZI, S. 1982. Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizas. IV. Ultracytoenzimological evidence (ATPase) for active transfer processes in the host-arbuscule interface. *New Phytol.* 90: 37-43.

MATARE, R.J. y HATTING, M.J. 1978. Effect of mycorrhizal status of avocado seedlings on root rot caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Soil* 49: 433.

MAYO, K., DAVIS, R.E. y MOTTA, J. 1986. Stimulation of germination of spores of *Glomus versiforme* by spore associated bacteria. *Mycologia* 78: 426-431.

MEJSTRIK, J. 1965. Study of the development of endotrophic mycorrhiza in the association of *Cladietum marisci*. En: "Plant Microbe Relationship" Eds. J. Macura y V.

Vancura. pp. 283-290. Praga. Czechoslovak Academy of Science.

MEYER, J. 1985. Analizing the VA mycorrhizosphere. Proceedings 6th N. Am. Conf. on Mycorrhizae, ed. R. Molina, pp. 121-122.

MITHEN, R.F., LEWIS, B.G., HEANEY, R.K. y FENWICK, G.R. 1986. In vitro activity of glucosinolates and their products against *Leptosphaeria maculans*. Trans. Br. Mycol. Soc. 87 433-440.

MINCHIN, P.E.K. y Mc NAUGHTON, G.S. 1984. Exudation of recently fixed carbon by non-sterile roots. J. Exp. Bot. 35: 74-82.

MONTÉGUT, J. 1960. En: "The Ecology of Soil Fungi", an International Symposium. Parkinson, D y Waid, J.S. Eds. Liverpool Univ. Press.

MORANDI, D., BAILEY, J.A. y GIANINAZZI-PEARSON, V. 1984. Isoflavonoid accumulation in soybean roots infected with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Physiol. Plant Pathol. 24: 357-364.

MORTON, J.B. 1988. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: Classification, nomenclature, and identification. Mycotaxon 32: 267-324.

MORTON, J.B. y BENNY, G.L. 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (zygomycetes). A new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporarineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporarineaceae, with an emendation of Glomaceae. Mycotaxon. 37: 471-491.

- MOSSE, B. 1959. Observations on the extra-matrical mycelium of a vesicular-arbuscular endophyte. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 42: 439.
- MOSSE, B. 1962. The establishment of vesicular arbuscular mycorrhiza under aseptical conditions. *J. Gen. Microbiol.* 27: 509-520.
- MOSSE, B. 1975. Specificity of vesicular-arbuscular mycorrhizas. En: "Endomycorrhizas" Sanders, F.E, Mosse, B. Y Tinker, P.B. Eds. Academic Press, Londres. pp. 469-484.
- MOSSE, B. y HEPPER, C. 1975. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organ cultures. *Physiol. Plant Pathol.* 5: 215-223.
- MUCHOVEJ, J.J., MUCHOVEJ, R.M.C. y GONCALVES, E.J. 1991. Effect of kind of method of fungicidal treatment of bean seed on infections by the VA-mycorrhizal fungus *Glomus macrocarpum* and by the pathogenic fungus *Fusarium solani*. II. Temporal spatial relationships. *Plant and Soil* 132: 47-51.
- MUGNIER, J. y MOSSE. B. 1987. Spore germination and viability of a vesicular-arbuscular fungus *Glomus mosseae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 88 (3): 411-413.
- NEAL, J.L., BOLLEN, W.B. y ZALE, B. 1964. Rhizosphere microflora associated with mycorrhizae of douglas fir. *Can. J. Microbiol.* 10: 259-265.
- NEAL, J.I. Jr, LU, K.C., BOLLEN, W.B. y TRAPPE, J.M. 1968. A comparison of rhizosphere microfloras associated with mycorrhizae of red alder and Douglas-fir. En: "Biology of Alder" p. 57-61. Eds. J.M. Trappe, J.F. Franklin, R.F. Tarrant y G.M. Hansen. USDA For. Serv., Pac. Northwest

For. Range Expt. Stn. pp 292.

NEWMAN, E.I. y REDDELL, P. 1987. The distribution of mycorrhizas in families of vascular plants. *New Phytol.* 106: 745-751.

NEWMAN, E.I. y WATSON, A. 1977. Microbial abundance in the rhizosphere: A computer model. *Plant and Soil* 48: 17-56.

NICOLSON, T.H. 1959. Mycorrhiza in the Gramineae. I. Vesicular-arbuscular endophytes with reference to the external phase. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 42: 421-438.

NICOLSON, T.H. 1960. Mycorrhiza in the Gramineae. II. Development in different habitats, particularly sand dunes. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 43: 132-145.

OCAMPO, J.A. 1976. Investigación de los factores ecológicos que afectan el establecimiento en la rizosfera de microorganismos utilizados como fertilizantes biológicos: *Azotobacter* y *fosfobacterias*. Tesis doctoral, Universidad de Granada.

OCAMPO, J.A. y BAREA, J.M. 1982. Depressed metabolic activity of VA mycorrhizal fungi by photosynthesis inhibitor herbicides. *Collq. INRA.* 13: 267-270.

OCAMPO, J.A. y BAREA, J.M. 1985. Effect of carbamate herbicides on VA mycorrhizal infection and plant growth. *Plant Soil.* 85, 375-383.

OCAMPO, J. A., CARDONA, F. y EL-ATRACH, F. 1985. Effects of root extracts of non-host plants on VA mycorrhizal infection and spore germination. En "Physiological and genetical aspects of mycorrhizae". (Eds. V. Gianinazzi-Pearson y S. Gianinazzi) pp: 721-724 INRA. Paris.

OCAMPO, J.A. y HAYMAN, D.S. 1981. Influence of plant interactions on vesicular-arbuscular mycorrhizal infections. II. Crops rotations and residual effects of non-host plants. *New Phytol.* 87: 333-343.

OCAMPO, J.A., MARTIN, J. y HAYMAN, D.S. 1980. Influence of plant interactions on vesicular arbuscular mycorrhizal infections. I. Host and non-host plants grown together. *New Phytol.* 84: 27-35.

ODUM, E.P. 1959. *Fundamentals of ecology*. 2nd. ed. saunders, Philadelphia.

OLSON, F.C. 1950. Quantitative estimates of filamentous algae. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 69: 272-279.

PAGET, D.K. 1975. The effect of *Cylindrocarpon* on plant growth responses to VA mycorrhiza. En: "Endomycorrhizas" Sanders, F.E., Mosse y B. Tinker, P.B. Eds. Academic Press, Londres. pp 593.

PAUL, E.A. y CLARK, F.E. 1989. "Soil Microbiology and Biochemistry". Academic Press, pp. 273.

PAVLICA, D.A., HORA, T.S., BRADSHAW, J.J., SKOGERBOE, R.K. y BAKER, R. 1978. Volatiles from soil influencing activities of soil fungi. *Phytopathology* 68: 758-765.

PERRIN, D.D. y DEMPSEY, B. 1974. "Buffers for pH and Ion control". Fletcher & Son Ltd, Norwich, U.K. 176 pp.

PHILLIPS, D.A. y TSAI, S.M. 1990. Flavonoids as plant signals to rhizosphere microbes. 8th NACOM. Abstracts. pp. 238. Wyoming, U.S.A.

PHILLIPS, J.M. y HAYMAN, D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-

arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158-161

PRIKRYL, Z. y VANCURA, V. 1980. Roots exudates of plants. VI Wheat root exudation as dependent on growth, concentration gradient of exudates and the presence of bacteria. *Plant and soil* 57: 69-83.

RAI, R. 1988. Interactions responses of *Glomus albidus* and *Cicerrhizobium* strains on iron uptake and symbiotic N₂ fixation in calcareous soil. *J. Plant Nut.* 11: 863-869.

RAJ, J., BAGYARAJ, D.J. y MANJUNATH, M. 1981. Influence of soil inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhiza and a phosphate-dissolving bacterium on plant growth and ³²P-uptake. *Soil Biol. Biochem.* 13: 105-108.

RAMBELLI, A. 1973. The rhizosphere of mycorrhizae. En: "Ectomycorrhizae", eds. G.L. Marks y T.T. Kolowski. Academic Press., New York, 444 pp.

RAMIREZ, B.N. 1974. Influence of *Endomycorrhizae* on the relationships of inoculum density of *Phytophthora palmivora* in soil to infection of papaya roots. M.S. Thesis. Un. Florida.

RAPER, K.B. y FENNEL. 1965. "The genus *Aspergillus*". Baltimore, 686 pp.

RAPER, K.B. y THOM, C. 1949. "A Manual of Penicillia". Baltimore. 875 pp.

RATNAYAKE, M., LEONARD, R.T. y MENGE, J.A. 1978. Root exudation in relation to supply of phosphorus and its possible relevance to mycorrhizal formation. *New Phytol.* 81: 543-552.

READ, D.J., FRANCIS, R. y FINLAY, R.D. 1985. Mycorrhizal mycelia and nutrient cycling in plant communities. En: "Ecological interactions in soil: plant, microbes and animals". Special publication series of the British Ecological Society Nº 4. Ed. A.H. Fitter.

RHODES, L.H. y GERDEMANN, J.W. 1978. Influence of phosphorus nutrition on sulphur uptake by vesicular-arbuscular mycorrhize of onion. *Soil Biol. Biochem.* 10: 361.

RICH, J.R. y BIRD, G.W. 1974. Association of early season vesicular-arbuscular mycorrhizae with increased growth and development of cotton. *Phytopathology* 64: 1421-1425.

RIFAI, M.A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers* 116: 1-55.

ROSEBERG, G., OUSTEDAL, D.O., SELJELID, R., SCHREINER, O. y GOKSOYR, J. 1981. Estimation of carbon flow in a *Calluna* heath system. *Oikos* 37: 295-305.

ROSS, J.P. 1972. Influence of *Endogone* mycorrhiza on *Phytophthora* rot of soybean. *Phytopathology* 67: 1507-1511.

ROVIRA, A.D., FOSTER, R.C. y MARTIN, J.H. 1979. Note on terminology: origin, nature and nomenclature of the organic materials in the rhizosphere. En: *The Soil-root Interface*. Harley, J.L. y Russel, R.s. Eds. Academic Press. Londres. pp 1-4.

SCANNERINI, S. y BONFANTE-FASOLO, P. 1983. Comparative ultrastructural analysis of mycorrhizal association. *Can J. Bot.* 61: 917.

SCHWAB, S.M., MENGE, J.S. y LEONARD, R.T. 1983. Quantitative and qualitative effects of phosphorus on extracts and exudates of sudangrass roots in relation to vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. *Plant Physiol.* 73: 761-765.

SCHWAB, S., MENGE, J.A. y TINKER, P.B. 1991. Regulation of nutrient transfer between host and fungus in vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytol.* 117: 387-398.

SINGH, C.S., KAPOOR, A. y WANGE, S.S. 1991. The enhancement of root colonisation of legumes by VA mycorrhizal fungi through the inoculation of the legume seed with commercial yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Plant and Soil* 131: 129-133.

SIQUEIRA, J.O. 1987. Cultura axénica e monoxénica dos fungos micorrízicos vesículo-arbusculares. En: "II Reuniao Brasileira sobre Micorrizas". pp. 44-70. Sao Paulo, Brasil.

SMITH, S.E. y SMITH, F.A. 1990. Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport. *New Phytol.* 114: 1-38.

SMITH, S.E. y WALKER, N.A. 1981. A quantitative study of mycorrhizal infection in *Trifolium*: separate determination of the rates of infection and of mycelial growth. *New Phytol.* 89: 225-240.

SPANU, P. y BONFANTE-FASOLO, P. 1988. cell wall bound peroxidase activity in roots of mycorrhizal *Allium porum*. *New Phytol.* 109: 119-124.

St. JOHN, T.V., COLEMAN, D.C. y REID. C.C.P. 1983. Influence of a volatile compound on formation of

vesicular-arbuscular mycorrhizad. Trans. Br. Mycol. Soc. 81 (1): 153-154.

SUBBA RAO, N.S., TILAK, K.V.B.R. y SINGH, C.S. 1985. Synergistic effect of vesicular-arbuscular mycorrhizas and *Azospirillum brasilense* on the growth of barley in pots. Soil Biol. Biochem. 17: 119-121.

SYLVIA, D.M. y SCHENCK, N.C. 1983. Germination of chlamydospores of three *Glomus* species as affected by soil matric potential and fungal contamination. Mycologia. 75 (1): 30-35.

TESAROVA, M. y SIMEK, M. 1987. Rhizosphere microflora in managed grasslands. En: "Interrelationships between microorganisms and plants in soil". Developments in Soil Science 18. Vancura, V. t Kunc, F. Eds. Proceedings of an International Symposium. Czechoslovakia.

TILAK, K.V.B.R. 1985. Interaction of vesicular-arbuscular mycorrhizae and nitrogen fixers. En: Proc. Soil Biol. Symp. Hisar. p. 219-226.

TOSI, L. GIOVANNETTI, M., ZAZZERINI, y DELLA TORRE, G. 1988. Influence of mycorrhizal tobacco roots, incorporated into the soil, on the development of *Thielaviopsis basicola*, J. Phytopathol., 122: 186-191.

VANCURA, V. 1988. Microorganisms, their mutual relations and functions in the rhizosphere. En: "Soil Microbial Associations, Control of Structures and Functions" Vancura, V. y Kunc, F. Eds. Academia, Praga. pp 191-295.

VANCURA, V. y JANDERA, A. 1986. Formation of biologically active metabolites by rhizosphere microflora. En "Microbial Communities in Soil". FEMS Symposium N° 33.

Eds. A.Kjoller y L.H.Sorensen. Elsevier.

VIAN, B. y ROLAND, J.C. 1987. The helicoidal cell wall as a time register. *New Phytol.* 105: 345-357.

VIDAL DOMINGUEZ, M.T. 1991. Contribución al estudio de los factores que influncian el crecimiento "in vitro" de hongos de las micorrizas VA y su establecimiento en plantas micropropagadas. Tesis doctoral. Universidad de Granada. España.

VIERHEILIG, H. 1990. Estudio de los factores implicados en la susceptibilidad de plantas a la colonización por endófitos vesiculo-arbusculares. Tesis doctoral. Universidad de Granada. España.

VON ARX, J.A. 1981. "The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture". J. Cramer, Vaduz. 424 pp.

WALKER, C. 1987. Identifying the endomycorrhizal Endogonaceae. II Reuniao Brasileira sobre Micorrizas. Sao Paulo. Brasil.

WARNER, A. y MOSSE, B. 1980. Independent spread of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 74: 407-410.

WHIPPS, J.M. y LYNCH, J.M. 1985. Energy losses by the plant in rhizodeposition. *Ann. Proc. Phytochem. Soc. Eur.* 26: 59-71.

WIDDEN, P. y BISSET, J. 1972. An automatic multichamber soil washing apparatus for removing fungal spores from soil. *Can. J. Microbiol.* 18: 1399-1404.

- WILSON, J.M. 1984. Comparative development and interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 97: 413-426.
- WILSON, G.W.T., DANIELS, B.A., HETRICK, B.A. y GERSCHEFSKE KITT, D. 1989. Suppression of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus spore germination by non-sterile soil. *Can. J. Bot.* 67: 18-23.
- WOODHEAD, S.H., GERDEMANN, J.W. y PAXTON, J.D. 1977. Mycorrhizal infection of soybean roots reduces *Phytophthora* root rot. *Abt. 3rd N. Am. Conf. Mycorrhizae.* Athens. Ga. 10.
- WYSS, P. MELLOR, R.B. y WIEMKEN, A. 1990. Vesicular-arbuscular mycorrhizas of wild type soybean and non-nodulating mutants with *Glomus mosseae* contain specific polypeptides (mycorrhizins), immunologically cross-reactive with nodulins. *Planta* 182: 22-26.
- YAMAZAKI, N. FRY, S., DARVILL, A. y ALBERSHEILM, P. 1983. Host-pathogen interactions. XXIV. Fragments isolated from suspension-cultures sycamore cell walls inhibit the ability of the cells to incorporate (¹⁴C) leucine into proteins. *Plant Physiol.* 72: 864-869.
- ZAMBOLIN, L. y SCHENCK, N.C. 1981. Interactions between a VA mycorrhiza and root infecting fungi on soybean. *Phytopathology* 71: 267.
- ZYCHA, H., SIEPMANN, R. y LINNEMANN, G. 1969. "Mucorales". *J. Cramer, Lehre*, 355 pp.