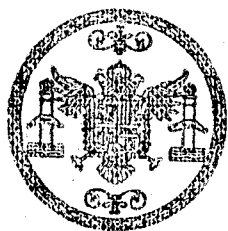


UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS



Micorrizas VA en Cultivos
Arbóreos: Almendro, Naranja y Olivo

Benito E. Roldán Fajardo

Tesis Doctoral

1985

FACULTAD DE CIENCIAS

| | |
|----------------------|---|
| BIBLIOTECA | |
| FACULTAD DE CIENCIAS | |
| GRANADA | |
| Estante | 5 |
| Tabla | |
| Núm. | 4 |

| | |
|------------------------|----------------------------|
| UNIVERSIDAD DE GRANADA | |
| FACULTAD DE CIENCIAS | |
| SALIDA | N.º 9 Fecha 9 ENE. 1988 |

MICORRIZAS VA EN CULTIVOS ARBOREOS:
ALMENDRO, NARANJO Y OLIVO.

| | |
|--------------------------|-----------|
| BIBLIOTECA UNIVERSITARIA | |
| GRANADA | |
| Nº Documento | 61353550X |
| Nº Copia | 15516374 |

Benito E. Roldán Fajardo
(Tesis Doctoral)

UNIVERSIDAD DE GRANADA

1985

Tesis Doctoral, dirigida por el Prof. Dr. D. José Miguel Barea Navarro, del CSIC. Fue leída el día 16 de Diciembre de 1985, ante el Tribunal formado por los Profesores, Montoya Gómez, Granada; Hernández Giménez, Valencia; Olivares Pascual, Granada; Recalde Manrique, Granada; y Arias Peñalver, Granada. Obtuvo la calificación de Apto "cum laude".

Este Trabajo ha sido realizado en el Departamento de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín de Granada, Centro del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

La conclusión de un trabajo importante, como es la Tesis Doctoral, ha significado siempre en mi vida prepararme para el inicio de una nueva etapa. Al comenzar ésta siento la necesidad de manifestar mi agradecimiento a todas las Personas e Instituciones que lo han hecho posible.

Siento mucha gratitud hacia mis maestros D. Jesús Terrés y D^a Aurora Martín que, basándose en la total confianza que en ellos depositaron mis padres, se esforzaron en darme con gran generosidad una formación que ha sido básica en mi futuro.

Un grato recuerdo merecen el Instituto "Padre Suárez" y la Facultad de Ciencias de Granada. Tuve la gran suerte de recibir en la Facultad las enseñanzas de un querido Profesor, D. Enrique Montoya, maestro indiscutible de Microbiología en cuyas clases se cimentaron mis conocimientos biológicos. Hoy es una satisfacción para mi que él sea el Ponente de esta Tesis. Recuerdo con gran entusiasmo y gratitud las clases de mi Profesor de Prácticas de Microbiología José Miguel Barea y aquellos inolvidables meses que como Jefe de Prácticas tuve la suerte de compartir con él.

Esta memoria de Tesis Doctoral se ha realizado a partir del curso 1979-80, aprovechando los periodos de tiempo libre que me dejaron mis actividades docentes, en la Estación Experimental del Zaidín del CSIC. A este Centro agradezco en las personas de D. Manuel Lachica y D. Julio López Gorge, directiva que me admitió, y a la actual directiva encabezada por D. Julio Boza, que en todo momento me animó, y D. José Miguel Barea, a su vez Director de esta Tesis Doctoral y principal responsable de que este trabajo haya concluido.

Un especial agradecimiento a mis compañeros de la U.E. de Microbiología especialmente a Eustoquio Martínez, a Charo y

Conchi Azcón y Juan Antonio Ocampo que en todo momento me ayudaron y a D. José Olivares que siendo Jefe de la U.E.L de Microbiología me permitió trabajar en ella.

No puede faltar mi agradecimiento a las Sras. Teresa, Pura y Pilar Medina por el análisis de plantas, a la Sra. Rosa Burgos y D. Alfonso Fernández por el análisis de suelos y a D. Juan Rodríguez Robledo por fotografía. Tengo que agradecer a D. Antonio Velázquez y D. Antonio Trescastro por su trabajo de campo y a D. Manuel Martínez por el sumo cuidado que puso para dibujar y rotular las figuras y gráficas de esta Tesis y a Isabel López que con tanto afecto y esmero la mecanografió.

Quiero expresar un agradecimiento especial a la Excma. Diputación Provincial y Cámara Provincial Agraria de Granada, por el apoyo económico prestado a los estudios sobre almendro realizados en este trabajo.

Finalmente, pero ante todo, a mis padres. Ellos han apoyado siempre mis inquietudes y aceptando considerables sacrificios, han hecho posible mi carrera y que ahora culmine con este trabajo.

A mis padres y
a mis maestros

INDICE

| | |
|---|----|
| I. Introducción al Tema | 1 |
| II. Objeto e interés del trabajo | 4 |
| III. Revisión bibliográfica | 7 |
| A. Conceptos generales | 8 |
| Formación de las MVA | 8 |
| Fisiología de las MVA | 21 |
| Factores que afectan la formación y función de las MVA | 33 |
| Aplicaciones prácticas de las MVA .. | 41 |
| Significado de las MVA en Ecolo- gía Vegetal | 52 |
| B. Dependencia y especificidad en MVA . | 54 |
| Dependencia de los hongos VA | 55 |
| Dependencia de una planta a las Micorrizas | 58 |
| Especificidad en MVA | 64 |
| C. MVA en árboles y arbustos | 66 |
| Las MVA en silvicultura | 71 |
| Las MVA en plantas arbóreas uti- zadas en la lucha contra la erosión, desertización y recuperación de suelos | 80 |

| | |
|--|-----|
| Las MVA en plantas arbóreas cultiva- das por su interés alimenticio, in- dustrial u ornamental | 86 |
| Las MVA en cítricos | 94 |
| IV. Plan de trabajo | 100 |
| V. Material y Métodos | 102 |
| Material General | 102 |
| Material y toma de muestras en campo | 104 |
| Ensayos de laboratorio | 107 |
| Estudios de invernadero: Ensayos gene- rales | 116 |
| Estudios de invernadero: Ensayos espe- cíficos | 120 |
| Ensayos de vivero | 128 |
| VI. Resultados | 130 |
| Muestreos de campo | 133 |
| Estudios de invernadero: Ensayos espe- cíficos | 141 |
| Ensayos en vivero | 203 |
| VII. Discusión | 207 |
| Presencia de MVA en almendro, naranjo y olivo crecidos en condiciones natu- les | 207 |
| Compatibilidad hongo-planta | 209 |

| | |
|--|-----|
| Dependencia de almendro, olivo y naranja a las MVA | 211 |
| Obtención de plantas con micorrización optimizada en vivero | 215 |
| VIII. Conclusiones | 220 |
| IX. Bibliografía | 222 |

I. INTRODUCCION AL TEMA

I. INTRODUCCION AL TEMA

Las micorrizas son asociaciones simbióticas mutualísticas que se desarrollan entre las raíces de la mayoría de las especies vegetales y ciertos hongos del suelo. Se trata de una simbiosis "casi universal", no sólo por el número de plantas susceptibles de ser micorrizadas sino también por su ubicuidad en la inmensa mayoría de los hábitats naturales.

Los hongos de la micorriza, habitantes comunes del suelo, colonizan la corteza de las raíces y, en perfecto equilibrio biológico, establecen con las plantas una serie de interrelaciones biotróficas. La planta suministra substratos energéticos y funcionales al hongo y éste, por medio de su red de hifas externas, capta nutrientes, principalmente fósforo, de la solución edáfica y transfiere estos iones a la planta hospedadora mediante mecanismos, inespecíficos unos y específicos otros, de gran eficacia. A las micorrizas se les reconoce un papel clave en la evolución y supervivencia de las plantas, así como una contribución significativa en Producción Vegetal, basado, principalmente, en su efecto crucial sobre el ciclo del P y otros nutrientes.

Existen varios tipos de micorrizas, pero el 96 % de las especies vegetales existentes sobre la corteza terrestre forman las del tipo llamado Vesículo-Arbuscular (VA). Los hongos causantes son zigomicetos microscópicos pertenecientes a la familia Endogonaceae.

Las micorrizas VA son tan antiguas como las propias plantas como se deduce de la observación del primer registro fósil que se conoce de un vegetal (fósil Rhynie datado en 370 millones de años). La existencia de tal coevolución ha dado lugar a diversas interdependencias planta-hongo formador de micorrizas VA (en adelante hongo VA), de forma que hoy se sabe que la mayoría de las plantas necesitan, en mayor o menor grado, estar micorrizadas para captar nutrientes y crecer adecuadamente. Sin embargo, la dependencia es aún más marcada por parte de los hongos VA, ya que no se ha logrado evidenciar que éstos sean capaces de completar su ciclo de vida en ausencia de la planta hospedadora, por lo que estos hongos deben ser considerados actualmente simbioses obligados.

La búsqueda de los factores necesarios que permitan el crecimiento independiente del hongo constituye un tema de estudio de considerable interés, no sólo en lo referente a conocer ciertos aspectos que aún se ignoran, o se conocen de forma fragmentaria, sobre la biología y ecología de hongos y micorrizas VA (MVA) sino también por las repercusiones de índole aplicada derivadas de la ob-

tención de cultivos "in vitro" de estos microorganismos.

Otro concepto importante a considerar es el de "especificidad" en las asociaciones hongo VA-planta. Clásicamente se viene aceptando que cualquier hongo VA puede formar micorrizas con cualquier planta susceptible, es decir, que no existe "especificidad" en el sentido estricto del término; sin embargo, sí que se manifiesta una variabilidad en el nivel de efectividad de la micorriza formada entre una planta y diferentes hongos VA, circunstancia, a su vez, modificada por el factor suelo. Hoy se está llegando al convencimiento de que tal variabilidad, en cuanto a eficacia, es enorme. Ello sugiere que el término "especificidad" tiene una mayor importancia en micorrizas VA de lo que se pensó inicialmente por lo que se hace necesario una reconsideración del mismo.

Para finalizar estas ideas introductoras del tema, conviene puntualizar que los aspectos que se acaban de comentar sobre "micotrofismo", "dependencia de una planta a las micorrizas" y "especificidad en MVA" tienen un especial significado y transcendencia en especies vegetales arbóreas formadoras de MVA. Puesto que plantas de este tipo son las que se usan en la presente investigación, es evidente que tales conceptos cobran una especial relevancia en este estudio.

II. OBJETO E INTERES DEL TRABAJO

II. OBJETO E INTERES DEL TRABAJO

Tal como indica el Título de la presente Memoria, se trata de conocer, evaluar el significado e intentar la manipulación de las MVA en tres cultivos de plantas arbóreas típicas de la Cuenca Mediterránea: olivos, cítricos y almendros. La idea final que pretende esta investigación es establecer las bases científicas que permitan el desarrollo de la biotecnología apropiada para optimizar los efectos de las micorrizas VA sobre el crecimiento y nutrición de los mencionados cultivos.

En cuanto al Interés de los cultivos elegidos, sólo decir que huelgan los comentarios después de recordar que olivos, almendros y cítricos forman parte incuestionable de la Cultura y Economía de los Países ribereños del Mediterráneo; y que esto es así hoy y desde tiempo inmemorial. Citar referencias bibliográficas que refrenden la aseveración anterior está fuera de lugar por ser muy diversas, numerosas y universalmente conocidas, aunque quizás merezca consignar sólo a una de ellas por su especial transcendencia: La Biblia, en la cual aparecen diversas alusiones a la incidencia de estos cultivos en la agri-

cultura de la época.

Parte importante de este estudio es conocer la especificidad y grado de dependencia de las MVA en estas plantas. Así mismo, un incentivo más de la presente investigación, derivado de la correcta manipulación del sistema MVA, es la posibilidad de reducir el consumo de fertilizantes en estos cultivos.

La originalidad del estudio que nos ocupa se manifiesta según diferentes puntos de vista. En primer lugar, no se posee ninguna referencia bibliográfica sobre MVA en almenadro; se trata por tanto de un aporte totalmente original. En lo referente a olivo, sólo se poseen someras indicaciones, de que forma MVA. Se puede considerar, por tanto, una contribución científica prácticamente original. Finalmente, el caso del naranjo es diferente en cuanto a su originalidad, ya que se trata de una de las plantas más estudiadas con respecto a MVA. Sin embargo, estos estudios parecen indicar que las variaciones de efectos de los diferentes hongos VA ensayados y el concepto de dependencia a las micorrizas tienen una especial relevancia en Citrus. Así mismo se ha apuntado la gran influencia de la especie y variedad de Citrus y de los suelos usados en la efectividad de las diferentes asociaciones MVA en estas plantas. Hay que tener en cuenta que la gran mayoría de los estudios hasta ahora efectuados se han llevado a cabo en California y Florida; por ello, es importante extenderlos a

otras áreas geográficas donde el cultivo de cítricos sea habitual. Salvo unos ensayos iniciales practicados en Israel, no se poseen otras informaciones al respecto en la Cuenca Mediterránea, consecuentemente el investigar, bajo influencia de diferentes condicionantes ecológicos, el micotrofismo del naranjo es un tema de investigación con suficiente interés si se pretenden remodelar los conceptos de "especificidad" y "dependencias" en MVA.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, y según el objetivo final de este estudio, los Objetivos Intermedios concretos que se pretenden lograr son los siguientes:

1. Definir el grado de micotrofismo y dependencia a las micorrizas para el almendro, naranjo y olivo, según las condiciones del Ecosistema.
2. Seleccionar el hongo VA "más específico" para cada una de estas tres plantas referido a suelos donde comúnmente se cultivan.
3. Obtención de plántulas con "micorrización optimizada" controlada.
4. Hacer prosperar dichas plántulas en condiciones naturales y comparar el efecto de la micorrización controlada con el de los tratamientos normales de la práctica agrícola (micorrización natural y fertilizantes químicos).

III. REVISION BIBLIOGRAFICA

III. REVISION BIBLIOGRAFICA

Como es habitual en la sistematización de una Memoria Doctoral, antes de exponer el Plan de trabajo y la Metodica experimental utilizada se efectua una revisión Bibliográfica sobre el Tema de estudio. Para ello la información disponible se analiza de acuerdo al siguiente esquema:

A. Conceptos generales. En varias revisiones recientes, algunas de ellas en castellano (Azcón-Aguilar y Barea, 1980; Ocampo, 1980; Borie y Barea, 1981; Peña y Sanchez-Díaz 1983), se han tratado aspectos generales en lo que se refiere a tipos, morfología, ecología y fisiología de las MVA, así como los efectos de esta simbiosis en el crecimiento de las plantas. Sin embargo, algunas facetas importantes en el estudio de las MVA, o no han sido tratadas exhaustivamente en los trabajos antes citados, o bien, al haberse experimentado considerables progresos en su conocimiento, necesitan ser reconsideradas. A grandes rasgos, se puede decir que las áreas temáticas en las que interesa profundizar son las referentes a formación, fisiología, factores ecológicos que condicionan el establecimiento, desarrollo

y función de las micorrizas, y finalmente todo lo relacionado con las posibilidades de manipular el sistema MVA con vistas a la aplicación del potencial de esta simbiosis en agricultura.

- B. Revisión de los conceptos de dependencia y especificidad en MVA. Ello se justifica dado la necesidad, en sí, de reconsiderar estos conceptos a la luz de recientes hallazgos en MVA, como por la implicación de los mismos en el tema del presente estudio.
- C. Revisión de los estudios que expresan y evalúan el significado de las MVA en plantas arbóreas con especial referencia a las que son objeto de este trabajo.

A. CONCEPTOS GENERALES

FORMACION DE LAS MVA

Sin tener en cuenta las matizaciones derivadas de los fenómenos de susceptibilidad, compatibilidad y especificidad en las relaciones hongo VA-planta hospedadora, que serán tratados más adelante, en términos generales se puede decir que existen 5 hechos claves en el proceso de formación de MVA (Bowen, 1981a; Hayman, 1983; Barea y Azcón-Agui-

lar, 1983): a) activación de los propágulos del hongo que persisten en el suelo; b) estimulación de los micelios formados cuando alcanzan la rizosfera de una planta susceptible; c) unión de la hifa infectiva a la superficie de la raíz y formación de los primeros puntos de penetración del hongo; d) progreso de la infección en la raíz y e) crecimiento del micelio externo en el suelo que la circunda. Los procesos a), b) y c) constituyen la fase de pre-infección (Smith y Bowen, 1979); mientras que d) y e) son la fase de desarrollo de la micorriza.

a. Activación de los propágulos del hongo. En primer lugar hay que establecer cuales son los propágulos de estas micorrizas. Hoy día se acepta que existen en el suelo tres formas de inóculo, las cuales, aunque con diferente grado en su capacidad de supervivencia y potencial infeccioso, pueden originar la simbiosis. Estas son: i) Las grandes esporas de resistencia de los hongos VA; ii) raíces micorrizadas, o sus fragmentos, procedentes de plantas preexistentes o coexistentes y iii) agregados de hifas que sobreviven en el suelo. El soporte experimental de estos hechos, recientemente revisados por Hayman (1983), es concluyente en lo que se refiere a los dos primeros modelos de inóculo aunque es más problemático el tercero. A continuación se discute el potencial de inóculo que representa cada una de estas distintas opciones de propágulos de la in-

feción VA.

i) Grandes esporas de los hongos VA. Las azigosporas de Acaulospora y Gigaspora, así como las clamidosporas de Glomus y Sclerocystis (únicos 4 géneros* con especies formadoras de MVA ya que Endogone, referido anteriormente como tal, únicamente engloba en la actualidad especies formadoras de ectomicorrizas) son capaces de persistir considerables periodos de tiempo en el suelo, en donde resisten condiciones adversas germinando cuando estas le son favorables.

Tommerup (1983) ha puesto de manifiesto la existencia de un periodo de letargo innato de las esporas VA que, en suelo húmedo y dependiendo de la especie, puede durar varias semanas a partir de la formación de la espora. En suelo seco se reduce significativamente tal periodo de reposo.

Existen pocos estudios acerca del efecto de la "fungistasis general de un suelo" (Stotzky, 1972) sobre la germinación de esporas VA y posterior desarrollo de las hifas, aunque estos estudios evidencian claramente la existencia de tal proceso de amensalismo microbio-microbio (Powell, 1976; Daniels y Duff, 1978; Ross, 1980; Tommerup 1983).

Algunas especies de hongos VA pueden formar varios tubos de germinación simultáneamente, como ocurre en Acaulospora laevis Gerd. & Trappe (Mosse, 1970) ó Gigaspora margarita Becker & Hall (Sward, 1981). En otros casos

* Recientemente, Schenck y Sieverding, han identificado un nuevo género, Entrophospora, formador de MVA (comunicación personal de los autores).

pueden ir apareciendo sucesivamente tubos de germinación, cuando los precedentes no encuentren raíces susceptibles, tal como describen Warner y Mosse (1980) para Glomus mosseae Nicol. & Gerd. o bien cuando se les separa premeditadamente de la espora en germinación como se demostró utilizando Gigaspora gigantea (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe (Koske, 1981). Estos hechos tienen una trascendencia considerable desde el punto de vista ecológico por su significado en el mantenimiento de la infectividad en suelos.

En este contexto ecológico y de acuerdo con la observación de Tommerup (1983), la existencia de una fase de reposo previa a la germinación de esporas, puede tener importancia en el mantenimiento de la capacidad infectiva de un suelo. Este puede ser el caso en habitats en los que alternan periodos favorables para el crecimiento vegetal con los de condiciones adversas para ello.

ii) Fragmentos de raíz micorrizada. Aunque desde el punto de vista de la supervivencia se acepta un papel crucial de las esporas como fuente de inóculo, en general, la infección VA se produce más rápidamente a partir de raíces previamente micorrizadas que a partir de esporas (Hall, 1976; Powell, 1976). Esto puede deberse bien a dificultades en la germinación de estos propágulos en el suelo, o al escaso vigor del micelio formado.

Es obvio suponer que la viabilidad de este inóculo dependa, de un lado, de la edad y capacidad metabólica del fragmento de raíz (Rives et al., 1980; Tommerup y Abbott, 1981); y de otro, del tipo de estructuras fúngicas que posean esos fragmentos. En este sentido, Biermann y Linderman (1983) han demostrado la importancia de las vesículas intraradicales presentes en un fragmento de raíz para decidir el potencial de estos inóculos. Según la observación de estos autores la infectividad derivada de la presencia de tales estructuras se manifiesta especialmente cuando la raíz deja de ser activa. Es más, estos autores también encuentran que raíces infectadas por hongos que no forman vesículas intraradicales, como es el caso de Gigaspora, pierden su potencial como inóculo al dejar la raíz de ser viable; en cambio, las vesículas intraradicales originadas por varias especies de Glomus, conservaban su infectividad incluso al ser aisladas de la raíz. Todo esto sugiere que las vesículas intraradicales, consideradas hasta ahora como simples órganos de reserva, pueden comportarse como esporas, corroborando la hipótesis apuntada por Gerdemann (1975) sobre un posible papel de las vesículas internas como órgano de reproducción.

iii) Hifas del hongo. De acuerdo con la observación de Clark (1964), la infectividad de un suelo se reduce drás-

ticamente al tamizarlo por una luz de malla de 9.5 mm (que no retiene esporas ni fragmentos de raíz) por lo que cabe suponer que la desintegración del micelio podría ser la causa responsable del descenso de infectividad del suelo. Por lo cual es lógico que la red de hifas de los hongos VA presentes en un suelo posean una capacidad infectiva (Read et al., 1976). No obstante, existe un punto clave de la discusión y es si la infectividad de una hifa depende de su asociación directa con un fragmento de raíz (en este caso tendríamos el tipo anteriormente descrito de forma de propágulo) o bien, los agregados de hifas independientes poseen per se, capacidad infectiva.

Recientemente se están encontrando ciertas apreciaciones que apuntan hacia la existencia de un crecimiento, aunque limitado, de las hifas de hongos VA en el suelo no dependiente de una raíz (Warner y Mosse, 1980; Ocampo y Hayman, 1981; Azcón-Aguilar y Barea, 1983). Esto apoyaría el hecho de una capacidad infectiva de los micelios de hongos VA presentes en el suelo. Con este punto, se plantea de nuevo el problema de conocer el papel real que las vesículas extrarradicales juegan en el suelo. Si éstas evolucionan hacia la formación de nuevas esporas, o si gracias a sus sustancias de reserva son capaces de soportar un cierto crecimiento independiente del hongo, es algo que no ha sido probado todavía.

En este contexto, Warner y Mosse (1980) y Hayman (1982a) sugirieron que las partículas de materia orgánica del suelo podrían ser el punto de anclaje y substrato de mantenimiento para la conservación de la supervivencia y actividad de los hongos VA en el suelo, en ausencia de planta. De hecho, estudios "in vitro" en un intento de cultivar hongos VA en ausencia de planta (Hepper, 1979 y 1983, Hepper y Jakobsen, 1983) han demostrado la capacidad asimiladora de las hifas de hongos VA. Recientemente, St. John et al. (1983) aportan evidencias experimentales que apoyan el papel de las partículas de materia orgánica en la estimulación del crecimiento y ramificación de las hifas de los hongos VA en el suelo. Estos autores no detectan la existencia de una orientación de las hifas hacia la partícula de materia orgánica, pero sí ponen de manifiesto la estimulación del desarrollo de las hifas que llegan a contactar con tales partículas. Aunque no está claro si la partícula de materia orgánica suministra fuentes de energía o nutrientes, al menos, sí que proporciona al hongo un nicho fisiológico y ecológico para desarrollarse.

Es evidente, por tanto, una diversidad de inóculo de MVA en los suelos, en cuanto a tipo, número, tamaño, edad y capacidad de respuesta a las condiciones que afectan su viabilidad y poder infectivo. Por ello, y como consecuencia de lo expuesto hasta ahora, se puede decir que si se

pretende comparar la mayor o menor "especificidad" de varios hongos VA para un sistema suelo-planta concreto, podrían obtenerse resultados erróneos si no se suministran inóculos equivalentes de cada hongo, en lo que respecta al número, tamaño, edad, y tipo de propágulos aportados. En términos absolutos se puede concluir que, dada la variedad de tipos de inóculo VA, decir que se están aportando inóculos completamente equivalentes de dos hongos, incluso pertenecientes a la misma especie, es prácticamente imposible. Sin embargo, sí que se pueden obtener inóculos suficientemente comparables para decidir, a grandes rasgos, una mayor o menor "especificidad" de un hongo en un sistema suelo-planta. En este sentido la aplicación de la técnica del Número Más Probable de propágulos (Porter, 1979; Powell, 1980), podría ser usada para definir más objetivamente el potencial infectivo real de un inóculo.

b. Crecimiento del hongo hacia la raíz y "estimulación rizosférica". Los estudios de Powell (1976) pusieron de manifiesto que ni la germinación de esporas ni la dirección inicial de las hifas son influenciadas por la presencia de las raíces de una planta hospedadora. Los tubos de germinación no son atraídos por la raíz hasta que, erráticamente, llegan a la rizosfera; e incluso, a veces, raíz e hifa se cruzan ignorándose. Esta misma situación la en-

cuentran Mosse y Hepper, (1975) cuando intentan provocar micorrizas en cultivos de órganos de raíz. En contraste con estas observaciones, Koske (1982) detectó la producción de una sustancia volátil, por parte de la raíz, que atrae los tubos de germinación aéreos de Gigaspora gigantea.

Un hecho hasta cierto punto generalizable es la existencia de una estimulación de las hifas, especialmente en el caso de las procedentes de esporas en germinación, cuando llegan a la rizosfera. Esto se visualiza por la formación de una "estructura de preinfección" (Powell, 1976) consistente en una especie de abanico de hifas cortas y gruesas, que se tabican rápidamente si no consiguen infectar a la raíz, aunque normalmente, alguna lograr contactar con ella dando lugar a un primer punto de entrada del hongo. Así mismo, Powell (1976) encontró que si la hifa que llega a la rizosfera de una raíz susceptible, procede de otra raíz infectada, no se forma estructura de pre-infección, lo cual hace suponer que esa hifa crece con un apoyo nutritivo, o funcional, que le suministra la raíz de procedencia y no una simple espora. Este comportamiento diferente sugiere, de acuerdo con Mosse y Hepper (1975), que la estructura de preinfección podría tener la función de absorber nutrientes u hormonas de la rizosfera de la planta a infectar, con lo cual la hifa adquiere el vigor

necesario para penetrar la raíz. Sin embargo, se puede dar otra explicación a la estructura de pre-infección. Sencillamente podría tratarse de una forma de incrementar las posibilidades de contacto micelio-raíz.

Con respecto a las causas de estimulación de las hifas del hongo cuando llegan a la rizosfera de una planta sólo hacer mención de la influencia que en ello deben tener los exudados radicales (Ratnayake et al., 1978; Graham et al., 1981; Azcón y Ocampo, 1981). De cualquier manera, como el efecto de un incremento en la exudación radical sobre la fase de preinfección en MVA suele evaluarse por la estimulación en la formación de la micorriza, no queda claro si lo que se produce es una acción directa sobre el micelio del hongo, o si por el contrario, la clave es la alteración de la permeabilidad, y por tanto la penetrabilidad de las células de la raíz. Es posible que los microorganismos del suelo, activados en la rizosfera, jueguen un papel clave en la estimulación de los micelios VA. Este hecho es apoyado por los ensayos de Azcón-Aguilar y Barea (1983).

c. Unión de la hifa infectiva a la superficie de la raíz y penetración de ésta. Una vez que una hifa infectiva llega a la superficie de la raíz se forma un apresorio sobre las células de la epidermis (incluyendo los propios

pelos radicales). A partir de aquí pueden ocurrir dos tipos de situaciones: i) que se produzca una infección abortiva; y ii) que el contacto vaya seguido de una auténtica infección.

Se ignora si la penetración es mecánica ó si tiene lugar mediante un mecanismo enzimático. Lo cierto es que el hongo no penetra por heridas ni por lugares en los que la corteza de la raíz está rota por cualquier causa, incluso para la emergencia de una raíz lateral (Hayman, 1983). Esto indica que se necesita un "sitio" fisiológicamente funcional para la penetración. De otro lado, se conoce que una vez producido el primer "punto de entrada", la raíz se vuelve más propensa a la formación de nuevos "puntos de infección" (Mosse y Hepper, 1975). Este hecho puede deberse a que se haya producido algún cambio fisiológico o bioquímico en la raíz o a que el hongo haya adquirido un vigor conferido por la planta tras el primer contacto íntimo.

El número de puntos de entrada por la longitud de raíz es muy variable, y se han descrito hasta 20 por mm de raíz (Rhodes y Gerdemann, 1980).

d. Progresión de la infección en la raíz. Con respecto al posterior desarrollo de la micorriza se sabe, que el hongo que ha penetrado en, o entre, las células epidér-

micas coloniza la corteza de la raíz mediante hifas distributivas que se ramifican inter e intracelularmente. La distancia que recorre el hongo en el interior de la raíz a partir de un punto de entrada es lo que se denomina unidad de infección. Suele oscilar entre 0.5 y varios cm y puede verse afectada por la "especificidad" hongo-raíz, es decir, por la receptibilidad de un huésped a un determinado hongo VA. El hecho de que las unidades de infección sean relativamente pequeñas hace que, salvo en micorrizas muy bien establecidas, la infección VA no ofrezca un aspecto continuo.

A los pocos días de iniciada la infección, y por división dicotómica repetida de hifas intracelulares se forman los arbúsculos. La función de éstos es el intercambio biotrófico bidireccional de nutrientes. Los arbúsculos tienen una vida media de 4 a 14 días, y cuando degeneran la célula recupera su actividad normal, e incluso es susceptible de amparar a un nuevo arbúsculo. Cuando el desarrollo de las hifas internas está establecido se forman las vesículas que, como ya se ha indicado, tienen función de almacenamiento de reservas (lipídicas).

e. Crecimiento del micelio externo en el suelo que circunda la raíz. Simultáneamente al desarrollo intraradical del hongo, las hifas de penetración se ramifican

externamente y dan lugar a una red tridimensional de micelio, sobre la que se forman las esporas de resistencia. Estas son ricas en material lipídico y se acepta que constituyen el final, y principio, del "ciclo de vida" de estos hongos. En ciertas especies las esporas se encuentran agrupadas en esporocarpos.

También sobre el micelio externo se forman vesículas, a veces aisladas, y a veces agrupadas a modo de racimo, cuya función no se conoce con exactitud.

De acuerdo con Bowen (1981a) la mayor o menor extensión del micelio externo, hecho clave en la respuesta de la planta a su micorriza, depende de la especie de hongo, aunque varía también con la especie de planta y otros factores condicionantes propios del tipo de suelo y del ambiente.

Los cálculos de Tisdall y Oades (1979) indican que 1 cm de raíz micorrizada puede tener hasta 134 cm de hifas externas, y en el suelo adyacente a unas raíces micorrizadas se cuantificaron 55 m de hifas por g de suelo. Estos datos dan una idea cuantitativa del desarrollo del micelio extrarradical en MVA.

La figura 1 ilustra los hechos que se acaban de describir.

Hay que añadir finalmente que la cuantificación de

Formas de propágulos

Activación de propágulos

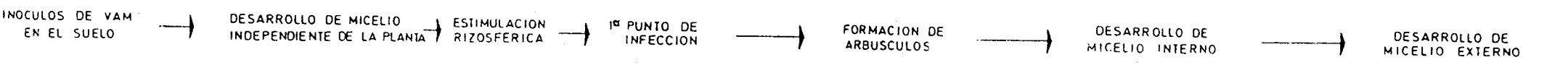
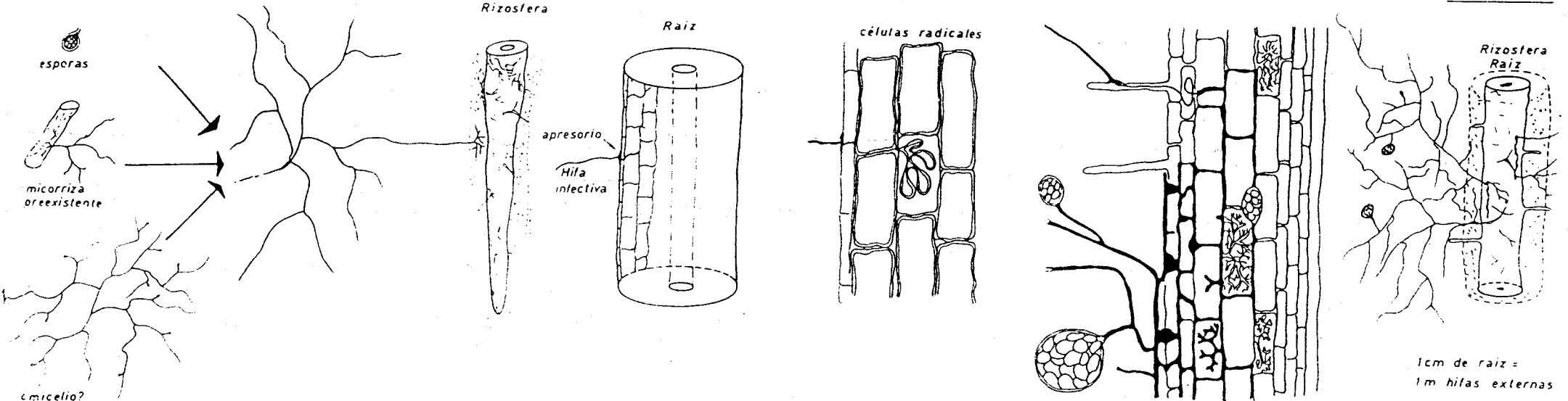
Contacto hifa-rizosfera

Contacto hifa-raíz

Penetración intracelular

Consolidación de la MVA

MVA operativa



FORMACION DE MICORRIZAS VA

FIGURA 1

la extensión de una MVA por los métodos normales de tinción (Phillips y Hayman, 1970) puede dar una información errónea en cuanto a que no es operativo todo el micelio que se detecta. En este sentido, se han propuesto técnicas para evaluar la proporción de micelio activo en un momento determinado del desarrollo de una MVA; entre ellas merecen referirse las que usan trazadores isotópicos (Ali, 1969) o técnicas citoquímicas (MacDonald y Lewis, 1978).

FISIOLOGIA DE LAS MVA

El estudio de los procesos fisiológicos en MVA es un tema de investigación que ocupa actualmente la atención de numerosos investigadores y, aunque restan muchas facetas por esclarecer, en los últimos años, se ha logrado un considerable avance en el conocimiento de los mecanismos responsables de los efectos de las micorrizas sobre el crecimiento y nutrición vegetal, así como sobre los aspectos nutritivos del hongo y coste energético de la simbiosis. Los trabajos sobre el tema han sido revisados en diversas publicaciones recientes (Mosse, 1978; Tinker, 1980; Smith, 1980; Rhodes y Gerdemann, 1980; Gianinazzi-Pearson

y Gianinazzi, 1981; Harley y Smith, 1983; Hayman, 1983; Barea y Azcón-Aguilar, 1983), por esta razón sólo los puntos principales van a ser tratados resumidamente en el presente estudio.

Las interacciones entre hongo, planta huésped y medio ambiente quedan reflejadas en la Figura 2, en la que se representa una modificación formal del modelo cualitativo de Smith (1980) que recoge la información relativa al flujo de nutrientes y su regulación en MVA. Aunque esta Figura explica por sí misma estos procesos, se ha considerado oportuno profundizar algo más en el conocimiento de estos aspectos de la fisiología y modo de acción de esta simbiosis. Para ello se sistematiza la información disponible de la forma que sigue:

a. Efectos de las micorrizas sobre el crecimiento de las plantas. Hoy día está fuera de duda que las micorrizas, en la mayoría de los casos, estimulan el crecimiento vegetal, y que esto ocurre merced a su efecto beneficioso sobre la nutrición mineral de la planta. Tal aseveración se ha corroborado utilizando trazadores isotópicos. La respuesta de la planta que más frecuentemente se ha descrito, y que universalmente es aceptada como principal responsable del "efecto micorriza" es el incremento de la concentración y/o contenido en P de los tejidos vege-

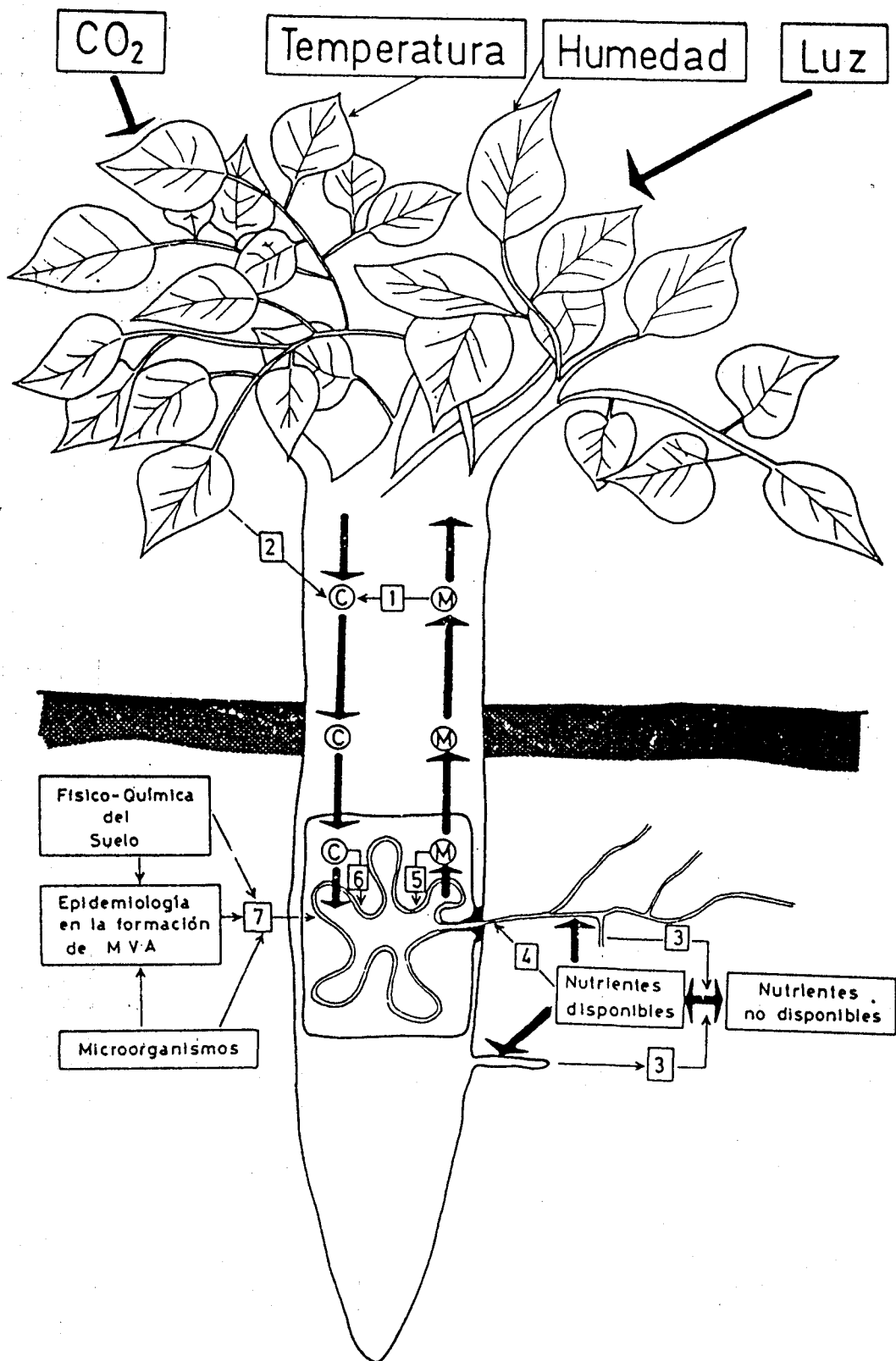


FIGURA 2

Fisiología de las interacciones hongo-planta en micorrizas VA según el modelo cualitativo de Smith (1980). C = flujo de carbohidratos; M = flujo de nutrientes minerales. En la figura se resalta el hecho real de considerar al arbusculo, albergado en una célula de la raíz, como la sede de los intercambios nutritivos. Los números encuadrados corresponden a los procesos reguladores del flujo de materiales. 1 = Regulación por parte de los nutrientes minerales de la distribución de fotosintato entre parte aérea y raíz. 2 = Efecto de factores relacionados con la fotosíntesis sobre la bajada de C a la raíz. 3 = Efecto de hifas de la micorriza y raíces sobre la disponibilidad de nutrientes en el suelo. 4 = Efecto del nivel de nutrientes solubles del suelo sobre la formación de la micorriza. 5 = Efecto del nivel de nutrientes en la raíz sobre el desarrollo de la micorriza. 6 = Efecto del nivel de carbohidratos en la raíz sobre el desarrollo de la micorriza. 7 = Control de la epidemiología de la infección por las características biológicas y físico-químicas del medio.

tales. No obstante, también se han encontrado incrementos en el contenido y concentración de otros nutrientes en la planta; en unos casos esto puede deberse a un efecto directo de la micorriza aunque en otros puede ser una consecuencia de que, merced a que la planta resuelve su demanda de P, vía micorriza, alcanza un equilibrio nutritivo más adecuado, por lo que las propias raíces resultan capacitadas para captar mejor otros nutrientes. Así mismo, la micorrización puede ocasionar otros efectos estimuladores basados en mecanismos no mediados por el aporte directo de nutrientes, como se comentará más adelante.

Las MVA no sólo incrementan la biomasa vegetal sino que también influyen en la proporción en la cual ésta se distribuye entre parte aérea y raíz. La estimulación de la captación de nutrientes y la subsiguiente translocación de estos a la parte aérea ocasiona que se transfieran a la raíz relativamente menos productos de la fotosíntesis, y una mayor proporción de estos sea retenida en la parte aérea y utilizada en la producción de materia verde. Como consecuencia, la relación "peso seco de parte aérea: peso seco de raíz" es, normalmente, más alta en plantas micorrizadas (Smith, 1980). Este hecho reviste un interés apreciable desde el punto de vista bioenergético ya que representa un ahorro de transferencia de fotosintato a la parte heterotrófica (consumidora) del sistema, en beneficio de un incremento de biomasa autotrófica.

En algunos casos se han descrito efectos negativos de las micorrizas sobre el crecimiento de la planta (Smith, 1980; Bowen, 1981b; Buwalda y Goh, 1982). Sin embargo, en la mayoría de estas situaciones, la depresión del crecimiento es "transitoria", probablemente debido a la competición entre planta y hongo por fotosintato en los estadios iniciales de la infección, cuando el hongo consume sin aportar aún beneficios, o bien cuando las condiciones para la fotosíntesis son sub-óptimas en cuanto a intensidad o calidad lumínica, temperatura, etc.

Las depresiones "persistentes" del crecimiento pueden tener lugar cuando se provocan concentraciones supraóptimas de P en los tejidos vegetales, o bien cuando la oferta de P del medio es tal que la planta se satura sin necesidad del hongo, por lo cual el mantenimiento de éste es un gasto superfluo, o sea, que el micosimbionte se está comportando como un auténtico parásito. Este y otros matices del "costo de la simbiosis" se discuten en el punto -e- de este apartado, en el que se tratará la nutrición carbonada en MVA.

b. Efecto de las MVA sobre la nutrición fosforada de las plantas. El primer hecho a reseñar se refiere a la fuente de fósforo para una MVA. Teniendo en cuenta que entre el 95-99 % del P de un suelo no es disponible para la planta

(Bieleski, 1973), se pensó en la posibilidad de que el P extra que las plantas micorrizadas captan procediera de una solubilización de estos fosfatos no asimilables. Es más, la mayor utilización por parte de las MVA de fuentes difícilmente solubles de P, como el fosfato de roca, confirmaba esta hipótesis. Sin embargo, los ensayos de marcado isotópico con P^{32} del suelo (revisados por Hayman, 1983) han puesto de manifiesto que, tal como hacen las propias raíces, las micorrizas toman el P de la fracción soluble (disponible) del suelo.

La explicación de la aparente "solubilización" de P por MVA puede ser que las hifas externas del hongo proporcionan a la planta más posibilidades de contacto con superficies de "partículas" insolubles de fosfato que las simples raíces, por lo que hay muchas más posibilidades de que en los distintos microhábitats donde química, o bioquímica, se está disociando P, para mantener el nivel de P soluble en el microhábitats, el nutriente pueda ser captado por la micorriza.

En el proceso de "Transporte de fosfato" desde la solución del suelo a la planta se distinguen tres fases de actuación de las MVA: (i) Captación de fosfato por el micelio externo, (ii) Translocación del fosfato desde el micelio externo al interno y (iii) Transferencia de fosfato desde el hongo a las células de la planta hospedadora. Es-

tas se discuten a continuación.

(i) Captación de fosfato en MVA. Como es sabido, el ritmo de captación de un nutriente por raíces o micorrizas depende del ritmo de llegada del mismo a la superficie de absorción, lo cual depende, a su vez, de la movilidad del ión y de su concentración en la solución del suelo. Estos hechos tienen un especial significado en el caso de la nutrición fosforada de una planta (Chapin, 1980). Es conocido que los iones fosfato están en la solución del suelo en concentración muy baja. Aproximadamente, en un suelo "standard", esta concentración es de 0.03 mg P/L en la solución del suelo, lo que equivale a 10^{-6} M, (Hayman, 1983). Además, estos iones, que se mueven en la solución edáfica mediante difusión, tienen un desplazamiento muy lento, ya que tienden a ser retenidos a lo largo de su recorrido, bien por adsorción a diversos tipos de superficies o bien por precipitación con Ca, Fe ó Al, según el pH del suelo (Bielecki, 1973). Una vez que el fosfato llega a la rizosfera, las raíces lo captan a una velocidad superior a la cual el ión se desplaza por la solución edáfica hacia dicha zona, por ello se forman unas zonas de deficiencia en P alrededor de las raíces que suelen tener entre 1 y 2 mm de anchura. Las hifas de la micorriza son capaces, sin embargo, de crecer y ramificarse más allá de dicha zona de de-

ficiencia, llegando hasta distancias de incluso varios cm de la raíz. Por tanto, las MVA actúan en gran medida por un mecanismo meramente físico, proporcionando a la raíz un incremento en el número de sitios de absorción de P, que a su vez están mejor distribuidos, por lo que exploran un volumen de suelo superior al que una raíz, por sí misma, puede utilizar. Adicionalmente, el ión fosfato que ha sido captado por una hifa queda protegido de su re-fijación por los componentes del suelo.

De otro lado, existen otros mecanismos de tipo fisiológico en el funcionamiento de las MVA. En efecto, los estudios de Cress et al., (1979) demostraron que la "constante aparente" de Michaelis (Km) en la reacción de captación de fosfato por una "superficie viva" es más baja en raíces micorrizadas, lo que sugiere una mayor afinidad de las hifas por el ión. Esto puede justificar el hecho de que el "umbral mínimo" (concentración mínima de fosfato en un suelo a la cual una planta es capaz de captar el nutriente) es más baja para las raíces micorrizadas, las cuales son capaces de tomar P en suelos con incluso menos de 3 mg/kg de P extraíble con $\text{CO}_3\text{H Na}$ (Hayman, 1983).

Según este último autor, y como mecanismos de tipo fisiológico en la acción de las MVA, se puede añadir que, de un lado, una raíz es funcional durante más tiempo cuando está micorrizada, y de otro, que ciertas plántulas cuan-

do no están micorrizadas sufren detenciones en su crecimiento y se tornan durmientes, aunque contengan una elevada proporción de fosfato; estas sólo reinician el crecimiento si se les micorriza.

(ii) Translocación de P en MVA. Existe apoyo experimental suficiente como para asegurar que el P se transloca hacia las estructuras intrarradicales del hongo como gránulos de polifosfato que son impulsados a través del lumen de las hifas por corrientes citoplásmicas hacia los arbusculos, aunque también parece contribuir el flujo masivo (Cooper y Tinker, 1981). El P circula hacia el interior de la raíz unas 1000 veces más rápido por las hifas externas que por difusión a través de la solución del suelo (Bielecki, 1973).

En la formación de los gránulos de polifosfato parecen intervenir polifosfatoquinasas específicas situadas en las hifas externas (Capaccio y Callow, 1982), mientras que en la degradación de tales gránulos el papel fundamental lo desempeñan fosfatasa, fundamentalmente alcalinas, específicas de las micorrizas VA y que han sido descritas en varios trabajos que revisan Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi (1981). Estas están situadas en las vacuolas, principalmente de los arbusculos, con un máximo en su actividad en la fase en que la formación de estos es máxima. Como es obvio suponer, el aumento en la concentración del producto de la

acción de estas enzimas, el fosfato, las inhibe, lo cual puede estimarse como un mecanismo de autorregulación en MVA.

(iii) Transferencia de fosfato. Se acepta comúnmente que el principal sitio de transferencia de fosfato desde el hongo a las células radicales es el arbúsculo (ver Cox et al., 1980). La Figura 3 ilustra esquemáticamente tal observación. El proceso se basa en un mecanismo activo de transferencia a través de membranas vivas. Esta idea se refuerza por la observación de Marx et al., (1982) que encuentra que la actividad ATP-ásica unida a plasmalemas se redistribuye en células que contienen un arbúsculo, situándose, y concentrándose, alrededor de estos sistemas de doble plasmalema (hongo-raíz) que son los arbúsculos. La Figura 4 representa la idea antes apuntada. Esto nos indica la localización preferencial en esas zonas de mecanismos enzimáticos activos, que requieren activación de mecanismos proporcionadores de energía, como es el sistema ATP-asa.

Entre 4 y 14 días después de la formación de los arbúsculos, estos degeneran, quedando su contenido disperso en la célula huésped. Aunque en un principio se pensó que este era el mecanismo fundamental de transferencia de fosfato del hongo al huésped, hoy día se reconoce que su colaboración a la transferencia de P es bastante escasa.

ESQUEMA DE UN "ARBUSCULO"

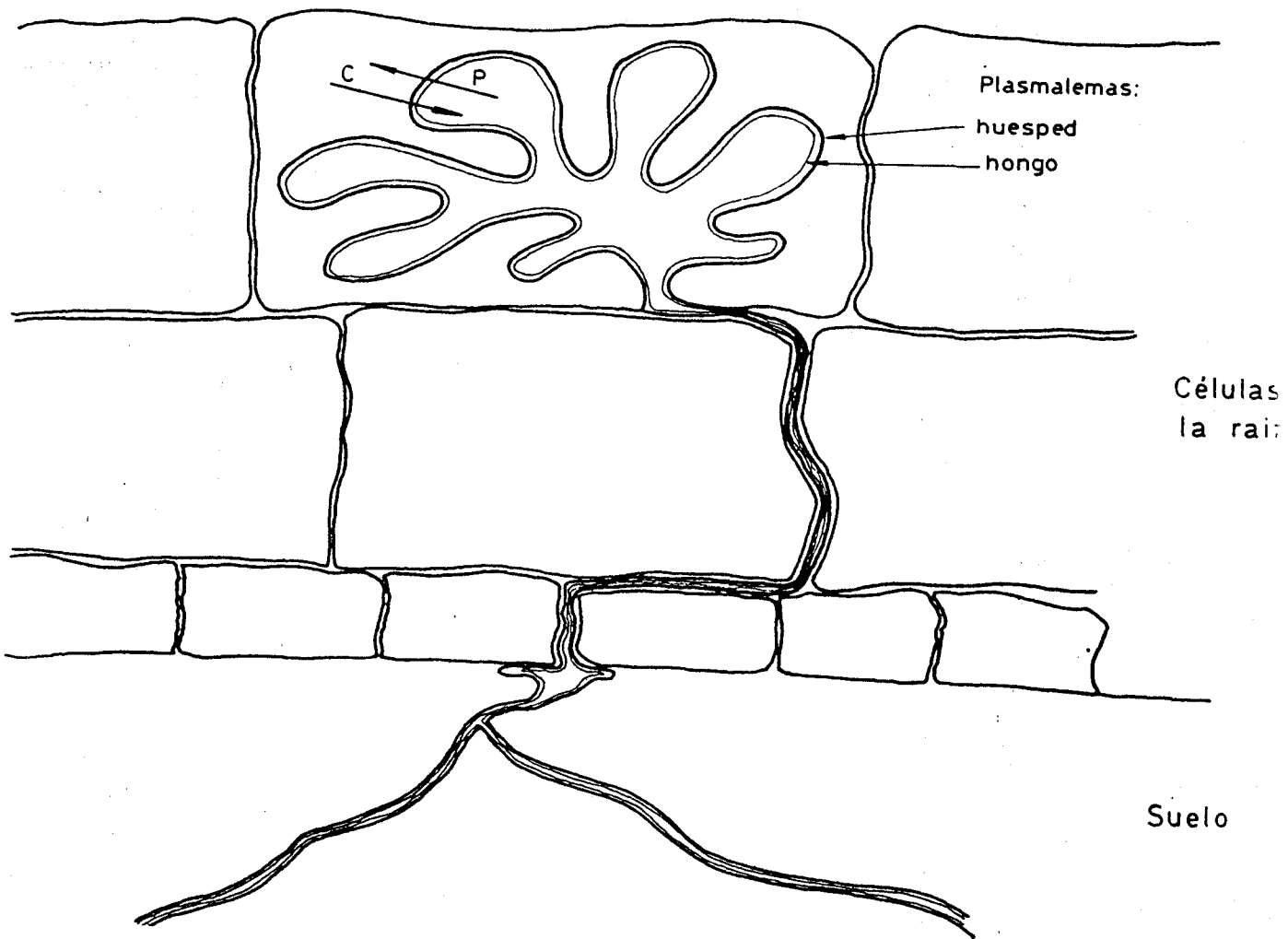


FIGURA 3

TRANSFERENCIA DE P

(mecanismo activo en arbusculos)

Redistribucion ATPasa en VAM
(Marx et al. 1982)

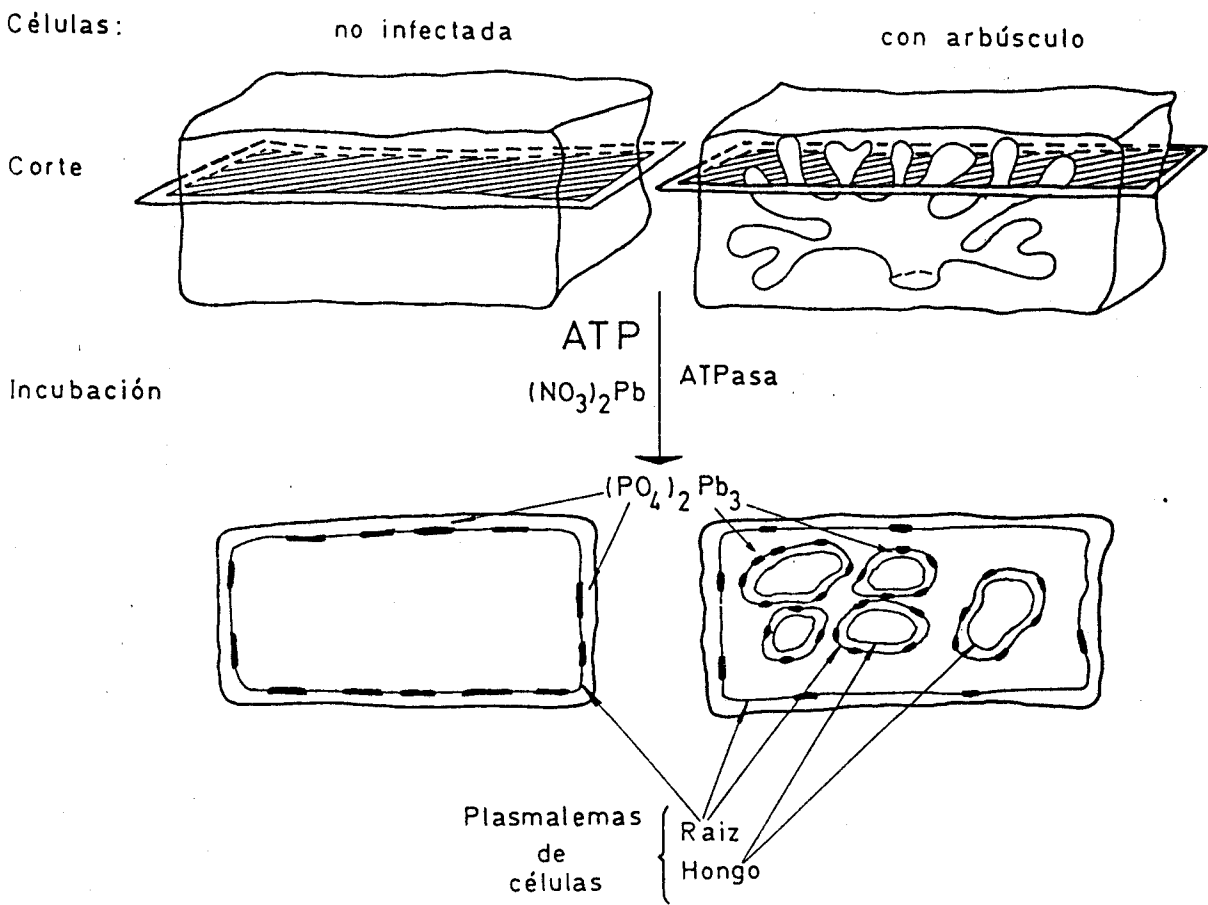


FIGURA 4

Por último, no se puede excluir la posibilidad de transferencia a través de las hifas intercelulares. Sin embargo, aunque se acepta que esto puede ser importante en micorrizas no formadoras de arbusculos, en las MVA que nos ocupan, la importancia relativa de este mecanismo es muy secundaria.

c. Absorción de otros nutrientes por MVA. Es obvio que cuando se trata de nutrientes que circulan con facilidad hacia la rizosfera, como es el caso del nitrato y sulfato, para los que no se suelen crear zonas de deficiencia alrededor de las raíces, la contribución extra de las hifas de la micorriza a la captación de estos nutrientes es bastante limitada. Sin embargo, es de esperar una participación de la simbiosis en el aporte a la planta de iones que, como el fosfato, difunde más lentamente en la solución del suelo. Tal es el caso del amonio, cuya captación por las hifas de la micorriza es actualmente objeto de estudio, utilizando sales de amonio marcadas con N^{15} . Con respecto a los micronutrientes, se ha descrito el efecto de la micorriza en la estimulación de la captación de algunos de ellos, aunque los resultados son a veces contradictorios. En el caso del Zn y Cu, sí se poseen evidencias más consistentes de un incremento de su captación por MVA (Rhodes y Gedermann, 1980).

El papel de las micorrizas en la captación de agua, o bien en el incremento de la resistencia de las plantas a la sequía, es un tema que se debate actualmente. En este sentido, los resultados de Peña y Sánchez-Díaz (1983) sugieren un efecto adicional de las micorrizas, en condiciones de estrés hídrico, al mero aporte de fosfato, el cual, a su vez, adquiere especial relevancia cuando la movilidad del ión se dificulta aún más, en condiciones de escasa humedad (Nelsen y Safir, 1982).

d. Efecto de las MVA no mediados por el aporte de nutrientes. Se han sugerido varios mecanismos por los que las MVA pueden afectar el crecimiento de la planta por acción no directa sobre la nutrición de esta. Así tenemos: a) Aquellos debidos a la producción de fitohormonas. En efecto, en plantas micorrizadas se han detectado niveles superiores de hormonas vegetales, tales como giberelinas y citoquininas (Allen et al., 1980 y 1982) y algunas respuestas a las micorrizas, como adelanto en la floración, han sido atribuidas a variaciones en el balance hormonal de dichas plantas. De hecho, se ha demostrado la capacidad de producir estas sustancias por determinados hongos VA en cultivo axénico (Barea y Azcón-Aguilar, 1982); b) los inducidos mediante una acción de mejora de estructura del suelo a través de la formación y estabilización de agregados por

las hifas del hongo (Forster y Nicolson, 1981; Koske y Halvorson, 1981); c) los ejercicios a través de una protección de la planta del ataque de patógenos. En el caso de enfermedades que afectan al sistema radicular, las micorrizas pueden actuar bien protegiendo a la raíz frente al patógeno o bien compensando el daño causado. En cualquier caso, esta protección puede ser debida simplemente a la mejor nutrición de la planta (Schenck y Kellan, 1978; Schönbeck, 1979 y Graham y Menge, 1982). Todas estas observaciones o hipótesis necesitan confirmación experimental en cuanto a evaluar su contribución real al efecto micorriza sobre la fisiología de la planta.

e. Nutrición carbonada en MVA. Los carbohidratos que el hongo VA, heterótrofo, necesita para subsistir y operar los obtiene mediante una transferencia biotrófica de productos del fotosintato, especialmente sacarosa, que tiene lugar en el arbusculo. Hace tiempo que se dispone de evidencia experimental sobre ello deducida de ensayos con $^{14}\text{CO}_2$ (Ho y Trappe, 1973). Al contrario de lo que ocurre normalmente en hongos, el de la micorriza VA no acumula manitol ni trehalosa (Hayman, 1974). En estas micorrizas el material de reserva se acumula en forma de lípidos. Se puede decir que casi la mitad en peso del micelio corresponden a material lipídico (Cooper y Lösel, 1978).

Es un punto bastante discutido si las MVA representan un drenaje de fotosintato considerable (Bowen, 1981b). Parece ser que el hongo se comporta como un parásito sólo cuando se trata de suelos muy fértiles, o cuando son muy infectivos, y poco efectivos (escaso micelio externo, y extensivo micelio interno, por ejemplo). De otro lado, Kucey y Paul (1982) en ensayos con Vicia faba ponen de manifiesto que el consumo de C, que obviamente ocurre, está compensado por la estimulación de la fotosíntesis en plantas micorrizadas.

FACTORES QUE AFECTAN LA FORMACION Y FUNCION DE LAS MVA.

Es obvio que las condiciones de base para que se forme una MVA son la presencia de una planta susceptible (la mayoría de las especies lo son) y la existencia de propágulos infectivos en el medio (los cuales están virtualmente en todos los suelos); por ello, en líneas generales, se puede decir que la formación de la MVA está teóricamente asegurada. No obstante las propiedades de "infectividad" en la simbiosis resultante van a ser moduladas considerablemente por varios factores: (a) El grado de dependencia de la planta a las micorrizas; (b) la "especificidad" de los hongos presentes para la planta en cuestión, (c) la

efectividad de dichos hongos y (d) las condiciones físico-químicas y biológicas del medio.

Los factores (a) y (b) serán tratados en otro apartado, por ello se comentan directamente los dos restantes.

Efectividad de hongos VA.

Aunque en algunos casos existe una correlación positiva entre extensión intrarradical de la infección VA y respuesta de la planta, esto no puede considerarse una norma general. Efectivamente, tal correlación tiene lugar en el caso de asociaciones planta-hongo VA escasamente compatibles, en las cuales tanto el grado de infección como la respuesta producida son bajas, o cuando las diferencias en la extensión de la infección son debidas a la existencia de factores limitantes del poder infectivo del hongo VA, como por ejemplo, las escasez de propágulos (Smith et al., 1979); pero en general, los endofitos más infectivos no tienen por qué ser más efectivos. Es de hacer notar que el grado de infección que puede alcanzar una planta va a estar determinado por sus propias características fisiológicas y genéticas. Así por ejemplo, es importante el ritmo de crecimiento de la raíz, ya que si este es mayor que el propio del hongo en la corteza de aquella siempre habrá raíces no colonizadas. Teniendo en cuenta que, incluso en plantas muy dependientes, las raíces principales no son

muy receptivas a la infección, esta nunca alcanza valores del 100 %, y en cualquier caso, cada planta posee su nivel máximo de micorrización que no puede ser sobrepasado en condiciones normales de crecimiento activo.

De otro lado, y puesto que las hifas extrarradicales van a ser las encargadas de captar nutrientes del suelo y translocarlos a la planta, su número, tamaño y distribución van a ser factores claves en la operatividad de las MVA. En este sentido, se ha intentado correlacionar cantidad de micelio externo con la eficacia simbiótica, encontrándose en muchos casos que tal correlación existe (Bowen, 1981a Graham et al., 1982). Es de gran importancia también el ritmo al cual el hongo coloniza la raíz. Debido a que hay plantas de crecimiento muy rápido que desde los primeros estadios de su desarrollo tienen una alta demanda de P, es fundamental que la simbiosis se establezca y comience a funcionar rápidamente.

En resumen, se puede decir que las características que definen la eficacia de un hongo son, de acuerdo con Abbott y Robson (1981), aquellas relacionadas con la estimulación de la captación de nutrientes y con la persistencia de sus efectos, es decir: La capacidad de formar un micelio extenso y bien distribuido en el suelo, así como de formar infecciones extensivas en las nuevas raíces.

ces que se vayan formando; la eficacia para absorber fosfato de la solución del suelo y el tiempo que las hifas permanecen efectivas en el transporte de nutrientes hacia la planta. Adicionalmente habría que considerar la mayor o menor capacidad de intercambio nutritivo con la planta, mediante una abundante formación de arbusculos, así como la mínima alteración del metabolismo del hospedador, lo que implica también un bajo consumo de los productos carbonados de la planta por el hongo.

Fertilidad del suelo y MVA. Tanto la fertilidad natural de un suelo como los tratamientos con fertilizantes y otras prácticas agronómicas, se sabe que afectan la formación y desarrollo de las MVA.

La información disponible al respecto, revisada recientemente por Abbott y Robson (1982), Hayman (1982b) y Barea y Azcón-Aguilar (1983), indica que la formación de MVA suele afectarse negativamente por la aplicación excesiva de fertilizantes químicos fosforados y nitrogenados. Esta circunstancia, aunque generalizable, no es suficiente para que se pueda predecir respuesta de los propágulos de MVA existentes en el suelo a una adición puntual de fertilizantes. Ello se debe a que la aplicación reiterada de tales productos, o sea, la llamada "historia de la fertilización de un suelo", condiciona la selección de

hongos adaptados a la formación de la micorriza en suelos fértiles o fertilizados. En este punto, conviene recordar que no existe paralelismo en cuanto al grado de infectividad de los hongos VA y efectividad de la micorriza formada y que, precisamente, esto se manifiesta especialmente en el caso de hongos adaptados a sobrevivir e infectar en suelos con condiciones que, teóricamente, no son las adecuadas para que se forme la micorriza, como es el caso provocado por una excesiva aplicación de fertilizantes.

El efecto de la cantidad de fosfato asimilable, ya sea propio o adicionado, de un suelo sobre la formación de la micorriza ha sido un tema bastante estudiado dado su interés práctico. La adición de cantidades bajas de P es compatible, e incluso complementaria, con las MVA en la estimulación del crecimiento de la planta, pero al incrementar la dosis se comienza a interferir la formación de la simbiosis, llegándose incluso a la inhibición (Mosse, 1973). La conclusión general es que el nivel de fosfato en la planta, más que el del suelo, es el que controla el establecimiento y función de las micorrizas.

Con respecto a los mecanismos en que se basa la interferencia por P de la formación u operatividad de las MVA se han propuesto los siguientes:

(i) De acuerdo con Ratnayake et al. (1978), la aplicación de P soluble provoca un descenso en la exudación

radical y en la formación de la MVA. Estos autores, que establecen una relación causa-efecto entre exudación y formación de MVA, explican su observación sobre la base de la participación del P en la constitución de las membranas celulares, lo cual hace que al ser estas fisiológicamente más correctas, se ejerza un control efectivo de la permeabilidad celular y, como consecuencia, de la exudación radical, lo cual repercute en la formación de la micorriza.

(ii) Este mecanismo se basa en el hecho de que al aumentar la concentración de fosfato en las células radicales, se inhiben las fosfatasas específicas de la MVA encargadas de degradar los gránulos de polifosfato en el interior del arbúsculo, paso previo a la transferencia de iones fosfato desde el hongo a la planta (Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1981). Por ello, es lógico aceptar, de acuerdo con estos autores, una regulación por fosfato de la transferencia de P, y consecuentemente de la actividad típica de esta simbiosis.

(iii) Los trabajos de Jasper et al. (1979) y Same et al. (1983) ponen de manifiesto que cuanto más alta es la concentración de P en una planta más bajo es el contenido en carbohidratos solubles de la raíz y sus exudados, y como consecuencia de ello, apuntan estos autores, es más baja la frecuencia de puntos de entrada del hongo VA en la raíz. El mecanismo que explicaría la hipótesis apuntada

en este apartado (iii) es diferente del sugerido en el (i), mediado por las membranas, y se basa en el efecto regulador que ejerce el P en la parte aérea de la planta sobre el descenso de fotosintato a la raíz (o micorriza) (Smith, 1980). Hay evidencias de que factores que reducen la tasa de fotosíntesis, tales como la disminución de la intensidad luminosa (Furlan y Fortin, 1977; Hayman, 1977) o defoliación (Daft y El-Giahmi, 1978) afectan negativamente la formación de micorrizas, lo que apoya el hecho de que los carbohidratos solubles de la planta, y más concretamente de la raíz, deben jugar un papel importante en el establecimiento de la simbiosis.

Los estudios realizados sobre la acción directa (no mediada por la planta) de los fertilizantes sobre el desarrollo preinfectivo del hongo y la formación de micorrizas, han puesto de manifiesto que ni la germinación ni el posterior desarrollo de las hifas se ven afectados por la concentración de P del medio lo que hace suponer que la inhibición de la micorrización es producida fundamentalmente a través de la planta.

El efecto de los fitofármacos adicionados al suelo en las prácticas agronómicas actuales (herbicidas, nematocidas, insectocidas, etc.) sobre la formación y efectos de las MVA, es un tema vigente objeto de estudio y debate. Los resultados, contradictorios a veces, no permiten ex-

traer conclusiones generales (Hayman, 1982b), y solamente los fungicidas, como era lógico esperar se pueden considerar realmente perjudiciales para las micorrizas (Safir, 1980).

Finalmente, hay que hacer notar que las diferentes especies de hongos VA muestran distintos grados de resistencia a la aplicación de fertilizantes y productos fitosanitarios, lo cual tiene consecuencias de interés práctico en relación con la selección de hongos VA "específicos" para una planta en un suelo que ha recibido dichos aportes (Hayman, 1982b).

Otros factores del suelo que influyen en el desarrollo de la micorriza son la temperatura y la humedad. Con respecto a la primera, se ha puesto de manifiesto que el porcentaje de infección aumenta al incrementarse esta hasta alcanzar un máximo a los 30° C (Schenck y Schroeder, 1974; Harley y Smith, 1983). A partir de esta temperatura la infección decrece, y por encima de 40° C se inhibe por completo. También por encima de 40° C se produce una inhibición completa de la germinación de las esporas de ciertos hongos VA (Tommerup y Kidby, 1980), por lo que la falta de infección a estas temperaturas puede ser debida a la ausencia de germinación de las esporas y desarrollo de otros propágulos. Con respecto a la humedad se sabe que el óptimo para que se desarrolle la micorriza coincide con

el óptimo para la planta.

APLICACIONES PRACTICAS DE LAS MVA.

Una vez establecida la importancia de las MVA en la nutrición de las plantas, es lógico que la atención de los investigadores se centrara en el estudio de las posibilidades de manipular la simbiosis con vistas a la explotación de su potencial en la práctica agrícola.

El punto básico en este tipo de estudios es conocer cual es el potencial real en micorrizas de un suelo. Si este es suficiente, el objetivo entonces será preservarlo mediante las prácticas agrícolas adecuadas. En caso de que tal potencial natural sea insuficiente, hay que tratar de reforzarlo, y en ocasiones de sustituirlo, por medio de la inoculación con micosimbiontes adecuadamente seleccionados.

El esquema a seguir para abordar en la práctica una investigación de este tipo se expone a continuación, utilizando como base la información recogida en las revisiones de Abbott y Robson (1982), Hayman (1982a) y Barea y Azcón-Aguilar (1983). Los puntos más importantes a tener en cuenta son los siguientes: (1) Factores que van a de-

terminar la conveniencia de llevar a cabo una inoculación con MVA en una situación determinada; (2) criterios de selección de hongos VA para ser usados como inoculantes; (3) preparación de inóculos y (4) técnicas de inoculación.

1. Factores que determinan la conveniencia de llevar a cabo una inoculación con MVA.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente sobre los factores que afectan la formación y efecto de las MVA, se puede considerar que son cuatro los factores primarios implicados: (a) el grado de dependencia de la planta a las MVA; (b) el nivel de fertilidad del suelo y (c) el tamaño y eficacia de las poblaciones naturales de hongos VA. Es de hacer notar que como en el capítulo anterior se ha discutido la incidencia de algunos de estos factores en la formación de las MVA, se trata ahora únicamente de matizar su influencia en la decisión de introducir los hongos VA en un sistema suelo-planta determinado, y de como deben tenerse en cuenta tales factores para garantizar el éxito de la inoculación.

(a) La especie vegetal. Resulta evidente que la respuesta de una planta a la inoculación va a estar condicionada por su grado de dependencia a las MVA, por lo que se hace necesario su conocimiento, así como el de los endofitos más adecuados para formar la simbiosis en el sistema planta-

suelo en cuestión.

(b) Nivel de fertilidad del suelo. Es conocido que las respuestas a las MVA tienden a ser mayores en suelos deficitarios en P asimilable, por lo que es de gran importancia determinar la concentración de fósforo soluble en el suelo de prueba. En suelos neutros y neutro-alcalinos se recomienda emplear el método de Olsen et al. (1954) por ser el que mejor correlaciona con la respuesta de la planta a la micorriza (Mattingly, 1980), permitiendo así obtener una idea aproximada de los efectos que se producirán como consecuencia de la inoculación de los hongos VA.

Teniendo en cuenta, de otro lado, que en algunas ocasiones para obtener una cosecha máxima se requiere usar combinadamente fertilizantes fosforados junto con MVA, es necesario un estudio previo de la dosis a emplear para que no se produzca una inhibición de la formación o funcionamiento de la micorriza. Una práctica recomendable en este sentido es la elaboración de curvas de respuesta a dosis crecientes de P en plantas micorrizadas y no-micorrizadas. De un lado permite seleccionar la combinación P soluble-MVA que produce cosecha máxima en las condiciones experimentales concretas y de otro, proporciona información sobre el grado de dependencia relativa a las micorrizas de una planta. Conviene hacer referencia en este punto al efecto de la adición de fuentes de fósforo de baja solu-

bilidad, especialmente fosfatos naturales, y su interacción con las MVA. Se sabe que en suelos de pH inferior a 6.5, en los que ocurre una liberación, más o menos lenta, de iones fosfato, las MVA estimulan la capacidad de las plantas para utilizar estas formas de P. En suelos neutros y neutro-alcalinos, tal actividad es más problemática, aunque se ha apuntado una hipotética colaboración de MVA y "bacterias solubilizadoras de fosfatos", especialmente si el contenido en Ca^{++} intercambiable en dichos suelos es bajo (ver Barea et al., 1983), para referencias y discusión de estos conceptos).

(c) Tamaño y efectividad de poblaciones nativas de hongos VA. Este factor es absolutamente clave para decidir la necesidad de inocular en una combinación suelo-planta en la que potencialmente cabe esperar respuesta positiva a las micorrizas. En principio, hay que partir de la base teórica de la omnipresencia de propágulos VA pero, evidentemente, esto no es así en la práctica. Por circunstancias debidas fundamentalmente a la manipulación de los ecosistemas (fertilización y otras prácticas de cultivo), la realidad es diferente y así, en la literatura científica al respecto, se han descrito diversas situaciones en lo referente a la presencia y actividad de las poblaciones indígenas de hongos VA. Estas son las siguientes:

(i) Incidencia baja (ó nula) de propágulos. En este

caso, es recomendable la inoculación.

(ii) Propágulos abundantes pero poco infectivos. También es recomendable la inoculación.

(iii) Hongos nativos muy infectivos pero poco efectivos. En principio, lo lógico es eliminarlos para evitar competencia en la raíz por sitios de colonización. Si esta práctica no es factible la inoculación debe efectuarse con hongos VA seleccionados por su competitividad en cuanto a rapidez de infección, además de por su eficacia.

iv) Hongos nativos infectivos y efectivos pero que se encuentran en escaso número. En este caso lo lógico es aislar estos endofitos, reproducirlos en condiciones controladas y utilizarlos a ellos mismos como inóculo, reforzando así el potencial natural del suelo.

v) Presencia de hongos nativos que producen una rápida, extensiva y efectiva micorriza. Sólo es recomendable preservar esa riqueza ecológica.

Un hecho que se deduce de lo anterior es que no sólo es necesario estimar el número de propágulos infectivos, sino también, y prioritariamente, su efectividad.

2) Selección de hongos VA como inoculantes.

Las características fundamentales que debe poseer un hongo VA para ser utilizado como inoculante son las siguientes (Bowen, 1981a, Abbott y Robson, 1982):

i) Infectividad. Esta propiedad viene dada por la capacidad del hongo para producir rápidamente infecciones bajo un amplio margen de condiciones, especialmente en compatibilidad con ciertas dosis de P soluble.

ii) Efectividad. El hongo debe ser eficaz en la captación, translocación y transferencia de nutrientes desde el suelo a la planta. Esto debe ser compatible igualmente con las condiciones físicas, químicas y microbiológicas del medio. Un funcionamiento correcto en colaboración con un nivel adecuado de P, es crítico para obtener una cosecha máxima. También desde el punto de vista de la efectividad es importante que el desarrollo intrarradical sea "equilibrado" en el sentido de que no suponga un excesivo sumidero de fotosintato y el crecimiento del micelio externo extensivo y bien distribuido, colonizando un gran volumen de suelo.

iii) Capacidad de colonización y dispersión del inóculo. Es conveniente que el inoculante tenga una capacidad reproductiva elevada, sus propágulos germinen con facilidad y sus hifas crezcan y se extiendan abundantemente en el suelo. De esta forma aumentan las posibilidades de contacto entre el hongo y distintas raíces del suelo, facilitándose así la colonización de nuevas raíces y la dispersión del inóculo.

iv) Supervivencia del inóculo y persistencia de sus

efectos . Esta característica, que enlaza con la anterior, está asociada con la capacidad de producir estructuras (esporas, esporocarpos, vesículas intrarradicales, etc...) que le confiera resistencia a una amplia gama de condiciones ambientales adversas, con lo cual se asegura el mantenimiento del inóculo sin necesidad de tener que practicar reinoculaciones en el inicio de cada periodo de crecimiento.

En cuanto a la selección de hongos, lo lógico y recomendable es que cualquier método debe efectuarse en suelos no estériles y en condiciones lo más similares posible a las naturales. Ello permite investigar simultaneamente las interacciones con micorrizas indígenas y establecer así la necesidad o nó de inocular en cada situación concreta.

3) Preparación de inóculos.

La preparación de un inóculo masivo de alta calidad y libre de patógenos es un factor que actualmente limita la inoculación de MVA a escala agrícola, dado el carácter de simbiontes obligados de estos hongos. Los inóculos que ahora se utilizan responden a los siguientes tipos:

i) Rizosfera de plantas que han sido previamente micorrizadas en condiciones controladas con propágulos de una sola especie de hongo ("stock" de inóculo). Los esquemas de Menge y Johnson (1978) y Gianinazzi et al. (1981) son modelos recomendables para obtener tales inoculantes.

Estos consisten en una mezcla de raíces micorrizadas y suelo adherido en el que existe micelio, esporas maduras, etc. Es lo que suele denominarse normalmente como "inóculo bruto".

ii) "Micorriza limpia", es decir raíces bien infectadas exentas de suelo, obtenidas normalmente en cultivo hidropónico. Tiene la ventaja de ser un material bastante más limpio que el anterior, con lo cual el riesgo de introducir contaminantes disminuye. Además, es menos pesado y por tanto más manejable. La técnica del "Nutrient Film Culture" está siendo investigada no sólo en lo concerniente a la obtención del inóculo en sí mismo, sino también en cuanto a la viabilidad y retención de la infectividad con el tiempo (Elmes y Mosse, 1980; Howeler et al., 1981). En este sentido, Tommerup y Abbott (1981) han puesto de manifiesto que fragmentos de raíces infectadas con ciertos hongos VA, y desprovistos de esporas de resistencia, mantienen el poder infectivo hasta al menos seis meses después de haberse producido la muerte de las raíces.

iii) Estructuras del hongo, fundamentalmente esporas. Este inóculo es el propuesto por Daniels y Menge (1981) para Glomus epigaeus, dada la capacidad de esporulación tan extraordinaria de esta especie y la facilidad de recolección de las esporas producidas. Efectivamente, este hongo forma en la superficie del suelo esporocarpos observa-

bles a simple vista, que contienen miles de esporas. Este material, sin embargo, no resulta práctico, por el momento, para otras especies.

4) Técnicas de inoculación.

De acuerdo con Hayman (1982a) las más usadas son las siguientes:

i) Transplante de plántulas preinoculadas. Este método es de gran utilidad para los cultivos que emplean el transplante como técnica agronómica habitual y permite una micorrización controlada antes de exponer las raíces al contacto con endofitos de efectividad dudosa presentes en el suelo de cultivo definitivo. El sistema presenta la ventaja de un ahorro considerable de inóculo, ya que este va a ser aplicado a una superficie pequeña que puede ser desinfectada previamente. Cuando se procede al transplante, la micorriza que se pretende introducir suele estar bien establecida. Aparte de las ventajas ya descritas que proporciona una adecuada micorrización, hay que añadir en este caso una mayor resistencia a los riesgos del transplante. Obviamente esta técnica no es factible en los sistemas agrícolas que normalmente no utilizan fase de vivero.

ii) Incorporación del inóculo directamente al surco, bajo las semillas. Este procedimiento se ha practicado utilizando inóculo bruto, lo cual tiene el inconveniente de

que se trata de un material bastante pesado (se calcula que se necesitarían 2 ó 3 ton/ha) lo que hace que el método sea impracticable en una dimensión agronómica.

iii) Aplicación directamente al surco de siembra de una especie de pasta fluida obtenida a partir de un inóculo concentrado que se suspende, junto con las semillas, en un medio viscoso tal como la metil celulosa. Su factibilidad en agricultura es también limitada.

iv) Aplicación, como en el caso anterior, de gránulos ("pellets") de inóculo que llevan adsorvidos en su superficie las semillas. Esta técnica que ha mostrado resultados esperanzadores, utiliza un material portador obtenido mediante una mezcla de lignito, turba o suelo estabilizado con arcilla y un suelo muy infectivo procedente de un "stock" de micorrizas. Con este material, a humedad adecuada, se obtienen unos gránulos de 1 cm de diámetro, aproximadamente, sobre los que se adhieren las semillas. Es obvio que también tiene dificultades para su uso extensivo.

Finalmente, conviene reseñar que las técnicas actuales de micropropagación y propagación vegetativa de plantas podrían, y en algunos casos se ha conseguido, ser conectadas con las de micorrización "in vitro", con el fin de obtener plántulas adecuadamente micorrizadas en las condiciones controladas que preconizan tales metodologías.

De lo dicho anteriormente se deduce que, salvo en el caso de cultivos que utilicen el transplante, la aplicación de las micorrizas a escala agrícola está limitada por la obtención masiva de inóculos adecuados. Mientras se consiguen tales inóculos se están usando los ahora disponibles para establecer una serie de bases científicas, tanto ecológicas como fisiológicas, de la micorrización controlada. Los ensayos utilizan consecuentemente parcelas piloto, y, aún aceptando sus limitaciones, la información que se obtiene está permitiendo progresar en este orden de conocimientos.

Hoy día son ya numerosos los ensayos practicados en condiciones de campo. En unos casos se usaron suelos previamente desinfectados; en otros, los ensayos se efectuaron en suelos no tratados, o sea, en condiciones normales de cultivo. Como plantas de prueba se han utilizado cítricos, frutales de hueso, cereales y leguminosas entre otras y los resultados en muchos casos han sido satisfactorios. En las revisiones de Hayman (1982a); Plenchette (1982) y Barea y Azcón-Aguilar (1983), se recogen referencias bibliográficas y resultados de los distintos ensayos efectuados, y a ellas se remite al lector interesado en estos aspectos, ya que resultaría prolijo e innecesario transcribirlos en el presente.

En el contexto de este apartado de aspectos prácticos de las MVA, merece dedicar una especial atención al significado de las MVA en el caso concreto de las plantas noduladas fijadoras de nitrógeno, es decir leguminosas y angiospermas formadoras de actinorrizas.

Como es conocido, estas especies vegetales son prácticamente independientes de la aplicación de fertilizantes nitrogenados, ya que son capaces de fijar N_2 de la atmósfera merced a su simbiosis con Rhizobium, en el caso de las leguminosas, y con Frankia (actinomicetos) en las plantas formadoras de actinorrizas. Estas plantas, y en el caso concreto de las leguminosas se ha cuantificado experimentalmente, suelen poseer un grado de dependencia de las micorrizas relativamente elevado en virtud de su gran demanda de P, ya que, además del que precisan para su propio crecimiento, necesitan este nutriente para la formación y desarrollo del nódulo y especialmente para la fijación de N_2 (Azcón-Aguilar et al., 1983).

SIGNIFICADO DE LAS MVA EN ECOLOGIA VEGETAL.

El papel de las MVA en la evolución de las plantas sobre la corteza terrestre ha sido y continua siendo actualmente sumamente decisivo (Malloch et al., 1980). En efecto, las plantas micorrizadas poseen ventajas con res-

pecto a las que no lo son en diversas situaciones ecológicas marginales. Estas, en resumen, podemos enumerarlas como sigue:

- (a) Recuperación de suelos erosionados.
- (b) Programas de estabilización de dunas.
- (c) Revegetación en suelos provenientes de excavaciones (minas, canteras, construcciones....).
- (d) Colonización de suelos en regiones áridas y semiáridas.
- (e) Colonización de suelos derivados de cenizas volcánicas.
- (f) Crecimiento de plantas en ciertas situaciones de estrés (salinidad, pH bajo, temperatura alta en el suelo....).
- (g) Colonización de restos de turberas.
- (h) Establecimiento de pastizales en suelos marginales.

Como puede deducirse de lo anterior, y a manera de epílogo, se puede decir que las micorrizas VA ofrecen una contribución a lo que podría catalogarse como una alternativa para una agricultura que, marcada actualmente por unos costos elevados de fertilizantes químicos tradicionales, debe utilizar métodos biológicos para facilitar la conse-

cusión de los nutrientes que la planta necesita, a un menor coste ecológico y económico. Teniendo en cuenta la condición de "casi universalidad" de las MVA, así como las dificultades actuales para la práctica de la micorrización controlada, lo que exige un fuerte nivel de investigación para lograr progresar en esta faceta de la biotecnología del suelo, es de interés recordar la importancia que tiene el potencial natural de micorrizas de un suelo. En primer lugar, y mediante la investigación adecuada, se pueden predecir hasta que punto ciertas prácticas agrícolas no deben aplicarse para preservar dicho potencial; en segundo lugar, cuales de dichas prácticas pueden optimizar la acción de las MVA naturales y, finalmente, no olvidar que esas micorrizas propias de suelo siempre deben ser tenidas en cuenta cuando se haya de practicar la inoculación de hongos VA seleccionados de acuerdo con los criterios científicos antes discutidos.

B. DEPENDENCIA Y ESPECIFICIDAD EN MVA

Como se dijo anteriormente, la evolución conjunta de las plantas y hongos VA ha condicionado una serie de interdependencias de los componentes de las MVA. Estas van a ser consideradas en este capítulo.

DEPENDENCIA DE LOS HONGOS VA.

Los hongos VA no pueden completar su ciclo de vida más que en asociación con la planta, sin embargo, la germinación de esporas incluso cuando son esterilizadas en superficie, y en condiciones axénicas, ocurre con relativa facilidad en ausencia de suelo y de planta hospedadora con sólo proporcionarles unas condiciones físico-químicas adecuadas. Esto parece paradójico para un microorganismo simbiote obligado. Simplemente en agar-agua (1 %), a un pH próximo a la neutralidad y temperatura de unos 18-25°C se obtiene una germinación generalizada de las esporas.

Se sabe que la germinación se afecta por una serie de factores como son la especie o variedad del hongo (Daniels y Duff, 1978), la temperatura (Schenck et al., 1975), el pH (Green et al., 1976), presencia de metales pesados (Hepper y Smith, 1976), la concentración de Cl^- y Na^+ (Hirrel, 1981), etc. En cambio, la adición de nutrientes (incluso fosfato), que realmente tiene posterior influencia en el desarrollo del micelio (Daniels y Graham, 1976), parece ser menos crítica para la germinación en sí (Mosse y Hepper, 1975; Koske, 1981). En el caso de una germinación precaria en Glomus epigaeus (10 %), con pobre ramificación del micelio, Graham (1982) consigue estimular el proceso de germinación mediante la adición de exudados radicales. Para explicar este hecho quizás haya que cuestionarse, e

investigar, si lo que está operando y causando tal efecto es un factor o estímulo de tipo no nutritivo (hormonal por ejemplo), limitante de la germinación espontánea.

Los estudios llevados a cabo por Hepper (1979) sobre el efecto de inhibidores de la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos sobre la germinación de esporas y desarrollo del micelio en hongos VA ponen de manifiesto que la espora tiene almacenado ARN-m en el que está programada la síntesis de las proteínas necesarias para la germinación, aunque luego es necesaria, y así ocurre, la síntesis de nuevo ARN-m para el posterior desarrollo de las hifas. Así mismo, el tratamiento de las esporas con bromuro de etidio reveló la necesidad de que se forme nuevo material mitocondrial durante la germinación, hecho que se confirma mediante estudios al microscopio electrónico. En resumen, los estudios de Hepper (1979) indican que no existen limitaciones serias para que ocurra la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y otros eventos bioquímicos asociados durante la germinación y subsiguiente desarrollo del micelio. Abundando en ello, recientemente Beilby y Kidby (1982) estudian la cinética de incorporación de leucina y uracilo marcados (C^{14}) en esporas de Glomus caledonius y observan que la síntesis de ARN y proteínas ha comenzado a los 35 minutos de la inhibición de las esporas en agua. Es más, Beilby y Kidby (1982) confirman en dichos ensayos que el ciclo tri-

caboxílico, gluconeogénesis y las rutas biosintéticas de la mayoría de los aminoácidos están operando a los 35 minutos de inhibir las esporas.

Estos hechos evidencian que los hongos VA se comportan, en este sentido, como saprofitos más que como biotrofos obligados. Además, la capacidad biosintética de las grandes esporas de hongos VA es suficiente para lograr la formación de un micelio de dimensiones considerables. Sin embargo, el posterior desarrollo del cultivo no sigue las pautas clásicas en el crecimiento de hongos saprofitos tras la germinación de sus esporas, según las cuales, una vez consumidas las reservas de una espora, el tubo de germinación evoluciona para dar lugar a hifas capaces de asimilar nutrientes del medio y prescindir del aporte de la espora madre, ya agotado. En este punto es donde se marca la clave del problema que se discute. En efecto, aunque la adición de ciertos nutrientes al medio, tales como peptona, extracto de levadura (Hepper, 1979) o algunos aminoácidos, en concreto, cisteína, glicocola y lisina (Hepper y Jakobsen, 1983), estimulan el crecimiento de las hifas en hongos VA, el desarrollo del micelio "in vitro" sigue dependiendo de las reservas de la espora madre para prosperar. En este sentido, se sabe que si las hifas del hongo no encuentran una raíz susceptible de ser infectada, el crecimiento del micelio cesa antes incluso de que se agoten las

reservas de la espora, permaneciendo ésta viable y dispuesta para iniciar nuevamente el proceso de germinación cuando las condiciones vuelvan a ser favorables.

Aunque lo que acaba de exponerse es un hecho generalizado en los hongos VA, muy recientemente Hepper (1983) ha descrito por primera vez que las hifas de G. caledonius separadas de la espora madre continúan creciendo saprofiticamente, aunque de forma limitada. Este crecimiento es dependiente de la adición de nutrientes al medio. El micelio obtenido es metabólicamente activo, de acuerdo con la prueba que detecta succinato deshidrogenasa en el citoplasma del hongo (MacDonald y Lewis, 1978). La adición de diversos azúcares orgánicos no estimula el crecimiento de las hifas. Sin embargo, el propio contenido (lipídico) de las esporas sí muestra un efecto positivo sobre el desarrollo de este micelio, aunque no se aprecia atracción hacia el lugar donde se depositó dicho material en la placa (Hepper, 1983). Estos hechos ponen de manifiesto la estricta dependencia que tienen los hongos VA de las plantas superiores para completar su ciclo biológico.

DEPENDENCIA DE UNA PLANTA A LAS MICORRIZAS.

El concepto de dependencia se entiende como la necesidad que tiene una planta de estar micorrizada para producir un crecimiento óptimo. Teniendo presente la defini-

ción anterior, los vegetales superiores que van desde la independencia total, como en crucíferas y quenopodiáceas que no suelen formar nunca micorrizas, pasando por una extensa gama de tipos intermedios, hasta la dependencia absoluta en ciertas plantas incapaces de desarrollarse si no están micorrizadas, incluso en suelos de elevada fertilidad. Ciertamente la micotrofia en plantas es tan antigua como ellas mismas y hoy día sigue manifestándose, de forma más o menos intensa, en la mayoría de las especies vegetales (Nicolson, 1975; Pirozynski y Malloch, 1975).

Aunque la respuesta de una planta a las micorrizas puede verse afectada por diversos factores del medio ambiente, su dependencia para captar nutrientes del suelo, especialmente fósforo, y crecer adecuadamente, es una característica inherente de la propia planta. En efecto, las especies vegetales, e incluso variedades dentro de la misma especie (Azcón y Ocampo, 1981), difieren considerablemente en su capacidad para extraer fósforo del suelo, así como el nivel de demanda y requerimientos en dicho nutriente (Hayman, 1983). Precisamente las especies o variedades con más dificultad para captar fósforo de la solución edáfica, o con una demanda de P más alta, son las que se benefician más de las MVA, o dicho de otra forma, son las más dependientes de la simbiosis para prosperar.

Al hablar de dependencia de las MVA es obligado re-

ferirse a la hipótesis de Baylis, expresada en las diversas publicaciones de este autor, y condensada por él mismo (Baylis, 1975). Las observaciones de este investigador ponen de manifiesto que las especies del orden Magnoliales, las angiospermas más primitivas, ancestro de todas las di y monocotiledonas, son especialmente dependientes de las MVA para captar nutrientes, es decir, son sumamente micotróficas. Baylis describe las raíces de estas especies como muy poco ramificadas, en ellas las divisiones más pequeñas raramente son menores de 0.5 mm de diámetro. Las llama raíces de tipo "magnoloide" se encuentran también en plantas pertenecientes a órdenes diferentes. Estas raíces carecen de pelos radicales o bien los tienen cortos y en escaso número y las plantas que las poseen dependen de la infección VA incluso en suelos muy fértiles.

En el extremo opuesto, Baylis sitúa las raíces de tipo "graminoide" que describe como muy ramificadas, con diámetros que usualmente son menores de 0.1 mm y frecuentemente cubiertas de largos pelos radicales. Las plantas con raíces de este tipo sólo responden a la inoculación con micorrizas en suelos deficientes en fosfato asimilables. Entre ambos extremos se encuentran la mayoría de las especies de Cormofitas, son las raíces de tipo "intermedio".

En resumen, la hipótesis de Baylis apunta que la morfología y geometría del sistema radical son factores cla-

ves que determinan el grado de micotrofia de una planta. En este sentido, y como apoyo a lo anteriormente dicho, hay que destacar el trabajo de St. John (1980) en el que se estudian 89 especies pertenecientes a 23 órdenes y concluye asociando micotrofia y raíces de tipo "magnoloide". Sin embargo, existen excepciones a esta hipótesis, habiéndose encontrado plantas con raíces de tipo graminoide fuertemente dependientes de las MVA (Hayman, 1983), por lo que, aún aceptándola en líneas generales, hay que pensar en la existencia de otros factores de tipo fisiológico o anatómico, que influyen en la mayor o menor dependencia de una determinada planta a las MVA.

Teniendo en cuenta que el fósforo es el principal elemento implicado en la efectividad y desarrollo de las micorrizas, la capacidad de la planta para captar este elemento es el factor que fundamentalmente contribuye a la dependencia de las plantas a las MVA. Por esta razón, Gerdemann (1975) define la Dependencia a las Micorrizas (DM) como "el grado en el cual una planta depende de la condición de estar micorrizada para que produzca su crecimiento máximo a un nivel dado de fertilidad del suelo".

Se han propuesto varios índices para expresar numéricamente la DM de una planta y poder establecer comparaciones entre plantas bajo un mismo conjunto de condiciones ambientales. Concretamente, Menge et al. (1978) y (1982)

proponen expresar la DM de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$DM = \frac{\text{Peso seco de planta micorrizada (Ps M)}}{\text{Peso seco de planta no micorrizada (Ps no M)}} \times 100$$

Mediante esta fórmula, plantas absolutamente independientes poseen un grado de DM del 100 %, habiéndose descrito valores de incluso hasta un 13.000 % (Hall, 1975). Además, este índice tiene el inconveniente de que determina la DM en función de la respuesta a la inoculación en unas circunstancias concretas y a un nivel de fertilidad que no se indica, por lo que podrían obtenerse valores muy distintos para la misma planta con tan solo variar la cantidad de P soluble en el suelo en el que se lleva a cabo el ensayo.

Plenchette et al. (1983) aplican una fórmula más lógica que sitúa la DM entre 0 (independencia de la micorriza) y 100 (dependencia absoluta):

$$DRM = \frac{(\text{Ps M}) - (\text{Ps no M})}{(\text{Ps M})} \times 100$$

Siendo DRM = Dependencia relativa a las micorrizas.

Los autores sugieren que este índice debe llevar sobreescrito la cantidad de P soluble del suelo en el que

se ha determinado, por ejemplo, DRM²⁵ si se determina en un suelo que tiene 25 ppm de P soluble. Este índice que expresa realmente la respuesta de una planta a la micorriza a un nivel dado de fósforo, puede dar una idea bastante aproximada de la DM, aunque para que esta fuera más exacta sería conveniente conocer el nivel de P soluble en el suelo a partir del cual la planta no necesita estar micorrizada para producir un crecimiento óptimo e incluso si tal nivel no existe porque la dependencia de la planta sea tan absoluta que por muy elevada que fuese la fertilidad del suelo, la planta no alcanzaría un desarrollo adecuado a no ser que estuviera micorrizada.

Estos datos nos permitirían predecir las situaciones en las cuales una planta incrementaría su crecimiento como consecuencia de una adecuada micorrización, o si por el contrario sería por si misma capaz de captar sus nutrientes a un ritmo apropiado para permitir un crecimiento óptimo. Sin embargo, aunque lo que se ha indicado puede considerarse válido en condiciones generales, en circunstancias concretas se han encontrado evidencias que relacionan la DM con la captación de Mn, Zn, y en algunos casos Cu, por la planta. Por tanto, los índices anteriormente citados (DRM y nivel de P por encima del cual la planta se desarrolla óptimamente sin necesidad de estar micorrizada) deben considerarse orientativos, pero no de-

finitivos, cuando se pretende predecir una respuesta a la micorrización.

Otro factor incidente en la respuesta de una planta a la micorriza es la especie de hongo VA implicada, aunque esta característica es más lógico considerarla bajo aspectos de compatibilidad entre hongo VA y planta, de la cual va a depender la eficacia simbiótica de las distintas combinaciones entre hongo VA con una planta hospedadora común. Estos conceptos suelen ser tratados en la literatura científica bajo el epígrafe de "Especificidad en MVA" y como tal van a ser discutidos en este trabajo en el apartado que sigue.

ESPECIFICIDAD EN MVA.

Desde hace tiempo se sabe que las propiedades del suelo, fundamentalmente su pH, así como el nivel macro y micronutrientes asimilables ejercen una influencia selectiva sobre distintas especies de hongos VA (Mosse, 1973; Hayman, 1983). En efecto se ha demostrado que existe una cierta especificidad entre determinadas características de un suelo y las especies de hongos VA predominantes en él. Sin embargo, la cuestión hace tiempo planteada y discutida es la referente a la especificidad hongo-planta. En términos generales existe una falta de especificidad, considerada en el sentido estricto del término, entre especies de hon-

gos VA y plantas superiores. Teóricamente, cualquier hongo VA puede infectar a cualquier planta susceptible; sin embargo, sí que existen grandes diferencias entre los distintos endofitos tanto en la morfología de la infección y el grado de micorrización que producen, como en la efectividad de la MVA formada en una planta determinada. Numerosos trabajos experimentales apoyan estas observaciones (Mosse, 1972; Sanders et al., 1977; Schenck y Kinloch, 1980).

Sin embargo, una reflexión pragmática sobre el hecho de que endofitos de gran eficacia en asociación con ciertas plantas, sean de escasa o nula efectividad en otras, aconseja una reconsideración del tema. Debido a que no se puede utilizar el término especificidad si se quiere respetar el sentido estricto del mismo, quizá fuera más lógico hablar de "compatibilidad" en las distintas combinaciones de una planta con especies de hongos VA. Este mayor o menor grado de compatibilidad se manifiesta en la propia morfología de la micorriza. Así en algunos casos se observa que en aquellos puntos donde se ha producido la penetración del hongo se forman unas "unidades de infección" que se extienden con dificultad por la corteza de la raíz, mientras que otros endofitos producen una colonización rápida y completa de esta. Ello indica la existencia de diferentes niveles de compatibilidad tisular y celular.

También a nivel de efectos se va a expresar esta com-

patibilidad, de forma que cuando se inocula una determinada planta con diferentes hongos VA la respuesta producida a cada uno de ellos suele ser distinta, lo cual permite seleccionar aquellos más favorables o compatibles para la planta en cuestión.

De lo que antecede, se puede deducir la importancia de los fenómenos de compatibilidad en MVA, y el interés de profundizar en el estudio del tema, tanto en lo que se refiere a aspectos de índole fisiológico, para lograr justificar las bases científicas de la misma, como ecológicos, en cuanto al efecto de suelo y vegetación en la distribución de las distintas especies de hongos en el ecosistema. Finalmente, desde el punto de vista práctico, y en relación con la aplicación de las MVA en agricultura, el hecho de seleccionar el hongo VA "específico" para un sistema suelo-planta dado, es abosolutamente clave. Sobre este punto se incidirá más adelante.

C. MVA EN ARBOLES Y ARBUSTOS

En las diversas revisiones actualmente publicadas sobre MVA es usual citar el porcentaje de plantas superiores que son susceptibles de formar este tipo de micorrizas,

aceptándose como conclusión general que más del 90 % de ellas lo son, pues aparte de las familias Pinaceae, Betulaceae y Fagaceae en las que predominan las ectomicorrizas, sólo hay que exceptuar a especies de las familias Chenopodiaceae, Poligonaceae, Cruciferaeae, Cariophilaceae, Fumariaceae, y algunas otras de menos interés que normalmente no forman la simbiosis. Estas especies son en su mayoría herbáceas, y, el hecho de haberse descrito muy pocas plantas arbóreas no formadoras de micorrizas, hace suponer una gran incidencia de las MVA en arbóreas. En efecto todas las especies no herbáceas estudiadas están demostrando formar MVA. Además, en algunos géneros como Salix, Populus, Prunus, Acacia, Alnus, Eucaliptus, Casuarina, entre otros, existen especies que forman tanto endomicorrizas como ectomicorrizas (Trappe, 1977; Harley y Smith, 1983; Barea y Azcón-Aguilar, 1983).

El interés del estudio de las MVA en arbóreas se justifica, no sólo, por el alto número de especies que las poseen sino por el hecho de que, al ser estas plantas perennes, las raíces permanecen vivas en el suelo y constituyen una extraordinaria fuente de inóculo para otras plantas (Hayman, 1983), ya que son capaces de mantener un potencial de infección permanentemente elevado y activo en el suelo.

La mayoría de las plantas leñosas (St John, 1980) presentan raíces secundarias de tipo magnoloide (Baylis, 1975) que,

como se sabe, tienen extremos finales que usualmente sobrepasan los 0.5 mm de diámetro y que, además, poseen escaso número de pelos radicales. Estos vegetales son normalmente más dependientes de las micorrizas que los que tienen raíces de otros tipos. Por ello se puede concluir con Trappe y Fogel (1977) que, en general, mientras las plantas herbáceas necesitan las micorrizas para crecer mejor, las arbóreas las precisan para sobrevivir. Esta generalización es indicadora de la importancia que tienen las MVA en la ecofisiología de plantas arbóreas, cuya contribución resulta decisiva en aspectos tan esenciales como la conservación de suelos, la colonización de ambientes deteriorados por actividades humanas o de otra índole, el ciclado de los bioelementos en la Naturaleza, etc...

Un hecho evidente es que la gran mayoría de los efectos que los hongos VA ejercen sobre el crecimiento y nutrición de las plantas se conocen por estudios realizados en herbáceas, como se ha reflejado en páginas precedentes de este capítulo de Introducción. Sin duda, la escasez de estos estudios sobre MVA en plantas arbóreas se debe a las dificultades que presentan estas plantas para investigar sus micorrizas. Tales dificultades se plantean a distintos niveles, así:

(i) Mientras que el muestreo de raíces para cuantificar la infección en campo es relativamente fácil en herbáceas, en las cuales se puede tomar casi toda la masa radical, en arbóreas es prácticamente imposible. El propio hecho de en-

contrar las raíces secundarias tróficas es en sí problemático, ya que los muestreos han de efectuarse a varios metros del pie de la planta por lo cual hay que asegurarse de tomar raíces de la planta que se está estudiando. Por esto, en muchas ocasiones hay que profundizar en el suelo hasta una raíz gruesa que parte del árbol y tomar de ella directamente las raicillas. Teniendo en cuenta que el muestreo se debe repetir en la misma planta y además tomar raíces de varias zonas para que sea fiable, la variabilidad suele ser más elevada que en el caso de las herbáceas. Así Malloch y Malloch (1982) encuentran grandes diferencias en los valores de micorrización en plantas arbóreas de la misma especie que viven en idénticas condiciones ambientales. En ocasiones, se han descrito plantas arbóreas como no hospedadoras por el simple hecho de no haber aparecido la simbiosis en las raíces muestreadas; mientras que en otros estudios se daban esas mismas especies como micotróficas.

(ii) La obtención de plántulas para los ensayos de micorrización controlada no sólo es más complicada en sí, sino también más lenta. Mientras que un semillero de herbáceas produce plántulas en unos días, los semilleros de arbóreas requieren varias semanas, e incluso meses, en la mayoría de los casos. En ocasiones la obtención de plántulas es más factible, a pesar de sus dificultades, mediante multiplicación vegetativa en viveros que por semillero.

(iii) El lento crecimiento que presentan las arbóreas en relación con las plantas herbáceas, obliga a incrementar considerablemente el tiempo de duración de los ensayos. Este hecho incluso afecta más la variabilidad experimental que en plantas herbáceas, ya que al no ser nunca totalmente homogéneas las condiciones de todas las repeticiones dentro de un mismo tratamiento (cantidad y actividad del inóculo recibido, diferencias entre las propias plántulas, posición en el invernadero etc.) la falta de homogeneidad se acentúa durante el desarrollo de las plantas, aumentando sus efectos con el paso del tiempo. A esto se une la facilidad de controlar los ensayos de herbáceas en el invernadero y el manejo de menores cantidades de suelo en relación con las leñosas.

(iv) Por último, la tinción de las raíces de leñosas ofrece más dificultad así como su observación al microscopio.

Después de todo lo dicho anteriormente, es un hecho curioso constatar que las primeras citas de que se dispone sobre MVA en fanerógamas, corresponden a plantas arbóreas. De esta forma Jansen (1896) encuentra micorrizas endotróficas en plantas leñosas y el trabajo que marcó la pauta de los modernos estudios sobre micorrizas se realizó en manzano (Mosse, 1957).

Una vez introducido el tema de las MVA en plantas arbóreas se procede a continuación al estudio de su presencia y significación en diversos ecosistemas. Para ello, se ana-

liza la información disponible sistematizada con los siguientes apartados:

- (1) Las MVA en Silvicultura: Bosques de zonas templadas y de zonas tropicales.
- (2) Las MVA en plantas arbóreas utilizables en la lucha contra la erosión, desertización y recuperación de suelos.
- (3) Las MVA en cultivos de plantas arbóreas de interés alimenticio (frutales y otros), o industrial (productores de caucho, lubricantes etc.) u ornamental (jardines y parques).
- (4) Como apartado especial dentro de la horticultura: Las MVA en el cultivo de los cítricos.

LAS MVA EN SILVICULTURA

Desde los primeros estudios de Jansen (1896), numerosos autores han puesto de manifiesto la presencia de esta simbiosis en comunidades naturales de plantas que constituyen los bosques de regiones tropicales templadas o boreales (Johnston 1949; Readhead, 1968; Janos, 1980 a y b; St John, 1980; Malloch et al., 1980; Kormanick, et al 1981; Malloch y Malloch, 1982).

El interés de estos bosques tanto desde el punto de vista ecológico como económico es inusitado por lo que huelgan

comentarios adicionales. Lo que sí se debe destacar es el papel de las micorrizas en el establecimiento y desarrollo de dichas masas boscosas, basado en el efecto de estas simbiosis sobre el ciclado de nutrientes y agua en tales ecosistemas. Entre los diversos aspectos a destacar nos referimos a los concernientes con el significado de las micorrizas en los contextos ecológico y evolutivo de los bosques, lo cual emana de los fenómenos de dependencia y especificidad tratados con anterioridad en este trabajo, así como de las interacciones de las MVA con otros tipos de micorrizas y finalmente de los estudios conducentes a la obtención de plántulas con micorrización controlada en viveros.

La información disponible ha permitido concluir que las especies vegetales que usualmente constituyen el bosque suelen ser bastante dependientes de las micorrizas para lograr un desarrollo adecuado (Baylis, 1975; St John, 1980; Janos, 1980 a y b; Kormanick et al., 1981; Pope, et al., 1983). Es más, de acuerdo con Janos (1980b), gran parte de las plantas en las comunidades por él estudiadas eran micotróficas obligadas, siendo las MVA el tipo más habitual de micorrizas en sus estudios. Como ocurre en herbáceas, los hongos VA suelen ser muy poco específicos de una planta hospedadora determinada; sin embargo, cada especie vegetal parece compatibilizar más con determinadas especies de hongos, por ello, se suelen ir produciendo selecciones indirectas de los hongos VA

por parte de las plantas que integran el bosque (Janos, 1980b; Malloch et al., 1980). Por el contrario, en el caso de las micorrizas ectotróficas (MEC) en plantas de interés forestal, el hongo es frecuentemente más específico de uno o muy pocos tipos de plantas, mientras que cada especie vegetal acepta a infinidad de hongos EC (Malloch et al., 1980). Estos hechos tienen una considerable repercusión desde el punto de vista ecológico y evolutivo de los bosques en relación con las micorrizas.

En efecto, la literatura sobre el tema revisada por Malloch et al., (1980) muestra que las plantas que constituyeron las primeras asociaciones forestales sobre la corteza terrestre, lo cual tiene lugar a partir del periodo Cretáceo medio en adelante (Pirozynski y Malloch, 1975), ya poseían micorrizas, las cuales eran de tipo VA.

Teniendo en cuenta el relativamente bajo número de especies de hongos VA presentes en un ecosistema y las preferencias, en cuanto a una mayor compatibilidad, de cada especie vegetal implicada por un hongo VA concreto, los individuos de una especie arbórea, para no competir, tienden a aparecer considerablemente espaciados en el bosque. Por ello es por lo que la foresta endotrófica presenta una gran riqueza de especies vegetales, con los individuos pertenecientes a la misma especie relativamente alejados entre sí (Malloch et al., 1980). El bosque ectotrófico suele estar formado, en

cambio, por un número escaso de especies vegetales, que se asocian con multitud de hongos EC e incluso seleccionan sucesivamente a estos según la fase de su desarrollo (Bowen y Theodorou, 1973).

Los bosques tropicales suelen ser de tipo endotrófico (Meyer, 1973; Janos, 1980 a y b; Malloch et al., 1980), salvo cuando se desarrollan sobre suelos muy pobres, en los cuales parecen poseer ventajas, en cuanto a la rapidez para formar micorrizas, los hongos EC con respecto a los VA. Sin embargo, aunque los bosques endotróficos no son raros en zonas templadas de Norte América y Eurasia, perpetuando aquellos primitivos, hoy se acepta que las intensas sequías características del Plioceno medio en Norte América y las prolongadas y repetidas glaciaciones del Cenozoico tardío en Eurasia redujeron progresivamente la rica diversidad de los bosques mesofíticos endotróficos. A partir de ellos se originaron la mayoría de los bosques ectotróficos actualmente predominantes en las zonas templadas.

La explicación de esta ventaja ecológica de los hongos EC sobre los VA está en que los primeros son capaces de desarrollar actividades saprofíticas en el suelo, descomponiendo la materia orgánica, por lo que sobreviven en ausencia del árbol hospedador. Además, al tener la posibilidad de acumular más nutrientes en sus estructuras (manto, "cordones" de micelio y rizomorfos, se adaptan mejor que las VA a sue-

los relativamente ricos (Harley y Smith, 1983).

En este punto hay que hacer constar también que en el Cretaceo tardío se han datado asociaciones ectotróficas, mediante una evolución "directa" no mediada por la existencia de un bosque endotrófico previo (Malloch et al., 1980).

Desde el punto de vista evolutivo, como eslabón de conexión entre los primitivos habitats endotróficos y los más avanzados ectotróficos, es de destacar la existencia de plantas capaces de formar MVA y MEC. Este es el caso de Eucaliptus (Malajczuk et al., 1981). Estas plantas constituyen la especie predominante en los bosques de Australia en donde forma ecosistemas equilibrados con leguminosas, dotadas de MVA existentes en el sotobosque. Cuando se acumula materia orgánica (manto) en el bosque de Eucaliptus, las leguminosas quedan eliminadas y se favorece el desarrollo de MEC. El fuego, componente natural de los ecosistemas en Australia, hace comenzar un nuevo ciclo, ya que después de él empiezan a crecer leguminosa con MVA, y a rebrotar los Eucaliptus que comienzan a ser colonizados por hongos VA a partir de las raíces de las leguminosas (Malajczuk et al., 1981). Es de destacar, según los estudios de dichos autores, que cuando se ha intentado controlar la intensidad de los incendios, han comenzado a prosperar especies de Proteaceas, como Banksia spp., que como todas las plantas con raíces de tipo "proteoide" no forman micorrizas, ya que tienen su propio

sistema de captación y translocación de fosfato (Jeffrey, 1964). La presencia de estas plantas va en perjuicio de la estabilidad del bosque micotrófico de Eucaliptus que funciona mejor en asociación con leguminosas provistas de MVA.

Es muy probable que estos efectos de la eliminación de la materia orgánica, lo cual hace incrementar el contenido del suelo en P, Ca, K, Mg etc. (Grier y Cole, 1971), y permite que prosperen leguminosas y otras plantas herbáceas con MVA, justifique algunos resultados que indican un mejor crecimiento inicial y supervivencia de plántulas en reforestación tras eliminar la materia orgánica. Sin embargo, la literatura revisada por Parke et al., (1983) y las propias evidencias experimentales de estos autores indican la importancia de mantener la materia orgánica en las prácticas de reforestación, incluso con especies formadores de MVA. Concretamente encuentran que en esa capa de humus se mantenían propágulos VA, además de una serie de microorganismos, que con sus actividades en el ciclo de los nutrientes, o bien estimulando el crecimiento de las plantas o el proceso de micorrización, por mecanismos no mediados por nutrición, intervienen beneficiosamente en los primeros estadios del establecimiento de las plántulas.

En otro orden de cosas, Malajczuk et al. (1981), apuntan una asociación importante para la estabilidad ecológica de estos bosques templados endotróficos. Concretamente se re-

fieren a la asociación de Eucaliptus con leguminosas leñosas formadoras de MVA, especialmente Acacia spp. Realmente la importancia forestal de leguminosas formadoras de doble simbiosis: con Rhizobium sp. y hongos VA, resulta crítica en virtud de sus implicaciones simultáneas en los ciclos del P y del N. La coexistencia de nódulos fijadores de N_2 y endomicorrizas arbóreas se conoce desde hace un siglo (Jansen, 1896) y desde entonces se han llevado a cabo varios estudios que revisan Barea y Azcón-Aguilar (1983). Desde el punto de vista forestal merecen reseñarse algunos estudios que destacan la importancia de esta doble simbiosis entre ellos el de Moiroud et al. (1981) en el que se destaca, el uso de Robinia pseudo-acacia, el de Janos (1980a), que describe esta asociación en los bosques tropicales, el de Rose (1980) referido a plantas actinorrizas, en las que, como es sabido, el microsimbionte nodular es un actinomiceto y no Rhizobium. Estos estudios, además de sus connotaciones desde el punto de vista forestal, hacen también referencia a la importancia de las plantas noduladas y micorrizadas en las prácticas de revegetación en suelos marginales, pero de ello nos ocuparemos más adelante en un apartado especial.

Desde el punto de vista evolutivo en relación con las micorrizas en leguminosas arbóreas es de destacar que las plantas en las subfamilias Faboideae (antes Papilionoideae) y Mimosoideae usualmente están noduladas y tienen micorrizas

del tipo VA. En cambio las Caesalpinoideae, raramente forman nódulos y normalmente forman MEC. De acuerdo con Malloch et al., (1980), autores de estas observaciones, los nódulos y las MEC podrían ser considerados como medios alternativos para suministrar N a las plantas que, como se sabe, la capacidad de mineralizar N orgánico es bastante común en hongos EC.

De lo que antecede queda patente la importancia de las MVA en el ciclado de nutrientes en comunidades vegetales de interés forestal. consecuentemente, no es de extrañar que la atención de los investigadores se centrara sobre diversos aspectos prácticos en torno a la manipulación de esta simbiosis con la finalidad de que el estudio y uso de la misma formara parte de los programas de reforestación.

Como se indicó anteriormente, a pesar de que las cantidades de inóculos de MVA que por ahora pueden obtenerse no permiten su aplicación en una agricultura extensiva, si que son suficientes para su uso en superficies más reducidas. Por ello, hoy día es factible utilizar MVA en viveros de plantas lo cual es realista para aquellos cultivos que habitualmente contemplan la práctica agronómica del trasplante. Este suele ser el caso de las arbóreas en general, y el de las plantas de bosque en particular, y sobre ello se dispone de diversos trabajos experimentales.

En efecto, desde los trabajos pioneros de Clark (1963)

y (1969) con especies de interés en silvicultura destinados a demostrar la importancia de la micorrización para obtener plántulas con crecimiento adecuado, varios estudios han profundizado en este tema de trabajo (Gray y Gerdemann, 1967; Bryan y Kormanik, 1977; Kormanik et al., 1977a). Aunque los estudios sobre este tema suelen perseguir un fin práctico, son de destacar los aportes que han proporcionado al conocimiento de la fisiología de las micorrizas. En este contexto hay que mencionar los relacionados con el estudio del tipo de inóculo más compatible (Hall, 1976), los efectos sobre la concentración de nutrientes minerales (Schultz et al., 1979; Pope, P. E., 1980); la interacción de fertilizantes nitrogenados y MVA (Brown et al., 1981) o los fenómenos de especificidad y dependencia (Furlan, et al., 1983; Pope et al., 1983).

Como es lógico, las prácticas actuales de desinfección en viveros, que afectan negativamente la presencia y efecto de los propágulos de las MVA, ha llevado como consecuencia que la micorrización en viveros destinados a la reforestación comenzaran a extenderse cada vez más (Riffle, 1980; Kormanik et al., 1981), y es de suponer que lleguen a hacerse habituales.

En este sentido, y tal como puntualiza Janos (1980b) es igualmente de interés controlar la adición de fertilizantes en vivero para obtener una micorrización adecuada.

Este mismo autor resalta la importancia en silvicultura de obtener individuos fuertemente premicorrizados en vivo los cuales al ser trasplantados intercaladamente transmiten la infección a otros ejemplares preexistentes cuando se entrelacen las raíces.

LAS MVA EN PLANTAS ARBOREAS UTILIZADAS EN LA LUCHA CONTRA LA EROSION, DESERTIZACION Y RECUPERACION DE SUELOS.

La disminución de masas forestales y aumento de la desertización son dos procesos estrechamente relacionados. Así, se sabe que los bosques tropicales, por citar un ejemplo, han experimentado una reducción de su superficie de más del 50 % sólo en lo que va de siglo (Spears, 1980), y, en general, los datos disponibles correspondientes a otros ecosistemas forestales proporcionan una información parecida (Skujins, 1984). Estas situaciones, especialmente en regiones áridas y semiáridas, conllevan a una expansión de los desiertos (desertización) en lo cual es común que tenga lugar la intervención humana (desertificación). La eliminación de la cubierta vegetal conduce a la desestabilización de la superficie edáfica, que queda sometida a la erosión, mediante arrastre de materiales tras lluvias más o menos esporádicas o bien la ejercida por acción del viento (erosión eólica) que tiene como consecuencia la formación de

dunas (Skujins, 1984).

Como es sabido, las zonas áridas y semiáridas del Planeta, en las cuales habitan alrededor de un décimo de la población mundial, se encuentran mayoritariamente en dos grandes cinturones subtropicales: Uno en el hemisferio norte, que cubre el Sahara, Oriente Medio, sur de Asia y parte de América del Norte y otro en el hemisferio sur, que incluye tierras de Africa del Sur, Australia y las zonas secas de Perú, Chile, Argentina y Brasil (Anonimo, 1980).

Como se indicó anteriormente, la principal causa de la desertización es la explotación excesiva de estos medios a través de la eliminación de masas arbóreas con el fin de convertirlos en aptos para una agricultura sobre suelo arable, de obtener leña, madera o forraje para ganado. También el sobrepastoreo contribuye de forma importante a este proceso destructivo. Estos hechos dan lugar a que aparezcan los rasgos típicos que conforman la fisonomía de las zonas áridas y semiáridas que son: Bajo nivel de producción de alimentos, tanto para consumo humano como animal, baja disponibilidad de combustible vegetal y una fuerte disminución en la fertilidad del suelo.

Estas zonas áridas y semiáridas cubren aproximadamente cuatro décimas partes de la superficie terrestre, en donde el principal factor limitante es el agua, aunque algunos autores (Felker y Bandurski, 1979) señalan que en climas semi-

áridos la baja disponibilidad de nitrógeno, fósforo y materia orgánica del suelo son tan importantes como el factor humedad. Frecuentemente asociadas a las limitaciones anteriores se pueden presentar problemas de salinidad, temperaturas extremas y elevado pH en el suelo (Skujins, 1984). Hay que señalar también que las condiciones topográficas adversas limitan igualmente el cultivo en estas zonas. Precipitaciones irregulares y escasas, temperaturas fluctuantes en el día y la noche tanto en el suelo como en la atmósfera, y baja humedad relativa, son características comunes a las tierras áridas de clima cálido. Consecuentemente, estos ecosistemas tienen una marcada fragilidad por lo cual el ambiente físico puede ser deteriorado o destruido con cierta facilidad si se traspasa el umbral de tolerancia de los recursos humanos y animales.

En resumen, se puede decir que la productividad de las zonas áridas y semiáridas, comparada con áreas de abundante riego, representan respectivamente valores que van de menos del 1 hasta casi un 30 por ciento de la productividad de aquella (Fischer y Turner, 1978). Es obvio, por tanto, la necesidad de aumentar la productividad de estas zonas lo cual pasa por una planificación integrada para lograr la regeneración o establecimiento de una cubierta vegetal. En este sentido, tanto la teoría como la práctica han demostrado que en condiciones de aridez y semiaridez las plantas leñosas son las que

mejor uso hacen del suelo y del clima, y de paso además obtener de ellas madera, forraje, productos secundarios y, en algunos casos, alimentos para el hombre o el ganado (Ben Salem, 1980). Es de resaltar que una adecuada selección de las especies a utilizar, no sólo puede permitir una producción diversificada, sino también la obtención de un equilibrio ecológico. No obstante, no sólo por su participación directa en el propio establecimiento de las plantas, sino por su influencia en regeneración de materia orgánica, estabilización del suelo e influencia en diversas actividades, los microorganismos del suelo juegan un papel fundamental en los procesos de revegetación en ambientes xéricos (Skujins, 1984). Como se expresó anteriormente (final de parte A, de este capítulo de Introducción), las MVA tienen una importancia básica en los procesos de revegetación en ambientes deteriorados por diversas causas. Este hecho cobra especial interés en el caso de las arbóreas.

Los trabajos de Khan (1974) y Trappe (1981) describen la presencia de MVA en arbóreas crecidas en suelos áridos y semi-áridos y Skujins (1984) analiza este hecho no sólo, en cuanto a la ventaja en sí de la micorrización para la captación de agua y ciclado de nutrientes en estos suelos, sino también, en cuanto a ser estas plantas perennes reservorio de infectividad para las herbáceas anuales.

Cuando se inicia una recolonización de habitats severa-

mente degradados, parece ser que las especies no-micotróficas dominan la primera fase de la sucesión (Hall, 1978; Reeves et al. 1979; Janos, 1980 a,b). Después durante el lento proceso de sucesión característico de los habitats áridos, las especies micorrizadas reemplazan gradualmente a las no micotróficas cuando los hongos VA comienzan a desarrollarse. Hay que resaltar que bajo las altas temperaturas propias de los suelos áridos, las micorrizas desempeñan una función crítica para la captación de fosfato (Barrow et al., 1977).

Lo expresado para la recuperación de suelos en zonas desertizadas es igualmente aplicable a otros ambientes en los que dominan condiciones poco apropiadas para la implantación vegetal, como son los que se desarrollan sobre restos de turberas y minas (Daft y Hacskaylo, 1976), terrenos encharcados (Keeley, 1980) o habitat salinizados (Guttay, 1976).

Comentario especial merecen unas especies vegetales de importancia en colonización de suelos en zonas áridas: Los Atriplex sp.. Estas plantas, que pertenecen a las Quenopodiaceas, son una de las escasas excepciones dentro de esta familia no micotrófica, ya que sí forman MVA. El papel de estas en la nutrición de los Atriplex en sus habitats tan pobres, debe ser probablemente muy decisivo, aunque aun no disponemos de información bibliográfica al respecto.

En cualquier caso, lo importante es reseñar que las plantas arbóreas más indicadas para las prácticas de revegetación

en suelos degradados son los que poseen la capacidad de formar nódulos fijadores de N_2 por motivos repetidamente comentados a lo largo de esta Memoria. Como se sabe plantas susceptibles de formar MVA y nódulos son capaces de superar deficiencias en los dos nutrientes limitantes del crecimiento: N y P (Harley, 1973). En primer lugar tenemos el caso de las leguminosas arbóreas; concretamente, las especies de Robinia, Leucaena, Acacia y Prosopis, entre otras, las cuales son susceptibles de formar MVA (Barea y Azcón-Aguilar, 1983). son de gran interés en revegetación de suelos deteriorados o en la colonización de suelos marginales (Domingo, 1983; Dommergues, 1982; Felker, 1981; Felker y Bandurski, 1979; Herrera, 1984; Isely, 1982; Langkamp y Dalling, 1982; Lawrie, 1981; Monk et al., 1981; Roberts et al., 1983; Roskoski et al., (1982).

De otro lado, y en este contexto, tenemos las plantas actinorrizas, y concretamente especies de los géneros Alnus, Myrica, Purshia, Datisca, Casuarina, Eleagnus, Hyppophae, Ceanothus, Colletia, Robus, Discaria, Comptonia, Dryas y Coriaria poseen, además de actinorrizas, MVA (Trappe, 1979; Rose, 1980; Barea y Azcón-Aguilar, 1983). El trabajo experimental de Rose (1980) puede considerarle como modelo en cuanto al estudio del significado de estas plantas y su doble simbiosis en relación con los aspectos aquí tratados sobre revegetación y colonización de suelos en las diversas situaciones de estrés referidas a lo largo de estas últimas páginas.

LAS MVA EN PLANTAS ARBOREAS CULTIVADAS POR SU INTERES ALI-
MENTICIO, INDUSTRIAL U ORNAMENTAL.

Los estudios sobre MVA en este tipo de plantas, cuya repercusión económica está fuera de todo comentario, poseen un especial interés por varias razones:

- (1) Las investigaciones hasta ahora realizadas muestran que el nivel de micotrofia de estas plantas es bastante elevado.
- (2) El tipo de micorriza cuantitativamente mayoritario en estas plantas es VA.
- (3) Los fenómenos de especificidad y dependencia cobran un protagonismo destacable ya que los árboles y arbustos utilizados para los fines aludidos en el título de este capítulo han sufrido por intereses económicos, una elevada presión por lo que las variedades utilizadas presentan unas características singulares en lo que concierne a especificidad.
- (4) La aplicación dirigida de las MVA en estas plantas es factible gracias a su sistema de multiplicación en vivo.

Dejando los citrus que merecen un apartado especial, dado el gran número de estudios dedicados a las MVA en estas plantas, la información disponible se puede resumir de la forma siguiente:

(i) Presencia de MVA en las distintas especies de plantas estudiadas.

(a) Plantas de interés alimenticio.

No cabe duda que el manzano (Malus sp.) ha sido la planta que más atención ha recibido, tras los trabajos pioneros de Mosse (1956 y 1957) y Hawker y Ham (1957). Así merecen referirse los de Benson y Covey (1976) Plenchete et al. (1981 y 1982); Covey et al. (1981); Granger et al. (1983); Hoepfner et al. (1983); Geddeda et al. (1983 y 1984), lo cual indica una literatura relativamente abundante al respecto.

Entre las especies de Prunus el más estudiado ha sido el melocotonero (Prunus persica) cuyas MVA han sido puestas de manifiesto en diversas ocasiones (Gilmore, 1971; La Rue et al. 1975; Lambert et al. 1979; Kock et al, 1982). Igualmente se sabe que el cerezo (Prunus avium) forma MVA (Pons et al. 1983) otros frutales formadores de MVA son Persea americana, el aguacate (Ginsburg y Avizohar-Hershenson, 1965; Davis et al., 1978; Menge et al. 1978), el granado, Punica granatum (Maeda, 1954); la palmera detilífera, Phoenix dactylifera (Sabet, 1940; el pejibaje, Bactris gasipaes (Janos, 1977); el nogal, Juglans sp. (Maeda, 1954; Ponder 1983 y 1984); la papaya, Carica papaya (Maeda, 1954; Ramirez et al. 1975)...

Otras plantas de interés alimenticio formadoras de MVA son el olivo, Olea europaea (Hayman et al. 1976); la vid, Vitis vinifera (Menge et al., 1983; Schubert, 1982, Schubert y Carrara, 1985; el té, Thea sinensis (Butler, 1939); el cacao, Theobroma cacao (Laycock, 1945); el cafeto Coffea arabica (Jansen, 1896; Lopes et al. 1983; Caldeira et al. 1983); la ca-sava, Manihot esculenta (Howeler et al. 1982 y 1983; Sieverding y Leihner, 1984).

Es obvio que muchas especies de interés en horticultura no se recogen aún en las listas de plantas con MVA, pero, ciertamente, es de esperar que paulatinamente vayan apareciendo como se confirma cada una nueva que se investiga.

(b) Plantas de interés industrial.

En este apartado hay que consignar a los arbustos del género Parthenium, P. argentatum, la guayula y P. incanum la mariola; que producen latex en cantidades suficientes para ser un sustituto del caucho, así como ceras y sustancias resinosas. Estas plantas, que también poseen un interés ecológico por prosperar en climas áridos, forman MVA (Bloss, 1979 y 1980), habiéndose demostrado los beneficios de la simbiosis a nivel de invernadero y campo. (Bloss y Pfiffer, 1981 y 1984).

(c) Plantas de interés ornamental.

Aparte de algunas plantas formadoras de MVA que ya han sido citadas por su interés en silvicultura, y que suelen

utilizarse como ornamentales, merecen citarse algunas que son consignadas como tales en la bibliografía. Así se han descrito ciertos Populus sp. (Kormanik et al. 1977 a y b; Morton y Rizzo, 1983); Magnolia sp. (Maronek et al. 1980); Liriodendron (Gray y Gerdemann, 1967; Verkade y Hamilton, 1983); Liquidambar styraciflua (Bryan y Kormanik, 1977; Kormanik et al. 1977 y 1981). Es de hacer constar el interés creciente por la producción de estas plantas y por la práctica de la inoculación con MVA en contenedores adecuados, como se comentará más adelante.

(ii) Dependencia y especificidad.

La dependencia a las MVA de las plantas arbóreas de interés en horticultura ha sido puesta de manifiesto en numerosas ocasiones. Como es bien conocido estudios llevados a cabo con plantas herbáceas han descrito ampliamente este fenómeno. Las investigaciones en las que se utilizan arbóreas han tratado, de profundizar y buscar otros efectos de las micorrizas distintos del mero aporte de P, con objeto de complementar los conocimientos de las causas de la dependencia a las micorrizas. Así La Rue et al. (1975) muestran la existencia de un suministro de Zn a la planta (melocotonero) por medio de la micorriza, lo que hace superar la deficiencia de las plantas no micorrizadas a este nutriente, a pesar de estar presente en el suelo, Lambert et al. (1979) añaden que la micorriza también es clave para garantizar el aporte de Cu al

melocotonero, además de P y Zn. Barry (1962) asoció deficiencia en micronutrientes con falta de micorrizas en la rizosfera de las palmeras, y en efecto, Janos (1977) demuestra que estas plantas sólo crecen adecuadamente en presencia de MVA. Menge et al. (1978) describen que el aporte de agua por medio de la micorriza es otra causa adicional de la dependencia a la simbiosis en plantas de aguacate.

Los trabajos de Covey et al. (1981) en manzano son bastante ilustrativos de la dependencia de estas plantas a las MVA. Por ejemplo, mientras que con la dosis más efectiva de P soluble hacen incrementar el peso de las plántulas desde 0.19 g (sin P) a 0.59 g en ausencia de MVA; en presencia de G. mosseae este incremento ocurre desde 1.73 g (sin P) a 8.84 g, lo cual demuestra una clara dependencia a las MVA. Estudios posteriores de Koch et al. (1982) muestran respuesta al P soluble de plantas de manzano, aunque el "crecimiento máximo" sólo se consigue en plantas micorrizadas. El tipo de suelo claramente afecta la capacidad de captar P soluble por plantas de manzano no micorrizadas (Geddeda et al. (1984), pero, incluso en el caso de máxima absorción, el "crecimiento máximo" de las plantas sólo se lograba en los tratamientos con MVA. Plenchette et al. (1981) confirman la dependencia del manzano a las MVA bajo condiciones de campo.

Con respecto a las plantas de interés industrial antes

aludidas, la dependencia a las MVA de la guayula para superar deficiencias en P, Ca, Fe, Mn y Mg ha sido puesta de manifiesto recientemente (Bloss y Pfeiffer, 1984).

Los fenómenos de especificidad en frutales han sido objeto de varios estudios. Por ejemplo, algunos de estos llevados a cabo en manzano muestran que determinadas variedades comerciales de esta planta se micorrizaban de forma adecuada por G. mosseae mientras que G. microcarpus no lograba infectar las raíces (Covey et al. 1981). El trabajo de Plenchette et al. (1983) es muy ilustrativo sobre este tema de la especificidad. En este estudio se comparan 6 especies de hongos VA, encontrándose que las tres más infectivas (78, 83 y 100 de índice de colonización) eran también las más efectivas. Infectividad y efectividad para estas tres especies de hongo VA estaba correlacionada. En cambio, dos especies que producían índices de colonización de 48 y 60 % no superaban estadísticamente, el efecto del control no micorrizado, mientras que otra especie, con sólo 6 % de índice de colonización provocaba un efecto significativo del crecimiento de las plantas. En resumen este trabajo informa de una "compatibilidad" de algunos hongos VA-manzano, a nivel de eficacia, aunque es obvio que no se pueda hablar de "especificidad" en el sentido estricto del término. La conclusión que cabe obtener es que, la especificidad de los frutales para determinados hongos VA se va a ver muy afectada por las características genéticas de las variedades

comerciales estudiadas; como es de esperar que el número de estos incrementos, no es aventurado decir que la especificidad de estas plantas a hongos VA determinados va a ser un hecho clave en programas de micorrización controlada en el futuro.

(iii) Obtención de plantas micorrizadas en vivero.

Sólo un breve comentario al hecho de que cada día se poseen más bases experimentales de la factibilidad de micorrizar estas plantas en viveros, contenedores etc. y que estas pueden ser suministradas adecuadamente micorrizadas. La preparación de viveros, la micorrización VA dirigida y sus ventajas al trasplante y posterior desarrollo de las plantas se discutió anteriormente (MVA EN SILVICULTURA). Ahora sólo indicar que prácticamente todos los trabajos relativamente recientes que acaban de citarse en este apartado, tratan y comentan, de forma más o menos extensa, las ventajas de aplicar MVA en frutales y ornamentales y que esta práctica es factible a nivel de vivero.

Finalmente, una excueta referencia al hecho de que la posibilidad de conexión de las técnicas de micropropagación parecen poseer un futuro esperanzador, como lo apoya el primer trabajo disponible sobre el tema (Pons et al, 1983) en el que se logra la micorrización axénica de plántulas de cerezo obtenidas por micropropagación. Si esta última técnica se convierte en una rutina en las prácticas hortícolas,

la aplicación de esporas de un hongo VA seleccionado sólo plantea pequeños problemas técnicos fácilmente superables.

LAS MVA EN CITRICOS

Las especies, cultivares y ecotipos de plantas arbustivas que se agrupan bajo la denominación de "cítricos" han sido objeto de numerosos estudios en relación con las MVA. Esta simbiosis es de gran importancia para estas plantas lo cual se sustenta en las mismas 4 razones anteriormente expuestas (p. 86) al introducir el estudio de MVA en Horticultura, tema del cual se han excindido los cítricos para dedicarles un estudio especial que se expone seguidamente.

(i) Presencia de las MVA en cítricos.

Casi 40 años antes de que se conociera su función había sido descrita la presencia de MVA en raíces de cítricos (Peyronel, 1922). Desde entonces los trabajos de Rayner (1933 y 1935); Muller (1936); Reed y Frement (1935); Neill (1944); Sabet (1945); Sudskaya (1958) han continuado la descripción de la asociación hasta que más recientemente Marx et al. (1971) confirmaron la influencia decisiva de las MVA en el crecimiento de dichas plantas. Su distribución en la rizosfera de estas, crecidas en zonas típicas de su cultivo, ha merecido diversos estudios (Nemec, 1978; Tzean y Huang, 1980; Krikun y Levy, 1980; Nemec et al. 1981).

Los cítricos han sido unas de las plantas más utilizadas para investigar la fisiología de las MVA. Esto resulta curioso dadas las dificultades propias de planta no-herbácea. La causa es, sin duda, la importancia de los fenómenos de dependencia y especificidad en estas plantas. A continuación se expone un resumen de los trabajos más significativos sobre este tema.

(ii) Dependencia y especificidad.

Desde hace tiempo que la fumigación del suelo en viveros de cítricos provocaba posteriormente la inhibición del crecimiento y clorosis en estas plantas (Martin et al. 1953 y 1963). Posteriormente, en un trabajo clave en la historia de las MVA, Kleinschmidt y Gerdemann (1972), demostraron que la reinoculación con hongos VA, que habían sido eliminados por la fumigación, inducía el crecimiento de las plantas. Trabajos subsiguientes de Tucker y Anderson (1972); Schenck y Tucker (1974); Newcomb (1975), presentan evidencias, a veces contradictorias, sobre casos en los que ocurre, y otros en que no tienen lugar tales detenciones del crecimiento tras la fumigación, así como sobre la necesidad o no de reinocular hongos VA para reestablecer el crecimiento normal de estas plantas. El análisis de estos trabajos

aporta una serie de conclusiones de gran interés básico y aplicado en estudios sobre micorrizas: (a) Existen casos en los que claramente se demuestran una dependencia a las MVA. (b) No todos los cultivares son igualmente dependientes de las MVA. Algunos de ellos, recobran el ritmo de crecimiento adicionando fosfato; pero siempre a dosis elevadas. (c) Los fitofármacos empleados varían en sus efectos sobre la formación y función de las MVA. Este último punto tiene una gran importancia en los aspectos prácticos de las MVA en viveros de cítricos, que posteriormente se analizarán. Con respecto a los dos primeros puntos las ideas han sido confirmadas en la literatura científica más antigua sobre el tema (Menge et al. 1978a y b) y por la más reciente (Graham y Timmer, 1984 y Edriss et al. 1984). Estos trabajos demuestran que en algunos cultivares de cítricos se pueden substituir las MVA por dosis de P que proporcionan fosfato disponible en el medio en cantidades que oscilan alrededor de las 200 ppm de P. En ciertos casos, la "cosecha máxima" no se alcanza más que en plantas micorrizadas, y finalmente en otras situaciones las plantas apenas responden a la aplicación de fosfatos. Todos los cítricos tienen raíz tipo magnoloide, pero difieren en su ritmo de crecimiento y capacidad para obtener fosfato. De ahí que difieran en su grado de dependencia a las MVA.

El hecho de haberse encontrado dosis de P que producen en plantas no micorrizadas efectos comparables a los de las MVA ha permitido definir unos efectos adicionales de las MVA en cítricos no mediados por el aporte de P. Así se ha encontrado que las MVA aportan micronutrientes especialmente Zn y Cu a estas plantas (Menge et al. 1977, 1978b y 1982; Krikun y Levy 1980; Timmer y Leyden, 1980; Graham y Timmer, 1984). Así mismo, Nemeč y Guy (1982) pudieron demostrar que las MVA no representan un gran drenaje de fotosintato y, finalmente, Johnson (1984), utilizando como control plantas de Citrus que crecían en una solución que contenía una concentración elevada de P soluble, encontró que las MVA estimulaban el proceso de fotosíntesis, sugiriendo una intervención de las hormonas en el mecanismo de acción del hongo VA.

Los fenómenos de especificidad están claramente demostrados en MVA en cítricos habiéndose encontrado que los distintos patrones de estas plantas compatibilizan mejor con hongos VA concretos (Nemeč, 1978; Daniels y Menge, 1981; Edriss et al. 1984).

(iii) Las MVA en viveros de cítricos.

Prácticamente todos los estudios citados en este subapartado de MVA en cítricos hacen referencia al hecho crí-

tico de suministrar MVA a los suelos destinados a vivero, cuando estos habían sido tratados con productos fitosanitarios. Igualmente, se sabe que la producción de plantas de cítricos en sustratos, sin suelo, que en los últimos años está tomando un gran auge, exigen una aplicación adecuada de MVA (Graham y Timmer, 1984). No insistimos más sobre este tema varias veces comentando a lo largo de este capítulo de INTRODUCCION. Sólo decir que en E.E.U.U. están comercializados los inóculos de MVA para viveros de cítricos o el suministro de plantones ya micorrizados.

Para finalizar, sólo unas breves referencias a un tema de interés relacionado con el tratamiento de los viveros con productos fitosanitarios destinados al control de patógenos en general y en particular a Phytophthora parasitica (Timmer y Leyden, 1978b; Davis y Menge, 1980 y 1981). Los tratamientos, principalmente con Bromuro de metilo, eliminan también a los hongos VA. Por esta razón se ha investigado en los trabajos antes aludidos el aplicar dosis que reduzcan, aunque no eliminen, el nivel de infectividad del patógeno con objeto de que el propio hongo VA, al colonizar ejerza cierto efecto protector frente a ese patógeno deprimido en su nivel de propágulos (Davis y Menge, 1981). Esta práctica no resulta muy segura por lo que, ante la facilidad que se tiene hoy día de reinocular MVA en viveros, es

aconsejable la eliminación de patógenos de cítricos si los hubiera.

En este mismo sentido Nemec (1982) y Menge (1982) estudian la posibilidad de aplicar a cítricos pesticidas, seleccionados por su bajo efecto sobre hongos VA, en las distintas fases del desarrollo de un vivero. Recientemente, Nemec (1985) encuentra que algunos biocidas y los tres nematocidas por él estudiados no producían efectos colaterales frente a G. mosseae, como este autor sugiere este es el camino a seguir porque, a veces, es necesario recomendar en viveros de cítricos un pesticida y es preciso que este no afecte a las MVA, ya que como es conocido la actuación de esta simbiosis es crítica en tales situaciones.

IV. PLAN DE TRABAJO

IV. PLAN DE TRABAJO

El análisis de los antecedentes bibliográficos sobre el tema, de acuerdo con los OBJETIVOS perseguidos, permite elaborar un PLAN DE TRABAJO que, "a priori" puede concretarse en los siguientes apartados:

- (1) Estudio cualitativo de las características micotróficas de almendro, naranjo y olivo.
 - (a) Grado de micorrización de estas plantas en las condiciones naturales del "biotopo" elegido (Valle de Lecrín).
 - (b) Identificación de los hongos VA más habituales en la rizosfera de estas plantas. Su aislamiento.
 - (c) Variaciones estacionales de la simbiosis y hongos VA.
- (2) Cuantificación de la micotrofia de estas plantas.
 - (a) Propagación del material vegetal.
 - (b) Selección de hongos VA. "Especificidad" (compatibilidad).
 - (b) Elaboración de las "curvas de respuesta al fosfato" en plantas micorrizadas y no micorrizadas.
 - (d) Cálculo del Grado de Dependencia Relativa a las Micorrizas.
- (3) Interacciones con factores químicos biológicos que pueden modificar la formación y respuesta de las micorrizas.
 - (a) Efecto de los fosfatos naturales.

- (b) Interacción con bacterias solubilizadoras de fosfatos
 - (c) Efecto de inóculos mixtos de hongos VA. Formas de inóculo.
 - (d) Algunas interacciones con fitohormonas.
- (4) Ensayos previos a los de inoculación en campo (vivero).
Ecofisiología de la micorrización.
- (a) Elaboración de "curvas de micorrización".
 - (b) Investigación de la necesidad de micorrizar. Interacción de los endofitos naturalmente existentes en el suelo de vivero y los que se pretenden introducir (seleccionados).
- (5) Ensayos en vivero. Biotecnología de las MVA.
- (a) Producción de plántulas con micorrización optimizada.
 - (b) Establecimiento de los viveros. Estudio de la supervivencia al trasplante en plantas micorrizadas y con troles.
 - (c) Seguimiento de los efectos de la micorrización en vivero durante un periodo de tiempo considerable (un año, "a priori").

V. MATERIAL Y METODOS

V. MATERIAL Y METODOS

MATERIAL GENERAL

Microorganismos.

En los diferentes ensayos realizados se han utilizado varias especies de hongos VA procedentes de la colección de inóculos de la UE de Investigación de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín del CSIC. Esta colección está compuesta por especies solicitadas a otros laboratorios y por hongos VA nativos que, en este trabajo de Tesis Doctoral tras varios años de cultivo sobre plantas hospedadoras y subsiguientes aislamientos, se han conseguido purificar.

En algunos ensayos se utilizaron bacterias solubilizadoras de fosfato. Estas se aislaron en suelos de huerta de la Estación Experimental del Zaidín.

Suelos.

En la mayoría de las experiencias se ha utilizado suelo de Murchas-Lecrín, suelo M-L, y en algunos ensayos el suelo nº 8 (Barea et al. 1980). Las características de estos suelos se describen en la Tabla 1.

Inóculos.

Se han utilizado dos tipos de inóculos de hongos VA:

a) Inóculo bruto. b) Clamidosporas.

El inóculo bruto, que es el más adecuado para lograr una buena infección, consiste en suelo con esporas, micelio y raíces infectadas, procedentes de la rizosfera de plantas con micorrización controlada.

La inoculación con clamidosporas, que siempre fueron esterilizadas en superficie, se llevó a cabo en tubos de ensayo con suelo, vermiculita o solución nutritiva, en condiciones estériles. Fundamentalmente esta técnica se ha usado para la inoculación controlada, en suelo libre de hongos VA, de plantas que se micorrizan muy bien como son alfalfa, cebolla o sorgo, con el fin de obtener inóculos, renovar la colección o aislar los hongos VA nativos.

El inóculo de bacterias solubilizadoras de fosfato se preparó a partir de un cultivo de la bacteria en medio de Brown (1972).

Plantas.

Las plantas utilizadas han sido almendro, (Prunus dulcis M); naranjo, (Citrus aurantium L.); y olivo (Olea europea L.).

Las plantas de almendro procedían de semilleros obteni-

dos a partir de semillas de almendra amarga utilizadas normalmente por los agricultores de la zona para obtener sus viveros. Prácticamente el 100 % de los patrones de almendro en edad productiva de la zona proceden de este tipo de semillas.

Las plantas de naranjo se han obtenido de semillas de naranja amarga también utilizada por los agricultores para obtener sus viveros. En este caso, aproximadamente el 95 % de los patrones cítricos en producción en la zona proceden de estas semillas.

Las plantas de olivo utilizadas en los ensayos eran estaquillas enraizadas. La procedencia de estas estaquillas es diversa. En la mayoría de las experiencias se han realizado con olivos manzanillo procedentes del Cortijo del Cuarto, Sevilla, CSIC, obtenidos según procedimiento descrito por Troncoso et al. (1980). En algunas experiencias las estaquillas a enraizar por nosotros procedían de olivos de las zonas tanto Murchas-Lecrín como Albolote-Atarfe.

MATERIAL Y TOMA DE MUESTRAS EN CAMPO.

Toma de muestras de suelo.

El suelo M-L procede del pago Viñas Bajas de Murchas, Municipio de Lecrín. El citado pago se encuentra en el contacto de terreno, del Mioceno de Murchas con Cuaternario

aluvial; estas tierras se dedican mayoritariamente al cultivo del almendro, aunque también crecen algunos olivos.

Las tomas de suelo se practicaron a lo largo del periodo 1979-84 y siempre del mismo lugar, en zona alejada de las plantas de almendro; por eso el contenido en los macronutrientes N, P, K del suelo no se alteró sustancialmente con los abonados periódicos que recibían las plantas. Como se sabe, el abonado de estas se hace tradicionalmente alrededor del tronco en el área de cobertura de copa. El suelo se sometía a un doble tamizado, para lo cual se han utilizado cribas de labranza. El primer tamizado se efectuó con cribas de 1 cm de luz de malla para eliminar partes gruesas y el segundo con la de 4 mm de luz de malla que deja el suelo en buenas condiciones de manipulación para los ensayos de invernadero.

El suelo nº 8 procede de secano dedicado al cultivo del olivo y se preparó de forma análoga a la citada anteriormente.

Recogida de muestras de suelo rizosférico y raíces de los cultivos estudiados.

Estos muestreos se han practicado a lo largo de los años 1979-84 coincidiendo con el principio final de las estaciones. O sea entre la segunda y primera quincena de Diciembre-Enero,

Marzo-Abril, Junio-Julio y Septiembre-Octubre. el suelo se tomaba en los primeros 20 cm donde se encuentran raíces secundarias de pequeño diámetro que son las raíces tróficas.

Las muestras en rizosfera de olivos y almendros se han tomado del pago Viñas Bajas y las de cítricos, del Pago Barranco de la Hojuela cultivados en terrenos aluviales del Cuaternario contactando con terrenos Paleozóicos y del Mioceno de Murchas. Así mismo se ha muestreado olivos y cítricos del Pago de las Cómicas situado en la parte central de la Vega de Murchas en terrenos aluviales del Cuaternario.

Recogida de material para semilleros de almendro y naranjo y vivero de propagación asexual en olivo.

La recolección de las almendras se hizo en el mes de Septiembre a lo largo de los años 1979-84. Estas almendras se conservaron en el laboratorio para ser utilizadas cuando se programasen las experiencias.

Las naranjas, tanto por ser un fruto perecedero como por presentar un período de recolección largo (Diciembre-Julio) se utilizaron justo al colectarlas. Sin embargo, si la programación de ensayos lo exige, las naranjas se pueden conservar unos dos meses en cámara a 40 C sin que se afecte la germinación de sus semillas. Se comprobó que si las naranjas permanecen más tiempo en la cámara se inicia la germina-

ción de las semillas, lo que impide que estas se puedan esterilizar en superficie, para la obtención de plántulas axénicas.

Las estaquillas de olivo para su reproducción vegetativa se recolectaron, en las zonas de la provincia de Granada ya indicadas, durante los meses de Junio y Septiembre; estos meses coinciden con el final de los períodos de crecimiento en el olivo. Se tomaron ramos sanos con uno o dos años de edad que presentaban un crecimiento vigoroso.

ENSAYOS DE LABORATORIO.

Recolección de esporas en muestras de suelo rizosférico.

Esta operación se llevó a cabo por la técnica de decantación y tamizado húmedo descrita por Gerdemann y Nicolson (1963). Para ello, se toma una alícuota de suelo de unos 50 a 100 g que se homogeniza adecuadamente en un recipiente que contiene aproximadamente 1 l de agua tibia; se deja decantar unos segundos y se pasa por un tamiz de 700 μ m de luz de malla procurando mantener un ritmo uniforme de filtrado; de este modo, las partículas de suelo más pesadas quedan retenidas en el recipiente mientras que la mayor parte de las esporas se vierten sobre el tamiz. Este retiene fragmentos de raíz o micorrizas y partículas de materia orgáni-

ca de relativamente gran tamaño, dejando pasar las esporas sueltas. El filtrado se recoge en probeta de 1 l se agita y tras unos segundos de decantación se hace pasar de nuevo por un tamiz de 250 μm de luz de malla. La operación se repite sobre un tamiz de 100 μm . En el presente trabajo siempre se resuspendió el contenido del primer recipiente en agua tibia, repitiéndose todo el proceso descrito anteriormente.

En resumen, en el primer tamiz quedan retenidas raíces, esporocarpos y micelio externo que casi siempre lleva esporas unidas, en el segundo quedan esporocarpos y micelio con esporas y el tercero, esporas sueltas.

Cuantificación e identificación de las esporas.

Para llevar a cabo la cuantificación el contenido de cada uno de los tamices, que se recoge en vasos de precipitado, se vierte sobre una placa transparente, con surcos concéntricos excavados, semejante a la descrita por Doncaster (1962). Estos surcos impiden excesivos desplazamientos de las esporas, ya que cuando se depositan no pasan de un surco a otro lo que facilita su cuantificación. Esta se realiza con microscopio binocular de disección (30 a 40 aumentos).

Las esporas se identificaron siguiendo las claves de Mosse y Bowen (1968), Gerdemann y Trappe (1974) y Trappe (1982).

Aislamiento de las esporas.

A partir de las placas de recuento, se aislaron esporocarpos, agrupaciones de esporas unidas a micelio, en forma de racimos, y esporas sueltas. Los esporocarpos y "racimos de esporas" se tomaron con pinzas de relojero de punta fina y las esporas sueltas con tubo capilar. Depositándolas sobre trozos de papel de filtro humedecido en placa petri, se pudieron conservar en cámara a 40 C durante algunos meses.

Tinción y cuantificación de la infección radical.

En esencia se siguió la técnica de Phillips y Hayman (1970).

En este apartado hay que distinguir dos tipos de raíces a teñir. a) Raíces de plantas arbóreas. b) Raíces de plantas herbáceas empleadas para obtener inóculo.

En el primer caso, se toman las raíces en las correspondientes muestras de rizosfera. Tras un lavado adecuado para eliminar las partículas de suelo adheridas a las raíces, estas se sumergen en KOH al 10% y se les deja al "baño María" durante hora y media. Este tratamiento clarifica los tejidos radicales. Posteriormente se elimina la potasa y las raíces se sumergen en H_2O_2 de 10 v durante 15 a 20 minutos hasta eliminar los pigmentos. Eliminada el H_2O_2 , las raíces se lavan 4 ó 5 veces con agua de grifo y se da un último lavado con ClH dilui-

do 0.1 N. posteriormente, se tiñe con Lactofenol-Azul-Tripan durante 5 minutos al baño María. Las raíces se conservan en Lactofenol al 25 % en agua.

La fórmula del Lactofenol es la siguiente:

| | |
|---------------------|--------|
| Acido láctico | 100 ml |
| Fenol | 20 g |
| Glicerol | 50 ml |
| Agua | 40 ml |

En el caso de raíces de plantas herbáceas el proceso de tinción se simplifica ya que son raíces secundarias de menor diámetro que las anteriores y con menor cantidad de pigmentos; por eso, el tratamiento con KOH se reduce a una hora y no es necesario tratar con H_2O_2 , ya que se clarifican suficientemente con la potasa. El resto de la tinción se realiza como en el apartado anterior.

Cuantificación.

Se siguió la técnica descrita por Giovannetti y Mosse (1980), que utiliza una placa cuadrada, de 10 cm de lado con cuadrícula de 1'3 cm marcadas. En esta placa se vierten las raíces teñidas y se distribuyen al azar. Con microscopio binocular de disección (30 a 40 aumentos), se cuenta el número de intersecciones de raíces teñidas (micorrizadas) y no teñidas (no micorrizadas) con las líneas que delimitan

las cuadrículas. Este dato nos da directamente el porcentaje de la longitud de raíces micorrizadas de la planta.

Esterilización de semillas en superficie.

Habiéndose observado que las semillas de naranjo germinan con dificultad por la aparición de una contaminación generalizada se procedió a su esterilización en superficie. Como esterilizantes se utilizaron Cl_2Hg al 2'5 % (Bonnier y Brakel, 1969) y NaOCl al 40 % (lejía comercial).

Antes de aplicar el esterilizante (NaOCl) se eliminan pectinas de las semillas de naranjo sometiéndolas varias veces a agitación (4 ó 5 minutos) en agua tibia. Las semillas así tratadas se sumergen en el esterilizante durante minuto y medio; a continuación se elimina el esterilizante mediante unos diez lavados con agua estéril.

En el caso del almendro las semillas se sumergen en agua durante 12 horas colocándose en estufa a 28°C lo que facilita la eliminación de los tegumentos de manera mecánica. Las semillas sin tegumentos se esterilizan como las del naranjo.

Germinación de semillas.

Una vez esterilizadas en superficie las semillas se colocan en placa de petri entre dos círculos de papel de

filtro estériles y humedecidos con 3 ml de agua. En el caso del almendro se disponían unas 5 ó 6 por placa, mientras que en el caso del naranjo se colocaban unas 10 a 12. Las placas de petri, cerradas con "parafilm", se llevaban a estufa de 28º C en oscuridad. Las figuras 4 y 5 muestran los resultados del proceso en naranjo.

Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfatos.

Se parte de 1 g de suelo y se hacen diluciones-suspensiones en agua estéril. 1 ml de las diluciones 10^{-6} y 10^{-7} se disemina en placa con medio de Ramos y Callao (1967) adicionado con 0.2 % de fosfato insoluble.

La composición del medio Ramos y Callao (1967) es la siguiente.

| | |
|--------------------------|------|
| Agar..... | 22 g |
| Extractos de levadura... | 2 g |
| Glucosa..... | 20 g |
| Agua..... | 1 l |

Se han utilizado dos fuentes de fosfato insoluble: Fosfato tricálcico y fosfato de roca.

Las placas sembradas se incuban a 28º C durante cinco días detectándose las bacterias que solubilizan fosfato por producir halo de aclaramiento alrededor de las colonias. De esas colonias se toman aquellas que producen mayor halo

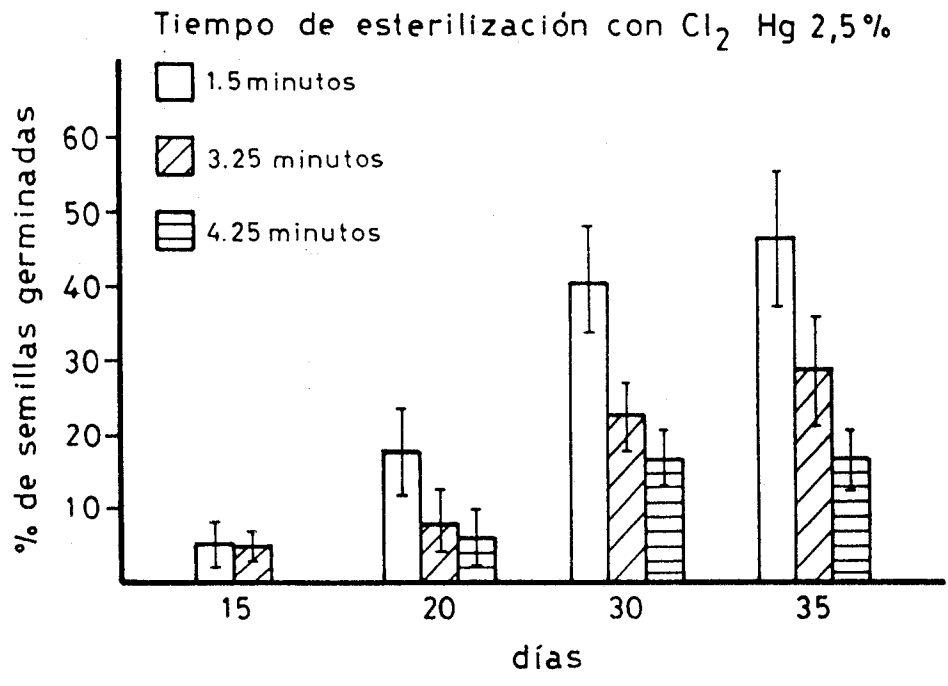


Figura 4

Efecto del Cl₂Hg sobre la germinación de semillas de naranjo.

Tiempo de esterilización con NaClO al 40%

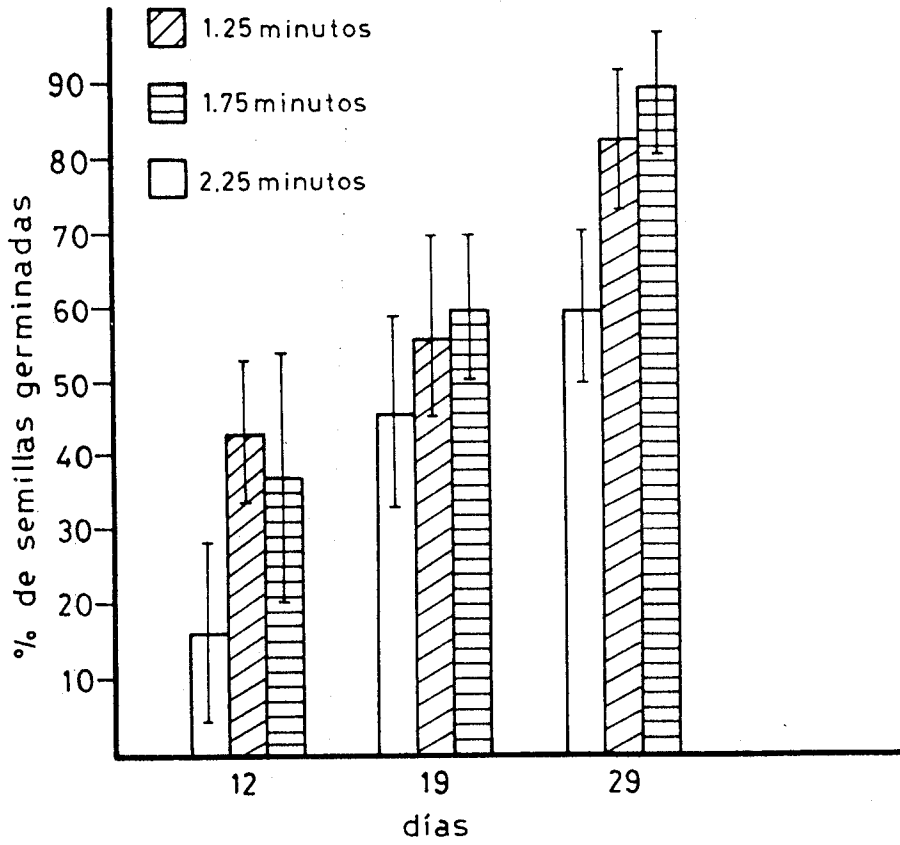


Figura 5

Efecto del NaClO sobre la germinación de semillas de naranjo.

seleccionándose cepas que solubilizan los dos tipos de fosfato insoluble; se conservan en el medio sólido de Ramos y Callao (1967), a 40 C. Una vez comprobado que las bacterias conservan la capacidad de solubilizar fosfatos insolubles a lo largo del tiempo, se utilizan como fuente de inóculo.

Preparación de inóculos bacterianos.

Se cultivan las bacterias anteriormente seleccionadas en medio líquido de Brown (1972) y se mantienen durante 10 días a 280 C en agitación, en este tiempo el cultivo alcanza una densidad de unas 10^9 bacterias/ml.

La composición del medio Brown (1972) es la siguiente:

| | |
|-----------------------------|--------|
| Sacarosa | 10 g |
| NO_3K | 0,5 g |
| Extracto de levadura | 0,5 g |
| Solución A | 5 ml |
| Solución B | 5 ml |
| Extracto de suelo | 250 ml |
| Agua destilada | 740 ml |
| Se ajusta el pH a 7. | |

Solución A:

| | |
|---------------------------------------|--------|
| PO_4HK_2 | 25 g |
| $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ | 25 g |
| Agua destilada | 250 ml |

Solución B:

| | |
|--------------------------|--------|
| SO ₄ Mg | 10 g |
| ClNa | 0,5 g |
| SO ₄ Fe | 0,5 g |
| SO ₄ Mn | 0,5 g |
| Agua destilada | 250 ml |

El extracto de suelo se prepara dejando en maceración durante 24 horas el suelo en agua, a partes iguales, y filtrando la suspensión por papel Whatman nº 1.

Aplicación del inóculo bacteriano.

Al tiempo de poner la planta en la maceta se aplican a sus raíces 25 ml de cultivo bacteriano y cada 15 días se añaden 5 ml de este cultivo durante las seis primeras semanas.

ESTUDIOS DE INVERNADERO: ENSAYOS GENERALES

Preparación de semilleros libres de hongos VA.

Se prepararon bateas con una capa de 6 a 8 cm de espesor de una mezcla suelo-arena estéril en proporción 1:1 (V/V). Sobre esta capa se colocaron las semillas germinadas axénicamente y se cubren con una capa de 2 a 3 cm de arena estéril. Se riega abundantemente con agua de grifo

y se lleva a estufa de 280 C en oscuridad. Los primeros almendros aparecen sobre la arena a los 3 ó 4 días y los naranjos a los 6 ó 7. Cuando las plántulas emergen sobre la arena, los semilleros se pasan al invernadero.

Cada 15 días se suministró a las plantas solución nutritiva (Hewitt 1952), exenta de fósforo, en la proporción de 15 ml/100 cm² de superficie de batea sembrada. En el caso del almendro, desde la 3ª a la 5ª semana de permanencia en el invernadero, las plántulas se pueden utilizar para experiencias; mientras que el naranjo se empieza a utilizar a partir de la 7ª a 9ª semanas, cuando las plántulas tienen desarrolladas las 4 ó 5 primeras hojas.

La solución de Hewitt (1952) modificada es la siguiente:

| <u>Nutrientes</u> | <u>g/100 ml</u> | <u>Para 1 l</u> |
|--|-----------------|-----------------|
| NO ₃ K | 3,03 | 10 ml |
| (NO ₃) ₂ Ca | 7,08 | 20 ml |
| SO ₄ Mg.7H ₂ O | 1,84 | 20 ml |
| EDTA Fe(II) | 0,25 | 10 ml |
| SO ₄ Mn | 0,223 | 1 ml |
| SO ₄ Cu.5H ₂ O | 0,24 | 0,1 ml |
| SO ₄ Zn.2H ₂ O | 0,29 | 0,1 ml |
| BO ₃ H ₃ | 1,86 | 0,1 ml |
| MoO ₄ NaNH ₄ | 0,035 | 0,1 ml |
| Agua | | c.s. |

Para preparar inóculos con alfalfa se eliminó también el N de la solución nutritiva en este caso el K y Ca se agregan en forma de sulfato y cloruro respectivamente, en las siguientes cantidades:

| <u>Nutrientes</u> | <u>g/100 ml</u> | <u>Para 1 l</u> |
|-------------------------------|-----------------|-----------------|
| SO_4K_2 | 3,03 | 10 ml |
| Cl_2Ca | 4,75 | 20 ml |

Multiplicación vegetativa del olivo.

Se ha seguido la técnica descrita por Troncoso et al. (1983), que se basa en el uso combinado de temperatura, auxinas y nebulización.

En esencia consiste en tomar fragmentos (estaquillas), de 15 a 18 cm de longitud con 4 a 8 hojas en su parte superior, de ramos vigorosos. Estas tomas se realizaron en Junio ó Septiembre por las razones ya descritas. Los cortes apical y basal, para obtener las estaquillas, se practicaban por debajo y encima de un nudo respectivamente, ya que Nahlawi et al. (1975) comprueban que esto produce un mejor enraizamiento. De cada ramo se obtienen tres tipos de estaquillas basal, media y apical, siendo las de tipo basal las que enraizan mejor. Todo este proceso se realiza en ambiente húmedo para evitar desecación. A las estaquillas se ha-

cen incisiones longitudinales de 3 cm de longitud en la base y unos 2 cm de la parte basal se sumergen en una disolución de 3000 ppm de AIA en alcohol del 50 %, durante 5 segundos. Posteriormente, las estaquillas se dejan secar 15 a 20 minutos y se llevan a recipientes con vermiculita estéril con una densidad de plantación de 600 a 650 por m². Los recipientes utilizados poseían un buen drenaje ya que las estaquillas debían ser mantenidas bajo constante aporte de agua pulverizada en el invernadero. A los dos meses aproximadamente las estaquillas suelen haber desarrollado un sistema radical adecuado para utilizar estas plántulas de olivo en el ensayo correspondiente.

El material obtenido por este procedimiento fué muy heterogéneo, tanto en lo que se refiere al enraizamiento como a la vitalidad de las plántulas, por ello para conseguir poblaciones homogéneas y abundantes se debía partir de un número muy elevado de estaquillas, lo cual requiere a su vez la instalación de bancadas de enraizamiento especiales. La instalación de estas se consideró innecesaria: dadas las facilidades para conseguir gran número de plántulas enraizadas homogéneas obtenidas por el procedimiento patentado por Troncoso y colaboradores en el Centro de Edafología y Biología Aplicada, Cortijo del Cuarto del CSIC. Este material fué puesto a nuestra disposición por parte

de dichos investigadores e institución.

Preparación de suelos para ensayos en macetas.

El suelo se esteriliza sometiéndolo a vapor fluente durante una hora en tres días consecutivos. Tanto el suelo M-L como el nº 8, se diluyen con arena de cuarzo estéril, libre de nutrientes, en las proporciones 5:2 o 3:1 V/V según ensayo esto hace al suelo más suelto y trata de compensar la compactación inducida por la maceta.

La mezcla suelo-arena se reinocula con los microorganismos propios del suelo, mediante filtración de una suspensión de este suelo natural, en este filtrado se retienen los propágulos de hongos VA; lo que permite obtener suelos con su actividad biológica propia y, de acuerdo con Smith y Smith (1981), proporciona auténticos controles micorriza (-).

En todas las experiencias se han utilizado macetas de 500 g de capacidad, preparándose de 5 a 7 repeticiones por tratamiento.

ESTUDIOS DE INVERNADERO: ENSAYOS ESPECIFICOS.

1. Experiencia preliminar.

En primer lugar se pretende conocer si las plántulas de los tres cultivos objeto de estudio: naranjo, almendro

y olivo forman micorrizas en las condiciones de trabajo propias de los ensayos de invernadero. Se utilizó suelo M-L y un inóculo de G. mosseae, del cual se aplicaron 3 a 5 g por maceta.

Dado que el naranjo no se consiguió micorrizar adecuadamente en las condiciones de este estudio, se plantearon nuevos ensayos con esta planta. Tanto olivo como almendro si se micorrizaron bien, ocurriendo una buena respuesta de estas plantas a las micorrizas.

2. Influencia de la adición de fosfato sobre la infectividad de Glomus mosseae en citrus.

Se aplicaron dos niveles de P, equivalentes respectivamente, a una dosis agronómica (150 kg P/ha) y a la mitad de dicha dosis. De cada una de estas concentraciones más del suelo control, se prepararon dos series de macetas, a una de las cuales se aplicó inóculo de G. mosseae y a la otra no. Como fuente de P se utilizó P_4O_{10} .

3. Influencia del tipo de inóculo sobre la infectividad de G. mosseae en naranjo.

Se ensayaron los siguientes inóculos: a) 20 esporocarpos de G. mosseae por planta; b) 150 esporas por planta y c) raíces de alfalfa fuertemente micorrizadas por G. mosseae.

4. Investigación de un posible efecto tóxico de naranjo sobre el desarrollo de *G. mosseae*.

Esta posible causa de la no infectividad de *G. mosseae* en raíces de naranjo se investigó utilizando dos suelos: M-L y nº 8 inoculados con *G. mosseae*. De cada suelo se prepararon 10 macetas, en cinco de las cuales se plantaron naranjos. Ello proporciona, por consiguiente 4 series de macetas. A los 50 días de crecimiento en todas las macetas, con y sin naranjo, se sembró alfalfa germinada, planta muy susceptible de ser micorrizada por *G. mosseae*. A las 14 semanas de crecimiento se estudió la micorrización de la alfalfa para comprobar si había sido afectada por la presencia de naranjo en la maceta.

5. Intento de micorrización de naranjo utilizando suelo natural.

Constó la experiencia de 3 grupos de tratamientos:

- a) Suelo desprovisto de micorrizas, por esterilización.
- b) Suelo esterilizado y reinoculado con *G. mosseae*.
- c) Suelo natural no esterilizado.

En los tres casos se estudiaron tres niveles de fósforo. El propio del suelo más una dosis equivalente a 150 Kg/ha, y otra equivalente a 75 Kg/ha.

6. Investigación de un posible efecto tóxico del suelo inducido por la esterilización sobre la infectividad de *G. mosseae* en naranjo.

Se ensayaron dos inóculos de micorriza: *G. mosseae* y *Glomus* sp. (nativo) (presente en el suelo que infectó al naranjo en la experiencia anterior). Ambos se estudiaron en el suelo natural no esterilizado, y en suelo estéril.

7. Dilución del inóculo bruto de *Glomus* sp. (nativo), para micorrización de naranjo en suelo estéril.

La experiencia consta de tres tratamientos y un control (suelo estéril no micorrizado). En el primer tratamiento se añaden a cada maceta 1,5 g de *Glomus* sp. (nativo), que posee aproximadamente el mismo número de esporas que los inóculos de *G. mosseae* utilizados. Para el segundo y tercer tratamiento este inóculo se diluyó 1/2 y 1/4, respectivamente.

8. Micorrización de naranjo por *G. mosseae* en plantación simultánea con alfalfa.

Utilizando alfalfa por su facilidad para formar micorrizas con *G. mosseae*, se estudió el efecto de la inoculación de *G. mosseae* en los suelos M-L y nº 8 estériles. En todos los casos se plantan naranjos y semillas de alfalfa

esterilizadas en superficie. A los cuatro meses se comprueba el grado de micorrización de la alfalfa, al ser este alto, se cortó su parte aérea y se dejaron las raíces de alfalfa micorrizadas junto con las plantas de naranjo. Siete meses después se cosechó, e investigó la micorrización en naranjo.

9. Infectividad de *G. mosseae* utilizando otro patrón de naranjo.

En este caso el patrón utilizado corresponde a *Citrus aurantium* L. (variedad dulce), que crece en la Estación Experimental del Zaidín (CSIC). El ensayo sobre suelo estéril consta de dos tratamientos de inoculación: *G. mosseae* y *Glomus* sp. (nativo).

10. Selección de hongos VA para la micorrización de plántulas de naranjo, almendro y olivo, según sus efectos sobre el crecimiento de estos.

Estos ensayos se realizaron con suelo M-L, exento de micorrizas (control), ensayándose como inóculos de MVA: *Glomus* sp. (nativo), *G. mosseae*, *G. fasciculatus* y *G. macrocarpus*.

11. Interacción de los hongos VA y el fosfato soluble sobre el crecimiento, nutrición y micorrización de almendro, naranjo y olivo. Estudio del grado de Dependencia Relativa (DRM) de estas plantas a las micorrizas.

En los tres cultivos se utiliza suelo M-L exento de micorrizas ensayándose la inoculación de Glomus sp. (nativo). Tanto a macetas inoculadas como a controles se aplicaron niveles de fosfato equivalentes a 75 Kg/ha y 150 Kg/ha en forma de PO_4H_2K . Con los datos de crecimiento de las tres plantas tanto micorrizadas como no, y para los tres niveles básicos de P (0, 75 y 150 Kg/ha) se calculó el índice de DRM de estas especies arbóreas aplicando la fórmula de Plenchette et al. (1983).

En el caso del naranjo y utilizando suelo nº 8 (Barea et al. 1980) se ensayaron niveles, algunos sumamente elevados, de P soluble. Concretamente se añadió, PO_4H_2K , tanto a macetas micorrizadas como a controles a razón de: 0.185 g/Kg suelo; 0.374 g/Kg suelo; 1.5 g/Kg suelo; 6.008 g/Kg suelo y 24.032 g/Kg suelo.

12. Interacción del fosfato de roca y los hongos VA sobre el crecimiento y micorrización de las plántulas.

Este ensayo se llevó a cabo con naranjo y olivo. Se utilizó suelo M-L y Glomus sp. (nativo) como inóculo. Las

dosis de fosfato de roca aplicadas fueron 0, 1 y 10 g de este producto natural por kg de suelo.

En el caso del olivo se prepararon series de macetas, una con inóculo de MVA y otra control no inoculada. En naranjo, dada su dificultad para crecer cuando no está micorrizado, sólo se empleó la serie de macetas inoculadas. Como tratamiento complementario en naranjo, se ensayó la inoculación de bacterias solubilizadoras de fosfatos. El inóculo de estas se preparó según se describió anteriormente.

13. Ensayo para estudiar la necesidad de inocular plántulas de almendro en un determinado suelo.

El ensayo se llevó a cabo con dos tipos de suelo M-L y nº 8 (Barea et al. 1980). Se toma de cada tipo de suelo dos porciones, una provista de los propágulos de micorriza (suelo natural) la otra exenta de estos propágulos, previa esterilización y reposición de microorganismos. En ambos suelos se estudió el efecto de G. mosseae que fué el hongo VA elegido. Así por cada tipo de suelo se tienen cuatro tratamientos. Control (sin micorriza), micorriza elegida (G. mosseae), micorriza nativa y micorriza elegida más micorriza nativa.

Con los datos de peso seco de parte aérea obtenidos se calculó el porcentaje de incremento del crecimiento sobre el control, en cada tipo de suelo.

14. Efecto de inóculos mixtos de hongos VA sobre la micorrización, crecimiento y nutrición de las plantas.

Este ensayo se efectuó utilizando el suelo M-L y plantas de naranjo y olivo. Los inóculos mixtos se prepararon sobre la base de G. mosseae y Glomus sp. (nativo).

15. Efecto del ácido indol acético (AIA) y hongos VA sobre enraizamiento y desarrollo de estaquillas de olivo, (ecotipo "Lechin" procedente de la zona Murchas-Lecrin.

Utilizando suelo M-L se estudió el efecto producido por la fitohormona, G. mosseae y los hongos VA nativos. En el ensayo se dispuso de los respectivos controles MVA (-) y AIA (-).

16. Influencia de extractos radicales de naranjo inoculado con Glomus sp. (nativo) sobre la micorrización de esta planta por G. mosseae.

La idea de este ensayo es investigar en macetas de naranjos inoculadas con G. mosseae, la posible influencia de extractos radicales obtenidos de otros naranjos que se inocularon, al mismo tiempo que los anteriores, con Glomus sp. (nativo).

el tratamiento se efectuó cada cinco días durante el primer mes de crecimiento, cada siete días durante el segundo y cada 10 días durante el tercer mes. A los siete meses se

cosechó estudiándose el desarrollo y micorrización de las plántulas.

17. Elaboración de las curvas de micorrización y crecimiento de almendro, naranjo y olivo a lo largo del tiempo.

Utilizando suelo M-L e inóculo Glomus sp. (nativo), se preparó suficiente número de macetas de cada tipo de planta para hacer tomas periódicas necesarias, a cuatro macetas por toma, con el fin de establecer el proceso de infección con respecto al tiempo "curva de infección". En el caso del naranjo se hizo utilizando tres cantidades diferentes de inóculo (número de esporas).

ENSAYOS DE VIVERO

Una vez obtenidas en el invernadero plántulas de los tres cultivos con micorrización optimizada, se procedió a su trasplante a vivero junto a controles no micorrizados. En el momento del trasplante, controles y tratamientos tenían un tamaño parecido.

El suelo del vivero (zona "verde" de la Estación Experimental del Zaidín) no recibió tratamiento químico, sólo se preparó el terreno para su uniformidad. Las plantas se colocaron a unos 50 cm unas de otras, dentro de la fila con igual tratamiento, y 1 m entre tratamientos. A lo largo del

desarrollo se efectuaron varias medidas del desarrollo vegetativo, y controles de la nutrición.

VI. RESULTADOS

VI. RESULTADOS

Los datos numéricos, resultado de los diversos ensayos que componen la presente investigación, se presentan en este capítulo sistematizados según el modelo utilizado en MATERIAL Y METODOS. Lógicamente ello ayuda a localizar las condiciones experimentales del ensayo en cuestión. Los datos que se presentan son valores medios de, en la mayoría de los casos, 5 repeticiones. En las Figuras 6, 7, 8 y Tablas 2, 3 y 4 se indica taxativamente el Intervalo de Confianza del valor medio dado al 5 % de nivel de probabilidad. En las restantes Tablas se utiliza el sistema de letras minúsculas de forma tal que cuando dos números no van seguidos de la misma letra difieren significativamente al 5 %.

Es de hacer notar que experimentos con la misma planta y tratamientos, aunque mantienen claramente las tendencias de los resultados, no reproducen los mismos datos numéricos.

Esto es lógico, dadas las variaciones ambientales a lo largo del año, a pesar de desarrollarse en invernadero controlado.

De acuerdo con todo ello, se procede a la exposición de los resultados obtenidos que son los siguientes:

En la Tabla 1 se muestran las características de los suelos utilizados en este trabajo. Son suelos pobres en materia orgánica, con pH de neutro-alcalino a básico. El suelo nº 8 se dedica al cultivo del olivar y el suelo M-L al cultivo del almendro.

TABLA 1

Características analíticas de los suelos

| Suelos nº | Arena (%) | Limo (%) | Arcilla (%) | pH (agua) | Materia orgánica (%) | CO ₃ Ca activo. (%) | N total (ppm) | P total (ppm) | K total (ppm) | P soluble en CO ₃ HNa 0,5 M (ppm) |
|--------------|--------------|-------------|----------------|--------------|----------------------------|--------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--|
| M-L | 44.5 | 33.2 | 22.3 | 7.1 | 1.1 | 9.9 | 1011.5 | 470 | 223 | 7.5 |
| 8 | 18.2 | 39.8 | 42 | 7.4 | 1.23 | 33.2 | 910 | 1072 | 562 | 8.2 |

MUESTREOS EN CAMPO

Los resultados de la evaluación del grado de micorrización natural en almendro, naranjo y olivo así como el efecto de las estaciones del año sobre la evolución de las MVA en estas plantas se recogen en las Figuras 6, 7 y 8, que corresponden a los datos de % de micorrización y número global de esporas. Las variaciones en especies concretas de hongos VA se resumen en las Tablas 2, 3 y 4.

En efecto, las Figuras 6, 7 y 8 indican el número de esporas, en suelo rizosférico, que presentan a lo largo del año los tres cultivos estudiados almendro, naranjo y olivo, respectivamente y el proceso de infección radical. Tanto en olivo como en almendro el número de esporas aumenta significativamente a finales de verano y principios de otoño y disminuye en invierno que es cuando alcanza sus valores mínimos. En naranjos, el número de esporas disminuye en primavera y verano, aumentando significativamente a principios de otoño y alcanzando su máximo en invierno. Se puede observar que el suelo rizosférico de almendro es más rico en esporas que el de olivo y este más que el de naranjo.

El porcentaje de infección radical presenta una evolución bastante paralela en los tres cultivos. Disminuye en otoño para alcanzar la mínima infección en invierno; aumen-

ta significativamente en primavera y alcanza el máximo a finales de esta o en verano.

Las Tablas 2, 3, 4 indican el número y tipos de esporas observadas en las muestras de suelo rizosférico de los tres cultivos. En suelo rizosférico de olivo y almendro hay más diversidad de tipos o especies de esporas que en el de naranjo. En todas las muestras las esporas de tipo "E₃" o G. fasciculatus son las más abundantes, pero en olivo se detecta con frecuencia las del tipo "White reticulate".

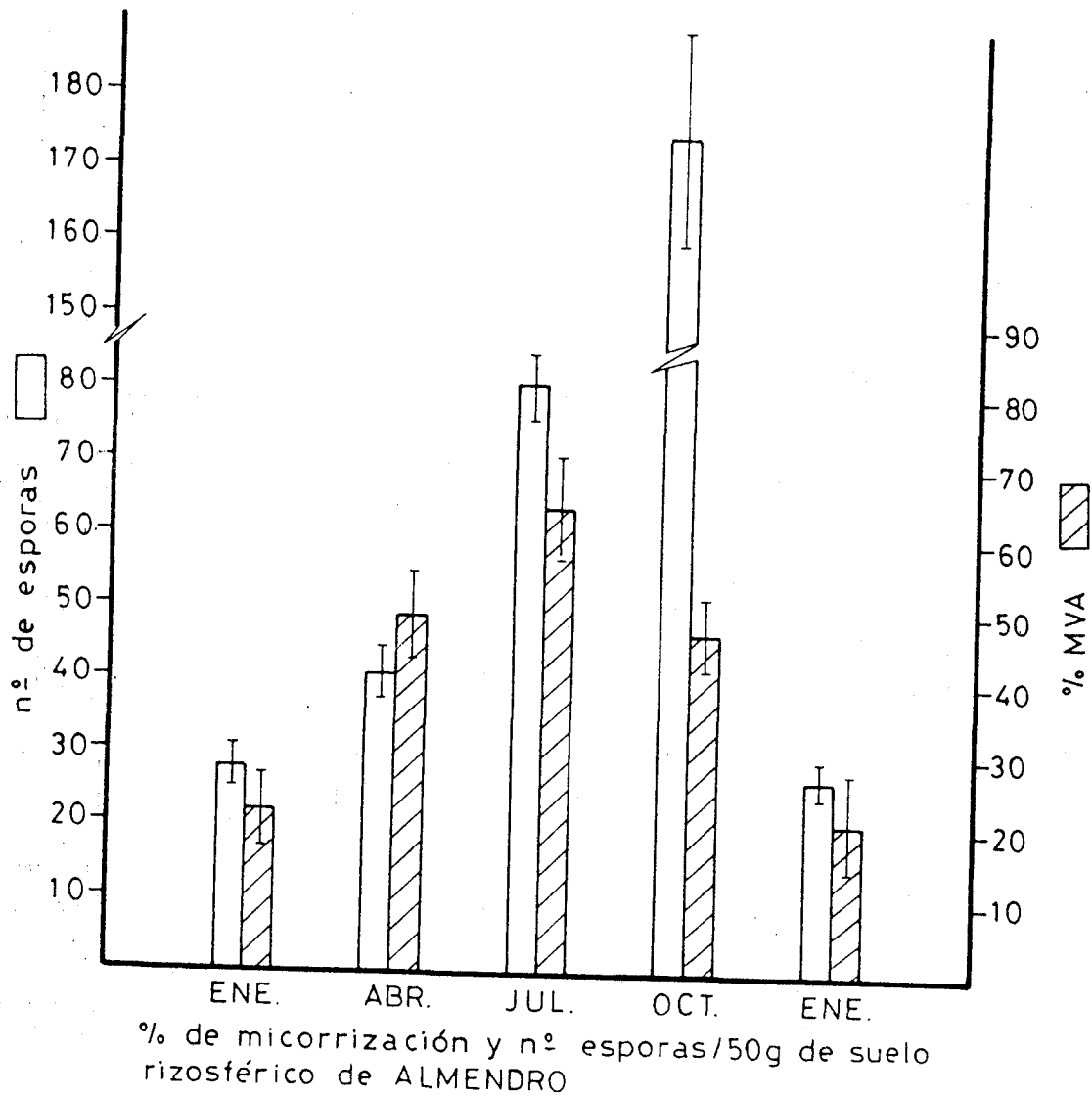
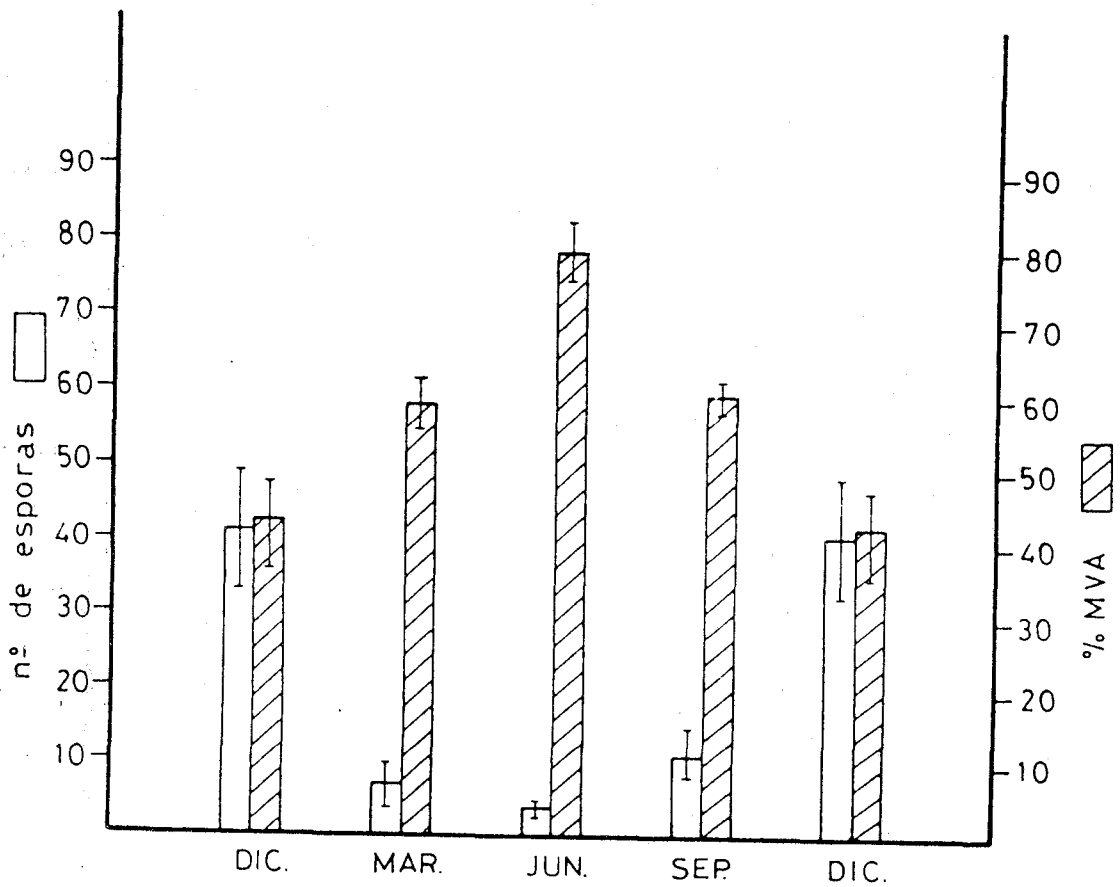


Figura 6

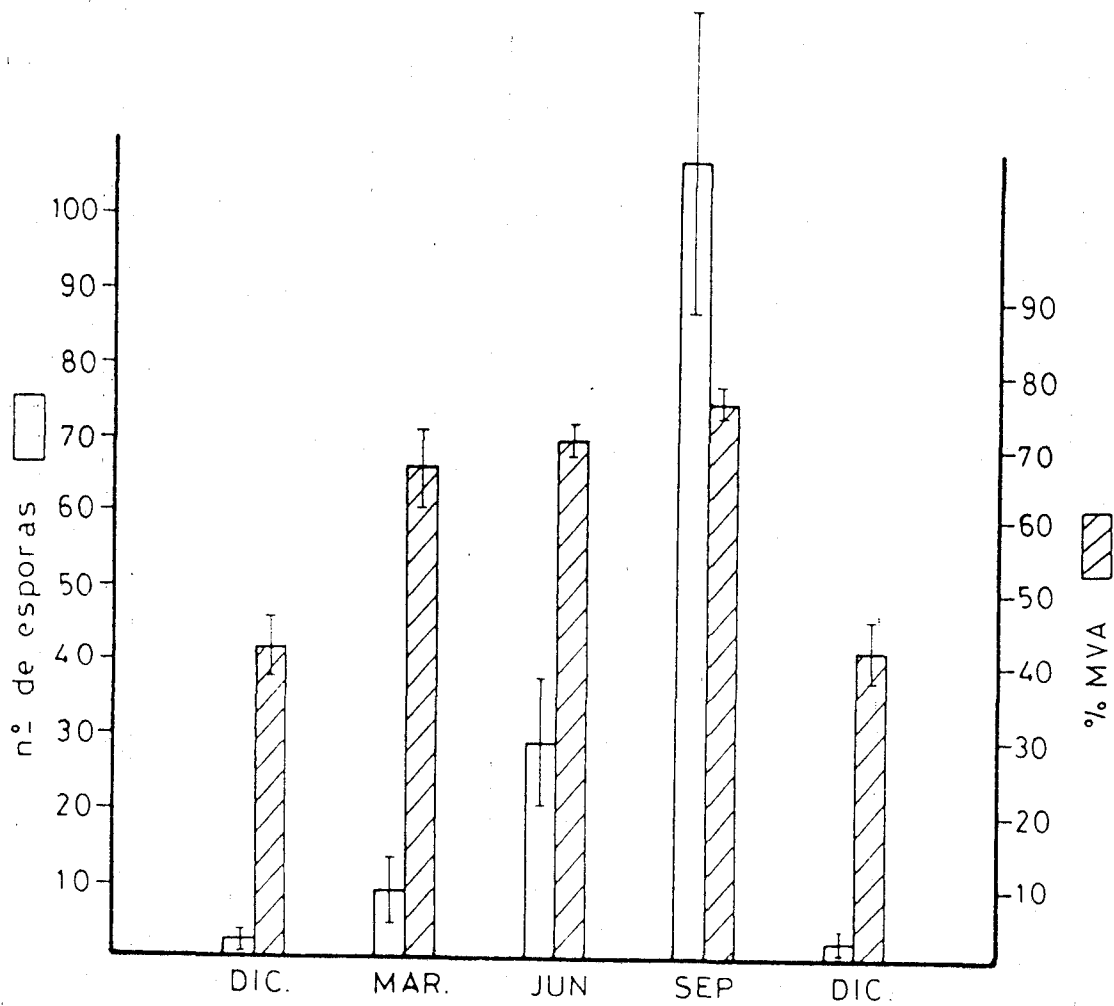
Variaciones estacionales de las MVA en almendro bajo condiciones de campo.



% de micorrización y nº esporas/50g de suelo rizosférico de CITRUS

Figura 7

Variaciones estacionales de las MVA e cítricos bajo condiciones de campo.



% de micorrización y nº esporas/50g de suelo rizosférico de OLIVO.

Figura 8

Variaciones estacionales de las MVA en olivo bajo condiciones de campo

TABLA 2

Número y tipos de esporas en 50 g de suelo rizosférico de almendro (\pm Intervalo de Confianza)

| Tipo de espora | Enero | Abril | Julio | Octubre |
|--|-------------|------------|------------|-------------|
| <u>G. mosseae</u> | 3 \pm 0.5 | 2 \pm 1 | 19 \pm 3 | 28 \pm 3 |
| <u>G. macrocarpus</u> var. geospora | 6 \pm 1.5 | 10 \pm 3 | 7 \pm 2 | 42 \pm 9 |
| <u>G. fasciculatus</u> | 15 \pm 2 | 25 \pm 3 | 44 \pm 4 | 93 \pm 14 |
| No identificadas | 5 \pm 2 | 5 \pm 2 | 11 \pm 1 | 12 \pm 3 |

TABLA 3

Número y tipos de esporas en 50 g de suelo rizosférico de cítricos (\pm Intervalo de Confianza)

| Tipo de espora | Diciembre | Marzo | Julio | Septiembre |
|-------------------|------------|-------------|---------------|---------------|
| <u>G. mosseae</u> | 3 \pm 1 | 1 \pm 0.5 | 1 \pm 0.5 | 1.5 \pm 0.5 |
| E ₃ | 32 \pm 7 | 5 \pm 2 | 2 \pm 1 | 4.5 \pm 1 |
| No identificadas | 6 \pm 1 | 2 \pm 1 | 1.5 \pm 0.5 | 6 \pm 2 |

TABLA 4

Número y tipos de esporas en 50 g de suelo rizosférico de olivo (± Intervalo de confianza)

| Tipo de espora | Diciembre | Marzo | Junio | Septiembre |
|-------------------|-----------|-----------|--------|------------|
| <u>G. mosseae</u> | 1 ± 0.5 | 1.5 ± 0.5 | 8 ± 2 | 23 ± 4 |
| E ₃ | 1 ± 1 | 4 ± 2.5 | 12 ± 4 | 35 ± 7 |
| White reticulate | 1 ± 0.5 | 2 ± 1.5 | 5 ± 2 | 49 ± 9 |
| No identificadas | 1 ± 0.5 | 3 ± 1 | 5 ± 1 | 1.5 ± 0.5 |

ESTUDIOS DE INVERNADERO: ENSAYOS ESPECIFICOS

1. Experiencia preliminar

Como muestran los resultados que se recogen en la Tabla 5 las plántulas de olivo y almendro se micorriza de manera efectiva con G. mosseae. El índice de colonización de las raíces de estas plantas es elevado. Sin embargo, el naranjo apenas se infecta con este hongo VA, por lo que no se producen efectos significativos sobre el crecimiento.

TABLA 5

Investigación de la capacidad de formar micorrizas VA por plantas de almendro olivo y naranjo en condiciones controladas.

| Plantas y tratamientos | Peso seco (g) (Parte aérea) | % de micorrización |
|------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| Olivo | | |
| Control | 1.2a | - |
| <u>G. mosseae</u> | 2.1b | 89 |
| Almendro | | |
| Control | 0.67a | - |
| <u>G. mosseae</u> | 1.33b | 73 |
| Naranjo | | |
| Control | 0.33a | - |
| <u>G. mosseae</u> | 0.42a | 2 |

2. Influencia de la adición de fosfato sobre la infectividad de *G. mosseae* en citrus.

La escasa infectividad de *G. mosseae* en naranjo indujo a pensar en la posibilidad de que fuera necesaria la adición de una cierta cantidad de fosfato para que las plantas iniciaran el crecimiento y posteriormente se pudiera producir su micorrización. Los resultados de la Tabla 6 indican que las plantas de naranjo no responde a la adición de P ni se micorrizan adecuadamente con *G. mosseae*. Sin embargo, los valores de infección son algo mayores que los de la Tabla 5, posiblemente debido a que las plantas se mantuvieron en invernadero 1 mes más en el ensayo de Tabla 6 que en el de Tabla 5.

TABLA 6

Efecto de la adición de fosfato sobre la infectividad de G. mosseae en naranjo

| Tratamientos | | Peso seco | % de |
|-------------------|-----------------------------|----------------------|---------------|
| Micorrizas | Fosfato (kg P/ha equiv.) | (g) (Parte aérea) | micorrización |
| Control | 0 | 0.3a | - |
| | 75 | 0.3a | - |
| | 150 | 0.4a | - |
| <u>G. mosseae</u> | 0 | 0.5a | 12a |
| | 75 | 0.6a | 12a |
| | 150 | 0.7a | 15a |

3. Influencia del tipo de inóculo sobre la infectividad de G. mosseae en naranjo.

Como se aprecia en los resultados que se resumen en Tabla 7 cuando se fuerza el potencial del inóculo de G. mosseae tampoco se logra la infección de naranjo ya que no se producen diferencias significativas sobre el crecimiento con respecto al control. Teniendo en cuenta que esta especie de hongo se considera bastante infectiva, no sólo en plantas herbáceas sino también en arbóreas, se sospechó la posibilidad de que el patrón de naranjo utilizado presentara algún efecto tóxico para este hongo VA.

TABLA 7

Efecto del tipo de inóculo sobre la infectividad de G. mosseae en naranjo.

| Tratamientos | Peso seco (g) (Parte aérea) | % de micorrización |
|----------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| Control | 0.2a | - |
| 20 esporocarpos/ planta | 0.7a | 4.6 |
| 150 esporas/ planta | 0.3a | - |
| Raíces muy micorrizadas | 0.6a | 12 |

4. Investigación de un posible efecto tóxico de naranjo sobre el desarrollo de G. mosseae.

Los resultados de este ensayo, se recogen en la Tabla 8. Tanto en suelo M-L como en suelo 8 la alfalfa se micorri-za y responde al efecto de esta simbiosis, de forma similar en presencia o en ausencia de las plantas de naranjo. Ello indica claramente que el naranjo no ejerce influencia alguna sobre el potencial de G. mosseae en el suelo.

TABLA 8

Investigación de un posible efecto tóxico del naranjo sobre G. mosseae utilizando alfalfa como planta indicadora.

| Suelo | Presencia de naranjo | Datos correspondientes a alfalfa | | |
|-------|----------------------|----------------------------------|--------|-------------------|
| | | Peso seco (g) | % MVA | % P (Parte aérea) |
| nº 8 | - | 0.38a | 70.1a | 0.25a |
| | + | 0.41a | 70.5a | 0.26a |
| ML | - | 0.78b | 68.06b | 0.31b |
| | + | 0.75b | 70.1b | 0.32b |

5. Intento de micorrización del naranjo utilizando el potencial de micorrización natural del suelo.

Los datos que se resumen en la Tabla 9 indican que los hongos VA naturalmente presentes en el suelo M-L provocan una abundante colonización de las raíces de naranjo, y consecuentemente, una respuesta en estimulación del crecimiento y concentración del P en hoja. Es de destacar que el fosfato soluble adicionado no interfiere el proceso de micorrización.

Los resultados de las Tablas 5, 6, 7,8 y 9, en su conjunto, indican un cierto grado de especificidad entre los hongos VA y el naranjo.

TABLA 9

Efectos del potencial natural de micorrizas del suelo sobre la infección del naranjo, en presencia de distintas cantidades de fosfato.

| Micorrizas | Tratamientos Fosfato (kgP/ha) | Peso seco (Parte aérea) (g) | % P (Parte aérea) | % de micorrización |
|-------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------|--------------------|
| Control | 0 | 0.35a | 0.01a | - |
| | 75 | 0.30a | 0.03a | - |
| | 150 | 0.28a | 0.04a | - |
| <u>G. mosseae</u> | 0 | 0.37a | 0.02a | 5a |
| | 75 | 0.39a | 0.05a | 5a |
| | 150 | 0.40a | 0.04a | 3a |
| Naturales | 0 | 1.38b | 0.14b | 73b |
| | 75 | 1.47b | 0.14b | 72b |
| | 150 | 1.94b | 0.14b | 79b |

6. Investigación de un posible efecto tóxico del suelo, inducido por la esterilización sobre la formación de MVA en naranjo.

La Tabla 10 muestra que la inoculación con Glomus sp. (N) en suelo previamente esterilizado no impide la infección del naranjo por esta especie de endofito; como consecuencia, se observa un buen crecimiento de las plántulas, buen porcentaje de infección y concentración de fósforo en hoja. No existen diferencias significativas entre la respuesta de los ensayos crecidos en suelo estéril y no estéril. Por el contrario los naranjos inoculados con G. mosseae en suelo estéril presentan bajo crecimiento, concentraciones de fósforo foliar y porcentaje de infección radical. Es obvio que en suelo no estéril el tratamiento con G. mosseae se practicaba en presencia de los hongos VA naturales, que son infectivos.

TABLA 10

Investigación de un posible efecto tóxico del suelo, inducido por la esterilización, sobre la infectividad de los hongos VA en naranjo.

| Tratamientos | Peso seco (g) (Parte aérea) | % P (P. aérea) | % de micorrización |
|-----------------------|--------------------------------|-------------------|-----------------------|
| <u>Suelo esteril</u> | | | |
| Control | 0.27a | 0.04a | - |
| <u>G. mosseae</u> | 0.64b | 0.07b | 22a |
| <u>Glomus</u> sp. (N) | 2.13c | 0.11c | 81b |
| <u>Suelo natural</u> | | | |
| Control | 2.00c | 0.10c | 85b |
| <u>G. mosseae</u> | 2.38c | 0.11c | 85b |
| <u>Glomus</u> sp. (N) | 2.75c | 0.11c | 84b |

7. Dilución del inóculo bruto de *Glomus* sp. (nativo) sobre la micorrización del naranjo en suelo estéril.

Al ser el inóculo de *Glomus* sp. (N) muy rico en densidad de esporas, surge la duda de que no sea comparable con el inóculo de *G. mosseae*, bastante más pobre en esporas.

La Tabla 11 muestra que un inóculo de *Glomus* sp. (N) en número de esporas comparable a los utilizados de *G. mosseae* y diluciones del mismo al 1/2 y 1/4, inducen incluso a la dilución más alta, un buen crecimiento de la planta, grado de micorrización y concentración de fosfato foliar en los naranjos. Se observa una disminución importante de la relación R/S en las plantas inoculadas en relación a los controles.

TABLA 11

Efecto de la dilución del inóculo bruto nativo (Glomus sp. -N-) sobre la micorrización del naranjo en suelo esterilizado.

| Tratamientos (Dilución inóculo) | Peso seco (g) (Parte aérea) | % P (Parte aérea) | R/S | % de micorrización |
|------------------------------------|--------------------------------|----------------------|------|-----------------------|
| Control | 0.19a | 0.04a | 1.6a | - |
| 1 | 3.02b | 0.09b | 0.6b | 88a |
| 1/2 | 2.91b | 0.1b | 0.6b | 84a |
| 1/4 | 2.49b | 0.1b | 0.6b | 75a |

8. Micorrización de naranjo por *G. mosseae* en plantación simultánea con alfalfa.

En un intento de forzar el potencial infectivo de un suelo sobre la base de *G. mosseae* se desarrolló el ensayo apropiado. La Tabla 12 muestra el escaso desarrollo y bajo porcentaje de infección y contenido de fosfato foliar de los naranjos, a pesar de que crecieron en un suelo con alto contenido de raíces de alfalfa muy bien micorrizadas con *G. mosseae*, lo que implica que este suelo poseía un potencial infectivo muy elevado, para cualquier planta susceptible.

TABLA 12

Intento de micorrización de naranjo en plantación simultánea con alfalfa fuertemente micorrizada con G. mosseae.

| Tiempo de corte | Suelo | Peso seco (g) Parte aérea | % de P | % de MVA |
|-----------------|-------|------------------------------|--------|----------|
| 4 meses | 8 | 0.19a | 0.05 | 1.07a |
| | ML | 0.17a | 0.04 | 0.59a |
| 11 meses | 8 | 0.30b | 0.04 | 0.42a |
| | ML | 1.44c | 0.045 | 11.70b |

9. Infectividad de G. mosseae utilizando otro patrón de naranjo.

Puesto que la especificidad a las MVA en frutales ha sido asociada a las manipulaciones en los patrones empleados, la infectividad de G. mosseae sobre el naranjo se estudió utilizando otro patrón de citrus.

Los datos de la Tabla 13 muestran cierto incremento en el porcentaje de infección radical y contenido en fosfato foliar como consecuencia de la inoculación con G. mosseae; sin embargo, la efectividad de Glomus sp. (N) es muy superior como se pone de manifiesto por el mayor porcentaje de fosfato foliar, micorrización y peso seco de la parte aérea. Se observa también una clara disminución de la relación R/S en las plantas inoculadas con Glomus sp. (N), como corresponde a un proceso de micorrización efectivo.

TABLA 13

Estudio de la infectividad de G. mosseae utilizando otro patrón de naranjo.

| Hongo VA inoculado | Peso seco (g) (parte aérea) | R/S | % P | % MVA |
|-----------------------|-----------------------------------|------|-------|-------|
| Control | 0.2a | 1.9a | 0.04a | - |
| <u>G. mosseae</u> | 1.1b | 1.1b | 0.07b | 16 |
| <u>Glomus</u> sp. -N- | 3.1c | 0.6c | 0.09c | 89 |

10. Selección de hongos VA para almendro, naranjo y olivo.

Los resultados que permitieron la selección del hongo más efectivo en los tres cultivos se muestran en las Tablas 14 y 19, inclusives.

Las Tablas 14 y 15 corresponden a almendro y muestran que Glomus sp. (N), G. mosseae y G. fasciculatus son efectivos para esta planta. Con escasas diferencias, en la mayoría de los casos no significativas, Glomus sp. (N) parece superar a los restantes en el binomio infectividad-efectividad. En el caso del naranjo (Tablas 16 y 17) Glomus sp. (N) y G. fasciculatus poseen una eficacia similar, con ligera ventaja a favor del primero. Glomus sp. (N), G. fasciculatus y G. mosseae son de parecida eficacia para el olivo (Tablas 18 y 19), con ligera ventaja en este caso para G. mosseae.

Analizando todo el ensayo de selección en su conjunto, y teniendo en cuenta la adaptación ecológica de Glomus sp. (N) a las condiciones locales, se decidió la selección de este para ser usado con cualquiera de los tres cultivos y así uniformar y simplificar la obtención de inóculos de MVA para las plantas arbóreas en estudio.

TABLA 14

Selección de hongos VA para la micorrización de plantas de almendro según sus efectos sobre el crecimiento vegetal.

| Hongo VA inoculado | Peso seco (g) (Parte aérea) | R/S | % de micorrización |
|------------------------|--------------------------------|------|--------------------|
| Control | 0.50a | 2.3a | - |
| <u>Glomus sp.</u> (N) | 4.17b | 1.5b | 84a |
| <u>G. mosseae</u> | 3.76bc | 1.3b | 58b |
| <u>G. fasciculatus</u> | 3.43c | 1.6b | 76ab |
| <u>G. macrocarpus</u> | 0.83d | 1.7b | 35c |

TABLA 15

Selección de hongos VA para la micorrización de plantas de almendro según sus efectos sobre la absorción de nutrientes por el vegetal.

| Hongo VA inoculado | Concentración (%) hoja | | |
|------------------------|------------------------|-------|-------|
| | N | P | K |
| Control | 1.83a | 0.05a | 0.87a |
| <u>Glomus</u> sp. (N) | 2.52b | 0.14b | 1.75b |
| <u>G. mosseae</u> | 2.49b | 0.12b | 1.62b |
| <u>G. fasciculatus</u> | 2.35b | 0.12b | 1.45b |
| <u>G. macrocarpus</u> | 2.02a | 0.05a | 1.10c |

TABLA 16

Selección de hongos VA para la micorrización de plantas de naranjo según sus efectos sobre el crecimiento vegetal.

| Hongo VA inoculado | Peso seco (g) Parte aérea | R/S | % de micorrización |
|------------------------|---------------------------|------|--------------------|
| Control | 0.36a | 1.3a | - |
| <u>Glomus sp.</u> (N) | 2.59b | 0.7b | 88a |
| <u>G. mosseae</u> | 0.55a | 1.1a | 2b |
| <u>G. fasciculatus</u> | 2.11b | 0.7b | 82a |
| <u>G. macrocarpus</u> | 0.49a | 1.2a | - |

TABLA 17

Selección de hongos VA para la micorrización de plantas de naranjo según sus efectos sobre la absorción de nutrientes por el vegetal.

| Hongo VA inoculado | Concentración (%) hoja | | |
|------------------------|------------------------|-------|-------|
| | N | P | K |
| Control | 4.76a | 0.04a | 2.01a |
| <u>Glomus</u> sp. (N) | 1.47b | 0.13b | 1.78b |
| <u>G. mosseae</u> | 4.45a | 0.04a | 2.22a |
| <u>G. fasciculatus</u> | 1.57b | 0.12b | 1.65b |
| <u>G. macrocarpus</u> | 2.50c | 0.03a | 1.74b |

TABLA 18

Selección de hongos VA para la micorrización de plantas de olivo según sus efectos sobre el crecimiento vegetal.

| Hongo VA inoculado | Peso seco (g) | | | Longitud brotes (cm) | % de MVA |
|------------------------|---------------|-------|------------|----------------------------|-------------|
| | Brotes | Hojas | Estaquilla | | |
| Control | 1.29a | 1.16a | 1.65a | 18a | - |
| <u>Glomus sp.</u> (N) | 3.58b | 2.88b | 2.91b | 43b | 70a |
| <u>G. mosseae</u> | 4.35b | 3.28b | 3.27b | 51b | 73a |
| <u>G. fasciculatus</u> | 3.46b | 2.81b | 2.08a | 35c | 81a |
| <u>G. macrocarpus</u> | 1.09a | 0.97a | 1.80a | 18a | 11b |

TABLA 19

Selección de hongos VA para la micorrización de plantas de olivo según sus efectos sobre la absorción de nutrientes por el vegetal.

| Hongo VA inoculado | Concentración (%) hoja | | |
|------------------------|------------------------|-------|-------|
| | N | P | K |
| Control | 0.97a | 0.03a | 0.61a |
| <u>Glomus</u> sp. (N) | 1.29b | 0.07b | 0.88b |
| <u>G. mosseae</u> | 1.30b | 0.07b | 1.03b |
| <u>G. fasciculatus</u> | 1.34b | 0.07b | 0.93b |
| <u>G. macrocarpus</u> | 1.26b | 0.04a | 0.63a |

11. Interacción de los hongos VA y fosfato soluble sobre el crecimiento nutrición y micorrización de almendro, naranjo y olivo. Estudio del grado de Dependencia Relativa a las Micorrizas (DRM) de estas plantas.

Ya seleccionado Glomus sp. (N), su efectividad debe ser matizada de acuerdo con su comportamiento en algunas interacciones conocidas por su repercusión en la formación y efecto de las MVA. Una de estas interacciones es la que se produce con aplicación de fosfato soluble. El resultado de tales interacciones se expone en las Tablas 20 a 25, inclusives y Figuras 9 y 10.

En el caso del almendro (Tablas 20 y 21) en el estudio se introduce como contraste la inoculación de G. mosseae. La primera observación a constatar es que la "cosecha máxima" solo se obtiene en plantas micorrizadas. Es más, la dosis más efectiva de fosfato aplicada, no fué capaz de estimular significativamente el crecimiento de las plantas ni la captación de fosfato, fenómenos ambos que fueron significativamente afectados, de forma positiva, por la micorrización, tanto por Glomus sp. (N) como por G. mosseae. El efecto de estos, sin embargo, presentó ciertas disimilitudes. La más importante de ellas es la compati-

bilidad entre Glomus sp. (nativo) y el fertilizante mientras que este interfería con G. mosseae tanto a nivel de captación de P como de formación de la simbiosis.

La citada compatibilidad entre fertilizante fosforado y Glomus sp. (N) también se manifiesta en el caso del naranjo (Tablas 22 y 23), confirmándose, así mismo, su dependencia de las MVA para crecer y captar P. Es de hacer notar el incremento en la concentración de N y K en hojas de naranjo no micorrizado, con respecto a los que si lo están (Tabla 23). Se trata obviamente de una concentración de nutrientes provocada por la ausencia de crecimiento, al faltar el factor limitante, que es el P proporcionado por las MVA.

Dadas las peculiaridades de la captación de P por plantas de naranjo, se estudió la "curva de respuesta al P" utilizando incluso dosis de P soluble en la que sus valores más altos se sabe que son absolutamente excesivos. A pesar de ello, no se observó disminución significativa del crecimiento (Figura 9) e incluso la concentración foliar de P incrementaba, aunque muy amortiguadamente. Sin embargo, las dosis elevadas de P sí consiguieron hacer decrecer paulatinamente la micorrización (Figura 10).

Las Tablas 24 y 25 ponen de manifiesto la dificultad

del olivo para captar P y crecer cuando no está micorrizado. Igualmente se aprecia una compatibilidad entre fertilizantes fosforados y micorrizas así como la cooperación de ambos sistemas de aportar P a la planta. Es de hacer notar el efecto de la micorriza en la estimulación del crecimiento de nuevos brotes sobre la "estaquilla" de olivo.

TABLA 20

Interacción de las micorrizas VA y fosfato soluble sobre el crecimiento y micorrización de plantas de almendro.

| <u>Tratamientos</u> | | | | | |
|-----------------------|-----------------------------|------------------------------|--------|-------------|--|
| Micorrizas | Fosfato (kg P/ha equiv.) | Peso seco (g) Parte aérea | R/S | % de MVA | |
| Control | 0 | 1.00a | 1.20a | - | |
| | 75 | 1.20a | 1.15a | - | |
| | 150 | 1.48a | 0.96ba | - | |
| <u>Glomus</u> sp. (N) | 0 | 1.99b | 0.89b | 51.8a | |
| | 75 | 2.52c | 0.68c | 59.8b | |
| | 150 | 2.99d | 0.56d | 63.1b | |
| <u>G. mosseae</u> | 0 | 1.93b | 0.71c | 53.1a | |
| | 75 | 2.10bc | 0.70c | 42.0c | |
| | 150 | 2.59cd | 0.61d | 38.9c | |

TABLA 21

Interacción de las micorrizas VA y fosfato soluble sobre la concentración foliar de nutrientes en plantas de almendro.

| Micorrizas | Tratamientos | | Concentración (%) | | |
|-----------------------|-----------------------------|--|-------------------|-------|--------|
| | Fosfato (kg P/ha equiv.) | | N | P | K |
| Control | 0 | | 2.10a | 0.08a | 1.72a |
| | 75 | | 2.45b | 0.11a | 2.10b |
| | 150 | | 2.50b | 0.11a | 2.10b |
| <u>Glomus</u> sp. (N) | 0 | | 3.90c | 0.25b | 2.20b |
| | 75 | | 2.70b | 0.34c | 2.27bc |
| | 150 | | 2.22a | 0.34c | 2.28c |
| <u>G. mosseae</u> | 0 | | 3.37d | 0.24b | 2.12b |
| | 75 | | 2.59b | 0.21b | 2.18b |
| | 150 | | 2.25a | 0.19d | 2.22b |

TABLA 22

Interacción de las micorrizas VA y fosfato soluble sobre el crecimiento y micorrización de plantas de naranjo.

| <u>Tratamientos</u> | | | | |
|-----------------------|-----------------------------|------------------------------|-------|-------------|
| Micorrizas | Fosfato (kg P/ha equiv.) | Peso seco (g) Parte aérea | R/S | % de MVA |
| Control | 0 | 0.31a | 2.49a | - |
| | 75 | 0.30a | 2.64a | - |
| | 150 | 0.28a | 2.59a | - |
| <u>Glomus</u> sp. (N) | 0 | 1.40b | 1.00b | 75b |
| | 75 | 1.47b | 0.92b | 73b |
| | 150 | 1.94b | 1.02b | 79b |

TABLA 23

Interacción de las micorrizas VA y fosfato soluble sobre la concentración foliar de nutrientes en plantas de naranjo.

| Micorrizas | Tratamientos | | Concentración (%) | | |
|----------------|-----------------------------|--|-------------------|-------|-------|
| | Fosfato (kg P/ha equiv.) | | N | P | K |
| Control | 0 | | 4.24a | 0.01a | 0.70a |
| | 75 | | 4.58a | 0.03a | 1.05b |
| | 150 | | 3.46a | 0.02a | 1.02b |
| Glomus sp. (N) | 0 | | 3.06b | 0.15b | 0.73a |
| | 75 | | 3.19b | 0.13b | 0.76a |
| | 150 | | 2.85b | 0.14b | 0.65a |

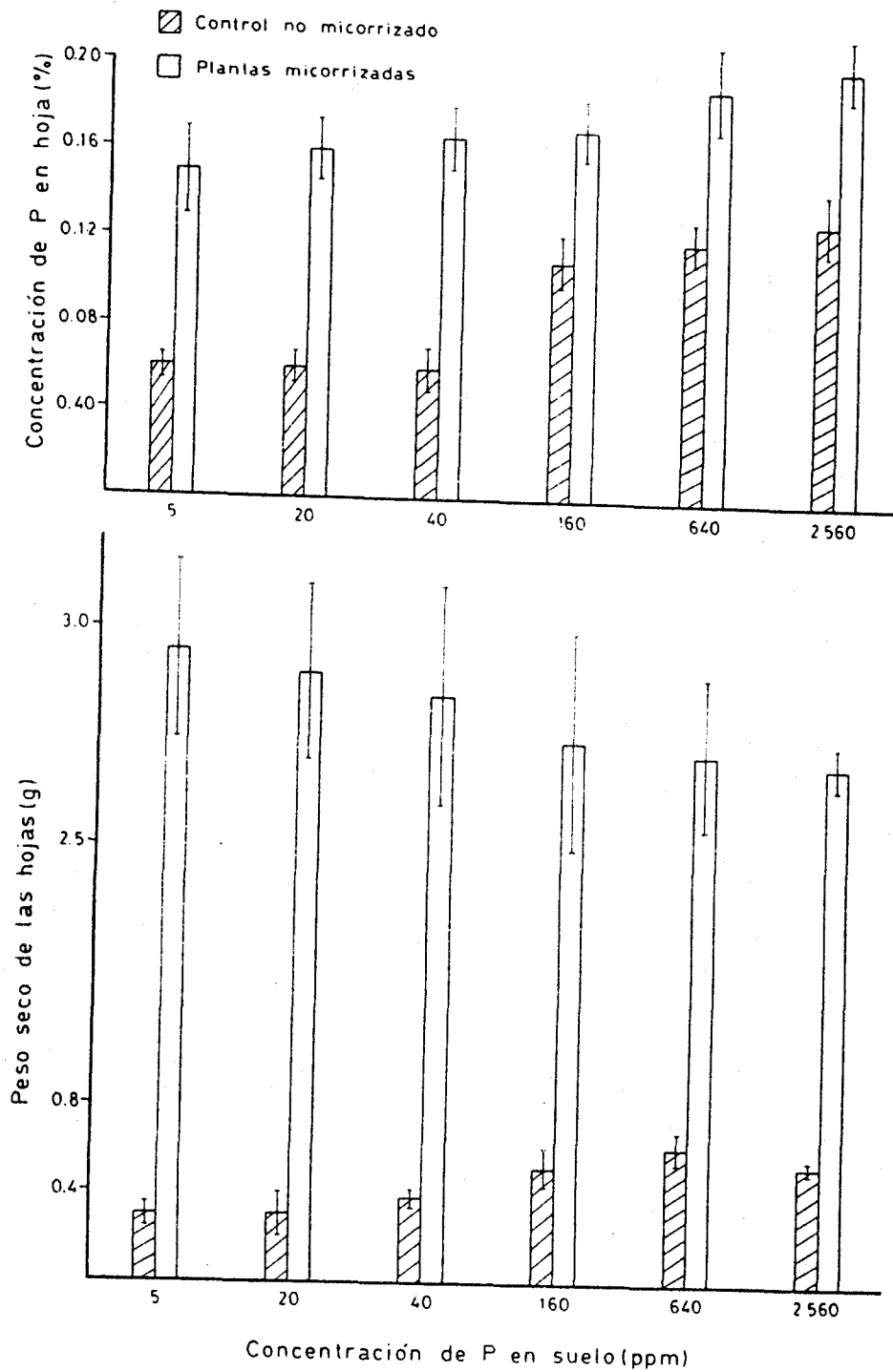


Figura 9

Efecto de dosis crecientes de P soluble añadido al suelo sobre el crecimiento y captación de P por naranjos micorrizados y no micorrizados.

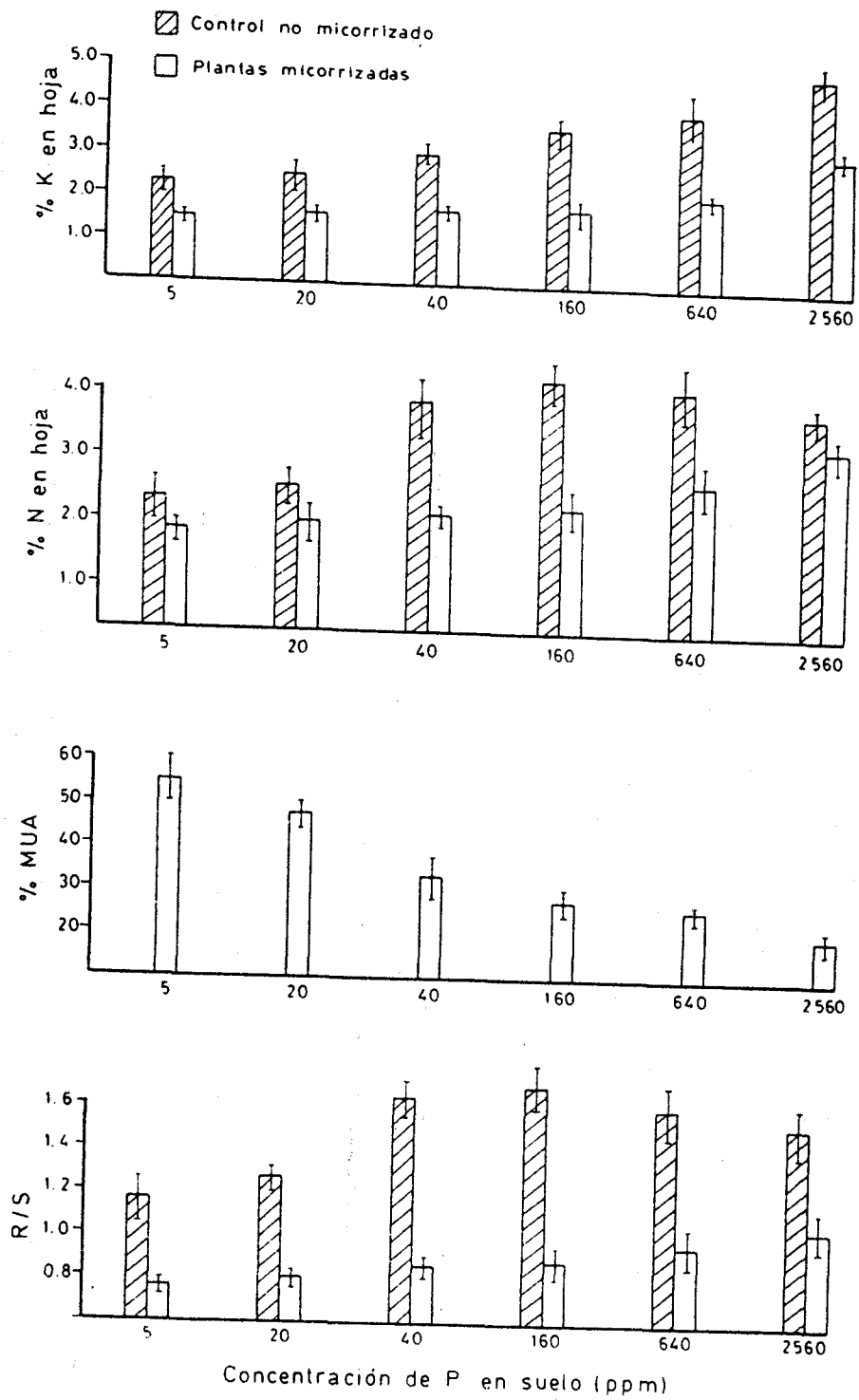


Figura 10

Efecto de dosis crecientes de P soluble añadido al suelo sobre la micorrización, relación R/S y captación de N y P por naranjos micorrizados y no micorrizados.

TABLA 24

Interacción de las micorrizas VA y fosfato soluble sobre el crecimiento y micorrización de plantas de olivo.

| Micorriza | Tratamientos | | Peso seco (g) | | | Longitud (cm) Brotos | % MVA |
|----------------------|-----------------------------|--|---------------|-------|------------|----------------------------|----------|
| | Fosfato (Kg P/ha equiv.) | | Brotos | Hoja | Estaquilla | | |
| Control | 0 | | 0.89a | 0.79a | 1.03a | 14.80a | - |
| | 75 | | 0.86a | 0.78a | 1.62a | 18.37b | - |
| | 150 | | 0.82a | 0.77a | 1.10a | 15.80 | - |
| <u>Glomus</u> sp.(N) | 0 | | 3.40b | 2.61b | 1.96b | 39.50c | 57.8a |
| | 75 | | 5.13c | 3.74c | 2.81c | 59.60d | 51.3a |
| | 150 | | 3.26b | 2.70b | 2.01b | 48.87c | 60.2a |

TABLA 25

Interacción de las micorrizas VA y fosfato soluble sobre la concentración foliar de nutrientes en plantas de olivo.

| Micorrizas | Tratamientos | | Concentración (%) | | |
|-----------------------|-----------------------------|--|-------------------|-------|-------|
| | Fosfato (kg P/ha equiv.) | | N | P | K |
| Control | 0 | | 1.14a | 0.05a | 0.95a |
| | 75 | | 1.13a | 0.05a | 0.70b |
| | 150 | | 1.14a | 0.05a | 0.70b |
| <u>Glomus</u> sp. (N) | 0 | | 1.33b | 0.11b | 1.03b |
| | 75 | | 0.97c | 0.09b | 1.06a |
| | 150 | | 1.17a | 0.10b | 0.98a |

La Tabla 26 muestra el Grado de Dependencia Relativa a las micorrizas (DRM), utilizando Glomus sp. (N) para los tres cultivos. Es evidente que las tres plantas poseen un elevado nivel de dependencia y que es afectado ligeramente por el contenido de P soluble en el medio.

El nivel de compatibilidad entre Glomus sp. (N) y P soluble, se aprecia claramente en la Tabla 26. Las MVA en olivo y almendro compatibilizan mejor con dosis intermedias de P y en el naranjo las acepta superiores.

TABLA 26

Grado de Dependencia Relativa a las Micorrizas (DRM) para las tres plantas estudiadas a tres niveles de P, usando como inóculo de referencia Glomus sp. -N-.

| Planta | Nivel de P kg P/ha equiv.. | DRM (%) |
|----------|-------------------------------|------------|
| Almendro | 0 | 49.7 |
| | 75 | 52.4 |
| | 150 | 50.5 |
| Olivo | 0 | 64.2 |
| | 75 | 68.8 |
| | 150 | 63.6 |
| Naranjo | 0 | 77.8 |
| | 75 | 79.6 |
| | 150 | 85.6 |

12. Interacción del fosfato de roca y los hongos VA sobre el crecimiento y micorrización de naranjo y olivo.

La posibilidad de aplicar un fosfato natural (de escasa solubilidad) con vista a una cooperación con Glomus sp. (N), en el aporte de P a la planta, fué investigada en estas dos arbóreas. En el caso del naranjo se ensayó así mismo la inoculación con bacterias "solubilizadoras" de fosfato (BSP). Los resultados de la Tabla 27 indican que el fosfato de roca no es fuente de P adecuada y que las BSP sólo muestran un efecto significativo sobre la concentración de P foliar, pero precisamente actuando sobre el P insoluble del suelo (Tratamiento -0-, sin P de roca).

Los efectos de la interacción de Glomus sp. (N) y fosfato de roca parecen de interés en el caso del olivo. Así en la Tabla 28 se observa un efecto positivo de la mencionada interacción sobre el desarrollo de esta planta. Concretamente existen diferencias significativas en cuanto al crecimiento de las plantas micorrizadas en respuesta a las diferentes dosis de fosfato de roca.

La Tabla 29 ofrece las concentraciones de nutrientes en hoja de olivo, siendo de destacar un efecto de dilución principalmente del fósforo, provocado posiblemente por el propio efecto sobre el crecimiento de las plántulas.

TABLA 27

Efecto del fosfato de roca sobre el crecimiento y micorrización de plantas de naranjo inoculadas con Glomus sp (N) y bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSP).

| Tratamiento | BSP | Peso seco Parte aérea (g) | % P | % de MVA |
|-------------|-----|---------------------------------|--------|----------|
| 0 | + | 3.32 a | 0.14 a | 94.2 a |
| | - | 3.29 a | 0.09 b | 94.5 a |
| 1 | + | 3.27 a | 0.13 a | 95.7 a |
| | - | 3.35 a | 0.12 a | 81.1 a |
| 10 | + | 3.10 a | 0.11 a | 88.1 a |
| | - | 3.20 a | 0.12 a | 91.3 a |

TABLA 28

Efecto de la interacción de los hongos VA y el fosfato de roca sobre el crecimiento y micorrización de plántulas de olivo.

| Tratamientos | | Peso seco (g) | | | Longitud brotes (cm) | % de MVA |
|-----------------------|-------------------------------|---------------|--------|------------|-------------------------|----------|
| Micorriza | fosfato de roca g/kg suelo | Brote | Hojas | Estaquilla | | |
| Control | 0 | 0.89 a | 0.79 a | 1.33 a | 14.80 a | - |
| | 1 | 0.88 a | 0.75 a | 1.30 a | 15.80 a | - |
| | 10 | 1.12 a | 1.01 a | 1.42 a | 15.10 a | - |
| <u>Glomus sp.</u> (N) | 0 | 3.40 b | 2.61 b | 1.96 a | 39.50 b | 57.85 |
| | 1 | 4.64 c | 3.43 c | 2.75 b | 47.37 bc | 67.57 |
| | 10 | 5.64 c | 4.15 d | 2.34 b | 57.62 c | 62.99 |

TABLA 29

Efecto de la interacción de los hongos VA y el fosfato de roca sobre la concentración de nutrientes en hoja de plantas de olivo.

| Tratamiento | | Concentración (%) | | |
|-----------------------|-------------------------------|-------------------|------|------|
| Micorriza | fosfato de roca g/kg suelo | N | P | K |
| Control | 0 | 1.15 | 0.07 | 0.95 |
| | 1 | 1.18 | 0.07 | 0.97 |
| | 10 | 1.32 | 0.06 | 0.91 |
| <u>Glomus sp.</u> (N) | 0 | 1.34 | 0.11 | 1.05 |
| | 1 | 1.25 | 0.06 | 0.93 |
| | 10 | 1.18 | 0.05 | 0.79 |

13. Ensayo para estudiar la necesidad de inocular en un determinado suelo utilizando como modelo Almendro-G. mosseae.

Los datos que se presentan en las Tablas 30 y 31 nos permiten conocer la necesidad de inocular plántulas de almendro tanto en el suelo M-L como en el n° 8, observándose como los endofitos del suelo M-L superan en efectividad y porcentaje de infección al introducido (G. mosseae), mientras que en el suelo n° 8 hay un sinergismo de los endofitos de este con G. mosseae, que resultó efectivo.

Con los datos de las Tablas 30 y 31 se elaboró la Tabla 32 donde se observa que en el suelo M-L los endofitos naturales presentan el mayor porcentaje de incremento sobre el control mientras que en el suelo n° 8 el mayor incremento lo produce la interacción de los endofitos nativos con G. mosseae.

TABLA 30

Interaction de G. mosseae con endofitos nativos del suelo M-L en el crecimiento y micorrización de plantas de almendro.

| Tratamiento | | Peso seco (g) Parte aérea | R/S | % de MVA |
|-------------------|-------------------|------------------------------|--------|-------------|
| Suelo | Micorriza | | | |
| <u>Estéril</u> | | | | |
| | Control | 0.67a | 1.26a | - |
| | <u>G. mosseae</u> | 1.16b | 0.88b | 73.1a |
| <u>No estéril</u> | | | | |
| | Control | 1.60 c | 0.72b | 78.5a |
| | <u>G. mosseae</u> | 1.21b | 0.62 b | 58.6b |

TABLA 31

Interacción de G. mosseae con endofitos naturales del suelo nº 8 en el crecimiento y micorrización de plantas de almendro.

| <u>Tratamiento</u> | | Peso seco (g) Parte aérea | R/S | % de MVA |
|--------------------|-------------------|------------------------------|-------|-------------|
| <u>Suelo</u> | <u>Micorriza</u> | | | |
| <u>Estéril</u> | | | | |
| | Control | 0.49a | 0.93a | - |
| | <u>G. mosseae</u> | 1.05b | 0.50b | 70.12a |
| <u>No estéril</u> | | | | |
| | Control | 1.00b | 0.61b | 74.78ab |
| | <u>G. mosseae</u> | 1.52c | 0.46c | 77.04b |

TABLA 32

Incrementos de crecimiento en plantas de almendro producidos por los endofitos del suelo, G. mosseae y la interacción de ambos (Referencias a Tablas 30 y 31).

| Suelo | % de incremento sobre control (no micorriza) | | |
|-------|--|-------------------|-------------|
| | Endofitos naturales | <u>G. mosseae</u> | Interacción |
| ML | 139 | 73 | 80 |
| 8 | 104 | 114 | 210 |

14. Efecto de inóculos mixtos de hongos VA, sobre el crecimiento, micorrización y nutrición de las plantas.

Los datos de las Tablas 33 y 34 permiten reafirmar la importancia que en el desarrollo del naranjo tienen los hongos VA Glomus sp. (N). No se obtienen ventajas, en cuanto a efecto sobre el crecimiento, de la inoculación conjunta de dicho hongo y G. mosseae.

Se observa también que la relación R/S de naranjos no micorrizados como los inoculados con G. mosseae es superior a los infectados con Glomus sp. (N), lo que confirma la efectividad de este hongo.

Las Tablas 35 y 36 muestran que tanto los endofitos G. mosseae como Glomus sp. (N) son efectivos en el desarrollo del olivo observándose una diferencia, si bien no significativa, a favor de G. mosseae. No hay tampoco efecto sobre el crecimiento en la inoculación conjunta de ambos endofitos.

TABLA 33

Efecto de la inoculación con mezcla de hongos VA sobre el crecimiento y micorrización de plantas de naranjo.

| Micorriza | Tratamiento | | Peso seco (g) Parte aérea | R/S | % de MVA |
|------------------------|----------------------------|--|------------------------------|-------|-------------|
| | g de inóculo por maceta | | | | |
| Control | - | | 0.20a | 1.30a | - |
| <u>G. mosseae</u> | 7.5 | | 0.27b | 1.55a | 5.7a |
| G. mosseae | 15 | | 0.35b | 1.20a | 7.5a |
| <u>Glomus</u> sp. (N) | 1 | | 2.05c | 0.49b | 77.2b |
| <u>G. mosseae</u> + | | | | | |
| <u>Glomus</u> sp. (N) | 7.5+1 | | 2.01c | 0.57b | 76.0b |
| <u>G. mosseae</u> + | | | | | |
| <u>Glomus</u> sp. (N) | 15+1 | | 1.96c | 0.54b | 73.4b |

TABLA 34

Efecto de la inoculación con mezcla de hongos VA, sobre la concentración de nutrientes foliares en plantas de naranjo.

| Micorriza | Tratamientos | | Concentración (%) | | |
|------------------------|--------------------|--|-------------------|-------|-------|
| | (g) inóculo maceta | | N | P | K |
| Control | - | | 4.84a | 0.04a | 2.14a |
| <u>G. mosseae</u> | 7.5 | | 4.32a | 0.05a | 2.33a |
| <u>G. mosseae</u> | 15 | | 4.42a | 0.05a | 2.20a |
| <u>Glomus</u> sp. (N) | 1 | | 1.95b | 0.15b | 1.42b |
| <u>G. mosseae</u> + | | | | | |
| <u>Glomus</u> sp. (N) | 7.5+1 | | 1.67b | 0.16b | 1.61b |
| <u>G. mosseae</u> + | | | | | |
| <u>Glomus</u> sp. (N) | 15+1 | | 1.78b | 0.17b | 1.54b |

TABLA 35

Efecto de la inoculación con mezcla de hongos VA sobre el crecimiento y micorrización de plántulas de olivo.

| Hongo VA inoculado | Peso seco (g) | | | Longitud Brotos (cm) | % de MVA |
|----------------------------|---------------|-------|------------|----------------------------|-------------|
| | Brote | Hojas | Estaquilla | | |
| Control | 1.29a | 1.16a | 1.65a | 17.90a | - |
| <u>Glomus</u> sp. (N) | 3.65b | 2.72b | 1.89a | 43.75b | 71.28a |
| <u>G. mosseae</u> | 4.35b | 3.28b | 3.27b | 51.06b | 73.51a |
| <u>Glomus</u> sp. (N) + | | | | | |
| <u>G. mosseae</u> | 4.21b | 3.39c | 3.14b | 56.37b | 76.60a |

TABLA 36

Efecto de la inoculación con mezcla de hongos VA, sobre la concentración de nutrientes en hoja de plantas de olivo.

| Hongo VA inoculado | Concentración (%) | | |
|------------------------|-------------------|-------|-------|
| | N | P | K |
| Control | 0.93a | 0.03a | 0.61a |
| <u>Glomus</u> sp. (N) | 1.47b | 0.05b | 0.91b |
| <u>G. mosseae</u> | 1.30b | 0.07b | 1.03b |
| <u>G. mosseae</u> + | | | |
| <u>Glomus</u> sp. (N) | 1.10c | 0.05b | 0.92b |

15. Efecto del AIA y los hongos VA en el enraizamiento y desarrollo de estaquillas de olivo.

La Tabla 37 muestra el efecto positivo que tanto los hongos VA como el AIA tienen sobre el enraizamiento de estaquillas de olivo, y como la interacción de ambos factores resulta claramente positiva.

En cuanto al desarrollo posterior de estas plantas enraizadas las Tablas 37 y 38 ofrecen el efecto altamente positivo de los hongos VA. El AIA estimula ligeramente la micorrización, aunque no de forma significativa.

TABLA 37

Efecto del AIA y hongos VA sobre enraizamientos y desarrollo de estaquillas de olivo (1).

| Suelo | Tratamiento | | Nº de repeticiones | Nº de enraizados | Peso seco (g) del brote | R/S | % de MVA |
|------------|-------------------|-----|--------------------|------------------|-------------------------|-------|----------|
| | Micorriza | AIA | | | | | |
| Estéril | | | | | | | |
| | Control | - | 7 | - | - | - | - |
| | Control | + | 7 | 4a | 1.1a | 0.26a | - |
| | <u>G. mosseae</u> | - | 7 | 4a | 2.1b | 0.16b | 90a |
| | <u>G. mosseae</u> | + | 7 | 7b | 2.6b | 0.18b | 93a |
| No estéril | | | | | | | |
| | Hongos VA (N) | - | 7 | 3a | 2.5b | 0.18b | 84a |
| | Hongos VA (N) | + | 7 | 7b | 2.3b | 0.18b | 92a |

(1) Olivo "lechín".

TABLA 38

Efecto del AIA y hongos VA sobre la concentración de nutrientes foliares en el olivo (1).

| Suelo | Tratamiento | | Concentración | | % |
|------------|-------------------|-----|---------------|--------|-------|
| | Micorriza | AIA | N | P | |
| Estéril | | | | | |
| | Control | + | 2.61a | 0.015a | 0.97a |
| | <u>G. mosseae</u> | - | 4.74b | 0.05b | 1.04a |
| | <u>G. mosseae</u> | + | 4.77b | 0.04b | 1.07a |
| No estéril | | | | | |
| | Hongos VA (N) | - | 4.55b | 0.04b | 0.99a |
| | Hongos VA (N) | + | 4.31b | 0.04b | 0.99a |

(1) Olivo "lechin".

16. Efecto de los extractos de raíz de naranjo micorrizada con *Glomus* sp. (N) sobre la infectividad de *G. mosseae* en esta planta.

Se trata de un intento más para investigar las causas de la no infectividad de *G. mosseae* en naranjo, pensando en que en la raíz bien micorrizada con *Glomus* sp.(N) se hubieran producido determinados compuestos relacionados con la penetrabilidad de los hongos VA en raíces de naranjo.

La Tabla 39 pone de manifiesto que los extractos radicales de naranjos infectados con *Glomus* sp. (N) no influyen en el proceso de micorrización del naranjo por *G. mosseae*.

TABLA 39

Influencia de extractos radicales de naranjo inoculado con Glomus sp. (N) sobre la micorrización de esta planta por G. mosseae.

| Micorrizas | Tratamientos | | Peso seco (g) Parte aérea | R/S | % de MVA | % P |
|-------------------|-------------------------------------|--|------------------------------|-------|-------------|------|
| | Extractos [*] radicales | | | | | |
| Control | + | | 0.22a | 1.97a | - | 0.04 |
| | - | | 0.29a | 1.39a | - | 0.04 |
| <u>G. mosseae</u> | + | | 0.26a | 1.74a | 0.97a | 0.04 |
| | - | | 0.23a | 2.00a | 1.35a | 0.04 |

* (+) Presencia

(-) Ausencia

17. Elaboración de las "curvas" de micorrización y crecimiento en el almendro, naranjo y olivo.

Los resultados de la dinámica del proceso infectivo de Glomus sp. (N) en los tres cultivos se indican en las Figuras 11 a 15, inclusives. Las tres plántulas presentan curvas típicas sigmoidales.

Las mencionadas Figuras ofrecen también la respuesta al crecimiento de estas plántulas observándose que para iniciarse el crecimiento se debe antes alcanzar un buen porcentaje de infección radical que coincide también con una subida en la concentración de nutrientes foliares principalmente fósforo.

Con los resultados de las Figuras anteriores se elaboró la Tabla 40 que muestra el tiempo en el que las plántulas alcanzan un elevado porcentaje de infección radical y el momento en el que se inician diferencias de crecimiento entre controles y plantas micorrizadas. Esto es necesario para decidir cuando llevar las plántulas a campo para desarrollar los llamados "ensayos de vivero".

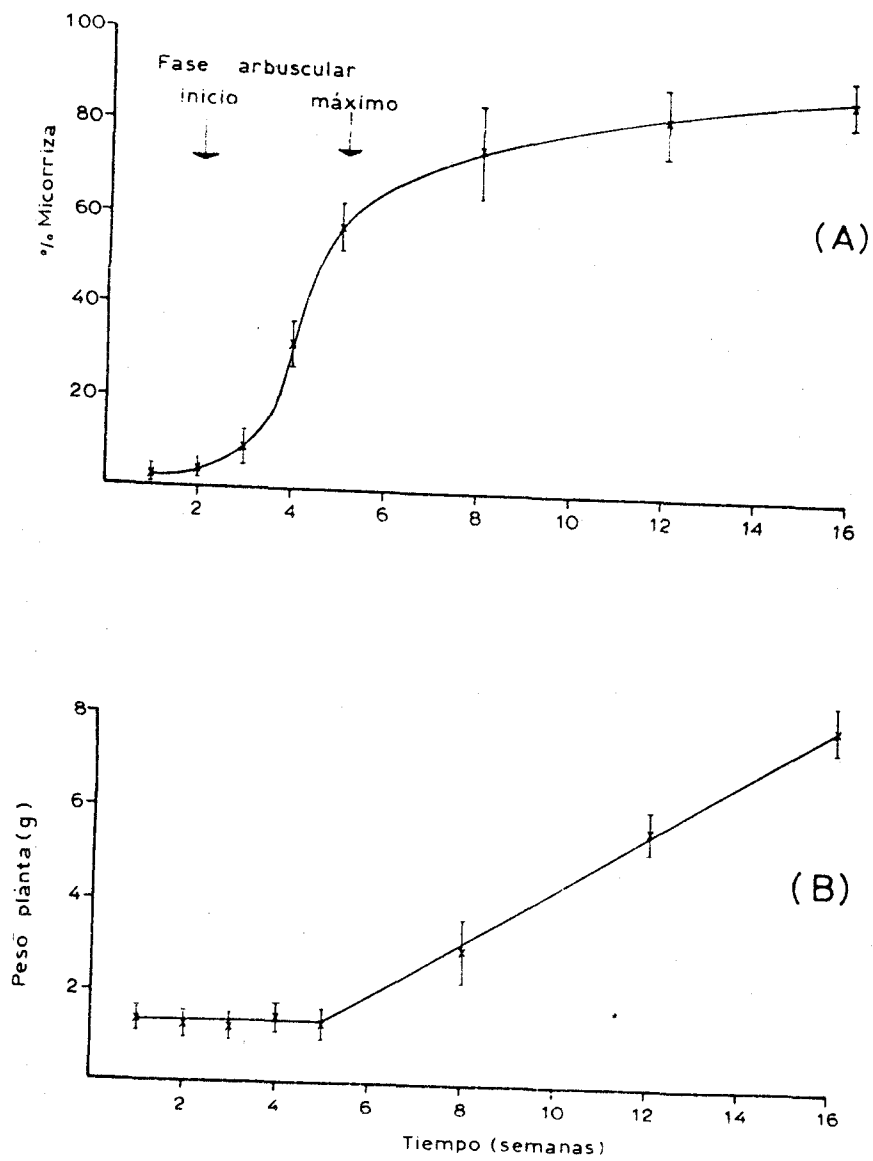


Figura 11

Evolución de la micorrización (A) y crecimiento (B) del almendro a lo largo del tiempo.

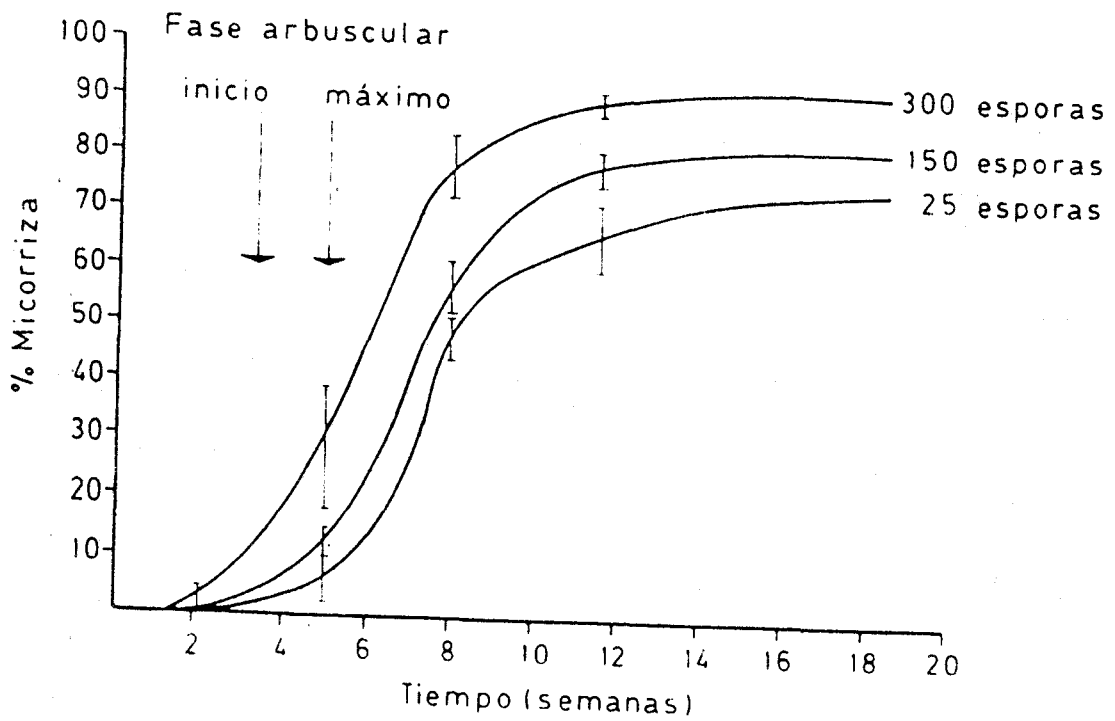


Figura 12

Evolución de la micorrización del naranjo a lo largo del tiempo según la riqueza del inóculo (*Glomus* sp. -N-).

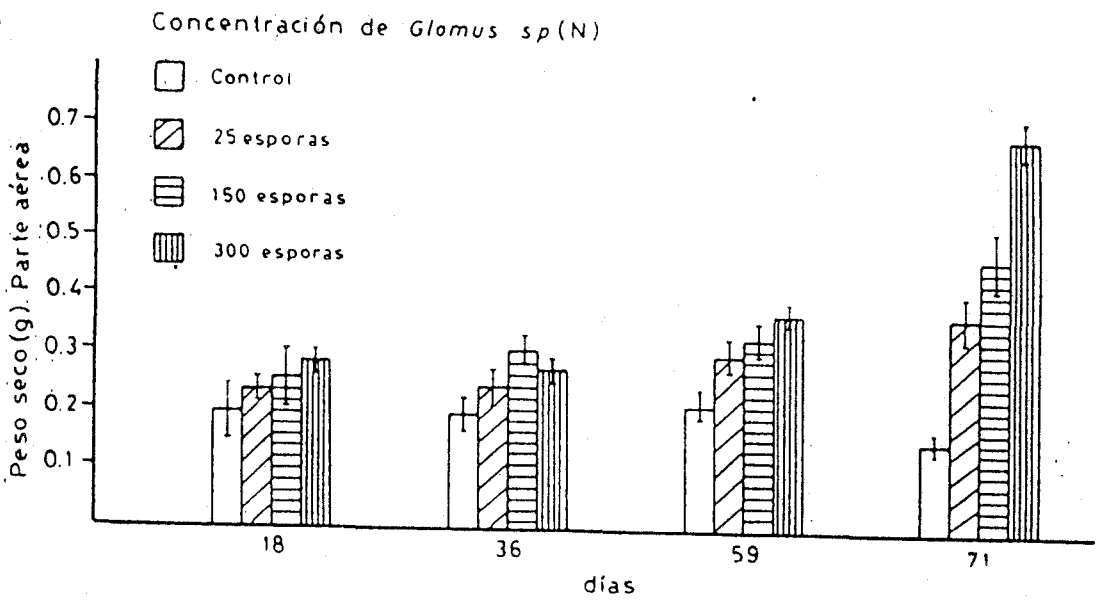


Figura 13

Evolución del crecimiento del naranjo micorrizado a lo largo del tiempo, según la riqueza del inóculo (*Glomus sp.* -N-).

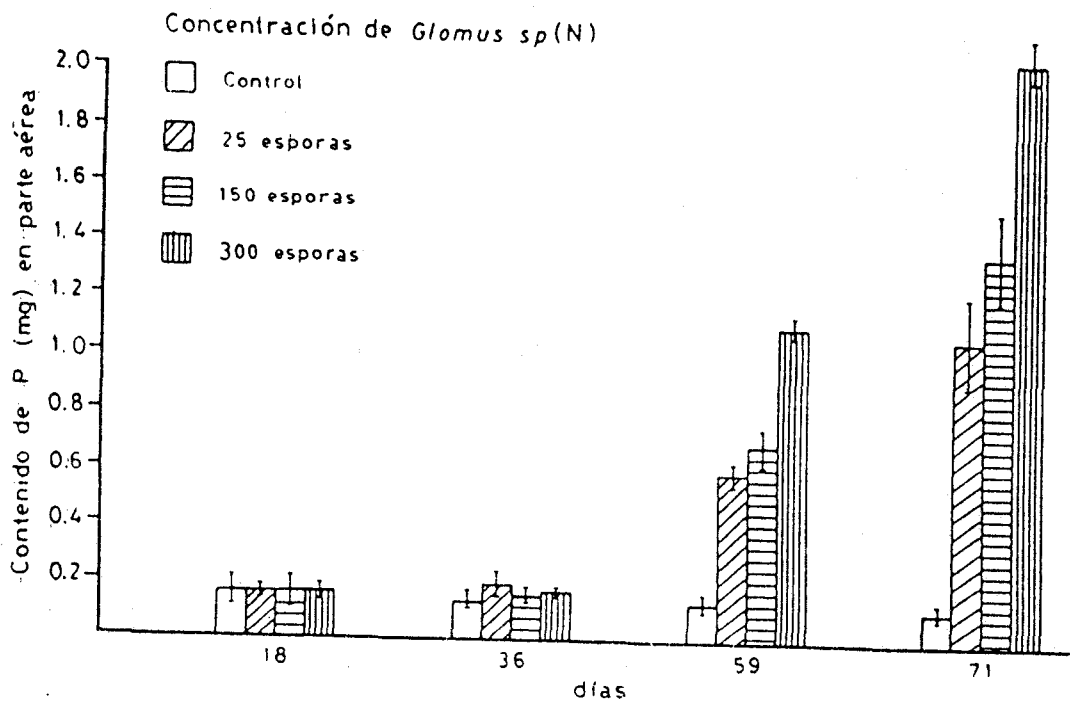


Figura 14

Evolución del contenido de P en hojas de naranjo micorrizado a lo largo del tiempo, según la riqueza del inóculo (*Glomus sp.* -N-).

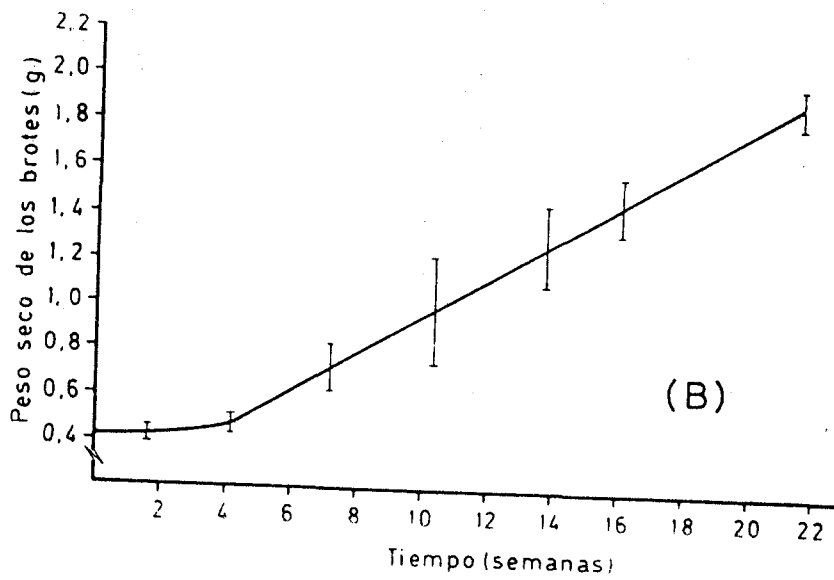
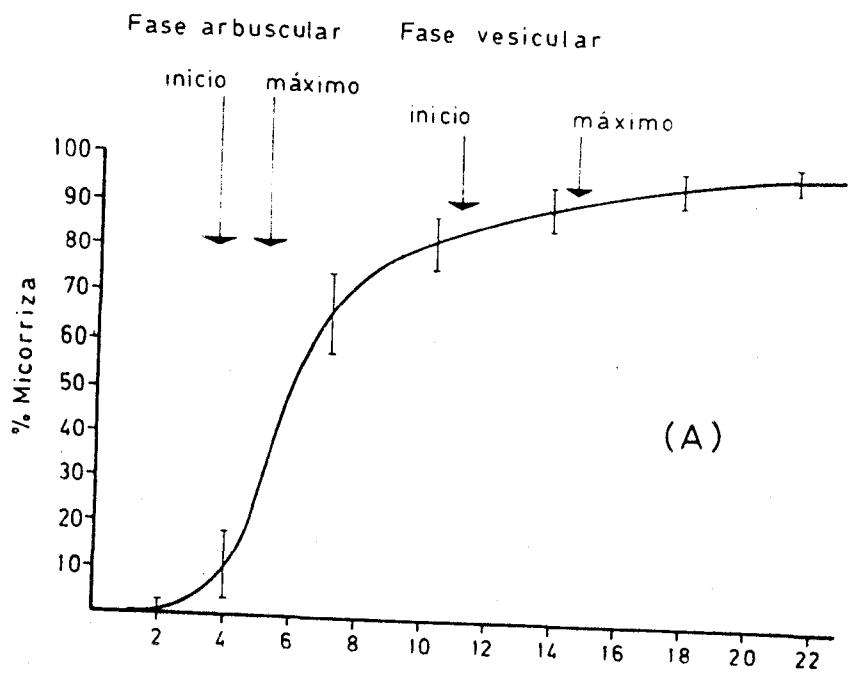


Figura 15

Evolución de la micorrización (A) y crecimiento (B) del olivo a lo largo del tiempo.

TABLA 40

Elección del tiempo adecuado para transplante a campo de las plántulas micorrizadas y controles producidas en condiciones de invernadero

| Criterio | Naranja | Plantas | | Almendra |
|--|---------|---------|---------------------|----------|
| | | Gordal | Olivo Manzanillo | |
| | | (Días) | | |
| Tiempo al que se alcanza un 70 % de MVA | 67 | 72 | 55 | 50 |
| Tiempo al cual se comienzan a apreciar diferencias macroscópicas entre plantas micorrizadas y controles en invernadero | 60 | 60 | 40 | 40 |

ENSAYOS EN VIVERO

Las Figuras 16, 17 y 18 nos muestran el efecto de las micorrizas VA en el desarrollo de plántulas de vivero.

Los distintos parámetros estudiados de crecimiento y supervivencia al trasplante indican un efecto beneficioso de la micorrización dirigida, incluso en presencia de los endofitos VA naturalmente existentes en el suelo del vivero.

ENSAYO EN VIVERO

C = Plantas control
M = " micorrizadas

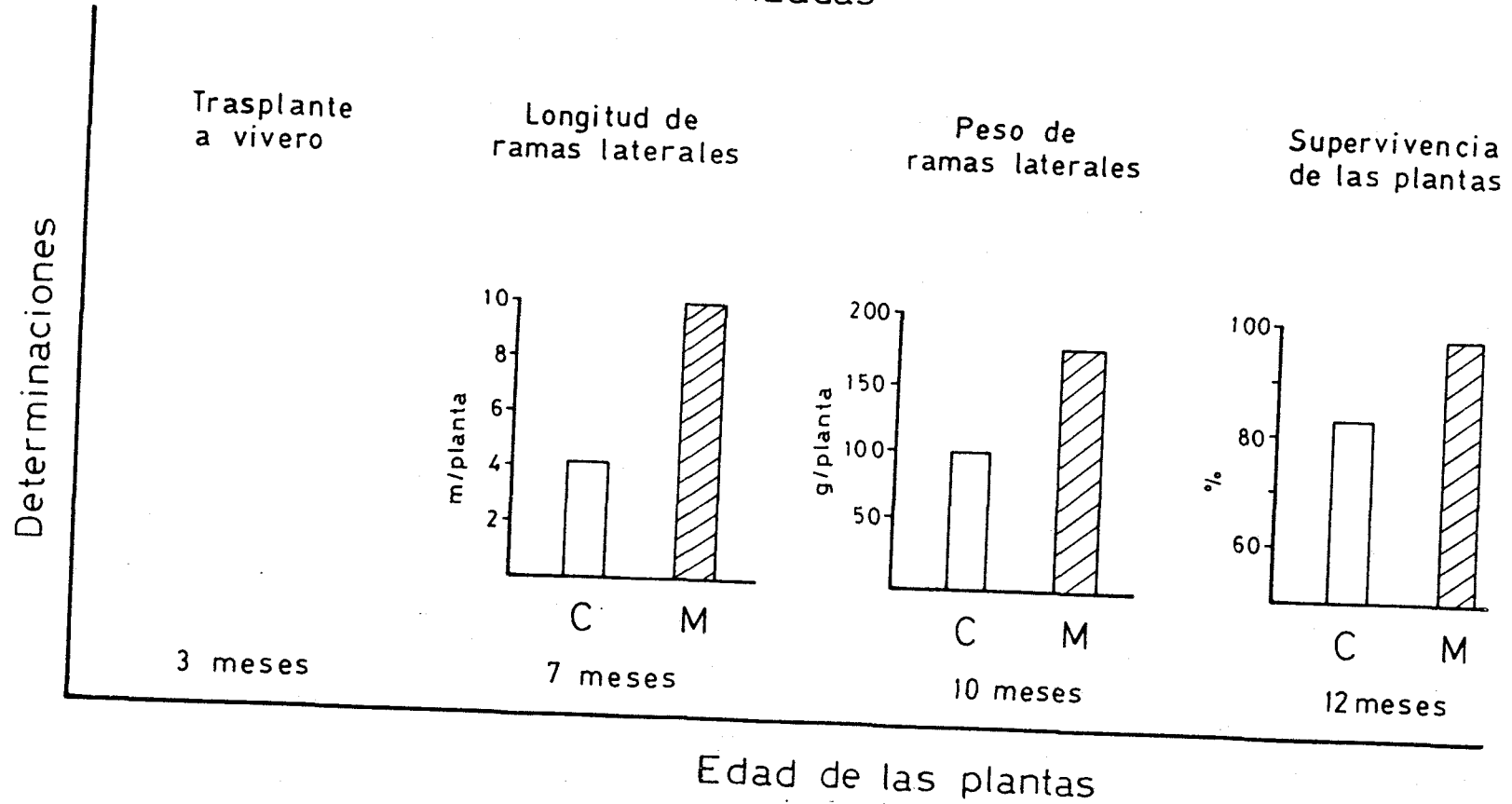


Figura 16

Desarrollo de plantas de almendro en vivero.

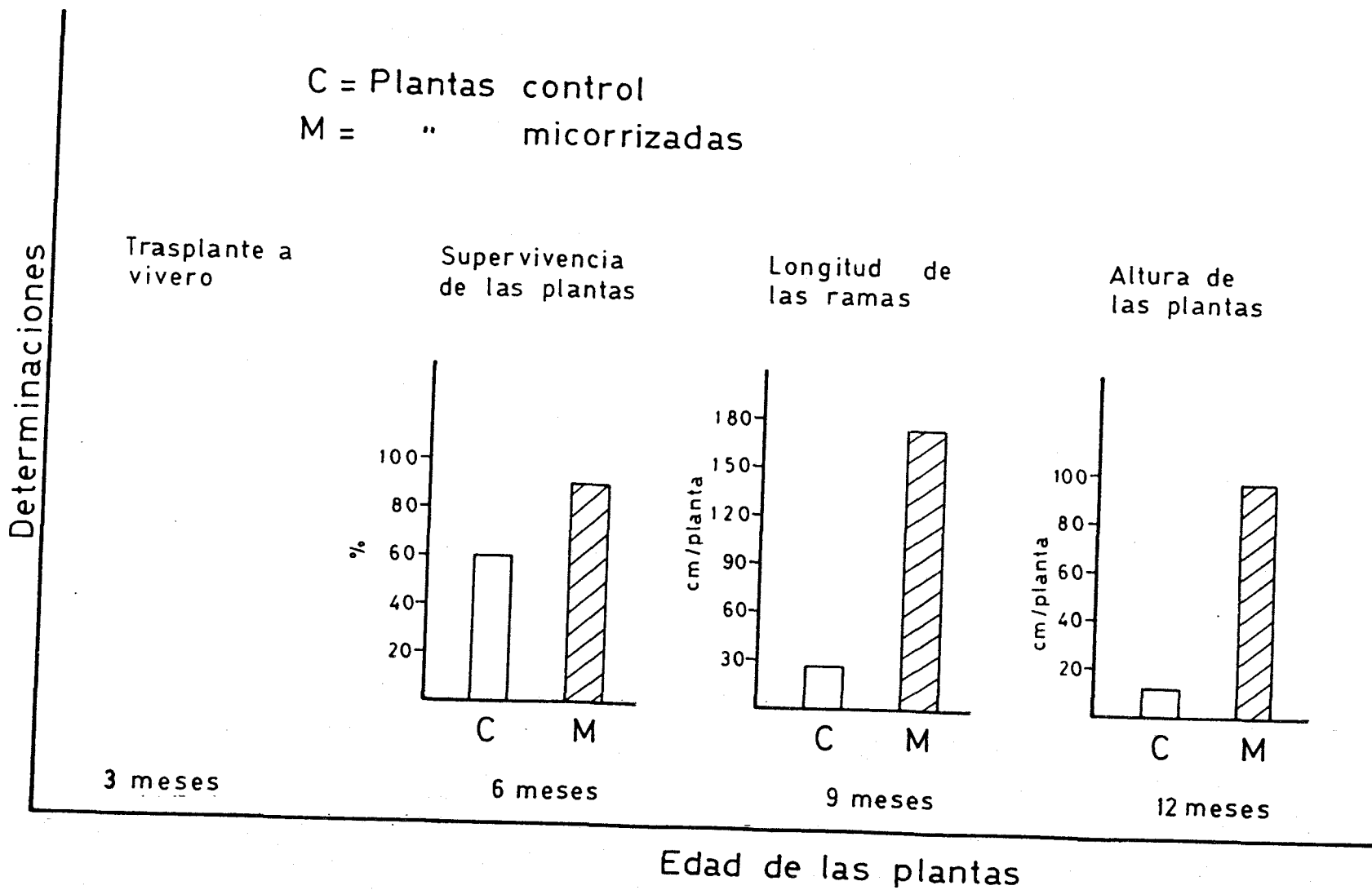


Figura 17

Desarrollo de plantas de naranjo en vivero.

C = Plantas control
 M = " micorrizadas

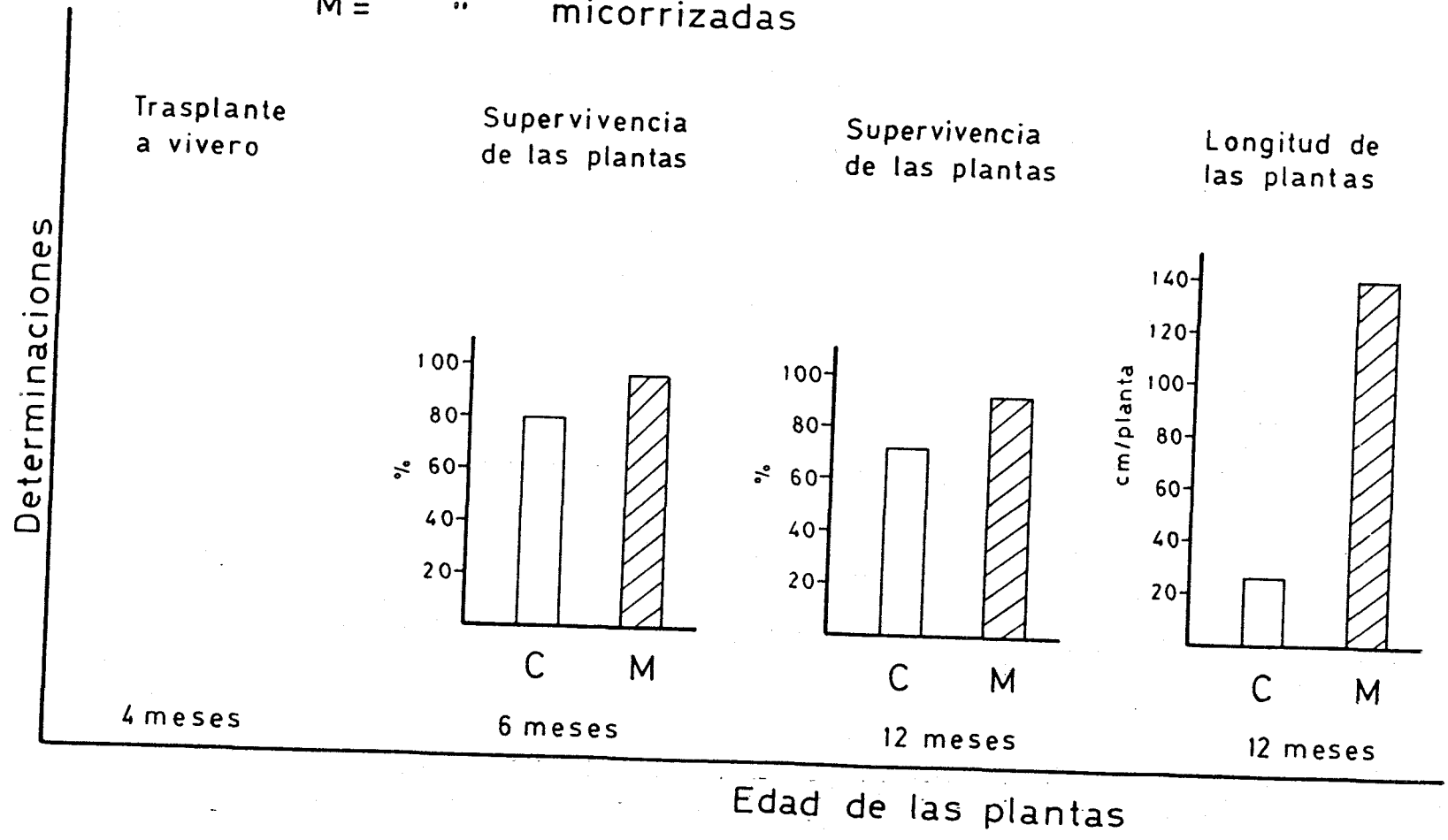


Figura 18

Desarrollo de plantas de olivo en vivero.

VII. DISCUSSION

VII. DISCUSION

Puesto que, en el capítulo que antecede, se han realizado comentarios individualizados a los resultados de experiencias concretas, analizar en su conjunto los resultados obtenidos en la presente investigación se ha adoptado el criterio de tratar de forma globalizada grupos de experimentos afines con objeto de simplificar esta Discusión y de facilitar la extracción de Conclusiones generales. Consecuentemente, los distintos ensayos que conforman este trabajo se van a agrupar para su estudio en cuatro grandes apartados marcados, de forma más o menos taxativa, por los Objetivos de la misma. Estos apartados son los siguientes:

- (i) Presencia de MVA en las plantas objeto de estudio cuando crecen en condiciones naturales.
- (ii) Estudio de los niveles de compatibilidad hongo-planta.
- (iii) Grado de dependencia de las tres plantas a las MVA.
- (iv) Posibilidades de manipular las MVA en estas plantas concretando en la obtención de viveros con micorrización optimizada.

PRESENCIA DE MVA en almendro, naranjo y olivo CRECIDOS EN CONDICIONES NATURALES.

En primer lugar, es de resaltar que las característi-

cas micotróficas en estas plantas están fuera de discusión ya que todas las muestras de rizosfera tomadas en condiciones naturales de cultivo mostraron la presencia de MVA. Tanto la incidencia de estas raíces de las plantas como el número de esporas en la rizosfera varía con la estación del año. Este hecho en sí y la magnitud de las cifras obtenidas están de acuerdo con las descripciones disponibles correspondientes a plantas herbáceas (Hayman, 1982b, 1984).

La proporción de MVA en el sistema radical de estas plantas aumenta en la estación en la que ocurre el crecimiento vegetativo de las mismas, como sucede en herbáceas; sin embargo, en estas últimas tal proporción suele mantenerse constante durante los procesos de floración y fructificación caracterizados por un elevado consumo de fotosintato, por lo que disminuye el ritmo de exportación hacia la raíz (Smith, 1980). Este hecho no ocurre en las plantas arbóreas estudiadas, posiblemente, sea así en arbóreas en general en virtud de la capacidad de estas para la acumulación de productos fotosintéticos procedentes de estaciones de crecimiento anteriores (López-Ritas, 1983). La esporulación de los hongos VA en olivo y almendro sigue la misma tendencia recordando su comportamiento al de las herbáceas (Hayman, 1984) en cambio, el ritmo de la esporulación en rizosfera de naranjo es diferente, con respecto a herbáceas.

COMPATIBILIDAD HONGO-PLANTA.

Un hecho absolutamente sorprendente en el desarrollo de la presente investigación fué que G. mosseae, la especie más comunmente empleada en nuestro Departamento por su efectividad, y que se asoció eficazmente con olivo y almendro, fuera poco efectiva e incapaz de colonizar las raíces de naranjo. Esto resulta más paradójico cuando G. mosseae es infectivo para otros patrones de naranjo (Bouza et al. (1985) que eran pocos infectados por otras especies de hongos VA. Resultados semejantes se han obtenido para manzano (Miller et al. 1985a y b.). Ni la presencia de fosfato, ni el tipo de inóculo, ni la utilización de otro patrón de naranjo, utilizado también en la región, ni incluso, la plantación simultánea con una planta fuertemente micotrófica, como es la alfalfa, cuyas raíces estaban muy extensamente colonizadas por G. mosseae, ayudaron a la infectividad de este hongo.

Una vez descartada la presencia de inhibidores de G. mosseae en los exudados del naranjo y cuando se investigaba la posible inducción de toxicidad en el suelo durante la tinalización, cosa que también se desestimó, se encontró que un hongo VA naturalmente existente en el suelo M-L (rizosfera de almendro) provocaba una micorrización abundante y efectiva en naranjo. Este hongo es parecido a G. fasciculatus (Trappe, 1980) aunque aún no ha sido identificado a nivel de

especie. Se trata del que se ha denominado Glomus sp. (Nativo-N-). La compatibilidad con el naranjo de este hongo y la incompatibilidad de G. mosseae se corroboró repetidamente. Posteriormente se encontró que el propio G. fasciculatus poseía una infectividad-efectividad similar a la de Glomus sp. (N). Puesto que este, si no es G. fasciculatus, es una especie muy cercana, cabe pensar que los patrones de naranjo posean cierta "especificidad" para hongos VA de un determinado grupo, un tipo de especificidad cuya existencia ha sido sugerida (Hayman, 1983).

Al haber sido apuntado (Mosse y Hepper, 1975) que al producirse los primeros "puntos de entrada" efectivos podría tener lugar algún cambio fisiológico en la raíz que facilitará el subsiguiente desarrollo de la infección, se investigó la posibilidad de que al ir añadiendo extractos de raíz de naranjos micorrizados con Glomus sp. (N) se pudiera favorecer la infección por G. mosseae en otras plantas de naranjo que se hacían crecer simultáneamente en otras macetas. Bajo las condiciones experimentales del ensayo no se logró tal estimulación de la infectividad. Por ello, con los datos disponibles, sólo se puede hablar de "incompatibilidad" entre el patrón de naranjo y G. mosseae ensayados.

Tanto olivo como almendro se asocian eficazmente con los tres hongos VA efectivos ensayados, siendo de resaltar el

hecho de que Glomus sp. (N), sea también muy efectivo para el almendro, precisamente la planta de cuya rizosfera fué aislado. Es evidente que estamos en un caso de selección y adaptación que posiblemente sea más común en MVA de lo que actualmente se supone (Hayman, 1984).

Es de hacer notar que la efectividad de una MVA en estas arbóreas produce una bajada en la relación R/S (relación entre el peso de la raíz y el de la parte aérea) como ocurre en herbáceas (Barea y Azcón-Aguilar, 1983, Hayman, 1984). Como se sabe esto es debido a un control "feed-back" de la bajada de fotosintato a la raíz ejercido por el fosfato, el nutriente limitante, cuando llega a la parte aérea (Smith, 1980).

DEPENDENCIA DE almendro, olivo y naranjo A LAS MVA.

Es un hecho incuestionable que olivo, almendro y naranjo, las tres plantas estudiadas, necesitan estar micorrizadas para crecer adecuadamente en todas las situaciones experimentales ensayadas. Esto apoya la generalización de Trappe y Fogel (1977) en la que sugirieron con los datos entonces disponibles, que las plantas arbóreas, en general, parecían tener un grado elevado de dependencia a las micorrizas. Este hecho lo confirma posteriormente Malloch et al. (1980).

Analizando en este sentido cada una de las plantas por separado se aprecia lo siguiente: En almendro, cuyo DRM (Plenchette et al. 1983) es de aproximadamente un 50 %, se aprecia que en plantas controles no micorrizadas la concentración de P en los tejidos foliares es baja incluso cuando se aplica una dosis agronómica de fosfato soluble y que la concentración sólo incrementa con la micorrización. Es de destacar que Glomus sp.(N) se mostró más tolerante a la aplicación de fosfato soluble que G. mosseae. Posiblemente el hongo nativo se seleccionó en unas condiciones en las que la llamada "historia de la fertilización de un suelo" (Hayman, 1982b) favoreció simultáneamente su supervivencia y efectividad, lo cual no es común en ecología de la rizosfera (Bowen, 1980). Esta compatibilidad entre fertilizantes químicos y MVA es de gran importancia desde el punto de vista práctico para aquellos casos en los que se pretende obtener "cosecha máxima" (Powell, 1977b; Clarke y Mosse, 1981; Hayman et al., 1985).

El olivo es incluso más dependiente de las MVA, oscilando su DRM entre 63-69 %, según el nivel de P soluble en el suelo, siendo este valor realmente elevado (Plenchette et al. 1983). Es evidente que esta planta apenas capta fosfato del suelo si no está micorrizada. Cuando lo está, no sólo incrementa la concentración de P en los tejidos sino que se desencadenan una serie de procesos de crecimiento

vegetativo, marcados fundamentalmente por la formación de ramas laterales, que apenas se desarrollan en controles no micorrizados, aunque se les suministra fosfato. Estos hechos que pueden justificar un componente hormonal en el efecto de las MVA, y que se confirman en el efecto de Glomus favoreciendo el enraizamiento de olivo, encontrado en este trabajo, fueron apuntados por Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi (1983). De hecho Glomus produce fitohormonas "in vitro" (Barea y Azcón-Aguilar, 1982).

Las publicaciones sobre otras plantas no herbáceas de interés alimenticio (frutales) sobre dependencia a las MVA e interacción con fertilizantes solubles de P concuerdan en sus conclusiones con las aquí encontradas sobre este tema (Covey et al., 1981; Plenchette et al., 1981; Koch et al., 1982; Geddeda et al. 1984; y Schubert y Cammarata, 1985).

El estudio de la Dependencia a las MVA en Citrus merece algunos comentarios especiales. Aunque ya descrito este hecho con anterioridad es de destacar que, en primer lugar, los cultivares aquí utilizados pertenecen al grupo de los "muy dependientes" (Graham y Timmer, 1984; Edriss et al. 1984), ya que alcanzan valores de DRM (Plenchette et al. 1983) que superan el 80 %. De otro lado, la curva de respuesta al P del naranjo, principalmente en lo que se refiere a los efectos de dosis absolutamente elevadas de P en

plantas micorrizadas y controles, muestra un hecho singular en los múltiples estudios sobre fisiología de las MVA publicados. Es evidente que el ecotipo o cultivar de naranjo estudiado no capta P si no está micorrizado y representa una confirmación feaciente de que, ni a dosis muy elevadas de P en el suelo, se afecta el potencial de MVA en la rizosfera, aunque el porcentaje de infección tiende a disminuir. Claramente es el P existente en los tejidos vegetales el único que es capaz de inhibir el proceso de micorrización y/o sus efectos (Schawbet et al. 1983; Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1983).

Llegado este punto se considera oportuno un somero comentario a las posibilidades de aplicar fosfatos naturales en conexión con MVA, en estas plantas. En efecto, la literatura sobre la aplicación de fosfato de roca y los factores que pueden permitir la utilización por estas de dicha fuente de P de escasa solubilidad, revisada por Khasawneh y Doll (1978), indica que en suelos no ácidos ciertas plantas pueden poseer tal capacidad. En el presente estudio, el olivo responde a la aplicación de fosfato de roca hecho que sólo se expresa cuando está micorrizado. Se ignoran las bases fisiológicas de este hecho de tanto interés práctico. De otro lado, se ha descrito así mismo que MVA y "bacterias solubilizadoras de P" (BSP) parecen desempeñar un papel apreciable para favorecer el uso de dichos compuestos en

en agricultura (Barea et al. 1983). En naranjo, que no responde a la adición del fosfato de roca, es de destacar una cooperación entre MVA y BSP en la utilización del P insoluble del suelo, confirmando ciertas descripciones correspondientes a plantas herbáceas (Barea et al. 1983). Recientemente (Graham y Timmer 1985) observan como diversos patrones de citrus crecidos en medios artificiales de turba y perlita, se micorrizan mejor y presentan mayor crecimiento al ser fertilizados con P soluble, lo que se debe obviamente a la lenta liberación de fosfato a partir del apatito bajo las condiciones de pH del medio.

OBTENCION DE PLANTAS CON MICORRIZACION OPTIMIZADA EN VIVERO.

El grupo de ensayos incluidos en este apartado componen obviamente, la "terminación" de los estudios básico-aplicados que constituyen esta investigación. Son el OBJETIVO final de la misma, que marcado por un componente práctico, o de aplicación se presenta aquí sustentado por los estudios necesarios que permitan racionalizar una manipulación científica del ecosistema. Los resultados obtenidos en este sentido van a ser discutidos de acuerdo con cuatro tipos de aspectos: (a) Obtención de los inóculos (b) Preparación de las plántulas y estudio de la dinámica de su micorrización (c) Investigación de la necesidad de inocular en los suelos

destinados a vivero. Y (d) Seguimiento de la micorrización y sus efectos en vivero.

(a) Obtención de inóculo de hongo VA.

Una vez analizado el porqué de la selección del hongo Glomus sp. (N), confirmada por los aspectos de compatibilidad con las condiciones del ecosistema en estudio, cooperatividad con fertilizantes solubles de fósforo etc. y comprobado, así mismo, que la aplicación de inóculos mixtos no ofrece ventajas adicionales a la inoculación individual del mismo, los únicos comentarios podrían ser los relativos a la técnica de preparación del inoculante. El procedimiento seguido no admite demasiada discusión, ya que ante la dificultad para cultivar el hongo, el que se ha utilizado en el presente estudio, que es el llamado "inóculo bruto" (Hayman, 1982a), es el más efectivo para los fines perseguidos como se deduce de la revisión de Barea y Azcón-Aguilar (1983).

(b) Preparación de las plántulas y estudio de la dinámica del proceso de micorrización.

Dejando aparte las técnicas de micropropagación para la obtención de material micorrizado las cuales parecen tener un futuro esperanzador aunque actualmente su uso es muy limitado (Pons et al. 1983), se puede decir que las de propagación empleadas en el presente estudio son

las que hoy se consideran más aceptables. En efecto, el partir de semilla, en lo que se refiere a naranjo y almendro, así como el enraizamiento de estaquillas en el caso del olivo no cabe duda, que proporciona un material adecuado para la micorrización. El procedimiento de Troncoso et al. (1983) para enraizar este material puede considerarse idóneo dada su efectividad y la uniformidad de las plántulas obtenidas. El presente estudio muestra que el proceso de micorrización de estas estaquillas es también bastante uniforme así como su respuesta en las fases de crecimiento y desarrollo subsiguientes.

Con respecto a la "curva de micorrización" decir que, al igual que en herbáceas (Sutton, 1973), es de tipo sigmoïdal para los tres cultivos. No obstante el tiempo al que ocurren las diferentes fases del proceso en herbáceas (Sanders y Sheilk, 1983) es lógicamente más largo en el caso de estas arbóreas. Teniendo en cuenta estos matices diferenciales, la correlación entre las fases de formación de las distintas estructuras de la micorriza, "arbúsculos" principalmente, y respuesta de la planta es similar a la descrita en herbáceas (Hayman, 1983; Harley y Smith. 1983).

(c) Investigación de la necesidad de inocular en un suelo en donde se pretende instalar un vivero.

Los presentes ensayos, realizados sólo con almendro

como planta modelo, confirman las observaciones en este sentido descritas para herbáceas, revisadas y discutidas por Barea y Azcón-Aguilar (1983). Es evidente que la micorrización artificial es necesaria en unos suelos y no lo es en otros, cuando estos posean un potencial natural adecuado. Puesto que se trata de una prueba sencilla y rápida, se aconseja practicarla habitualmente (se pueden estudiar simultáneamente un conjunto de suelos) como paso previo en la elección de un suelo para vivero, en el caso de que no se vaya a proceder a su fumigación, si esta se lleva a cabo es obligada la micorrización artificial.

(d) Seguimiento de la micorrización y sus efectos en vivero.

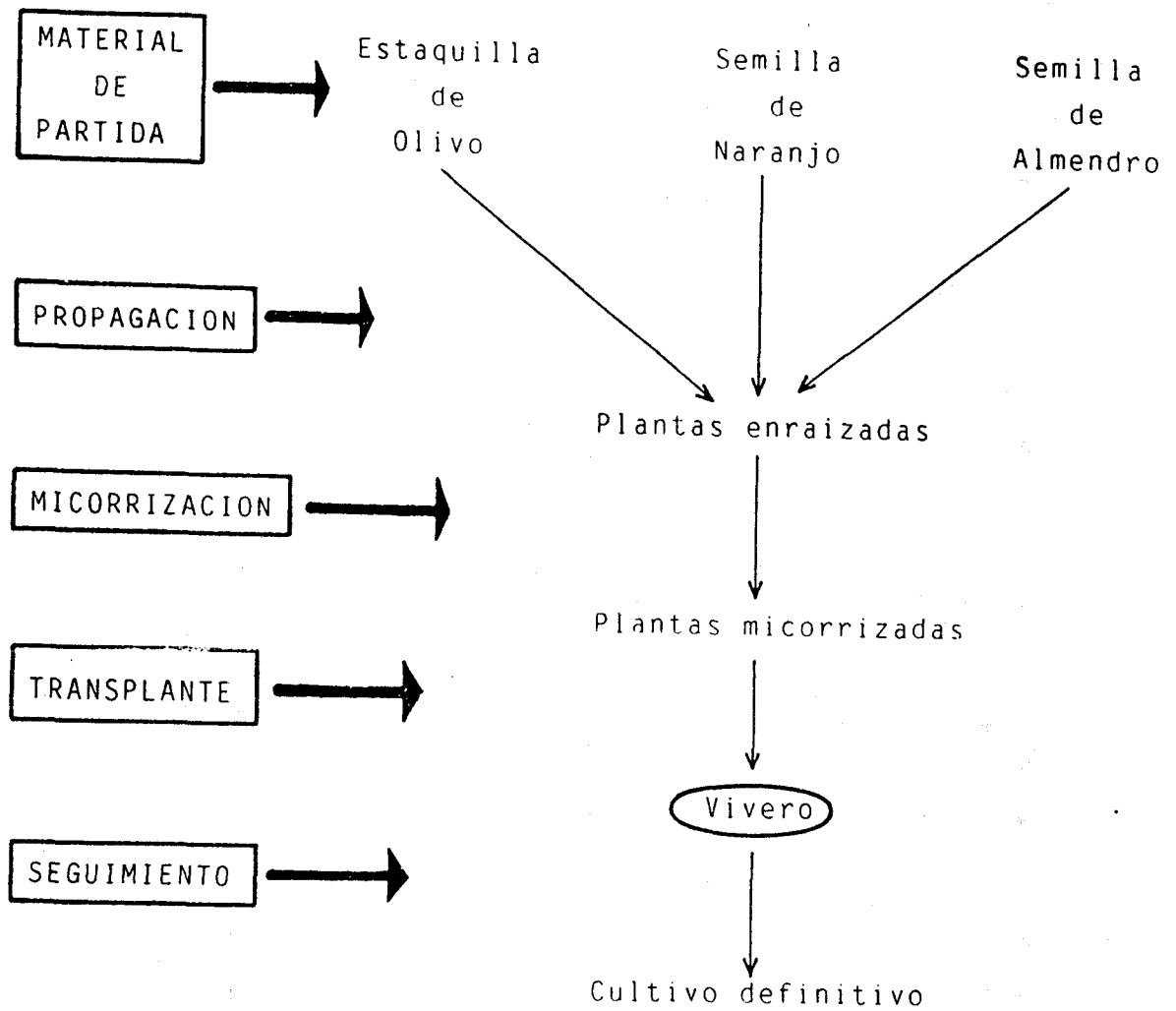
Los resultados obtenidos son autoevidentes y no precisan discusión. La micorrización es factible a escala de vivero y la inoculación del hongo Glomus sp. (N) estimuló de forma persistente el establecimiento, crecimiento, desarrollo y nutrición de las plantas, incluso en presencia de los propágulos MVA naturalmente existentes en el suelo de vivero estudiado. No se dispone de referencias bibliográficas que describan este hecho para olivo, almendro o naranjo en estas condiciones (para naranjo existen pero sobre suelos fumigados ver INTRODUCCION). Generalizando a frutales el trabajo de Plenchette et al. 1981, que con-

cretamente utiliza manzano, muestra unas conclusiones similares a las aquí obtenidas.

Finalmente, decir que si tenemos en cuenta que bajo la denominación de Biotecnología se incluye el estudio de procedimientos relativos a la transformación de materias primas renovables para su utilización racional y que tales procedimientos van destinados, entre otros muchos fines, a incrementar la productividad vegetal (Sasson, 1984), no cabe duda que la presente investigación es incluible en el campo de la Biotecnología. Tal como apunta Lynch (1983), se puede acuñar el término de Biotecnología del Suelo que podíamos definir como "el estudio y manipulación de los microorganismos del suelo, o de sus procesos metabólicos, para optimizar el crecimiento y nutrición de las plantas al mínimo coste ecológico y económico". En este sentido, la presente investigación puede considerarse encuadrada en Biotecnología del Suelo que evidentemente proporciona las bases científicas que permiten afirmar que es posible manipular ese recurso natural existente en el propio suelo, que son las MVA, y sus efectos sobre el crecimiento de Almendro, Naranja y Olivo.

De acuerdo con lo que antecede se propone un esquema para aplicar el potencial de las MVA en vivero. Este esquema que es extrapolable a otras plantas arbóreas de un interés en fruticultura, silvicultura o protección del medio ambiente se resume como muestra el esquema siguiente:

BIOTECNOLOGIA DE MVA EN ARBOREAS



VIII. CONCLUSIONES

VIII. CONCLUSIONES

- 1a Almendro, Naranja y Olivo forman micorrizas VA y están normalmente micorrizadas en las condiciones de su cultivo en la región.
- 2a Las fluctuaciones en la proporción de MVA en el sistema radical de estas plantas siguen un ciclo estacional, como sucede en herbáceas pero, al contrario que en estas, la presencia de MVA incrementa en los periodos de floración y fructificación en las arbóreas estudiadas.
- 3a Se ha aislado y seleccionado un hongo de la MVA, Glomus sp. -N- que compatibiliza muy eficazmente con almendro, naranja y olivo y con las condiciones del cultivo de estas plantas en la región.
- 4a Los grados de Dependencia Relativa a las Micorrizas de estas plantas son muy elevados: 50 % para almendro, 60 % para olivo y 80 % para naranja, aproximadamente.
- 5a El "crecimiento máximo" de estas tres plantas sólo se logra si están micorrizadas.
- 6a El olivo micorrizado es capaz de utilizar fosfato de roca como fuente de fósforo.
- 7a Las "curvas de micorrización" para las tres plantas son de tipo sigmoideal, como en el caso de las herbáceas, aunque las fases (lag, exponencial y de equilibrio) son

más largas en el tiempo, en virtud del ritmo más lento de crecimiento de estas plantas.

8a Se ha conseguido producir plantas de almendro, naranjo y Olivo con micorrización optimizada.

9a La micorrización "artificial" confiere a estas plantas, en condiciones de vivero, un mayor vigor, ritmo de crecimiento, desarrollo armónico así como una mayor resistencia a los riesgos del transplante.

10a Se propone un esquema para que las MVA sean una Biotecnología factible de aplicación en viveros de almendro, naranjo y olivo, extrapolable a otras arbóreas.

IX. BIBLIOGRAFIA

IX. BIBLIOGRAFIA

- ABBOTT, L.K. y ROBSON, A.D. (1981). Infectivity and effectiveness of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi: Effect of inoculum type. *Aust. J. Agric. Res*: 32, 631-639.
- ABBOTT, L.K. y ROBSON, A.D. (1982). The role of vesicular-arbuscular fungi in agriculture and the selection of fungi for inoculation. *Aust. J. Agric. Res*: 33, 389-408.
- ABBOTT, L.K. y ROBSON, A.D. (1985). Formation of external hyphae in soil by four species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol*: 99, 245-257.
- ALI, B. (1969). Cytochemical and autoradiographic studies of mycorrhizal roots of Nardus. *Arch. Mikrobiol*: 68, 236-245.
- ALLEN, M.F., MOORE, Jr.T.S.y CHRISTENSEN, M. (1980). Phytohormone changes in Boutelona gracilis infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae: I. Cytokinin increases in the host plant. *Can. J. Bot*: 58, 371-374.
- ALLEN, M.E., MOORE, Jr.T.S.y CHRISTENSEN, M. (1982). Phytohormone changes in Boutelona gracilis infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae. II. Altered levels of gibberellin-like substances and abscisic acid in the host plant. *Can. J. Bot*: 60, 468-471.
- ANONIMO (1980). Firewood crops: Shrub and tree species for energy production. *Natl. Acad. Sci*: 237 pp.

- AZCON, R. y OCAMPO, J.A. (1981). Factors affecting the vesicular-arbuscular infection and mycorrhizal dependency of thirteen wheat cultivars. *New Phytol*: 87, 677-685.
- AZCON, R. y OCAMPO, J.A. (1984). Effect of root exudation VA mycorrhizal infection at early stages of plant growth. *Plant and Soil*: 82, 133-138.
- AZCON-AGUILAR, C. y BAREA, J.M. (1980). Micorrizas. *Invest. Ciencia*: 47, 8-16.
- AZCON-AGUILAR, C. y BAREA, J.M. (1983). Monografías. Academia de Ciencias. Universidad de Granada.
- AZCON-AGUILAR, C., BAREA, J.M. y OLIVARES, J. (1983). Simbiosis Rhizobium-leguminosa. *Invest. y Ciencia*: 82, 84-93.
- BAREA, J.M. AZCON, R. y AZCON-Aguilar, C. (1983). Interactions between phosphate solubilizing bacteria and VA mycorrhiza to improve plant utilization of rock phosphate in non acidic soils. 3rd International Congress on Phosphorus Compounds, Bruselas: pp. 127-144.
- BAREA, J.M. y AZCON-AGUILAR, C. (1982). Production of plant growth-regulating substances by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus Glomus mosseae. *Appl. Environ. Microbiol*: 43, 810-813.
- BAREA, J.M. y AZCON-AGUILAR, C. (1983). Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants. *Advances in Agronomy*. Ed. N.C. Brady. 36, 1-46. Academic Press, New York.

- BAREA, J.M., ESCUDERO, J.L. y AZCON-AGUILAR, C. (1980). Effects of introduced and indigenous VA mycorrhizal fungi on nodulation, growth and nutrition of Medicago sativa in phosphate fixing soils as affected by P fertilizers. *Plant and Soil*: 54, 283-296.
- BARROW, N.J., MALAJCZUK, N. y SHAW, T.C. (1977). A direct test of the ability of vesicular-arbuscular mycorrhiza to help plants take up fixed soil phosphate. *New Phytol*: 78, 269-276.
- BARRY, D. (1962). The possibility of mycorrhizae in palms. *Principes*: 6, 87-90.
- BAYLIS, G.T.S. (1975). The magnoloid mycorrhiza and mycotrophy in root systems derived from it. En "Endomycorrhizas". Ed. F.E. Sanders, B. Mosse y P.B. Tinker. Academic Press. Londres: 373-389.
- BEILBY, J.P. y KIDBY, D.K. (1982). The early synthesis of RNA, proteins and some associated metabolic events in germinating vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores of Glomus caledonius. *Can. J. Microbiol*: 28, 623-628.
- BEN SALEM, B. (1980). Silvicultura en zonas áridas. *Unasyuva*: 32, 16-18.
- BENSON, N.R. y COVEY, R.P. (1976). Response of apple seedlings to zinc fertilization and mycorrhizal inoculation. *Host Science*: 11, 252-253.
- BIELESKI, R.L. (1973). Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. *Ann. Rev. Plant Physiol*: 24, 225-252.

- BIERMANN, B. y LINDERMAN, R.G. (1983). Use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles as inoculum. *New Phytol*: 95, 97-105.
- BLOSS, H.E. (1979). Vesicular-arbuscular mycorrhizae in jojoba and mariola. *Mycologia*: 71, 831-834.
- BLOSS, H.E. (1980). Vesicular-arbuscular mycorrhiza in guayule. *Mycologia*: 72, 213-216.
- BLOSS, H.E. y PFEIFFER, C.M. (1981). Growth and nutrition of mycorrhizal guayule plants. *Ann. appl. Biol*: 99, 267-274.
- BLOSS, H.E. y PFEIFFER, C.M. (1984). Latex content and biomass increase in mycorrhizal guayule (*Pasthenium argentatum*) under field conditions. *Ann appl. Biol*: 104, 175-183.
- BONNIER, C. y BRAKEL, J. (1969). Lutte biologique contre la faim. Duculot, Gembloux.
- BORIE, F. y BAREA, J.M. (1981). Ciclo del fósforo: I. Formas del elemento en los suelos y su disponibilidad para plantas y microorganismos. *Anal. Edafol. Agrobiol*: XL. 2351-2381.
- BOUZA, N., HERRERA, R.A., FERRER, R.L. y PRIETO, J. (1985). Perspectivas para la utilización de las micorrizas vesículo-arbusculares en el cultivo de los cítricos en Cuba. Workshop sobre Micorrizas. C.A.T.I.C. y I.F.S., Costa Rica, Septiembre, 1985.
- BOWEN, G.D. (1980). Rhizosphere biology. En "Contemporary Microbial Ecology" (D.C. Ellwood, J.N. Hedger, M.J. Latham, J.H. Slater y J.M. Lynch, eds), 283-304. Academic Press, New York y Londres.

- BOWEN, G.D. (1981a). Fungus and epidemiological factors in the mycorrhizal response. En FAO/IAEA Consult. Meet. "Use Isotopes Stud. Nutrient Availability Food Crops Endomycorrhizas" Viena. 85-102.
- BOWEN, G.D. (1981b). The fate of assimilates and the cost of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. En FAO/IAEA consult. Meet. "Use Isotopes Stud. Nutrient Availability Food Crops endomycorrhizas". Viena. 165-174.
- BOWEN, G.D. y THEODOROU, C. (1973). En *Ectomycorrhizae: Their Ecology and Physiology* (Eds. G.C. Marks and T.T. Korzlowski), Academic Press, New York, pp. 107-150.
- BROWN, M.E. (1972). Plant growth substances produced by microorganisms of soil and rhizosphere. *J. appl. Bact.*: 35, 443-451.
- BROWN, R.W., SCHULTZ, R.C. y KORMANIK, P.P. (1981). Response of vesicular-arbuscular endomycorrhizal sweetgum seedlings to three nitrogen fertilizers. *Forest. Sci.*: 27, 413-420.
- BRYAN, W.C. y KORMANIK, P.P. (1977). Mycorrhizae benefit survival and growth of sweetgum seedlings in the nursery. *South. J. Appl. Fer.*: 1, 21-23.
- BUTLER, E.J. (1939). The occurrences and systematic position of the vesicular-arbuscular type of mycorrhizal fungi. *Trans. of the Brit. Mycological Soc.*: 22, 274-301.
- BUWALDA, J.G. y GOH, K.M. (1982). Host-fungus composition for carbon as a cause of growth depressions in vesicular-arbuscular mycorrhizal ryegrass. *Soil Biol. Biochem.*: 103-106.

- CALDEIRA, S.F., CHAVES, G.M. y ZAMBOLIM, L. (1983). Associação de micorriza vesicular-arbuscular com café, limão-rosa e capim-gordura. *Pesq. Agropec. Bras.*: 18, 223-228.
- CAPACCIO, L.C.M. y CALLOW, J.A. (1982). The enzymes of polyphosphate metabolism in vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytol.*: 91, 81-91.
- CLARK, F.B. (1963). endotrophic mycorrhizal influence yellow poplar seedling growth. *Science.*: 140, 1220-1221.
- CLARK, F.B. (1964). Microorganisms and soil structure affect yellow-poplar growth. U.S. Forest Serv. Res. Paper, CS 9, Columbus, DH.
- CLARK, F.B. (1969). Endotrophic mycorrhizal infection of tree seedlings with *Endogone* spores. *Forest Sci.*: 15, 134-137.
- CLARKE, C. y MOSSE, B. (1981). Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. XII. Field inoculation responses of barley at two soil -P- levels. *New Phytol.*: 87, 695-703.
- COOPER, K.M. y LOSEL, D.M. (1978). Lipid physiology of vesicular-arbuscular mycorrhiza. I. Composition of lipids in roots of onion, clover and ryegrass infected with *Glomus mosseae*. *New Phytol.*: 80, 143-151.
- COOPER, K.M. y TINKER, P.B. (1981). Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. IV. Effect of environmental variables on movement of phosphorus. *New Phytol.*: 88, 327-339.
- COVEY, R.P. , KOCH, B.L. y LARSEN, H.J. (1981). Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizal on the growth of apple and corn in low-phosphorus soil. *Phytopathol.*: 71, 712-715.

- COX, G., MORAN, K.J., SANDERS, F., NOCKOLDS, C. y TINKER, P.B. (1980). Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. III. Polyphosphate granules and phosphorus translocation. *New Phytol.*: 84, 649-659.
- CRESS, W.A., THRONEBERRY, G.D. y LINDSEY, D.L. (1979). Kinetics of phosphorus absorption by mycorrhizal and non-mycorrhizal tomato roots. *Plant Physiol.*: 64, 484-487.
- CHAPIN, F.S. (1980). The mineral nutrition of wild plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*: 11, 233-260.
- DAFT, M.J. y EL-GIAHMI, A.A. (1978). Effect of arbuscular mycorrhiza on plant growth. VIII. Effects of defoliation and light on selected hosts. *New Phytol.*: 80, 365-372.
- DAFT, M.J. y HACSKAYLO, E. (1976). Arbuscular mycorrhizas in the anthracite and bituminous coal wastes of Pennsylvania. *J. appl. Ecol.*: 13, 523-531.
- DANIELS, B.A. y DUFF, D.M. (1978). Variation in germination and spore morphology among four isolates of Glomus mosseae. *Micologia.*: 70, 1261-1267.
- DANIELS, B.A. y GRAHAM, S.O. (1976). Effects of nutrition and soil extracts on germination of Glomus mosseae spores.: 68, 108-116.
- DANIELS, B.A. y MENGE, J.A. (1981). Evaluation of the commercial potential of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, Glomus epigaeus. *New Phytol.*: 87, 345-354.

- DAVIS, R.M. y MENGE, J.A. (1980). Influence of Glomus fasciculatus and soil phosphorus on Phytophthora root rot of Citrus. Phytopathol.: 70, 447-452.
- DAVIS, R.M. y MENGE, J.A. (1981). Phytophthora parasitica inoculation and intensity of vesicular-arbuscular mycorrhizal in Citrus. New Phytol.: 87, 705-715.
- DAVIS, R.M., MENGE, J.A. y ZENTMYER, G.A. (1978). Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae on Phytophthora root rot of three crop plants. Phytopathol.: 68, 1614-1617.
- DOMINGO, I.C. (1983). Nitrogen fixation in Southeast Asian forestry: research and practice. En: Biological Nitrogen Fixation in Forest Ecosystems: Foundations and Applications. (Eds. J.C. Gordon, C.T. Wheeler), Martinus Nijhoff, The Hague, 295-315.
- DOMMERGUES, Y. (1982). ensuring effective symbiosis in nitrogen fixing trees. En: Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture. (Eds. P.H. Graham y S.C. Harris). Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia, 395-411.
- DONCASTER, C.C. (1962). A counting dish for nematodes. Nematologica.: 7, 334-337.
- EDRISS, M.H., DAVIS, R.M. y BURGER, D.W. (1984). Increased growth responses of Citrus by several species of mycorrhizal fungi. Hort. Science.: 19, 537-539.
- ELMES, R. y MOSSE, B. (1980). Vesicular-arbuscular mycorrhiza: nutrient film technique. Rothamsted Report for 1979, Part 1, p. 188.

- FELKER, P. (1981). Uses of tree legume in semiarid regions. Economic Botany.: 35, 174-186.
- FELKER, P. y BANDURSKI, R.S. (1979). Uses and potential uses of leguminous trees for minimal energy input agriculture. Economic Botany.: 35, 172-184.
- FISCHER, R.A. y TURNER, N.C. (1978). Plant productivity in the arid and semiarid zones. Ann. Rev. Plant Physiol.: 29, 277-317.
- FORSTER, S.M. y NICOLSON, T.H. (1981). Aggregation of sand from a maritime embryo sand dune by microorganisms and higher plants. Soil Biol. Biochem.: 13, 199-203.
- FORSTER, S.M. y NICOLSON, T.H. (1981). Microbial aggregation of sand in a maritime dune succession. Soil Biol. Biochem.: 13, 205-208.
- FURLAN, V. y FORTIN, J.A. (1977). Effects of light intensity on the formation of vesicular-arbuscular endomycorrhizas on Allium cepa by Gigaspora calaspora. New Phytol.: 79, 335-340.
- FURLAN, V., FORTIN, J.A. y PLENCHETTE, C. (1983). Effects of different vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on growth of Fraxinus americana.: 13, 589-593.
- GEDDEDA, Y.I., TRAPPE, J.M. y STEBBINS, R.L. (1983). Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with apples grown in Oregon. Hort. Science.: 18, 929-930.
- GEDDEDA, Y.I., TRAPPE, J.M. y STEBBINS, R.L. (1984). Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal and phosphorus on apple seedlings. J. Amer. Soc. Hort. Sci.: 109, 24-27.

- GERDEMANN, J.W. (1975). Vesicular-arbuscular mycorrhizae. En "The development and fuction of roots". Ed. J.G. Torrey and D.T. Clarkson. Academic Press, Londres, 575-591.
- GERDEMANN, J.W. y NICOLSON, J.H. (1963). Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. Trans. Br. mycol. Soc.: 46, 235-244.
- GERDEMANN, J.W. y TRAPPE, J.M. (1974). The Endogonaceae in the Pacific Northwest. Micologia Memoir. 5.
- GIANINAZZI, S., TROUVELOT, A. y GIANINAZZI-PEARSON (1981). En "C.R. semmanaire du Groupe d'Etudes des Recines".: 8, 38-41.
- GIANINAZZI-PEARSON, V. y GIANINAZZI, S. (1981). Role of endomycorrhizal fungi in phosphorus cycling in the ecosystem. En "The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem" (D.T. Wicklow and G.C.Carrol,Eds.), pp. 637-652. M. Dekker, New York.
- GIANINAZZI-PEARSON, V. y GIANINAZZI, S. (1983). The physiology of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots. Plant and Soil.: 71, 197-209.
- GILMORE, A.E. (1971). The influence of endotrophic mycorrhizal on the growth of peach seedlings. J. Amer. Soc. Hort. Sci.: 96, 35-38.
- GINSBURG, O. y AVIZOHAR-HERSHENSON, Z. (1965). Observations on vesicular-arbuscular mycorrhizae associated with avocado roots in Israel. Trans. of the Bri. Mycol. Soc.: 48, 101-104.

- GIOVANNETTI, M. y MOSSE, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.*: 84, 489-500.
- GRAHAM, J.H. (1982). Effect of citrus root exudates on germination of chlamydospores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, Glomus epigaeus. *Micologia.*: 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.H., 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.
- GRAHAM, J.H. y MENGE, J.A. (1982). Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizal and soil-phosphorus on take-all disease of wheat. *Phytopathol.*: 72, 95-98.
- GRAHAM, J.H. y TIMMER, L.W. (1984). Vesicular-arbuscular mycorrhizal development and growth response of rough lemon in soil and soilless media: effect of phosphorus source. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*: 109, 118-121.
- GRAHAM, J.H. y TIMMER, L.W. (1985). Rock phosphate as a source of phosphorus for vesicular-arbuscular mycorrhizal development and growth of Citrus in a soilless medium. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*: 110, 489-492.

- GRANGER, R.L., PLENCHETTE, C. y FORTIN, J.A. (1983). Effect of a vesicular-arbuscular (VA) endomycorrhizal fungus Glomus epigaeum on the growth and leaf mineral content of two apple clones propagated in vitro. *Can.J. Plant. Sci.*: 63, 551-555.
- GRAY, L.E. y GERDEMANN, J.W. (1967). Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizas on the uptake of phosphorus-32 by Liriodendron tulipifera and Liquidambar styraciflua. *Nature.*: 213, 106-107.
- GREEN, N.E., GRAHAM, S.O. y SCHENCK, N.C. (1976). The influence of pH on the germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal spores. *Mycologia.*: 68, 929-934.
- GRIER, C.C. y COLE, C.W. (1971). Influence of slash burning on ion transport in a forest soil. *Northwest Sci.*: 45, 100-106.
- GUTTAY, A.J.R. (1976). Impact of deicing salts upon the endomycorrhizae of roadside sugar maples. *Soil Sci. Soc. Am. J.*: 40, 952-954.
- HALL, I.R. (1975). Endomycorrhizas of Metrosideros umbellata and Weinmannia racemosa. *N.Z.J. Bot.*: 13, 463-472.
- HALL, I.R. (1976). Response of Coprosma robusta to different forms of endomycorrhizal inoculum. *Trans. Br. mycol. Soc.*: 67, 409-411.
- HALL, I.R. (1978). Effects of endomycorrhizas on the competitive ability of white clover. *N.Z.J. Agric. Res.*: 21, 509-515.

- HARLEY, J.L. (1973). Symbiosis in the ecosystem. Journal of National Science Council of Sri Lanka.: 1, 31-48.
- HARLEY, J.L. y SMITH, S.E. (1983). Mycorrhizal Symbiosis. 500 pp. Academic Press. Londres.
- HAWKER, L.E. y HAM, A.M. (1957). Vesicular-arbuscular mycorrhizas in apple seedlings. Nature.: 180, 998-999.
- HAYMAN, D.S. (1974). Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. VI. Effect of light and temperature. New Phytol.: 73, 71-80.
- HAYMAN, D.S. (1977). Mycorrhizal effects on white clover in relation to hill land improvement. ARC Res. Rev.: 3, 82-85.
- HAYMAN, D.S. (1982a). En "Advances in Agricultural Microbiology" (N.S. Subba Rao ed.). IBH New Delhi. pp. 325-373. Butterworth Scientific. Londres.
- HAYMAN, D.S. (1982b). Influence of soils and fertility on activity and survival of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Phytopathology.: 72, 1119-1125.
- HAYMAN, D.S. (1983). The physiology of VA endomycorrhizal symbiosis. Can. Jour. of Bot.: 61, 944-963.
- HAYMAN, D.S. (1984). Methods for evaluating and manipulating vesicular-arbuscular mycorrhiza. En "Microbiological Methods for Environmental Biotechnology". Ed. The Society for Applied Bacteriology. pp. 95-117.

- HAYMAN, D.S., BAREA, J.M. y AZCON, R. (1976). Vesicular-arbuscular mycorrhiza in Southern Spain: its distribution in crops growing in soil of different fertility. *Phytopathol. Mediterran.*: 15, 1-6.
- HAYMAN, D.S., DAY, J.M. y DYE, M. (1985). Dual inoculation of white clover. 1st European Symposium on Mycorrhizal. Dijon, Francia. Abst. p. 29.
- HEPPER, C.M. (1979). Germination and growth of Glomus caledonius spores: The effects of inhibitors and nutrients. *Soil Biol. Biochem.*: 11, 269-277.
- HEPPER, C.M. (1983). The effect of nitrate and phosphate on the vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of lettuce. *New Phytol.*: 93, 389-399.
- HEPPER, C.M. y JAKOBSEN, I. (1983). Hyphal growth from spores of the mycorrhizal fungus Glomus caledonius: Effect of amino acids. *Soil Biol. Biochem.*: 15, 55-58.
- HEPPER, C.M. y SMITH, G.A. (1976). Observations on the germination of Endogone spores. *Trans. Br. Mycol. Soc.*: 66, 189-194.
- HERRERA, M.A. (1984). Estudio de algunos aspectos de la simbiosis Rhizobium-leguminosas leñosas. Tesis doctoral, Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes. Universidad Politécnica de Madrid.
- HEWITT, E.J. (1952). Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. *Tech. Commun. Vol.* 22 Farham Roy. Bucks. Common. Agric. Bur.

- HIRREL, M.C. (1981). The effect of Sodium and chloride salts on the germination of Gigaspora margarita. Mycologia.: 73, 610-617.
- HO, I. y TRAPPE, J.M. (1973). Translocation of ¹⁴C from Festuca plants to their endomycorrhizal fungi. nature.: 244, 30-31.
- HOEPFNER, E.F., KOCH, B.L. y COVEY, R.P. (1983). Enhancement of growth and phosphorus concentrations in apple seedlings by vesicular-arbuscular mycorrhizae. Jour. of Amer. Soc. for Hort. Sci.: 108, 207-209.
- HOWELER, R.H., ASHER, C.J. y EDWARDS, D.G. (1982). Establishment of an effective endomycorrhizal association on Cassava in flowing solution culture and its effects on phosphorus nutrition. New Phytol.: 90, 229-238.
- HOWELER, R.M., EDWARDS, D.G. y ASHER, C.J. (1981). Application of the flowing solution culture techniques to studies involving mycorrhizas. Plant and Soil.: 59, 179-183.
- HOWELER, R.H. y SIEVERDING, E. (1982). La importancia de las micorrizas en la absorción de fósforo por la yuca. Suelos Ecuatoriales.: 2, 182-195.
- HOWELER, R.H. y SIEVERDING, E. (1983). Potentials and limitations of mycorrhizal inoculation illustrated by experiments with field-grown cassava. Plant and Soil.: 75, 245-261.
- ISELY, D. (1982). Leguminosae and Homo sapiens. Economic Botany.: 36, 46-70.

- JANOS, D.P. (1977). Vesicular-arbuscular mycorrhizae affect the growth of Bactris gasipaes. *Principes.*: 21, 12-18.
- JANOS, D.P. (1980a). Vesicular-arbuscular mycorrhizae affect low land tropical rain forest plant growth.: 61, 151-162.
- JANOS, D.P. (1980b). Mycorrhizas influence tropical succession. *Biotropica.*: 12, 56-64.
- JANSEN, J.M. (1896). Les endophytes radicaux de quelques plantes javanaises. *Ann. de Jardin Botanique Buitensorg.*: 14, 53-212.
- JASPER, D.A., ROBSON, A.D. y ABBOTT, L.K. (1979). Phosphorus and the formation of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Soil Biol. Biochem.*: 11, 501-505.
- JEFFREY, D.W. (1964). The formation of polyphosphate in Banksia ornata, an Australian heath plant. *Austr. J. of Biol. Sci.* 17, 845-854.
- JOHNSON, C.R. (1984). Phosphorus nutrition on mycorrhizal colonization photosynthesis, growth and nutrient composition of Citrus aurantium. *Plant and Soil.*: 80, 35-42.
- JOHNSTON, A. (1949). Vesicular-arbuscular mycorrhiza in sea Island cotton and other tropical plants. *Tropical Agriculture.*: 26, 118-121.
- KEELEY, J.E. (1980). Endomycorrhizas influence growth of blackgum seedlings in flooded soils. *Ann. J. Bot.*: 67, 6-9.
- KHAN, A.G. (1974). The occurrence of mycorrhizas in halophytes, hydrophytes and xerophytes, and of Endogone spores in adjacent soils. *J. Gen. Microbiol.*: 81, 7-14.

- KHASAWNED, F.E. y DOLL, E.C. (1978). The use of phosphate rock for direct application to soils. *Advances in Agronomy.*: 30, 159-206. Academic Press. (Ed. N.C. Brady). New York.
- KLEINSCHMIDT, G.D. y GERDEMANN, J.W. (1972). Stunting of citrus seedlings in fumigated nursery soils related to the absence of endomycorrhizae. *Phytopatol.*: 62, 1447-1453.
- KOCH, B.L., COVEY, R.P. y LARSEN, H.J. (1982). Response of apple seedlings in fumigated soil to phosphorus and vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Hort. Science.*: 17, 232-233.
- KORMANIK, P.P., BRYAN, W.C. y SCHULTZ, R.C. (1977a). Influence of endomycorrhizae on growth of sweetgum from eight mother trees. *Forest Sci.*: 23, 500-506.
- KORMANIK, P.P., BRYAN, W.C. y SCHULTZ, R.C. (1977b). Quality hardwood seedlings require early mycorrhizal development in nursery beds. *Proc 14th South Forest Tree Improv Conf*, pp. 289-293. Gainesville, Fla.
- KORMANIK, P.P., BRYAN, W.C. y SCHULTZ, R.C. (1981). Effects of three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on sweetgum seedlings from nine mother trees. *Forest Sci.*: 27, 327-355.
- KOSKE, R.E. (1981). A preliminary study of interactions between species of vesicular-arbuscular fungi in a sand dune. *Trans. Br. Mycol. Soc.*: 76, 411-416.

- KOSKE, R.E. (1982). Evidence for a volatile attractant from plant roots affecting germ tubes of a VA mycorrhizal fungus. *Trans. Br. Mycol. Soc.*: 79, 305-310.
- KOSKE, R.E. y HALVORSON, W.L. (1981). Ecological studies of vesicular-arbuscular mycorrhizas in a barrier sand dune. *Can. J. Bot.*: 59, 1413-1422.
- KRIKUN, J. y LEVY, Y. (1980). Effect of vesicular-arbuscular mycorrhiza on citrus growth and mineral composition. *Phytoparasitica.*: 8, 195-200.
- KUCEY, R.M.N. y PAUL, E.A. (1982). Carbon flow photosynthesis, and N-2 fixation in mycorrhizal and nodulated faba beans (Vicia faba L.) *Soil Biol. Biochem.*: 14, 407-412.
- LA RUE, J.L. McCLELLAN, W.D. y PEACOCK, W.L. (1975). Mycorrhizal fungi and peach nursery nutrition. *California Agri.*: 29, 6-7.
- LAMBERT, D.H., STOUFFER, R.F. y COLE Jr. H. (1979). Stunting of peach seedlings following soil fumigation. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*: 104, 433-435.
- LANGKAMP, P.J. y DALLING, M.J. (1982). Nutrient cycling in a stand of Acacia holosericea A. Cunn. ex G. Don II. Phosphorus y endomycorrhizal associations. *Aust. J. Bot.*: 30, 107-109.
- LAWRIE, A.C. (1981). Nitrogen fixation by native Australian legumes. *Australian Journal of Botany.*: 29, 143-157.
- LAYCOCK, D.H. (1945). Preliminary investigations into the function of the Theobroma cacao. L. *Tropical Agriculture, Trinidad.*: 22, 77-80.

- LOPES, E.S., OLIVEIRA, E., DIAS, R. y SCHENCK, N.C. (1983). Occurrence and distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in coffee (Coffea arabica L.) plantations in central Sao Paulo State. Brasil. Turrialba.: 33, 417-422.
- LOPEZ-RITAS, J. (1973). El almendro. Mundi-Prensa Madrid. 315 pp.
- LYNCH, J.M. (1983). Soil biotechnology: Microbiological factors in crop productivity. Ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- MCDONALD, R.M. y LEWIS, M. (1978). The occurrence of some acid-phosphatases and dehydrogenases in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus Glomus mosseae. New Phytol.: 80, 135-141.
- MAEDA, M. (1954). The meaning of mycorrhiza in regard to systematic botany. Kamamoto J. Sci., Ser. B.: 3, 57-84.
- MALAJCZUK, N., LINDERMAN, R.G., KOUGH, J. y TRAPPE, J.M. (1981). Presence of vesicular-arbuscular mycorrhizae in Eucaliptus spp. and Acacia sp. and their absence in Banksia sp. after inoculation with Glomus fasciculatus New Phytol.: 87, 567-572.
- MALLOCH, D. y MALLOCH, B. (1982). The mycorrhizal status of boreal plants: additional species from northern Ontario. Can. J. Bot.: 60, 1035-1040.

- MALLOCH, D.W., PIROZYNSKI, K.A. y RAVEN, P.M. (1980). Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants (A Review). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.: 77, 2113-2118.
- MARONEK, D.M., HENDRIX, J.W. y KIERNAN, J. (1980). Differential growth response to the mycorrhizal fungus Glomus fasciculatus of southern magnolia and bar harbor juniper grown in containers in composted hardwood bark-shale. J. amer. Soc. Hort. Sci.: 105, 206-208.
- MARTIN, J.P., ALDRICH, D.G., MURPHY, W.S., BRADFORD, G.R. (1953). Effect of soil fumigation on growth and chemical composition of citrus plants. Soil Sci.: 75, 137-151.
- MARTIN, J.P., BAINES, R.C. y PAGE, A.L. (1963). Observations on the occasional temporary growth inhibition of citrus seedlings following heat or fumigation treatment of soil. Soil Sci.: 95, 175-185.
- MARX, D.H., BRYAN, W.C. y CAMPBELL, W.A. (1971). Effect of endomycorrhizae formed by Endogone mosseae on growth of citrus. Mycologia.: 63, 1222-1226.
- MARX, C., DEXHEIMER? J., GIANINAZZI-PEARSON, V. y GIANINAZZI, S. (1982). Enzimatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizas. IV. Ultracytoenzimological evidence (ATP ase) for active transfer processes in the host-arbuscule interface. New Phytol.: 90, 37-43.

- MATTINGLY, G.E.G. (1980). The reliability of soil phosphorus analysis in relation to fertilizer recommendations. *Chemistry and Industry*.: 1980, 690-693.
- MENGE, J.A. (1982). Effect of soil fumigants and fungicides on vesicular-arbuscular fungi. *Phytopathology*.: 72, 1125-1132.
- MENGE, J.A., DAVIS, R.M., JOHNSON, E.L.V. y ZENTMYER, G.A. (1978). Mycorrhizal fungi increase growth and reduce transplant injury in avocado. *California Agriculture*.: 32, 6-7.
- MENGE, J.A., JARRÉL, W.M.m LABANAUSKAS, C.K., OJALA, J.C., HUSZAR, C., JOHNSON, E.L.V. y SIBERT, D. (1982). Predicting mycorrhizal dependency of troyer citrange on Glomus fasciculatus in California citrus soils and nursery mixed. *Soil Sci. Soc. Am. J.* : 46, 762-768.
- MENGE, J.A. y JOHNSON, E.L.V. (1978) Comercial production of mycorrhizal inoculum may benefit Citrus growers. *Citograph*: 1978, 139-143.
- MENGE, J.A., LEMBRIGHT, M. y JOHNSON, E.L.V. (1977). Utilization of mycorrhizal fungi in Citrus nurseries. *Proc. Int. Soc. Citriculture*.: 1, 121-132.
- MENGE, J.A., JOHNSON, E.L.V. y PLATT, R.G. (1978a). Mycorrhizal dependency of several citrus cultivars under three nutrient regimes. *New Phytol.*: 81, 553-559.

- MENGE, J.A., LABANAUSKAS, C.K., JOHNSON, E.L.V. y PLATT, R.G. (1978b). Partial substitution of mycorrhizal fungi for phosphorus fertilization in the greenhouse culture of Citrus. Soil Sci. Soc. Am. J.: 42, 926-930.
- MENGE, J.A., MUNNECKE, D.E., JOHNSON, E.L.V. y CARNES, D.W. (1978c). Dosage response of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi Glomus fasciculatus and G. constrictus to methyl bromide. Phytopathol.: 68, 1368-1372.
- MENGE, J.A., STEIRLE, D., BAGYARAF, D.J., JOHNSON, E.L.V. y LEONARD, R.T. (1978d). Phosphorus concentrations in plants responsible for inhibition of mycorrhizal infection. New Phytol.: 80, 575-578.
- MENGE, J.A., RASKI, D.J., LIDER, L.A., JOHNSON, E.L.V., JONES, N.O., KISSLER, J.J. y HEMSTREET, C.L. (1983). Interactions between mycorrhizal fungi, soil fumigation, and growth of grapes in California. Am. J. Enol. Vitic.: 34, 117-121.
- MEYER, F.H. (1973). Distribution of ectomycorrhizae in native and man-made forests. En Ectomycorrhizae G.C. Marks and T.T. Kozlowski, (Eds.) pp. 79-105, Academic Press, New York.
- MILLER, D.D., DOMOTO, P.A. y WALKER, C. (1985a). Mycorrhizal fungi at eighteen apple rootstock plantings in the United States. New phytol.: 100, 379-391.
- MILLER, D.D., DOMOTO, P.A. y WALKER, C. (1985b). Colonization and efficacy of different endomycorrhizal fungi with apple seedlings at two phosphorus levels. New Phytol.: 100, 393-402.

- MOIROUD, A., CAPELLANO, A. y BARTSCHI, H. (1981). Fixation d'azote chez les espèces ligneuses symbiotiques. I. Ultrastructure des nodules, mycorrhizes à vésicules et à arbuscules et activité réductrice de C_2H_2 de jeunes plants de Robinia pseudoacacia cultivés au laboratoire. Can. J. Bot. 59, 481-490.
- MONK, D., PATE, J.S. y LONERAGAN, W.A. (1981). Biology of Acacia pulchella R. Br. with special reference to symbiotic nitrogen fixation. Australian. J. Bot.: 29, 579-592.
- MORTON, J.B. y RIZZO, A. (1983). Mycorrhizal associations with Populus grandidentata at 4 coal spoils in west-Virginia. Phytopathol.: 73, 841.
- MOSSE, B. (1956). Fructifications of an Endogone species causing endotrophic mycorrhiza in fruit plants. Ann. Bot. N.S.: 20, 349-362.
- MOSSE, B. (1957). Growth and chemical composition of mycorrhizal and non-mycorrhizal apples. Nature.: 179, 922-924.
- MOSSE, B. (1970). Honey-coloured, sessile Endogone spores. I. Life history. Arch. Mikrobiol.: 70, 167-175.
- MOSSE, B. (1972). The influence of soil type and Endogone strain on the growth of mycorrhizal plants in phosphate deficient soils. Rev. Ecol. Biol. Sol.: 9, 529-537.
- MOSSE, B. (1973). Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. Am. Rev. Phytopathol.: 11, 171-196.

- MOSSE, B. (1978). Mycorrhiza and plant growth. En "Structure and functioning of plant populations". Verhand der Koninklijke Neder. Akad. van Wetenschappen Afdeling Natuurkunde, Tweede Reeks, deel.: 70, 269-298.
- MOSSE, B. y BOWEN, G.D. (1968). A key to the recognition of some Endogone spore types. Trans. Br. Mycol. Soc.: 51, 469-483.
- MOSSE, B. y HEPPER, C. (1975). Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organ cultures. Physiol. Plant Pathol.: 5, 215-223.
- MULLER, H.R.A. (1936). Mycorrhiza in Citrus. Landbouw. 12, 1-10.
- NAHLAWI, N., RALLO, L., TOXOPEUS, H.R., CABALLERO, J.M. y EGUREN, J. (1975). Vegetative propagation of olive cultivars by softwood cutting under mist. II. Seminario Oleícola Internacional. Córdoba.
- NEILL, J.C. (1944). Rhizophages in Citrus. New Zealand J. Sci. Technol.: 25, 191-201.
- NELSEN, C.E. y SAFIR, G.R. (1982). Increased drought tolerance of mycorrhizal onion plants caused by improved phosphorus nutrition. Planta.: 154, 407-413.
- NEMEC, S. (1978). Response of six citrus rootstocks to three species of Glomus, a mycorrhizal fungus. Proc. Fla. State Hort. Soc.: 91, 10-14.

- NEMEC, (1982). Aspects of vesicular -arbuscular mycorrhizas in plant-disease research. Introduction. *Phytopathology.*: 72, 1102.
- NEMEC, S. (1985). Influence of selected pesticides on Glomus species and their infection in Citrus. *Plant and Soil.*: 84, 133-137.
- NEMEC, S. y GUY, G. (1982). Carbohydrate status of mycorrhizal Citrus rootstocks. *J. amer. Soc. Hort. Sci.*: 107, 177-180.
- NEMEC, S., MENGE, J.A., PLATT, R.G. y JOHNSON, E.L.V. (1981). vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with Citrus in Florida and California and notes on their distribution and ecology. *Mycologia.*: 72, 112-127.
- NEWCOMB, D.A. (1975). Mycorrhiza effects following soil fumigation. *Internat. Plant Propagat. Soc.*: 25, 102.
- NICOLSON, T.H. (1975). Evolution of vesicular-arbuscular mycorrhizas. En "Endomycorrhizas" Ed. F.E. Sanders, B. Mosse and P.B. Tinker. Academic Press, London. pp. 25-34.
- OCAMPO, J.A. (1980a). Micorrizas VA. I. Características generales. *Anal. Edaf. Agrobiol.*: 39, 351-365.
- OCAMPO, J.A. (1980b). Micorrizas VA. II. Efecto sobre el crecimiento de las plantas. *Anal. Edafol. Agrobiol.*: 39, 1049-1069.
- OCAMPO, J.A. (1980c). Micorrizas VA. III. Ecología. *Anal. Edafol. Agrobiol.*: 39, 1071-1088.

- OCAMPO, J.A. y HAYMAN, D.S. (1981). Influence of plant interactions on vesicular-arbuscular mycorrhizal infections. II. Crop rotations and residual effects of non-host plants. *New Phytol.*: 87, 333-343.
- OLSEN, S.R., COLE, C.V., WATANABE, F.S. y DEAN, L.A. (1954). Stimulation of available phosphorus in soil by extraction with sodium bicarbonate. *Cir. U.S. Dep. Agr.*: 939.
- PARKE, J.L., LINDERMAN, R.G. y TRAPPE, J.M. (1983). Effects of forest litter on mycorrhizal development and growth of Douglas-fir and western red cedar seedlings. *Can. J. For. Res.*: 13, 666-671.
- PEÑA CALVO, J.I. y SANCHEZ-DIAZ, M. (1983). Fisiología de la simbiosis leguminosa-Rhizobium-micorrizas-VA en condiciones de estrés hídrico. Tesis Doctoral de la Universidad de Navarra.
- PEYRONELL, B. (1922). Sulla presenza di micorrize nel grano e in altre piante coltivate spontance. *Bull. R. Staz. Path. Veg.*: 3, 43-50.
- 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.
- PIROZYNSKI, K.A. y MALLOCH, D.W. (1975). The origin of land plants: A matter of mycotrophism. *BioSystems.*: 6, 153-164.

- PLENCHETTE, C. (1982). Les endomycorhizes á vésicular et arbuscules (VA): un potentiel á exploiter en agriculture. *Phytoprotection.*: 63, 86-108.
- PLENCHETTE, C., Fortin, J.A. y FURLAN, V. (1983). Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. I. Mycorrhizal dependency under field conditions. *Plant and Soil.*: 70, 199-209.
- PLENCHETTE, C. , FURLAN, V. y FORTIN, J.A. (1981). Growth stimulation of apple trees in unsterilized soil under field conditions with VA mycorrhiza inoculation. *Can. J. of Bot.*: 59, 2003-2008.
- PLENCHETTE, C., FURLAN, V. y FORTIN, J.A. (1982). Effects of different endomycorrhizal fungi on five host plants grown on calcined montmorillonite clay. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*: 107, 535-538.
- PONDER, F. (1983). Soil-moisture levels and mycorrhizal infection in black walnut seedlings. *Commun. in Soil Sci. Plant Anal.*: 14, 507-511.
- PONDER, F. (1984). Growth and mycorrhizal development of potted white ash and black walnut fertilized by 2 methods. *Can. J. Botany.*: 62, 509-512.
- PONS, F., GIANINAZZI-PEARSON, V. GIANINAZZI, S. y NAVATEL, J.C. (1983). Studies of VA mycorrhizae in vitro: mycorrhizal synthesis of axenically propagated wild cherry (Prunus avium L.) plants. *Plant and Soil.*: 71, 217-221.

- POPE, P.E. (1980). Influence of Glomus fasciculatus mycorrhizae on some physical and chemical characteristics of Platanus occidentalis seedlings. Can. J. Bot.: 58, 1601-1606.
- POPE, P.E., CHANEY, W.R., RHODES, J.D. y WOODHEAD, S.H. (1983). The mycorrhizal dependency of four hardwood tree species. Can. J. bot.: 61, 412-417.
- PORTER, W.M. (1979). "The most probable number" method for enumerating infective propagules of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. Aust. J. soil Res. 14, 515-519.
- POWELL, C.LL. (1976). Development of mycorrhizal infections from Endogone spores and infected root segments. Trans. Br. Mycol. Soc.: 66, 439-445.
- POWELL, C.LL. (1977a). Mycorrhizas in hill country soils. II. Effect of several mycorrhizal fungi on clover growth in sterilized soils. N.Z.J. Agric. Res.: 20, 59-62.
- POWELL, C.LL. (1977b). Mycorrhizas in hill country soils. III. Effect of inoculation on clover growth in unsterile soils. N.Z.J. Agric. Res.: 20, 343-348.
- POWELL, C.LL. (1980). Mycorrhizal infectivity of eroded soils. Soil Biol. Biochem.: 12, 247-250.
- RAMIREZ, B.N., MITCHELL, D.J. y SHENK, N.C. (1975). Establishment and growth effects of three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on papaya. Mycologia.: 67, 1039-1041.

- RAMOS, A. y CALLAO, V. (1967). Criterios de selección de fosfobacterias. *Ars. Pharm.*: 11, 449-454.
- 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.
- RAYNER, M.C. (1933). Mycorrhiza in the genus Citrus. *Nature.*: 131, 339-400.
- RAYNER, C. (1935). Mycorrhizal habit in the genus Citrus. *Nature.*: 136, 516-517.
- READ, D.J., KOUCHEKI, H.K. y HODGSON, J. (1976). Vesicular-arbuscular mycorrhiza in natural vegetation systems. I. The occurrence of infection. *New Phytol.*: 77, 641-653.
- READHEAD, J.F. (1968). Mycorrhizal associations in some Nigerian forest trees. *Trans. Br. Mycol. Soc.*: 51, 377-387.
- REED, H.S. y FREMENT, T. (1935). Factors that influence the formation and development of mycorrhizal associations in Citrus roots. *Phytopathol.*: 25, 645-647.
- REEVES, F.B., WAGNER, D., MOORMAN, T. y KIEL, J. (1979). The role of endomycorrhizae in vegetation practices in the semi-arid west. I. A comparison of incidence of mycorrhizae in severely disturbed vs. natural environment. *Am. J. Bot.*: 66, 6-13.
- RHODES, L.M. y GERDEMANN, J.W. (1980). Nutrient translocation in vesicular-arbuscular mycorrhizae. En "Cellular interac-

- tions in symbiosis and parasitism" (C.B. Cook, P.W. Pappas, and E.D. Rudolph, Eds). pp. 173-198. Ohio State Univ. Press Columbus.
- RIFFLE, J.W. (1980). Growth and endomycorrhizal development of broadleaf seedlings in fumigated nursery soil. *Forest Sic.*: 26, 403-413.
- RIVES, C.S., BAJWA, M.I., LIBERTA, A.e. y MILLER, R.M. (1980). Effects of topsoil storage during surface mining on the viability of VA mycorrhiza. *Soil Sci.*: 129, 253-257.
- ROBERTS, D.R., ZIMMERMAN, R.W. STRINGER, J.W. y CARPENTER, S. B. (1983). The effects of combined nitrogen on growth, nodulation and nitrogen fixation of black locust seedlings. *Can. J. For.*: 13, 12-51-1254.
- ROSE, S.L. (1980). Mycorrhizal associations of some actinomycete nodulated nitrogen-fixing plants. *Can. J. bot.*: 58, 1449-1454.
- ROSKOSKI, J.P., MONTANO, J., VAN KESSEL, C. y CASTILLEJA, G. (1982). Nitrogen fixation by tropical woody legumes: potential source of soil enrichment. En: *Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture*. Eds. P.H. Graham and S.C. Harris. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. 447-454.
- ROSS, J.P. (1980). Effect of nontreated field soil on sporulation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with soybean. *Phytopathol.*: 70, 1200.1205.

- SABET, Y. (1940). Mycorrhizal habit in the date palm (Phoenix dactylifera L.), Nature.: 145, 782-782.
- SABET, Y. (1945). Reaction of Citrus mycorrhiza to manuriol treatment. Proc. Egyptian Acad. Sci.: 1, 21-28.
- SAFIR, G.R. (1980). Vesicular-arbuscular mycorrhizae and crop productivity. The Biology of Crop Productivity. Academic Press. New York. pp. 231-252.
- SAME, B.I., ROBSON, A.D. y ABBOTT, L.K. (1983). Phosphorus, soluble carbohydrates and endomycorrhizal infection. Soil Biol. Biochem.: 15, 593-597.
- SANDERS, F.E. y SHEIKH, N.A. (1983). The development of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in plant-root systems. Plant and Soil.: 71, 223-246.
- SANDERS, F.E., TINKER, P.B., BLACK, R.L.B. y PALMERLY, S.M. (1977). The development of endomycorrhizal root systems: I. Spread of infection and growth-promoting effects with four species of vesicular-arbuscular endophyte. New Phytol.: 78, 257-268.
- SASSON, A. (1984). Las biotecnologías: desafíos y promesas. Ed. Sextante, 2, (UNESCO), 338 pp.. Paris.
- SCHAWB, S.M., MENGE, J.A. y LEONARD, R.T. (1983). Comparison of stages of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation in sudangrass grown at two levels of phosphorus nutrition. Amer. J. Bot.: 70, 1225-1232.

- SCHENCK, N.C., GRAHAM, S.O. y GREEN, N.E. (1975). Temperature and light effects on contamination and spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia.*: 67, 1189-1192.
- SCHENCK, N.C. y KELLAM, M.K. (1978). The influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae on disease development. *Fla. Agr. Exp. Sta. Bul.* 798, 16 pp.
- SCHENCK, N.C. y KINLOCH, R.A. (1980). Incidence of mycorrhizal fungi on six field crops in monoculture on a newly cleared wood-land site. *Mycologia.*: 72, 445-456.
- SCHENCK, N.C. y SCHRODER, V.N. (1974). Temperature response of Endogone mycorrhiza on soybean roots. *Mycologia.*: 66, 600-605.
- SCHENCK, N.C. y TUCKER, D.P.H. (1974). Endomycorrhizal fungi and the development of Citrus seedlings in Florida fumigated soils. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*: 99, 284-287.
- SCHUBERT, A. (1982). Recherches sur la présence de mycorrhizes VA dans greffés-soudés de vigne. En "Les Colleges de l'INRA. n° 13". "Les mycorrhizes, partie intégrante de la plante: Biologie et perspectives d'utilisation". (Eds. Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson y A. Trouvelot.).
- SCHUBERT, A. y CAMMARATA, S. (1985). Effect of inoculation with different endophytes on growth and P nutrition of grapevine plants grown in post. 1st European Symposium on Mycorrhizae Dijon, France, Abstr. pp. 18.

- SCHULTZ, R.C., KORMANIK, P.P., BRYAN, W.C. y BRISTER, G.H. (1979). Vesicular-arbuscular mycorrhiza influence growth but not concentrations in seedlings of eight sweetgum families.: 9, 218-223.
- SHONBECK, F. (1979). En "Soil-Borne plant Pathogens" (Eds. B. Schippers and W. Gams.) pp. 271-280. Academic Press, New York y London.
- SIEVERDING, E. y LEIHNER, D.E. (1984). Influence of crop rotation and intercropping of cassava with legumes on VA mycorrhizal symbiosis of cassava. *Plant and Soil*.: 80, 143-146.
- SKUJINS. J. (1984). Microbial ecology of desest soils. *Adv. Microb. Ecol.* 7, 49-91.
- SMITH, S. S.E. (1980). Mycorrhizas of autotrophic higher plants. *Biol. Rev.*.: 55, 475-510.
- SMITH, S.E. y BOWEN, G.D. 1979. Soil temperature, mycorrhizal infection and nodulation of Medicago truncatula and Trifolium subterraneum. *Soil Biol. Biochem.*.: 11, 469-473.
- SMITH, S.E., NICHOLAS, D.J.D. y SMITH, F.A. (1979). Effect of early mycorrhizal infection on nodulation and nitrogen fixation in Trifolium subterraneum L. *Aust. J. Plant Physiol.*.: 6, 305-316.
- SMITH, F.A. y SMITH, S.E. (1981). Mycorrhizal infection growth of Trifolium subterraneum: Use of sterilized soil as a control treatment. *New Phytol.* 88, 299-309.

- SPEARS, J.S. (1980). ¿Pueden la agricultura y silvicultura coexistir en los trópicos? *Unasyuva.*: 32, 2-12.
- St. JOHN, T.V. (1980). Root size, root hairs and mycorrhizal infection: A reexamination of Baylis's hypothesis with tropical trees. *New Phytol.*: 84, 483-487.
- St. JOHN, T.V., COLEMAN, D.C. y REID, C.P.P. (1983). Association of vesicular-arbuscular mycorrhizal hyphae with soil organic particles. *Ecology.*: 64, 957-959.
- STOTZKY, G. (1972). Activity, Ecology, and Population Dynamics of microorganisms in Soil . Critical Reviews in Microbiology.: 2, 59-137.
- SUDSKAYA, L.A. (1958). Materials on the mycorrhiza of Citrus plants. Sb Rabot. Kapedry. Bot. Mort. Sel'skokhoz Acad. Im. K.A. Timiryazeva.: 1, 128-147.
- SUTTON, J.C. (1973). Development of vesicular-arbuscular mycorrhizae in crop plants. *Can. J. bot.*: 51, 2487-2493.
- SWARD, R.J. (1981). The structure of the spores of Gigaspora margarita. 3. Germ tube emergence and growth. *New. Phytol.*: 88, 667-673.
- TIMMER, L.W. y LEYDEN, R.F. (1978a). Stunting of Citrus seedlings in fumigated soils in Texas and its correction by phosphorus fertilization and inoculation with mycorrhizal fungi. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*: 103, 533-537.
- TIMMER, L.W. y LEYDEN, R.F. (1978b). Relationship of seedbed fertilization and fumigation to infection of sour orange

- seedlings by mycorrhizal fungi and Phytophthora parasitica. J. Amer. Soc. Hort. Sci.: 103, 537-103.
- TIMMER, L.W. y LEYDEN, R.F. (1980). The relationship of mycorrhizal infection to phosphorus-induced copper deficiency in sour orange seedlings. New Phytol.: 85, 15-23.
- TINKER, P.B. (1980). Role of rhizosphere microorganisms in phosphorus uptake by plants. En "The role of Phosphorus in Agriculture", pp. 617-653. Amer. Soc. Agrom., Madison, Wisconsin.
- TISDALL, J.M. y DADES, J.M. (1979). Stabilization of soil aggregates by the root systems of ryegrass. Aust. J. Soil Res.: 17. 429-441.
- TOMMERUP, I.C. (1983). Spore dormancy in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Trans. Br. Mycol. Soc.: 81, 37-45.
- TOMMERUP, I.C. y ABBOTT, L.K. (1981). Prolonged survival and viability of VA mycorrhizal hyphae after root death. Soil Biol. Biochem.: 13, 431-433.
- TOMMERUP, I.C. y KIDBY, D.K. (1980). Production of aseptic spores of vesicular-arbuscular endophytes and their viability after chemical and physical stresses. Appl. Environ. Microbiol.: 39, 1111-1119.
- TRAPPE, J.M. (1977). Three new Endogonaceae: Glomus constrictus, Sclerocystic clavispora, and Acaulospora scrobiculata. Mycotaxon.: 6, 359-366.
- TRAPPE, J.M. (1979). En "Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperature Forests" (J.C. Gordon, C.T.

- Weeler, and D.A. Perry, eds.), pp. 276-286. Oregon State Univ. For. Res. Lab., Corvallis.
- TRAPPE, J.M. (1981). Mycorrhizae and productivity of arid and semiarid rangelands. En, "Advances in food producing systems for arid and semi arid lands". pp. 581-599. Academic Press. Inc., New York.
- TRAPPE, J.M. (1982). Synoptic keys to the genera and species of zigomycetous mycorrhizal fungi. *Phytopathology.*: 72, 1102-1108.
- TRAPPE, J.M. y FOGEL, R.D. (1977). Ecosystematic functions of mycorrhizae. *Range Sci. Dep. Sci. Ser., Colo. State Univ.*: 26, 205-214.
- TRONCOSO y CERDA, A. (1983). Procedimiento para enraizar estaquillas de plantas semiherbáceas. Patente nº 521533, C.S.I.C.
- TRONCOSO, A., MONTAÑO, J.C., MURILLO, J.M. y NICOLAS, A. (1980). Influencia del fotoperiodo en el desarrollo de plantas jóvenes de Olivo. 3^{er} Congreso Nacional de Química. Sevilla.
- TUCKER, D.P.H. y ANDERSON, C.A. (1972). Correction of Citrus seedling stunting on fumigated soils by phosphate application. *Proc. Fla. Hort. Soc.*: 85, pp. 10.
- TZEAN, S.S. y HUANG, Y.S. (1980). The occurrence and formation of vesicular-arbuscular mycorrhizae of Citrus and maize. *Bot. Bull. Academia Sinica.*: 21, 119-134.

- VERKADE, S.D. y HAMILTON, D.F. (1983). Effects of benomyl on growth of Liriodendron tulipifera L. seedlings inoculated with the vesicular-arbuscular fungus, Glomus fasciculatus. Scientia Horticulturae.: 21, 253-260.
- WARNER, A. y MOSSE, B. (1980). Independent spread of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. Trans. Br. Mycol. Soc.: 74, 407-410.