

## ARTÍCULOS

**Colonización micorrícica de los plantines de ciprés de la cordillera en relación con la disponibilidad de fósforo y agua en vivero**

Mycorrhizal colonization of mountain cypress seedlings in relation to phosphorus and water availability under nursery conditions

**Diego S Massone<sup>a,b\*</sup>, Analía A Martucci<sup>a</sup>, Julieta E Askenazi Vera<sup>b</sup>, Mario J Pastorino<sup>c</sup>, Carlos Bartoli<sup>d</sup>**

<sup>a</sup> Universidad Nacional de la Patagonia SJB, Instituto de Biotecnología Esquel (INBIES), Unidad de Propagación Vegetal, Esquel, Argentina, tel.: 54 2945415445.

\* Autor de correspondencia: <sup>b</sup> Universidad Nacional de la Patagonia SJB, Facultad de Ingeniería Forestal, Esquel, Chubut, Argentina, upv.inbies@gmail.com

<sup>c</sup> Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria – Instituto de Investigaciones Forestales y Agropecuarias Bariloche (IFAB, INTA – CONICET), EEA Bariloche, Rio Negro, Bariloche, Argentina.

<sup>d</sup> Universidad Nacional de La Plata, Instituto de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, CCT-CONICET, Buenos Aires, La Plata, Argentina.

## ABSTRACT

The association of roots with mycorrhizal fungi increases the establishment success of forest species. Cordilleran cypress naturally forms associations with arbuscular mycorrhizae (AM). In general, the use of fertigation and artificial growth methods causes a decrease in mycorrhization, which could lead to a decrease in seedling performance in the field. The objectives of this study were: to determine whether AM colonization occurs in a nursery; to evaluate the influence of differing availability of phosphorus and substrate water status on the level of mycorrhizal colonization during plant growth; and to analyze the abundance of mycorrhization and its relationship with post-planting survival. The trial treatments were only applied during plant growth and consisted of a combination of three phosphorus concentration levels (1, 10 and 100 mg L<sup>-1</sup>) and two substrate water statuses (20 and 80 % of the container capacity (Cc)). The percentage of mycorrhization (% AM) was evaluated in plants grown in a nursery, in a sterilized substrate in the field, as was its survival in the field. Among the most relevant results, 24 % AM was found in the nursery while this value increased in the field (93 %), indicating that the mycorrhizal colonization process occurs during plant growth, even though it is partially inhibited by phosphorus and water management. It was also observed that the % MA increased once the plant was taken to the field independently of the % MA of the seedling in the nursery.

*Keywords:* *Austrocedrus chilensis*, arbuscular mycorrhizae, spontaneous inoculation.

## RESUMEN

La asociación de raíces con hongos micorrícicos aumenta el prendimiento en la implantación de especies forestales. El ciprés de la cordillera forma naturalmente micorrizas del tipo arbusculares (MA). En general, el uso de fertirriego y medios de crecimiento artificiales provoca una disminución de la micorrización, lo que podría repercutir en una disminución del desempeño a campo del plantín. Los objetivos de este estudio fueron: estudiar si se produce colonización de MA en vivero; evaluar la influencia de distintas disponibilidades de fósforo y estados hídricos del sustrato en el nivel de colonización micorrícica durante la viverización; analizar la abundancia de la micorrización y su relación con la supervivencia post plantación. Los tratamientos de los ensayos solo se aplicaron durante la viverización, y consistieron en la combinación de tres niveles de concentración de fósforo (1, 10 y 100 mg L<sup>-1</sup>) y dos estados hídricos del sustrato (20 y 80 % de la capacidad de contenedor (Cc)). Se evaluó el porcentaje de micorrización (% MA) en plantas cultivadas en vivero, en sustrato esterilizado y en campo, como así también la supervivencia en campo. Entre los resultados más relevantes se encontró un % MA en vivero del 24 % y un aumento de este valor en campo (93 %), mostrando que el proceso de colonización micorrícica se produce durante la viverización, a pesar de que la misma se encuentre inhibida parcialmente por el manejo del fósforo y del agua. También se observó que el % MA aumentó una vez que la planta fue llevada a campo independientemente del % MA que el plantín tenía en el vivero.

*Palabras clave:* *Austrocedrus chilensis*, micorrizas arbusculares, inoculación espontánea.

## INTRODUCCIÓN

El potencial de manipular la inoculación de las plantas con hongos micorrícicos para aumentar la productividad en plantaciones forestales o el establecimiento durante la restauración de ecosistemas después de una severa perturbación, es foco de una gran cantidad de investigaciones (Brundrett *et al.* 1996). Los hongos micorrícicos forman asociaciones con las raíces de más del 90 % de las plantas superiores, incluyendo árboles forestales, pastos silvestres y muchos cultivos (Bonfante y Genre 2010). Ambas partes de esta relación mutualista se benefician: el hongo micorrícico mejora el estado nutricional de la planta, contribuyendo a su nutrición mineral, absorción de agua, crecimiento y resistencia a las enfermedades, mientras que la planta es esencial para el hongo al proveerlo de los fotosintatos necesarios para su crecimiento y reproducción (Smith y Read 1997). Esta simbiosis no solo mejora el crecimiento de las plantas a través del aumento de la absorción de fósforo disponible en el suelo (P) y otros nutrientes minerales de baja movilidad esenciales para el crecimiento de las plantas, sino también tienen efectos ‘no nutricionales’ en la estabilización de los agregados del suelo, en la prevención de la erosión, y en la disminución del estrés de la planta causado por factores bióticos y abióticos (Smith y Read 2008).

Las micorrizas se clasifican en 7 diferentes tipos, siendo las endomicorrizas o micorrizas arbusculares las más frecuentes y abundantes en algunos ecosistemas (Kumar *et al.* 2015, Barman *et al.* 2016, Brundrett y Tedersoo 2018). La mayoría de las especies de plantas, exceptuando las acuáticas estrictas y algunas familias de plantas terrestres (Chimal-Sánchez *et al.* 2016), han sido documentadas como formadoras de micorrizas del tipo arbusculares (MA) (Vargas-Vázquez *et al.* 2021). Los hongos que forman MA se caracterizan por presentar un crecimiento intra e intercelular en la corteza de la raíz y por formar dos tipos de estructuras intrarradicales: arbuscúlos y vesículas (Quilambo 2003). Los hongos de las MA presentan una diversidad baja en relación a las plantas hospedadoras, con 230 especies descritas morfológicamente, en comparación con el estimado de 300.000 especies de plantas terrestres (Mora *et al.* 2011). En Chile, Godoy y Mayr (1989) mencionan que la mayoría de las especies de coníferas poseen una extraordinaria capacidad de adaptación, sobreviviendo frecuentemente bajo condiciones extremas, rasgo que estaría muy relacionado al papel que cumplen las asociaciones micorrícicas en estas especies. Los estudios realizados por estos autores indican relaciones endo-micorrícicas para coníferas nativas como el ciprés de la cordillera, pehuén (*Araucaria araucana* (Mol.) K. Koch), alerce (*Fitzroya cupressoides* I.M. Johnst.), ciprés de las Guaitecas (*Pilgerodendron uviferum* (D. Don) Florin), ciprés enano (*Dacrydium fonckii* (Phill.) Florin), mañío de hojas punzantes (*Podocarpus nubigena* Lindl.), mañío de hojas largas (*P. salignus* Lindl.), lleuque (*Prumnopitys andina* (P. et E.) de Laub.) y mañío de hojas cortas (*Saxegothaea conspicua* Lindl.). Se deter-

minó la presencia de MA en poblaciones naturales de ciprés de la cordillera en el Parque Nacional Nahuel Huapi, y además se encontraron MA en la mayoría de las especies acompañantes (*Maytenus boaria* Mol., *Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz, *Mutisia* spp.) (Fontenla *et al.* 1998).

En general el uso de fertirriego, que conlleva altas dosis de nitrógeno y fósforo, usado en medios de crecimiento artificiales provoca una disminución de la micorrización (Landis *et al.* 1990, Martínez *et al.* 2007). Fernández *et al.* (2013) indican que al disminuir las dosis de nutrientes que se aplican en los invernaderos, las micorrizas comienzan a aparecer y desarrollarse en las raíces de las plantas. En el estudio de Landis *et al.* (1990) mencionan que la micorrización puede no afectar el crecimiento de los plantines en el vivero, pero les otorgará mejores chances de supervivencia y mayores crecimientos una vez plantados a campo. Por otro lado, Jumpponen *et al.* (2005) señalan que los resultados de experiencias hechas a campo y en invernaderos varían ampliamente, e indican que el enriquecimiento con nitrógeno puede aumentar, disminuir o no tener efecto sobre la formación de MA. En esta misma línea, Salgado Salomón *et al.* (2009) sugirieron que el manejo de la micorrización bajo sistemas que reciben fertilización requiere un estudio detallado para cada caso, dado que existen reportes contradictorios sobre el efecto inhibitorio de la fertilización sobre la micorrización, dependiendo de las especies arbóreas y fúngicas involucradas.

Por lo expuesto, nuestros objetivos son: (i) evaluar si se produce la colonización en vivero o si los plantines de ciprés de la cordillera son micorrizados una vez que son llevados a campo, (ii) evaluar la influencia de distintas disponibilidades de fósforo y estados hídricos del sustrato en el nivel de colonización micorrícica durante la viverización, y (iii) analizar la abundancia de la micorrización y su relación con la supervivencia post plantación. Se plantea como hipótesis que en plantines de ciprés de la cordillera obtenidos mediante métodos de viverización con altos niveles de fertilizante y condiciones hídricas adecuadas, la micorrización será parcialmente inhibida. Por otra parte, se espera que el nivel de colonización micorrícica aumente de forma natural una vez que los plantines son llevados a campo.

## MÉTODOS

*Material vegetal y ambiente de cultivo.* Los experimentos de este estudio se llevaron a cabo con plantines de ciprés de la cordillera generados a partir de semillas de un rodal natural ubicado en la cabecera sur del Lago Futalaufquen (42° 54' 31,6" S, 71° 36' 41,8" W - 570 m s.n.m.), Parque Nacional Los Alerces, Provincia del Chubut. Se cosecharon los conos directamente de las ramas fructíferas, muestreando 16 árboles de polinización abierta separados por al menos 30 m de distancia entre sí, de tal modo de minimizar la probabilidad de muestrear árboles emparentados y asegurar una base genética amplia (Pastorino *et al.* 2013). La cosecha se llevó a cabo en el momento de madurez de

los conos. Para la siembra se utilizó semilla de la fracción de 2 a 3,5 mm de calibre.

El ensayo se desarrolló en la Unidad de Propagación Vegetal (UPV) del Instituto INBIES de la Universidad Nacional de la Patagonia (UNPSJB) (42° 55' 55,51" S, 71° 21' 50,17" W - 560 m s.n.m.), dentro de un invernadero de estructura metálica de arco tipo gótico de 6 m de frente por 18 m de largo (108 m<sup>2</sup>), el cual cuenta con las siguientes características: piso de cemento, apertura y cierre automáticos de cortinas laterales (control de temperaturas máximas y renovación de gases), calefacción por caldera de tiro forzado (control de temperaturas mínimas), control de fotoperiodo.

Se utilizaron tubetes individuales de 250 mL (140 mm de altura y 65 mm de diámetro superior del alvéolo), de sección tronco cónica, con 8 nervaduras interiores y 4 ventanas laterales en el extremo inferior para inducir la autopoda radical (DASSPLASTIC®, modelo R250). Los tubetes se ubicaron en bandejas porta-tubetes con capacidad para 56 unidades. Con la utilización de esta bandeja se obtuvo una densidad de cultivo de 207 plantas por m<sup>2</sup>. La siembra se efectuó directamente en los tubetes, rellenados con un sustrato formado por una mezcla de perlita y turba rubia *Sphagnum* en relación 1:2.

Con el propósito de descartar la presencia de esporas de MA en el sustrato utilizado en el vivero, se realizó un análisis sobre 10 muestras de sustrato, utilizando una adaptación de la técnica de extracción de esporas MA de muestra de suelo usada por Ianson y Allen (1986). Para esto se pesaron 50 g (por muestra) de sustrato, se diluyeron en 500 mL de agua destilada y se homogeneizaron, dejando reposar durante una noche. Luego se tamizó el preparado con tamices de suelo n° 25. Al sustrato residual se lo lavó con 300 mL de agua destilada, nuevamente en el tamiz, y luego se descartó la fracción mayor al tamiz n° 25. La fracción tamizada se centrifugó durante 5 min a 2.000 rpm, descartando el sobrenadante. El sólido se resuspendió en 50 mL de solución de sacarosa al 50 % y se centrifugó nuevamente por 5 min a 2.000 rpm. Por último, se filtró el sobrenadante en papel filtro n° 4 y se procedió a observar en una lupa binocular estereoscópica 10X (Bausch & Lomb). El análisis descripto no evidenció presencia de esporas de MA, en las muestras de sustrato analizadas.

Se utilizó un método de viverización semi-controlado con manejo de "fertirrigación" (provisión de fertilizantes a través del agua de riego). Este método distingue distintas fases de crecimiento, caracterizadas no solo por la etapa fenológica por la que transita el plantín sino también por un manejo de distintos factores que tienen incidencia en el desarrollo del cultivo (*i.e.* disponibilidad de agua y nutrientes, entre los principales), buscando objetivos específicos para cada etapa de desarrollo. Las fases de crecimiento que formaron parte del ciclo de cultivo de este ensayo fueron:

- Establecimiento: desde la finalización del raleo hasta el comienzo del crecimiento del epicótilo,

por un lapso de 6 semanas, desde el principio de primavera.

- Crecimiento rápido: desde el final del establecimiento, extendiéndose por 8 semanas, hasta principios de verano.
- Rustificación: desde el final del crecimiento rápido hasta el detenimiento del crecimiento radical (ausencia de puntas blancas), transcurriendo por aproximadamente 16 semanas, hasta mediados de otoño.

La duración de cada fase de crecimiento fue similar a la utilizada por otros autores en el cultivo de *A. chilensis* bajo este método de viverización (Enricci y Massone 2003, Havrylenko 2005, Taccari 2012).

El cultivo pasó por dos ciclos de crecimiento en vivero, separados por la etapa de dormancia, la cual transcurre desde el detenimiento del desarrollo radical hasta su reactivación, abarcando los meses invernales. Las fases de crecimiento se repitieron en el segundo ciclo de viverización con la misma duración que en el primer ciclo.

*Manejo de agua y fertirriego.* Luego de la siembra se realizaron riegos frecuentes para mantener el contenido de humedad del sustrato lo más cercano posible a capacidad de contenedor (Cc). Una vez producida la germinación, la frecuencia de riego se estableció utilizando el método de las pesadas, o sea usando como indicador para efectuar el riego un porcentaje del peso de las bandejas a Cc. En la fase de establecimiento se regó al llegar al 20 % o el 80 % (según tratamiento) del peso de la bandeja a Cc, en crecimiento rápido al alcanzar el 50 % y en rustificación al 40 %. El riego se aplicó en forma manual mediante la utilización de un kit de riego formado por una bomba periférica y un aplicador en forma de roseta.

En relación al manejo del fertirriego, tanto en la fase de crecimiento rápido como en la de rustificación, se utilizaron soluciones fertilizantes únicas para todos los tratamientos del ensayo. En la fase de crecimiento rápido se usó una solución nutritiva con una concentración de nitrógeno = 48 mg L<sup>-1</sup>, fósforo = 34 mg L<sup>-1</sup> y potasio = 50 mg L<sup>-1</sup>. Para llegar a estos valores se diluyó por litro de agua 0,265 g del fertilizante COMPO® HAKAPHOS rojo (18 - 18 - 18) y 0,02 mL de ácido fosfórico al 85 %. Para la solución de aplicación utilizada en la fase de rustificación se diluyó en un litro de agua 0,34 g de fertilizante COMPO® HAKAPHOS base (7 - 12 - 40), 0,23 g de fosfato monoamónico, 0,1 g de fosfato monopotásico y 0,02 mL de ácido fosfórico al 85 %, alcanzándose una concentración de nitrógeno = 49 mg L<sup>-1</sup>, de fósforo = 100 mg L<sup>-1</sup> y de potasio = 150 mg L<sup>-1</sup>. En la fase de establecimiento se usaron diferentes soluciones fertilizantes según los tratamientos aplicados.

*Tratamientos.* Los tratamientos consistieron en la combinación de distintos niveles de los dos factores estudiados, fósforo y agua, aplicados en la etapa de viverización, solo

durante la fase de establecimiento. Se aplicaron tres niveles del factor concentración de fósforo (1, 10 y 100 mg L<sup>-1</sup>) y dos niveles de estado hídrico del sustrato (20 % y 80 % de la Cc). De la combinación de los niveles de los factores se generaron seis tratamientos, los que se identificaron de la siguiente manera: T 20-1, T 20-10, T 20-100, T 80-1, T 80-10 y T 80-100. Para generar los tres niveles de concentración de fósforo, se diseñaron distintas soluciones nutritivas teniendo en cuenta los 10 mg L<sup>-1</sup> de potasio, 4 mg L<sup>-1</sup> de magnesio, 19 mg L<sup>-1</sup> de sulfatos y 67 mg L<sup>-1</sup> de calcio aportados por el agua de riego usada en el ensayo (cuadro 1), en tanto que los estados hídricos se determinaron mediante el método de las pesadas (Landis *et al.* 1989).

Para alcanzar los objetivos planteados, el análisis de colonización micorrícica (variable analizada) se efectuó sobre tres lotes de 48 plantas cada uno (8 plantines elegidos al azar por cada tratamiento), los cuales fueron sometidos a tres procesos diferentes (L1, L2 y L3). Si bien los tratamientos solo se aplicaron durante la etapa de vivero (L1), se mantuvo la identificación de los mismos en L2 y L3.

A un primer lote de plantas (L1), se le efectuó la determinación de micorrizas inmediatamente después de finalizado su segundo ciclo de crecimiento en vivero, directamente de los tubetes de 250 cm<sup>3</sup>. Entonces L1 se compuso de plantas con dos ciclos de crecimiento en tubetes en el vivero.

A las plantas de un segundo lote (L2), una vez concluido su segundo ciclo vegetativo en vivero se las repicó a envases de nylon negro de 1.000 cm<sup>3</sup> (20 cm de alto por 12 cm de diámetro) con 4 orificios basales para el drenado del agua. Como sustrato para el llenado de los envases se utilizó una mezcla formada por una proporción 1:1 de suelo (recolectado en las inmediaciones del vivero) esterilizado mediante tres tinalizaciones de una hora de duración, según metodología seguida por Salgado Salomón (2009), y turba rubia de *Sphagnum* esterilizada en estufa a 105 °C durante 72 horas. Las plantas envasadas se mantuvieron durante una temporada de crecimiento en invernadero, interviniéndolas solamente con dos aplicaciones semanales de agua de perforación. Las mismas se envasaron en el mes de septiembre y permanecieron en los envases durante 13 meses, extrayéndolas para realizarles los análisis de micorrizas en el mes de octubre del año siguiente. Resumiendo, las plantas de L2 pasaron dos ciclos vegetativos en tubete y un ciclo en envase, los tres períodos en el vivero.

Finalmente un tercer lote de plantines (L3) fue llevado al campo a principios de la primavera una vez concluido su segundo ciclo de crecimiento en vivero. La plantación se realizó en el mes de septiembre en un bosque puro de ciprés de la cordillera (41° 52' 08" S, 71° 29' 15" W - 564 m s.n.m.). El sitio presentaba baja densidad de sotobosque, una pendiente del 5 % con exposición noroeste y un suelo con textura franco arenosa formada por 2,3 % de arcilla, 12,4 % de limo y 85,3 % de arena. El mismo se encontraba dentro la Reserva el Guadal ubicada en la zona de Mallín Ahogado en la Ciudad de El Bolsón, Provincia de Río Negro. Debido a que el terreno presentaba una ligera pendiente se decidió realizar la plantación con un diseño en bloques, colocando a las repeticiones en forma perpendicular a la pendiente. Las plantas fueron muestreadas, luego de efectuarles las mediciones de supervivencia, en el mes de octubre del año siguiente. La extracción de las plantas se efectuó con pala, teniendo los recaudos necesarios para romper la menor cantidad posible de raíces. Una vez descalzada la planta, se colocó rápidamente el cepellón en una bolsa de *nylon* para evitar la pérdida de humedad en las raíces hasta el momento de realizarle el análisis. De esta manera, las plantas del L3 pasaron dos ciclos vegetativos en tubete en el vivero y un ciclo de crecimiento plantados en el campo.

*Variables analizadas.* Se midió el porcentaje de colonización de raíces por micorrizas arbusculares (% MA). Para realizar esto, los sistemas radicales de los plantines de todos los lotes a evaluar fueron lavados y teñidos según la siguiente metodología (Cázares y Trappe 1993). Se lavaron los sistemas radicales profusamente con agua corriente (mínimo 10 min). De cada sistema radical se seccionaron raíces por un total de 150 cm, en porciones de aproximadamente 2,5 cm de largo y se colocaron en celdas plásticas Tissue-Tek (Fisher Scientific Co. Pittsburgh, PA) para la decoloración. Se colocaron las celdas con las raicillas (raíces laterales sanas y homogéneas en tamaño) en KOH al 10 % llevándolas a 100 °C en baño maría durante 10 min, a partir de la ebullición. Luego se enjuagaron con agua corriente 5 veces, escurriendo el excedente de agua en papel absorbente. A temperatura ambiente se decoloraron en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 vol. al 15 % durante no menos de 3 h y se lavaron nuevamente en agua corriente 5 veces, es-

**Cuadro 1.** Concentraciones de las sales fertilizantes utilizadas en las tres soluciones nutricionales de los distintos niveles de fósforo (P).  
 Concentrations of the fertilizer salts used in the three nutrient solutions for different levels of phosphorus (P).

Nivel de concentración de P	Soluciones nutritivas expresadas en gramos de sales fertilizantes hidrosolubles por litro de agua
1 mg L <sup>-1</sup>	0,02 COMPO® HAKAPHOS violeta (7-12-40); 0,065 NO <sub>3</sub> K; 0,19 (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Mg.
10 mg L <sup>-1</sup>	0,02 COMPO® HAKAPHOS violeta (7-12-40); 0,065 NO <sub>3</sub> K; 0,19 (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Mg.; *0,02 H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> al 85 %.
100 mg L <sup>-1</sup>	0,26 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,3 NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; *0,02 H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> al 85 %.

\*: mililitros (mL)



curriéndolas luego en papel absorbente. Se tiñeron en azul de tripano en lactoglicerol al 0,05 % (proporción 3:1:1 glicerina: Ác. Láctico: H<sub>2</sub>O) durante 30 min a 4 °C. Finalmente se almacenaron perfectamente identificadas en lactoglicerol a 4 °C hasta el examen microscópico.

El porcentaje de colonización con MA se estimó mediante el método de intersección (Brundrett *et al.* 1996), expresado en la siguiente ecuación:

$$\% = \left( \frac{\sum}{IP} \right) \times 100 \quad [1]$$

siendo: % AM: porcentaje de colonización del sistema radical con hongos micorrícicos del tipo arbusculares, expresado en porcentaje (%), IM: intersecciones con raíz micorrizada, e IT: intersecciones totales.

El conteo de la cantidad de intersecciones de cada sistema radical analizado se efectuó sobre una caja de Petri a la que se le diseñó un fondo con una grilla cuadrada de 1 cm x 1 cm. Sobre esta grilla se distribuyeron homogéneamente las muestras de raíces y se efectuaron los conteos de las intersecciones de las raíces con las líneas de la grilla, identificando como "SI" a las intersecciones con raíces micorrizadas (teñidas de azul) y como "NO" las intersecciones con raíces no micorrizadas (no teñidas), contabilizando en un primer término los cruces en las líneas horizontales y luego en las verticales (figura 1). Las observaciones se realizaron con una lupa binocular estereoscópica 10X (Bausch & Lomb).

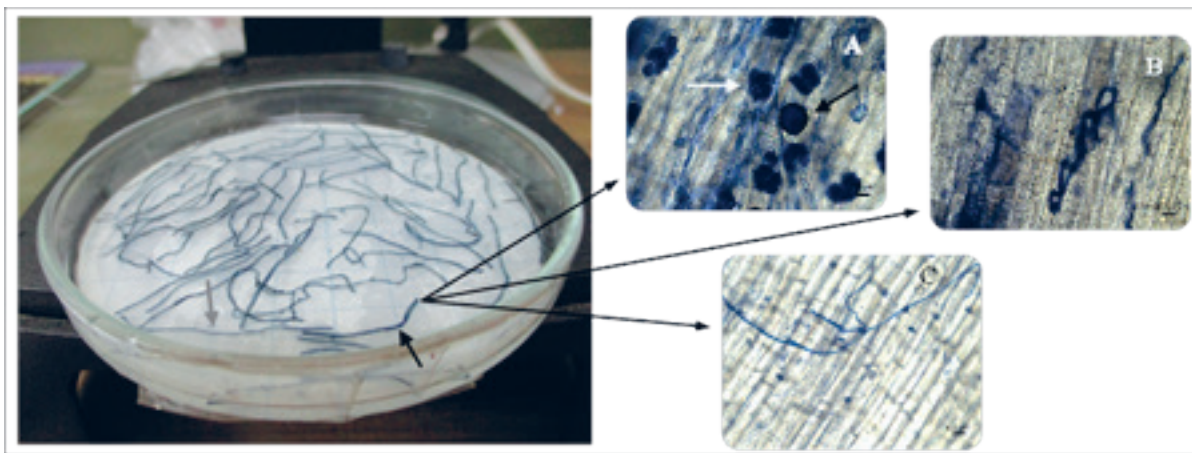
De los casos "SI" se realizó una sub-muestra de alrededor del 10 % del material para verificar que la tinción efectivamente se debía a estructuras pertenecientes a las MA

(i.e. vesículas, arbusculos, rulos e hifas inter-intracelulares). Estas observaciones se realizaron con un microscopio óptico Leica DM500 (figura 1 A, B y C). Por último, la cantidad de intersecciones "SI" y la cantidad de intersecciones totales ("SI" + "NO") se utilizaron en la ecuación 1.

También se registró la supervivencia de las plantas de L3 en campo. La supervivencia se determinó en forma visual, identificando como planta viva a los ejemplares con el follaje verde y planta muerta a las que mostraban el follaje totalmente seco o con signos de deterioro irreversibles (falta de turgencia severa o copas con un porcentaje mayor al 80 % del follaje seco).

*Diseño experimental y análisis estadístico.* Los ensayos de los lotes de plantas 1 y 2 se trabajaron con un diseño completamente aleatorizado (DCA), mientras que para el ensayo del lote 3 se utilizó un diseño en bloques completos aleatorizados (DBCA). En los tres casos se trabajó con 8 réplicas por tratamiento y la unidad muestral la conformó el plantín.

Para comprobar el efecto de los tratamientos se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) para las variables % MA y crecimiento inicial. En el caso de % MA se ajustó un modelo lineal factorial para la variable transformada con la función arcoseno con el fin de cumplir el supuesto de normalidad de los datos. Para el análisis de la variable supervivencia se utilizó un modelo lineal generalizado debido a que se trata de una variable binaria (viva-muerta). En los casos en que se encontraron diferencias entre los tratamientos se utilizó el test de LSD Fisher ( $\alpha = 0,05$ ) con corrección de Bonferroni. El procesamiento de los datos se realizó con el programa estadístico InfoStat / Profesional, versión 2016.



**Figura 1.** Caja de Petri con la cuadrícula de fondo y las raíces distribuidas. La flecha negra señala la intersección considerada 'SI', y la flecha gris la intersección considerada 'NO'; estructuras observadas en microscopio: A) Vesículas (flecha negra) y arbusculos (flecha gris claro), B) coils y C) hifas inter-intercelulares.

Petri dish with the background grid and the distributed roots. The black arrow points to the intersection considered 'YES', and the gray arrow to the intersection considered 'NO'. Structures observed under the microscope include: A) vesicles (black arrow) and arbuscules (light gray arrow), B) coils and C) intercellular hyphae.

## RESULTADOS

*Porcentaje de colonización de raíces por MA (% MA).* En los tres lotes de plantas (L1, L2 y L3) se comprobó la presencia de MA. La interacción de los factores concentración de fósforo y estado hídrico del sustrato no fue significativa ( $P > 0,05$ ), por lo que los factores actuaron en forma independiente.

El lote L1 (tubetes) mostró un % MA general del 24 %. Asimismo, se probaron diferencias significativas % MA entre los niveles ensayados, tanto para el factor estado hídrico del sustrato ( $P < 0,001$ ) como para el factor concentración de fósforo ( $P = 0,003$ ) (figura 2 A y B). Respecto al primer factor, las plantas con un estado hídrico más seco (20 % de la Cc) fueron las que mostraron mayor % MA, con valores cercanos al 32 %, en tanto que las de estado hídrico más húmedo (80 % de la Cc) rondaron el 16 % de colonización micorrícica. El factor fósforo mostró mayores % MA en el nivel de menor concentración (1 mg L<sup>-1</sup>), presentando porcentajes de 30 %, en tanto que los niveles de 10 y 100 mg L<sup>-1</sup> de fósforo no se diferenciaron entre sí, arrojando porcentajes de colonización de MA del orden del 22 % y 20 % respectivamente.

El % MA del lote L2 (envases) fue del orden del 81 %, y solo se comprobaron diferencias significativas entre los niveles del factor concentración de fósforo ( $P = 0,006$ ) (figura 3). El nivel de 100 mg L<sup>-1</sup> de fósforo presentó los mayores % MA, rondando valores del 94 %, diferenciándose de los plantines tratados con 10 mg L<sup>-1</sup> de fósforo, que fueron los que exhibieron los menores % MA (64 %).

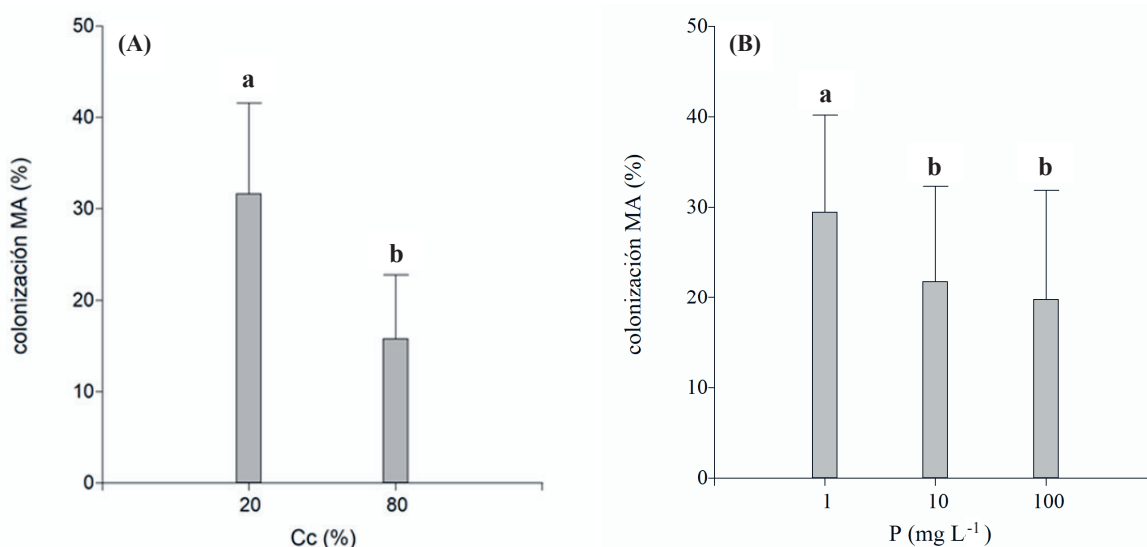
En tanto que las plantas tratadas con 1 mg L<sup>-1</sup> de fósforo no se diferenciaron del resto, mostrando porcentajes intermedios del orden del 85 %. El factor contenido hídrico presentó porcentajes que rondaron el 81 % de % MA.

El % MA del lote L3 (campo) fue del orden del 93 %, y solo se comprobaron diferencias significativas entre los niveles del factor estado hídrico del sustrato ( $P < 0,001$ ) (figura 4). Las plantas manejadas con el nivel de menor estado hídrico (20 % de la Cc) presentaron los mayores % MA, mostrando porcentajes del orden del 98 %, en tanto que las plantas tratadas con un estado hídrico mayor (80 % de la Cc) exhibieron los menores porcentajes de MA (87 %). El factor fósforo mostró porcentajes del orden del 92 %.

*Supervivencia.* En el registro de supervivencia, tanto el factor concentración de fósforo como el factor de contenido hídrico, no presentaron diferencias significativas para ninguno de los niveles ensayados ( $P = 0,553$  y  $P = 0,993$  respectivamente). La supervivencia fue alta en todos los tratamientos, promediando un 96 % en el total del ensayo a campo (ningún tratamiento bajó del 87 % de supervivencia).

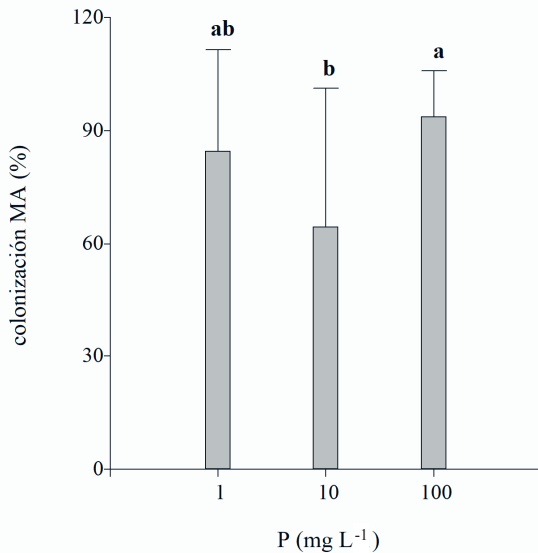
## DISCUSIÓN

El análisis de porcentaje de colonización de MA (% MA) realizado al lote L1 de plantas, inmediatamente después de concluir el segundo ciclo de cultivo, dio como resultado presencia de MA. Referente a este resultado, Salgado Salomon *et al.* (2009) en un estudio realizado so-



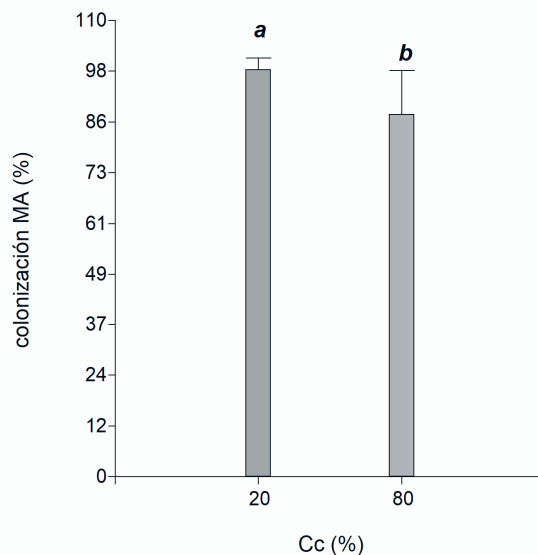
**Figura 2.** Porcentaje de colonización de MA de plantines de Ciprés de la Cordillera del lote L1 (plantines analizados directamente del vivero). (A) En relación a los dos niveles de contenido hídrico. (B) En relación a los tres niveles de concentración de fósforo ensayados. Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas (Fisher,  $P < 0,05$ ).

Percentage of AM colonization of Cordilleran cypress seedlings from lot L1 (seedlings analyzed directly from the nursery). (A) In relation to the two levels of water content. (B) In relation to the three levels of phosphorus concentration tested. Values followed by the same letter per treatment do not show significant differences (Fisher,  $P < 0.05$ ).



**Figura 3.** Porcentaje de colonización de MA de plantines de Ciprés de la Cordillera del lote L2 (plantines analizados luego de 1 año de permanencia en envase con suelo esterilizado), en relación con los tres niveles de concentración de fósforo ensayados. Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas (Fisher,  $P < 0,05$ ).

Percentage of AM colonization of Cordilleran cypress seedlings from lot L2 (seedlings analyzed after 1 year in sterilized soil), in relation to the three levels of phosphorus concentration tested. Values followed by the same letter per treatment did not show significant differences (Fisher,  $P < 0.05$ ).



**Figura 4.** Porcentaje de colonización de MA de plantines de Ciprés de la Cordillera del lote L3 (plantines analizados luego de 1 año de permanencia en campo), en relación a los dos niveles de contenido hídrico. Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas (Fisher,  $P < 0,05$ ).

Percentage of AM colonization of Cordilleran cypress seedlings from lot L3 (seedlings analyzed after 1 year in the field), in relation to the two levels of water content. Values followed by the same letter per treatment do not show significant differences (Fisher,  $P < 0.05$ ).

bre el estado micorrícico de plántulas de pino ponderosa (*Pinus ponderosa* Dougl. ex Laws.), observaron presencia de micorrizas en plantines salidos de vivero producidos bajo un método similar al implementado en este ensayo, asociando dicha colonización a cuatro fuentes posibles de inóculos: 1) el sustrato (arena volcánica), que no fue esterilizado antes de la siembra y que se almacenó debajo de ejemplares de pino ponderosa presentes en el predio del vivero, donde se observaron ocasionalmente fructificaciones de hongos micorrícicos; 2) aporte aéreo de esporas provenientes de un vivero de coníferas a raíz desnuda ubicado a escasos 200 m del invernáculo y de una pequeña plantación de pino ponderosa cercana; 3) el agua utilizada para el fertirriego, que se almacenaba en un tanque australiano sin protección alguna, ubicado a metros de la citada plantación y dentro del vivero a raíz desnuda, que también podría recibir y concentrar el inóculo, y 4) la cobertura seminal, que no es esterilizada al momento de la siembra. En relación con lo mencionado en nuestro estudio, todas las fuentes mencionadas en el trabajo de Salgado Salomón *et al.* (2009) pudieron ser causales de la provisión de inóculo. En el caso del sustrato, si bien se comprobó que la turba *Sphagnum* carecía de esporas de MA, es posible que otras estructuras micorrícicas se alojen en ella (Read *et al.* 2000) y por lo tanto no puede descartarse como fuente de inóculo. Se sabe que los hongos formadores de MA están comúnmente presentes en el suelo y que crean asociaciones micorrícicas con la mayoría de las plantas vasculares terrestres (Wang y Qiu 2006, Davison *et al.* 2015). Por otro lado, Fontenla *et al.* (1998) señalan que la mayoría de las plantas vasculares asociadas a los bosques de ciprés de la cordillera tiene micorrizas del tipo arbusculares. El vivero donde se realizó el ensayo se encuentra en una zona donde, si bien no hay presencia de bosques de ciprés de la cordillera, sí están presentes otras plantas vasculares que se asocian con MA, las cuales pueden ser fuente de un aporte aéreo de esporas. Por otro lado, la fuente de agua utilizada para el cultivo, si bien era de perforación, la misma se almacena en un tanque australiano, el que podría recibir inóculo del medio circundante. Y por último, tanto la semilla como el sustrato utilizado en cultivo no fueron esterilizados, convirtiéndose también en fuentes potenciales de inóculo de MA.

Al analizar el estado de colonización (% MA) del lote L1 observamos que el mismo fue mayor en los tratamientos con estado hídrico más seco (20 % de Cc) y en los de menor disponibilidad de fósforo (1 mg L<sup>-1</sup>). Con respecto a la influencia del contenido hídrico sobre la colonización por hongos formadores de MA, los resultados concuerdan con lo observado en varios estudios. Stevens y Peterson (1996), en su trabajo realizado sobre el status micorrícico de MA en *Lythrum salicaria* L., indicaron que los niveles de colonización son inversamente proporcionales al contenido hídrico del suelo o a algún factor que varíe con la disponibilidad de agua. Lekberg y Koide (2008) en su trabajo sobre la respuesta de MA a distintas condiciones hídricas

y temperaturas de suelo, mencionan que el suelo húmedo disminuyó la viabilidad hifal en comparación al suelo seco, independientemente de la temperatura del mismo, en tanto que la colonización micorrícica fue menor en el suelo húmedo solo cuando estaba caliente. En esta misma línea, García *et al.* (2008) observaron que bajo condiciones de exceso de agua en el suelo, los hongos MA disminuyeron sus estructuras arbusculares, número de esporas y densidad hifal, pero incrementaron las estructuras de resistencia (vesículas), mientras que en déficit de agua, los hongos MA redujeron las hifas externas y arbusculos en cierta medida, invirtiendo más en mantener una proporción similar de vesículas en las raíces y esporas en el suelo, en comparación con el tratamiento de control.

En lo referente al comportamiento de % MA en relación a la disponibilidad de fósforo, Gosling *et al.* (2013) mencionan que un factor ambiental que mostró tener impacto negativo sobre la colonización de MA es la alta concentración de fósforo disponible en el suelo. Por su parte Smith y Smith (2011) señalan que la asimilación de fósforo por parte de plantas colonizadas con MA refleja la sumatoria de la captación de P directamente vía células de la planta más la proveniente indirectamente vía hongo MA, con la importancia de la vía MA disminuyendo cuando la disponibilidad de fósforo es elevada, lo cual está usualmente asociado con una declinación del nivel de % MA. Por otro lado, Gosling *et al.* (2013) señalan que, si bien existe una respuesta a la disponibilidad de fósforo en el suelo, esta solamente se hace evidente a elevadas concentraciones y más fuertemente en relación a la especie de la planta hospedante. Estos autores obtuvieron una disminución significativa en la colonización de MA en respuesta a la disponibilidad de fósforo en el suelo en plantas de maíz (*Zea mays* L., *Sp. Pl.*, 2: 971, 1753); en tanto que no tuvieron decrecimientos del % MA significativos en soja (*Glycine max* (L.) Merr., 1917) y viola (*Viola arvensis* Murray 1770), aun en altas concentraciones de fósforo. Por lo mencionado, el ciprés de la cordillera se comportaría como una especie sensible a la disponibilidad de fósforo en lo que respecta al nivel de colonización de MA, ya que mostró un crecimiento del % MA solo en el tratamiento de menor concentración de fósforo, mientras que en los tratamientos de media y alta concentración (10 y 100 mg L<sup>-1</sup>) el % MA decreció y no se diferenció entre los mismos (figura 2 B).

Los % MA promedio de las plantas de los lotes L2 y L3 aumentaron en relación a los mostrados por las plantas del L1. Esto pudo haber estado relacionado, por un lado, con la desaparición de todo tipo de manejo de fertilización y agua, permitiendo el desarrollo de las MA heredadas del vivero. Salgado Salomón *et al.* (2009) mencionan en su trabajo sobre el estado micorrícico de plántulas de Pino ponderosa producidas bajo fertirriego sin manejo de la micorrización, que al comparar los porcentajes de micorrización total entre las plantas salidas de vivero (T1) y las envasadas en suelo estéril (T2), se observó un valor significativamente inferior en el T1, señalando que la dieta de fertilizante

aplicada en el vivero de producción acelerada estaría inhibiendo el proceso de formación de las micorrizas. Por otro lado, observaron que el inóculo micorrícico adquirido en el vivero de producción acelerada permaneció viable y al terminar el efecto inhibitorio del fertirriego se manifestó abundantemente. Fernández *et al.* (2013) en un trabajo realizado sobre el establecimiento natural de ectomicorrizas en plantines de *Nothofagus nervosa* (Phil.) (raulí) en vivero, reportaron que la colonización micorrícica se dio naturalmente luego de la etapa de rusticación (a 12 meses de la germinación), en la que el aporte de nutrientes (principalmente N y P) y la frecuencia de riego son significativamente reducidos. Por otro lado, sumado al inóculo heredado del vivero, las plantas de los lotes L2 y L3 estuvieron expuestas a otras fuentes potenciales de inóculo, los que pudieron aportar al aumento de % MA. En el caso de L2, las plantas pudieron recibir aportes aéreos de esporas presentes en el ambiente circundante al vivero. Mientras que las plantas del lote L3 estuvieron expuestas al aporte de inóculo aéreo, como así también al aportado por el suelo nativo donde se plantaron los plantines. Varios autores señalan que las condiciones del vivero (fertirrigación, control mecánico y químico de malezas, sistemas de cultivo en contenedores) puede afectar negativamente a algunas micorrizas, favoreciendo la colonización de solo unas pocas especies tolerantes a estas condiciones de viverización (El Karkouri *et al.* 2005, Rincón *et al.* 2007, Barroetaveña *et al.* 2009, Menkis y Vasaitis 2011). Por otro lado, se observó que los hongos micorrícicos que se adaptaron a las condiciones de invernadero a menudo permanecen en el sistema radicular durante un tiempo después del trasplante a campo, pero se van reemplazando por especies nativas de micorrizas características del lugar donde se han establecido los plantines y mejor adaptadas a las condiciones ambientales del sitio (Dahlberg y Stenstrom 1991, Quorehi 2003). En esta línea, Fernández (2012) observó que el número de especies de hongos que forman EcM en individuos de *N. nervosa* cultivados en vivero fue significativamente menor que los observados en plántulas correspondientes a la misma especie creciendo en un bosque nativo. En tanto que, Fernández *et al.* (2013) registró que plántulas de 2 años creciendo en el suelo, tenían presencia de cuatro especies ectomicorrícicas que no fueron registradas en el invernadero. Estos resultados indicaron que después de ser trasplantadas al suelo del vivero, las plántulas de *N. nervosa* se expusieron a un inóculo natural de hongos diferentes a los que colonizaron sus raíces en el invernadero.

El análisis estadístico de % MA en plantas del lote L3, comprobó diferencias significativas entre los plantines tratados con un 20 % de la Cc y los de 80 % de la Cc. Este comportamiento podría estar marcando un efecto de predisposición o “priming” que estimule la micorrización de las plantas crecidas con menor disponibilidad de agua en vivero una vez que son llevadas a campo. La supervivencia no presentó diferencias entre los tratamientos, promediando un 96 % de supervivencia del lote plantado. Esto



pudo deberse al hecho de que en todos los casos los porcentajes de colonización MA fueron elevados (no menor al 87 %), mejorando y uniformando la capacidad de los plantines de captación de nutrientes y agua, repercutiendo en las altas tasas de supervivencia. Rhodes y Gerdemann (1975) observaron que la fase extra-radical de los hongos se extendía a una distancia mucho mayor de la raíz, siendo esta de 8 cm o más, en comparación al milímetro de extensión generado por los pelos radicales. Esta red de hifas actúa como una extensión del sistema radical de la planta, explorando un mayor volumen de suelo en busca de nutrientes poco móviles como el fósforo (Li *et al.* 2006). En esta misma línea, Kumar *et al.* (2017) mostraron que todos los tratamientos con MA (inoculación combinada de *Acaulospora scrobiculata* y *Rhizophagus irregularis* juntos o individualmente usando las mismas especies por separado) incrementaron el crecimiento de las especies de árboles testeados en comparación con los tratamientos no inoculados. Los autores mencionan que esta diferencia pudo deberse al mayor volumen de suelo explorado en busca de disponibilidad de nutrientes y agua, por parte de las plantas micorrizadas.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el porcentaje de colonización micorrízica arbuscular (% MA) de plantines de ciprés de la cordillera cultivados en vivero es influenciado por los niveles de fósforo y el estado hídrico del medio de crecimiento durante la fase de establecimiento del cultivo. El proceso de colonización micorrízica se produce en el vivero, a pesar de que la misma se encuentre inhibida parcialmente por el manejo de fósforo y agua llevado adelante durante la viverización. El % MA aumenta una vez que la planta es llevada al campo, independientemente del grado de micorrización alcanzado en el vivero. En este ensayo, al trabajar con un solo sitio de plantación y no presentarse diferencias marcadas en los % MA, en las plantas del lote (L3), no fue posible analizar su relación con la supervivencia. Sería interesante en futuros estudios realizar experiencias en distintas situaciones de sitios de plantación, con plantas con distintos % MA y no micorrizadas, de manera de poder evaluar la relación entre el % MA y diferentes parámetros ecofisiológicos que inciden en el establecimiento y desarrollo inicial del plantín.

## REFERENCIAS

Barman J, A Samanta, B Saha, S Datta, B Vidyaniketan. 2016. Mycorrhiza The Oldest Association Between Plant and Fungi. *Resonance Journal of Science Education* 21(1): 1093-1104. Consultado 7 Jun. 2022. Disponible en: <https://www.ias.ac.in/article/fulltext/reso/021/12/1093-1104>

Barroetaaveña C, C Schinelli, VN Bassani, L Tejera, L Gallo. 2009. Inoculación ectomicorrízica de *Nothofagus* spp. Informe técnico. Proyecto Domesticación de especies Forestales Nativas. INTA.

Bonfante P, A Genre. 2010. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications* 1:48. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms1046>

Brundrett M, N Bougher, T Grove, N Malajczuk. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Canberra, Australia. Australian Center for International Agricultural Research. 374p.

Brundrett MC, L Tedersoo. 2018. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist* 220(4): 1108-1115

Cázares E, JM Trappe. 1993. Vesicular endophytes in roots of Pinaceae. *Mycorrhiza* 2: 153-156. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00210584>

Chimal-Sánchez E, NM Montaña, SL Camargo-Ricalde, R García-Sánchez, LV Hernández-Cuevas. 2016. Nuevos registros de hongos micorrizógenos arbusculares para México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 87(1): 242-247. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.01.02>

Dahlberg A, E Stenstrom. 1991. Dynamic changes in nursery and indigenous mycorrhiza of *Pinus sylvestris* seedlings planted out in forest and clearcuts. *Plant Soil* 136: 73-86. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02465222>

Davison J, M Moora, M Öpik, A Adholeya, L Ainsaar, A Bâ, M Zobel. 2015. Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science* 349: 970-973. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aab1161>

El Karkouri K, F Martin, JPE Douzery, D Mousain. 2005. Diversity of ectomycorrhizal fungi naturally established on containerised *Pinus* seedlings in nursery conditions. *Microbiological Research* 160: 47-52. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.09.008>

Enricci JA, DS Massone. 2003. Producción de plantines plug+0 de *Austrocedrus chilensis* en Patagonia Argentina. En actas del Congreso: XII Congreso Forestal Mundial, Quebec, Canadá.

Fernández NV. 2012. Micorrizas y levaduras asociadas a *Nothofagus nervosa* en poblaciones naturales y plantas cultivadas en vivero. Doctoral dissertation, Provincia de Río Negro, Argentina. Universidad Nacional del Comahue, Centro Regional Universitario Bariloche. 247 p.

Fernández NV, P Marchelli, SB Fontenla. 2013. Ectomycorrhizas naturally established in *Nothofagus nervosa* seedlings under different cultivation practices in a forest nursery. *Microbial Ecology* 66(3): 581-592. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0229-9>

Fontenla S, R Godoy, M Havrylenko, P Rosso. 1998. Root associations in *Austrocedrus chilensis* forests and seasonal dynamics of arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza* 8: 29-33. DOI: <https://doi.org/10.1007/s005720050207>

Havrylenko SB. 2005. Efectos de distintos programas de fertilización en *Austrocedrus chilensis* (D. Don) Pic. Ser. et Bizzarri. Seminario Final. Esquel, Argentina. Departamento de Ingeniería Forestal, Facultad de Ingeniería, UNPSJB. 40 p.

García I, R Mendoza, MC Pomar. 2008. Deficit and excess of soil water impact on plant growth of *Lotus tenuis* by affecting nutrient uptake and arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Soil* 304: 117. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9526-8>

Godoy R, R Mayr. 1989. Caracterización morfológica de micorrizas vesículo-arbusculares en coníferas endémicas del sur de Chile. *Bosque* 10(2): 89-98.

- Gosling P, A Mead, M Proctor, JP Hammond, GD Bending. 2013. Contrasting arbuscular mycorrhizal communities colonizing different host plants show a similar response to a soil phosphorus concentration gradient. *New Phytologist* 198: 546-556.
- Ianson DC, MF Allen. 1986. The effects of soil texture on extraction of vesicular-Arbuscular Mycorrhizal fungal spores from arid sites. *Mycologia* 78(2): 164-168. DOI: <https://doi.org/10.1080/00275514.1986.12025227>
- Jumpponen A, J Trowbridge, K Mandyam y L Johnson. 2005. Nitrogen enrichment causes minimal changes in arbuscular mycorrhizal colonization but shifts community composition – evidence from rDNA data. *Biology and Fertility of Soils* 41: 217-224. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00374-005-0845-8>
- Kumar A, JF Dames, A Gupta, A Sharma, JA Gilbert, P Ahmad. 2015. Current developments in arbuscular mycorrhizal fungi research and its role in salinity stress alleviation: a biotechnological perspective. *Critical Reviews in Biotechnology* 35(4): 461-474. DOI: <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.899964>
- Kumar N, A Kumar, A Shukla, S Kumar, AR Uthappa, OP Chaturvedi. 2017. Effect of arbuscular mycorrhiza fungi (AMF) on early seedling growth of some multipurpose tree species. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6(7): 3885-3892. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijemas.2017.607.400>
- Landis T, RW Tinus, SE McDonald, JP Barnett. 1989. Seedling nutrition and irrigation. 4 Vol. The Container Tree Nursery Manual. Washington DC, USA. Department of Agriculture, Forest Service. 119 p.
- Landis T, RW Tinus, SE McDonald, JP Barnett. 1990. The biological component: nursery pests and micorrhizae. 5 vol. The Container Tree Nursery Manual. Washington DC, USA. Department of Agriculture, Forest Service. 171 p.
- Lekberg Y, RT Koide. 2008. Effect of soil moisture and temperature during fallow on survival of contrasting isolates of arbuscular mycorrhizal fungi. *Botany* 86: 1117-1124.
- Li HY, SE Smith, RE Holloway, Y Zhu, FA Smith. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi contribute to phosphorus uptake by wheat grown in a phosphorus-fixing soil even in the absence of positive growth responses. *New Phytologist* 172: 536-543.
- Martinez DB, C Barroetaveña, M Rajchenberg. 2007. Influencia del régimen de fertilización y del momento de inoculación en la micorrización de *Pinus ponderosa* en la etapa de vivero. *Bosque* 28(3): 226-233. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002007000300007>
- Menkis A, R Vasaitis. 2011. Fungi in roots of nursery grown *Pinus sylvestris*: ectomycorrhizal colonisation, genetic diversity and spatial distribution. *Microbial Ecology* 61: 52-63. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9676-8>
- Mora C, DP Tittensor, S Adl, AGB Simpson, B Worm. 2011. How many species are there on Earth and in the ocean? *PLoS Biology* 9. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001127>
- Pastorino MJ, SS Mercedes, AG Aparicio, LA Gallo. 2013. Variability in seedling emergence traits of Patagonian Cypress marginal steppe populations. *New Forests*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11056-013-9395-3>.
- Quilambo O. 2003. The vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *African Journal of Biotechnology* 2(12): 539-546. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB2003.000-1105>
- Quoreshi AM. 2003. Nutritional preconditioning and ectomycorrhizal formation of *Picea mariana* (Mill.) B.S.P. seedlings. *Eurasian Journal of Forest Research* 6: 1-63
- Read DJ, JG Duckett, R Francis, R Ligrone, A Russell. 2000. Symbiotic fungal associations in 'lower' land plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 355(1398): 815-831.
- Rincón A, MR de Felipe, M Fernández-Pascual. 2007. Inoculation of *Pinus halepensis* Mill. with selected ectomycorrhizal fungi improves seedling establishment 2 years after planting in a degraded gypsum soil. *Mycorrhiza* 18: 23-32. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00572-007-0149-y>
- Rhodes LH, JW Gerdemann. 1975. Phosphate uptake zones of mycorrhizal and non-mycorrhizal onions. *New Phytologist* 75: 555-561.
- Salgado Salomón ME, M Rajchenberg, C Barroetaveña. 2009. Evaluación del estado micorrícico de plántulas de *Pinus ponderosa* producidas bajo fertirriego, sin manejo de la micorrización. *Bosque* 30(3): 127-134. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002009000300002>
- Smith SE, DJ Read. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. Ed 2. London, United Kingdom. Academic Press. 606 p.
- Smith SE, DJ Read. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*, Ed 3. London, United Kingdom. Academic Press. 815 p.
- Smith SE, FA Smith. 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review of Plant Biology* 62: 227-250.
- Stevens KJ, RL Peterson. 1996. The effect of a water gradient on the vesicular-arbuscular mycorrhizal status of *Lythrum salicaria* L. (purple loosestrife). *Mycorrhiza* 6: 99-104. DOI: <https://doi.org/10.1007/s005720050113>
- Taccari LE. 2012. Influencia de diferentes duraciones de la fase de establecimiento en el desarrollo de plantines de ciprés de la cordillera cultivados bajo cubierta. Seminario Final. Esquel. Argentina. Departamento de Ingeniería Forestal, Facultad de Ingeniería, UNPSJB. 25 p.
- Vargas-Vázquez VA, NI Sanchez-Rangel, LV Hernández-Cuevas, G Guevara-Guerrero. 2021. Riqueza de especies de hongos micorrízicos asociados a plantas de la familia Euphorbiaceae en el Área Natural Protegida Altas Cumbres, Tamaulipas, México. *CienciaUAT* 16(1): 6-19. DOI: <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v16i1.1527>
- Wang B, Y-L Qiu. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16: 299-363. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00572-005-0033-6>

Recibido: 07.06.22  
Aceptado: 30.01.23