

# INDICADORES PARA SELECCIONAR INÓCULOS DE HONGOS MICORRÍMICOS ARBUSCULARES EFICIENTES EN SUELOS MODERADAMENTE ÁCIDOS

F COVACEVICH<sup>1</sup> & HE ECHEVERRÍA<sup>2</sup>

1 Inv. Adjunto CONICET. EEA INTA, Balcarce. CC 276 (7620) Balcarce, Argentina

2 Unidad Integrada EEA INTA-FCA UNMP, Balcarce. CC 276 (7620) Balcarce, Argentina

Fax: +54-266-439101;

Correo electrónico: <sup>1</sup> covac@mdp.edu.ar, <sup>2</sup> hecheverr@balcarce.inta.gov.ar

Recibido: 00-00-00

Aceptado: 00-00-00

## RESUMEN

En ocasiones los propágulos de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) en los suelos pueden estar en bajo número o éstos no ser eficientes para aumentar el crecimiento de las plantas hospedadoras. La estrategia sería recurrir a la inoculación con HMA (nativos o no). Si la inoculación se realiza con HMA no nativos, debe considerarse que los suelos difieren en su receptividad a los HMA a ser introducidos. El objetivo del trabajo fue seleccionar algunos indicadores de presencia, actividad y beneficio de la simbiosis planta-HMA no nativos para ser utilizados como inóculos en suelos moderadamente ácidos. Para ello, se evaluó cómo la inoculación con HMA incidió sobre la colonización micorrícica y algunos parámetros de crecimiento en una planta modelo crecida en dos suelos moderadamente ácidos de diferente origen (Argentina y Francia). En el suelo de la Argentina la inoculación con *Glomus claroideum* y *Acaulospora longula* ocasionaron los mayores grados de micorrización total y con actividad fosfatasa alcalina (ALP) así como las mayores respuestas micorrícicas (RM). En el suelo de Francia, el mayor crecimiento y cantidad de raíz micorrizada se obtuvieron por la inoculación con *A. longula*. La inoculación con *Scutellospora pellucida* presentó adecuada RM en el suelo de la Argentina, pero nula en el suelo de Francia. *G. clarum* manifestó una alta capacidad micorrícica, aunque una baja eficiencia de dicho inóculo para ser utilizado en los suelos testeados. Asimismo, la inoculación con *A. laevins* presentó los más bajos niveles de colonización y las menores respuestas de crecimiento en ambos suelos. El análisis directo de los parámetros, así como el análisis multivariado entre la RM y los parámetros de micorrización y crecimiento mostraron que la combinación entre los parámetros de peso aéreo y de producción de raíces con los de colonización micorrícica (total y con actividad ALP) resultan adecuadas para identificar de manera rápida las potenciales cepas de HMA a introducir. La actividad ALP es un parámetro que evidenció la actividad de los HMA y con buena correlación con la respuesta de crecimiento. La producción de raíces combinado con el porcentaje de micorrización mostró ser un parámetro de utilidad, sin embargo hay que considerar que en condiciones de campo no es factible cuantificar el peso seco obtenido por planta. El crecimiento en altura de la planta, puede, en algunos casos, ser un parámetro de utilidad.

**Palabras clave.** Micorrizas - Actividad fosfatasa alcalina - Respuesta micorrícica.

## INDICATORS TO SELECT EFFICIENT ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI INOCULA IN MODERATELY ACIDIC SOILS

### ABSTRACT

The propagules of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in soils are sometimes insufficient in number or efficiency to increase the growth of host plants, a situation which could be resolved by inoculating the soils with indigenous or non-indigenous AMF, always taking into account that soils may differ in their receptivity to the introduced AMF. The aim of this work was to select parameters as indicators of the presence, activity and benefit of plant-symbiotic non-indigenous AMF which can be used as inoculants in moderately acidic soils. We evaluated how inoculation with AMF affected mycorrhizal colonization and growth parameters of model onion plants grown in two moderately acid soils of different origin (Argentina and France). Inoculation with *Glomus claroideum* and *Acaulospora longula* in the Argentinean soil produced the highest AMF colonization of roots, total alkaline phosphatase activity (ALP) and highest mycorrhizal response (MR). In the soil from France, inoculation with *A. longula* produced the highest amount of mycorrhizal roots and plant growth. Inoculation with *Scutellospora pellucida* produced an appropriate MR in the Argentinean soil but no significant MR was detected in the soil from France. *G. clarum* showed a high capacity to colonize roots but low efficiency for MR. Inoculation with *A. laevins* produced the lowest levels of colonization and MR in both soils. Direct and multivariate analysis of the tested parameters showed that the accumulation of dry shoot matter and fresh root matter combined with mycorrhizal colonization (both total and with ALP activity) is adequate for the rapid identification of potentially efficient strains for introduction into the tested soils. The ALP efficiently showed tested AMF activities and good correlation with plant growth responses. Although root growth combined with mycorrhizal colonization could be a useful parameter, it must be taken into consideration that it is not easy under field conditions to quantify total weight per plant. Plant height may in some cases be a useful parameter.

**Key words.** Mycorrhiza - Alkaline phosphatase activity - Mycorrhizal responsiveness.

Ci. SUELO (ARGENTINA) 28(1): 0-0, 2010

## INTRODUCCIÓN

Las micorrizas arbusculares constituyen el tipo de asociación simbiótica entre raíces de plantas vasculares y hongos del suelo pertenecientes al Phylum Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001) más extendida en la naturaleza (Harley, 1989, 1991; Schwarzott *et al.*, 2001; Brun-drett, 2004). Los incrementos de crecimiento en plantas colonizadas por los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) han sido bien reportados (Kough & Gianinazzi-Pearson, 1986; Pflieger & Linderman, 1996; Sylvia *et al.*, 2005; Rilling & Mummey, 2006). Sin embargo, en ocasiones la micorrización nativa puede presentarse en bajo número, o puede no ser eficiente para aumentar el crecimiento (Hamel, 1996; Pflieger & Linderman, 1996; Covacevich & Echeverría, 2008). En estas situaciones la estrategia sería recurrir a la inoculación, esto es, la incorporación de HMA (nativos o no) a efectos de incrementar el crecimiento de las plantas. En caso en que la inoculación se realice con HMA no nativos, debe considerarse que los suelos difieren en su receptividad a los microorganismos a ser introducidos. En particular para los HMA, la receptividad puede ser definida como la capacidad de un suelo para favorecer el desarrollo de la simbiosis luego de la inoculación (Plenchette, 2000). De esta manera, la evaluación de la receptividad de un suelo, debería ser un factor clave para la determinación de las cepas de HMA no nativo a introducir en un suelo. Plenchette (2000) estimó la receptividad de un suelo irradiado con rayos gamma frente a una única especie de HMA por un ensayo de dosis de inóculo-respuesta de crecimiento. Sin embargo, distintas especies de HMA pueden diferir en su capacidad de estimular el crecimiento de las plantas, así como distintas especies vegetales pueden responder diferencialmente a la inoculación con HMA (Vierheiling & Ocampo, 1991; Schweiger *et al.*, 2007). Varios factores edáficos, tanto del tipo biótico (relaciones HMA con bacterias u otros microorganismos) como abiótico, climáticos y hasta de carácter antropogénico (particularmente las prácticas agrícolas como aplicación de pesticidas, fertilizantes, fungicidas, etc.) pueden afectar el desarrollo de los HMA y sus relaciones con las plantas hospedadora (Moreira & Siquiera, 2006). En particular el pH, el contenido de materia orgánica, así como el de fósforo del suelo son parámetros que definen en gran parte la eficiencia de los HMA que se desarrollan en el mismo (Williams *et al.*, 1992; Schweiger *et al.*, 2007), por lo que deben ser considerados en el momento de seleccionar un potencial inóculo apropiado (Moreira & Siquiera, 2006).

La colonización de raíces por HMA ha sido el parámetro comúnmente utilizado como indicador rápido de la presencia de la simbiosis micorrízica. Sin embargo, la estimación de la biomasa fúngica presente en las raíces coloreadas utilizando las metodologías tradicionales con azul

tripán pareciera no ser suficiente, dado que tanto las estructuras fúngicas vivas como muertas son coloreadas con dicho reactivo (Tisserant *et al.*, 1993; Joner *et al.*, 2000; Van Aarle *et al.*, 2002). Por dicha razón, se han desarrollado algunas técnicas de tinción que permiten evidenciar ciertas actividades enzimáticas de los HMA como medidas de su actividad. Tisserant *et al.* (1993) han desarrollado un procedimiento de tinción de raíces que pone en evidencia las enzimas fosfatasa alcalinas presentes en las vacuolas de los tejidos de los HMA (Gianinazzi-Pearson & Smith, 1993), el cual puede ser una herramienta de utilidad en análisis de eficiencia de los HMA (Gianinazzi-Pearson & Gianinazzi, 1978; Zhao *et al.*, 1997; Joner *et al.*, 2000; Van Aarle *et al.*, 2002). Además de incrementar la nutrición mineral, la simbiosis micorrízica afecta la ecofisiología de la planta hospedadora. En tal sentido, se han reportado alteraciones en la elasticidad de las hojas, cambios en el potencial agua y turgencia de hojas, variaciones en la tasa de transpiración entre otros (Moreira & Siquiera, 2006) como resultado de la formación de micorrizas. Asimismo, es probable que otros parámetros del crecimiento vegetal tales como la producción de biomasa aérea y radical, así como la tasa de crecimiento de la planta podrían ser también considerados indicadores para evidenciar el beneficio que la planta hospedadora puede obtener de la simbiosis micorrízica.

Los suelos de la Pampa Argentina, particularmente los del sudeste de la provincia de Buenos Aires son moderadamente ácidos, presentan un elevado contenido de materia orgánica y una activa biomasa microbiana (Echeverría *et al.*, 1993). Estos suelos, presentan elevada diversidad y riqueza de HMA particularmente en agroecosistemas poco degradados (Menéndez *et al.*, 2001; Lugo & Cabello, 2002; Covacevich *et al.*, 2006; Schalamuk *et al.*, 2006; Covacevich *et al.*, 2007). Sin embargo, evaluaciones preliminares (Covacevich & Echeverría, 2008) han puesto en evidencia que los HMA nativos de campos agrícolas de trigo no son eficientes con respecto a la fertilización fosfatada, por lo que la inoculación con HMA más eficientes podría ser una alternativa promisoriosa para disminuir el uso de fertilizantes.

Resulta necesario definir indicadores que pueden ser fácilmente utilizados para la detección de potenciales inóculos a seleccionar en ensayos de receptividad. El presente trabajo tuvo por finalidad evaluar la utilidad de algunas técnicas y parámetros de cuantificación de presencia, actividad y beneficio de la simbiosis planta-HMA a efectos de seleccionar hongos con potencial eficiencia en incrementar el crecimiento de las plantas hospedadoras para ser utilizados como inóculos. Para ello, se evaluó el efecto de la inoculación con HMA sobre la respuesta de crecimiento en una planta modelo crecida en dos suelos moderadamente ácidos con algunas características

edáficas diferentes (para ello se utilizaron suelos agrícolas de diferentes orígenes: Argentina y Francia), y la relación entre la respuesta de crecimiento obtenida y los indicadores que pueden definir una cepa potencialmente adecuada para ser utilizada como inoculante.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sitio experimental y tratamiento de los suelos

El experimento se realizó en el Laboratoire de Phytoparasitologie UMR INRA/Université de Bourgogne BBCE-IPM, INRA-CMSE, Dijon, Francia. El suelo de la Argentina fue colectado de un monocultivo de trigo de larga duración (10 años) sin aplicación de fertilizantes (37° 45' Lat S, 58° 18' Long O, Estación Experimental Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Bal-carce, Buenos Aires, Argentina). El suelo de Francia fue colectado de un campo natural (8 años) sin aplicación de fertilizantes (45° 27' Lat N, 4° 41' Long E, Región Rhône-Alpes, Departamento Loire, Francia). Los suelos fueron colectados del horizonte superficial (0-20 cm), tamizados (0,5 cm), y tinalizados (85 °C durante dos períodos de 2 horas, con 48 horas entre tratamientos). Después de la esterilización los suelos fueron secados al aire en oscuridad y almacenados en bolsas plásticas a 15 °C durante un mes. Antes del inicio del ensayo, los sustratos presentaron las características que se describen en la Tabla 1.

### Material biológico

Se utilizó cebolla (*Allium cepa* L. var. Topaze) como planta 'test' dado que es un hospedero altamente micotrófico y que responde rápidamente a la colonización micorrízica (Fortin *et al.*, 2002). Las semillas fueron desinfectadas (hipoclorito de calcio 3,5%, 10 minutos, lavadas 5 veces con agua estéril 2 minutos cada una), y germinadas en vermiculita estéril en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas (18 h fotoperíodo con luz fluorescente, temperatura día/noche 19/22 °C, 60/70% humedad relativa, irradiancia 320  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Diez días después de la emergencia, plantas individuales fueron transplantadas a macetas (200 cc) que contenían uno u otro tipo de suelo.

Los inóculos utilizados fueron proporcionados por la Banque Européenne des Glomales (BEG) y seleccionados por provenir de suelos parcialmente ácidos. Los HMA utilizados fueron *Acaulospora longula* Spain & Schenck (aislamiento BEG8), *A. laevis* Gerdemann & Trappe (aislamiento BEG13), *Glomus claroideum* Schenck & Smith (aislamiento BEG31), *G. clarum* Nicol. & Schenck (aislamiento BEG142) y *Scutellospora pellucida* (Nicol & Schenck) Walker & Sanders (aislamiento BEG153). Las características de los sitios donde fueron extraídos, planta hospedadora en la naturaleza, sustrato y planta hospedadora del inóculo, entre otros, se presentan en la Tabla 2. Los inóculos consistieron en raíces de las plantas hospedadoras (Tabla 2), esporas, hifas y el sustrato en el cual crecieron. Los inóculos fueron conservados hasta su utilización en el Laboratoire de Phytoparasitologie UMR INRA/Université de Bourgogne BBCE-IPM, INRA-CMSE, Dijon, Francia de acuerdo a las normas establecidas por el BEG (inóculos secos, conservados en bolsas plásticas en oscuridad a 4 °C). Antes de la inoculación se evaluó la presencia de colonización (Trouvelot *et al.*, 1986) y abundancia de esporas de morfotipos correspondientes a la descripción de la especie (Schenck & Perez, 1990; INVAM, 2000; Blaszkowski, 2003; Barreto de Novais, 2009). Sólo se utilizaron los inóculos que presentaron un porcentaje de colonización mayor al 50% y esporulación mayor o igual a 50 esporas g suelo<sup>-1</sup>. En el momento de la inoculación, se colocaron 10 g de inóculo por debajo de las raíces de cada plántula, las que fueron posteriormente cubiertas por el sustrato. Para ambos tipos de suelo se utilizaron controles que consistieron en plantas que recibieron raíces de las mismas plantas hospedadoras utilizadas en cada tratamiento de inoculación (Tabla 2) no inoculadas (con un grado de micorrización del 0%) y el sustrato en el cual crecieron (Tabla 2). Cinco repeticiones de cada tratamiento (inoculados o no inoculado -control-) fueron distribuidas en bloques al azar en la misma cámara de crecimiento donde las plantas germinaron. Las plantas fueron regadas diariamente con agua destilada y cada 10 días recibían 20 mL de solución nutritiva de Long Ashton (Hewitt, 1966).

### Mediciones en planta y raíz

Se realizaron mediciones de altura de las plantas a los 26, 33, 40, 47 y 54 días después de la inoculación (DDI). Las plantas fueron cosechadas a los 54 DDI. En la parte aérea se cuantificó el peso fresco por gravimetría, posteriormente las plantas fueron dejadas en estufa a 60 °C durante 72 horas hasta que alcanzaron peso constante y se cuantificó el peso seco aéreo (PSA).

Tabla 1. Algunas características de los suelos de la Argentina y Francia utilizados.

Table 1. Chemical Soil characteristics of soils from Argentina and France.

Suelo	PH (H <sub>2</sub> O)	P-Bray	C	MO	Conductividad eléctrica	Fracción mineral (< 2 MM)		
						Arcilla	Limo	Arena
		mg kg suelo <sup>-1</sup>	%	%	mnhos cm <sup>-1</sup>	%		
Argentina	5,5	16,7	3,0	5,2	0,74	18	30	52
Francia	5,2	50,5	3,1	4,6	0,21	15	16,6	68,5

El material radical fue recuperado en su totalidad, lavado hasta eliminar todas las partículas de suelo adheridas a las raíces, secado con papel para la cuantificación del peso fresco radical por gravimetría. Inmediatamente después, el material radical fue dividido en dos submuestras de similar peso. Una submuestra fue utilizada para evidenciar la actividad fosfatasa alcalina (ALP) según la metodología propuesta por Tisserant *et al.* (1993). Para ella, la submuestra fue colocada en una solución fría de sorbitol 10% durante una hora, de manera tal que la totalidad de las raíces estuvieran cubiertas por la misma (50 mL para cada submuestra de raíz). Posteriormente fueron adicionados 20 mL de buffer ácido Tris/ácido acético (0,05 M, pH 9,2) que contenía 1 mg mL<sup>-1</sup> - naphthyl acid phosphate (Sigma), 1 mg mL<sup>-1</sup> Fast Blue salt, 0,05% MgCl<sub>2</sub> y 0,05% MnCl<sub>2</sub>. Las raíces fueron dejadas en dicha solución durante 3 horas a temperatura ambiente de manera tal de completar la tinción. La otra submuestra fue utilizada para evaluar la colonización total mediante la tinción con Azul tripán (TB) usando una modificación de la metodología propuesta por Phillips & Hayman (1970), en la que se ha omitido la utilización de fenol en los reactivos. Para ello, las raíces fueron clarificadas con KOH 10% (30 min, 90 °C), lavadas con agua, acidificadas (HCl 0,1 N), lavadas con agua y teñidas con Azul tripán (0,05%) en lactoglicerol (ácido láctico, glicerol, agua destilada 1:1:1, 5 min, 100 °C). Los segmentos teñidos fueron montados en portaobjetos y se detectó la presencia de HMA totales registrando los segmentos de raíz colonizados con estructuras de HMA (hifas, arbusculos o enrollamientos y vesículas) teñidas de azul por la tinción con TB, así como de color púrpura por la tinción que pone en evidencia la actividad ALP. El grado de colonización micorrícica (TB y ALP) en las raíces fue evaluado por el método descrito por Trouvelot *et al.* (1986), y expresado como intensidad de infección (M; MTB y MALP: porcentaje del córtex radical con infección por HMA total y con actividad ALP, respectivamente), o porcentaje de arbusculos (A; ATB y AALP: porcentaje del córtex radical con arbusculos totales y con actividad ALP, respectivamente). La biomasa radical con actividad ALP por HMA activos fue calculada a partir de la cantidad de material radical fresco y de M y A cuantificados luego de la tinción con ALP. De la misma manera, se calculó la biomasa radical con HMA total cuantificado luego de la tinción con TB.

La respuesta micorrícica (RM) fue calculada, separadamente para cada tipo de sustrato, de acuerdo a Cavagnaro *et al.*, (2003):

$$RM = \frac{PSA(I) - \text{media PSA(NI)}}{\text{media PSA(NI)}} \times 100 \quad \text{Eqn 1}$$

donde PSA(I) corresponde al parámetro individual del peso seco de las plantas inoculadas con cada una de las cinco especies de HMA, y media PSA(NI) corresponde al peso seco promedio de las plantas no inoculadas

### Análisis de resultados

Los resultados fueron analizados utilizando el paquete estadístico Statistical Analysis Systems (SAS, 1990). El crecimiento en altura fue analizado utilizando el análisis PROC REG y la pendiente de las tasas de crecimiento fueron estimadas mediante

PROC GLM. Los resultados de parámetros de la parte aérea y radical de las plantas fueron analizados con PROC ANOVA y las medias separadas por el test de Diferencias Mínimas Significativas ( $P=0,05$ ). Se utilizó el análisis de correlación de Pearson con el programa PROC CORR. Se realizó análisis de Componentes Principales (ACP) para identificar los indicadores que contribuyeron con mayor peso en la combinación lineal de las dos primeras componentes principales. Se utilizó el programa CANOCO (Ter Braak, 1988) incluyendo los datos de los indicadores MTB, ATB, MALP, AALP, RaizMTB, RaizATB, RaizMALP, RaizAALP, PFA, PSA, PFR, con la respuesta micorrícica ocasionada por la inoculación

### RESULTADOS

Todos los inóculos fueron infectivos en los dos suelos testeados (Fig. 1) y dado que el sustrato utilizado fue suelo esterilizado, no se detectó presencia de estructuras de HMA ni de actividad ALP en las raíces de las plantas control. La actividad ALP, expresada tanto como porcentaje de micorrización así como porcentaje de arbusculos, se mantuvo por debajo de los porcentajes obtenidos por la tinción con TB. Se obtuvo un amplio rango de porcentaje de micorrización (Suelo Argentina 0-91% MTB, Suelo Francia 0-74% MTB) y de actividad ALP (Suelo Argentina 0-73% MALP, Suelo Francia 0-46% MALP). No se detectaron diferencias significativas entre suelos para el peso aéreo (Tabla 2). Sin embargo, para todos los indicadores evaluados en las raíces de las plantas, los mayores valores de cada indicador evaluado se detectaron en las plantas que crecieron en el suelo de la Argentina (Tabla 2). Asimismo, para cada tipo de suelo, se encontraron claras diferencias en la formación de micorrizas entre los tratamientos de inoculación inóculos (Fig. 1). Las plantas crecidas en el suelo de la Argentina, presentaron los mayores grados de micorrización y actividad ALP por la inoculación con *G. clarum* y los menores por la inoculación con *A. laevis* (Fig. 1a). Para el suelo de Francia, la inoculación con *A. longula* y *G. clarum* ocasionó similares y elevados grados de micorrización y actividad ALP. Para los dos tipos de suelo, las plantas inoculadas con *A. laevis* presentaron el menor grado de micorrización y contenido de arbusculos totales y ALP activos (Fig. 1 b).

Las plantas crecidas en suelo de Francia presentaron, en general, menor peso de raíces que las crecidas en suelo de la Argentina (Tabla 3). Para las plantas crecidas en suelo de la Argentina, el mayor peso fresco de raíz se obtuvo por la inoculación con *G. claroideum*, el que se diferenció significativamente de los restantes tratamientos (Tabla 4). Para las plantas crecidas en suelo de Francia, el mayor desarrollo radical se obtuvo por la inoculación con *A. longula*, sin embargo éste fue casi la mitad del obtenido por la inoculación con *G. claroideum* en suelo de

Tabla 2. Características de cada inóculo micorrízico arbuscular utilizado (Fuente Banque Européene Des Glomales Beg).  
Table 2. Characteristics Of Each Arbuscular Mycorrhizal Inocula Used (Source Banque Européene Des Glomales Beg).

Especie	Aislamiento	Bioma	Sitio de colecta	Planta hospedera de colecta	Ph Suelo	Sustrato de inóculo	Planta hospedera de inóculo
<i>Acaulospora laevis</i> o «Near-Laevis»	Beg 13	Desconocido	Nueva Zelanda, Oceania	Desconocida	No determinado	Arena: Vermiculita (1:1)	<i>Trifolium</i> sp.
<i>Acaulospora longula</i>	Beg 8	Templado antropogénico	Yorkshire, Inglaterra, Europa (53° 44' 30'' N/ 1° 31' 0'' O)	Gramíneas y malezas no identificadas	3,80	Arena: Calval (2:1)	<i>Plantago lanceolata</i>
<i>Glomus claroideum</i>	Beg 31	Templado de agroecosistema	Finlandia Europa (62° 15' 0'' N/26° 15' 0'' E)	Hierbas no identificadas	5,40	Arena: Vermiculita (1:1)	<i>Fragaria ananassa</i> (Micropropagadas)
<i>Glomus clarum</i>	Beg 142	Desconocido	Brasil, Sud America	<i>Stylosanthes capitata</i>	5,00	Suelo limo arenoso (pH 5): Perlita (3:1)	<i>Tephrosia</i> sp.
<i>Scutellospora pellucida</i>	Beg 153	Templado de agroecosistema	Thurgau, St Gallen Suiza, Europa (47° 29' 10'' N/ 8° 55' 10'' E)	Trigo, Maiz, Colza	5,80	Suelo: Arena :Arcilla Atapulgita (1:2:2)	Puerro/Girasol

Tabla 3. Comparación de los diferentes indicadores evaluados en plantas de cebolla inoculadas o no inoculadas con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) crecidas en dos suelos parcialmente ácidos.

Table 3. Comparison of different parameters measured in onion plants inoculated or uninoculated with arbuscular mycorrhizal fungi (HMA) grown in two partially acidic soils.

Suelo	Indicadores										
	PFA	PSA	PFR	MTB	ATB	MALP	AALP	RAÍZMTB	RAÍZATB	RAÍZMALP	RAÍZAALP
Argentina	0,80 A	0,15 A	0,29 A	50,97 A	40,38 A	39,43 A	30,87 A	193 A	158 A	148 A	118 A
Francia	0,80 A	0,23 A	0,16 B	37,23 B	33,14 B	25,37 B	17,44 B	92 B	85 B	63 B	42 B

PFA: peso fresco aéreo, PSA: peso seco aéreo, PFR: peso fresco de raíces, MTB: porcentaje del córtex radical con infección total por hma teñida con azul de tripán, ATB: porcentaje del córtex radical con arbusculos de hma teñidos con azul de tripán, MALP: porcentaje del córtex radical con actividad fosfátasa alcalina (alp) de hma, AALP: porcentaje del córtex radical con arbusculos con actividad alp de hma, RAÍZMTB: cantidad de raíces colonizadas por hma teñidos con azul de tripán, RAÍZATB: cantidad de raíces con arbusculos de hma teñidos con azul de tripán, RAÍZMALP: cantidad de raíces colonizadas por hma teñidas para evidenciar la actividad fosfátasa alcalina, RAÍZAALP: cantidad de raíces con arbusculos de hma teñidos para evidenciar la actividad fosfátasa alcalina. Valores en columnas con letras iguales no presentan diferencias significativas entre suelos (test diferencias mínimas significativas,  $p < 0,05$ ; promedios de 6 tratamientos y 5 repeticiones). Values on columns with similar letters are not different between soils (least significant differences test,  $p < 0,05$ , means of 6 treatments and 5 repetitions).

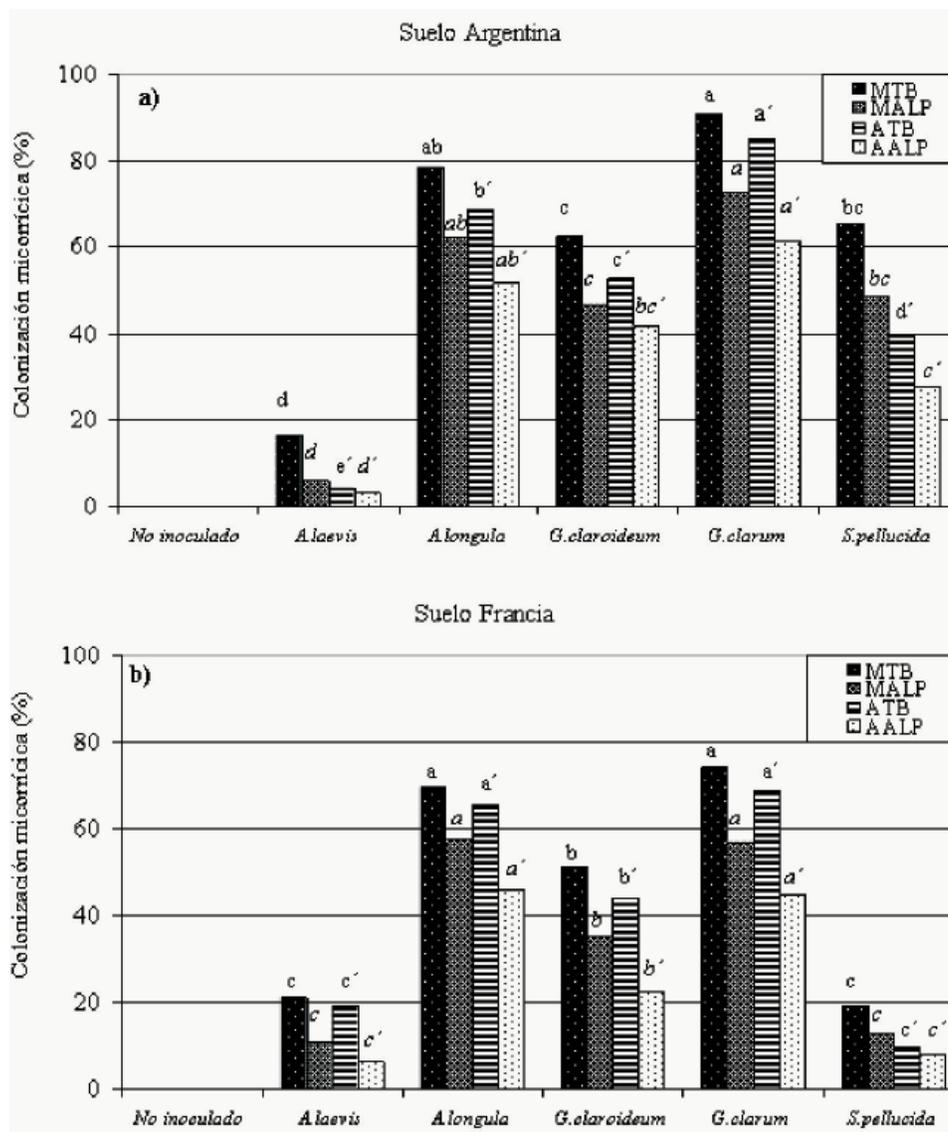


Figura 1. Efecto de la inoculación con hongos formadores de micorrizas sobre la colonización micorrizica arbuscular en raíces de plantas crecidas en suelo de la Argentina y de Francia.

Para cada tipo de tinción y parámetro de colonización, valores en columnas con letras iguales no presentan diferencias significativas (Test Diferencias Mínimas Significativas,  $P < 0,05$ , para cada suelo y tratamiento  $n=5$ ).

Figure 1. Effect of arbuscular mycorrhizal inoculation on root colonization of plants growing in soil from Argentina and from France.

For each staining procedure and colonization parameter, values on columns with similar letters are not different (Test Least Significant Difference,  $P < 0,05$ , for each soil and treatment  $n=5$ ).

MTB: intensidad de infección en raíces teñidas con Azul de tripán

ATB: porcentaje de arbusculos en raíces teñidas con Azul de tripán

MALP: intensidad de infección en raíces con actividad fosfatasa alcalina

AALP: porcentaje de arbusculos en raíces con actividad fosfatasa alcalina

Tabla 4. Peso fresco aéreo y de raíces y peso seco aéreo en plantas de cebolla no inoculadas e inoculadas con hongos micorrícicos arbusculares (*A. longula*, *A. laevis*, *G. claroideum*, *G. clarum* y *S. pellucida*) creciendo en dos suelos parcialmente ácidos.

Table 4. Shoot and root fresh mass, shoot dry mass of uninoculated and inoculated (*A. longula*, *A. laevis*, *G. claroideum*, *G. clarum* and *S. pellucida*) onion plants grown in two acidic-soils.

Suelo	Inóculos	Peso fresco		Peso seco
		Aéreo	Raíz	Aéreo
(G. maceta <sup>-1</sup> )				
Argentina	No inoculado	0,17 C	0,07 B	0,03 D
	<i>A. laevis</i>	0,19 C	0,06 B	0,03 D
	<i>A. longula</i>	0,96 B	0,31 B	0,22 B
	<i>G. claroideum</i>	1,51 A	0,70 A	0,29 A
	<i>G. clarum</i>	0,86 B	0,28 B	0,13 C
	<i>S. pellucida</i>	1,10 B	0,33 B	0,21 B
Francia	No inoculado	0,22 B	0,05 C	0,07 C
	<i>A. laevis</i>	0,30 B	0,11 BC	0,09 C
	<i>A. longula</i>	2,18 A	0,38 A	0,52 A
	<i>G. claroideum</i>	0,90 B	0,18 BC	0,33 AB
	<i>G. clarum</i>	0,73 B	0,12 BC	0,24 BC
	<i>S. pellucida</i>	0,22 B	0,04 C	0,07 C

Para cada suelo, valores en columnas con letras iguales no presentan diferencias significativas entre tratamientos de inoculación (test diferencias mínimas significativas,  $p < 0,05$ ; promedios 5 repeticiones).

For each soil, values on columns with similar letters are not different among inoculation treatments (least significant differences test,  $p < 0,05$ , means of 5 repetitions).

la Argentina. La mayor cantidad de raíces micorrizadas totales y con actividad ALP fueron obtenidas para las plantas crecidas en suelo de la Argentina inoculadas con *G. claroideum*, *A. longula*, *G. clarum* y parcialmente por *S. pellucida* (Fig. 2). Sin embargo, la mayor cantidad de raíces con arbusculos totales y ALP activos fueron obtenidas sólo por la inoculación con *G. claroideum* el que superó a los restantes tratamientos en más del 40%. Las plantas crecidas en suelo de Francia presentaron, en general menor cantidad de raíces micorrizadas que las plantas crecidas en suelo de la Argentina (Tabla 2). Aunque la inoculación con *A. longula* ocasionó la mayor cantidad de raíces micorrizadas, con arbusculos totales y con actividad ALP, éste fue similar al obtenido por la inoculación con el mismo inóculo en suelo de la Argentina y aproximadamente un 40% menor al obtenido por la inoculación con *G. claroideum* en las plantas crecidas en suelo de la Argentina. Para los dos tipos de suelo, las plantas inoculadas con *A. laevis* presentaron la menor cantidad de raíces micorrizadas y con arbusculos totales y ALP activos.

La inoculación con *G. claroideum*, *A. longula*, *S. pellucida* y *G. clarum* incrementó significativamente la altura de las plantas que crecieron en suelo de la Argentina (Fig. 3).

Para las plantas crecidas en suelo de Francia, sólo la inoculación con *A. longula* incrementó significativamente la tasa de crecimiento en altura de las plantas. Para los dos tipos de suelo, las plantas inoculadas con *A. laevis* presentaron la menor tasa de crecimiento en altura.

En general, no se obtuvieron diferencias significativas en el peso aéreo entre las plantas que crecieron en los dos tipos de suelo evaluados (Tabla 3). Para las plantas crecidas en suelo de la Argentina, el mayor peso fresco y seco de la parte aérea se obtuvo por la inoculación con *G. claroideum*, seguido por las plantas inoculadas por *A. longula* y *S. pellucida* (Tabla 4). La inoculación con *A. longula* ocasionó la mayor producción de materia seca aérea de las plantas crecidas en suelo de Francia, el que duplicó al obtenido por el mismo inóculo en el suelo de la Argentina. La mayor respuesta a la micorrización fue obtenida por la inoculación con *G. claroideum*, seguido por *A. longula* y *S. pellucida* en las plantas que crecieron en el suelo de Argentina (Fig. 4). Para las plantas crecidas en el suelo de Francia, sólo la inoculación con *A. longula* incrementó significativamente la respuesta micorrícica.

El análisis de componentes principales explicó el 96,2% de la variabilidad total en las dos primeras compo-

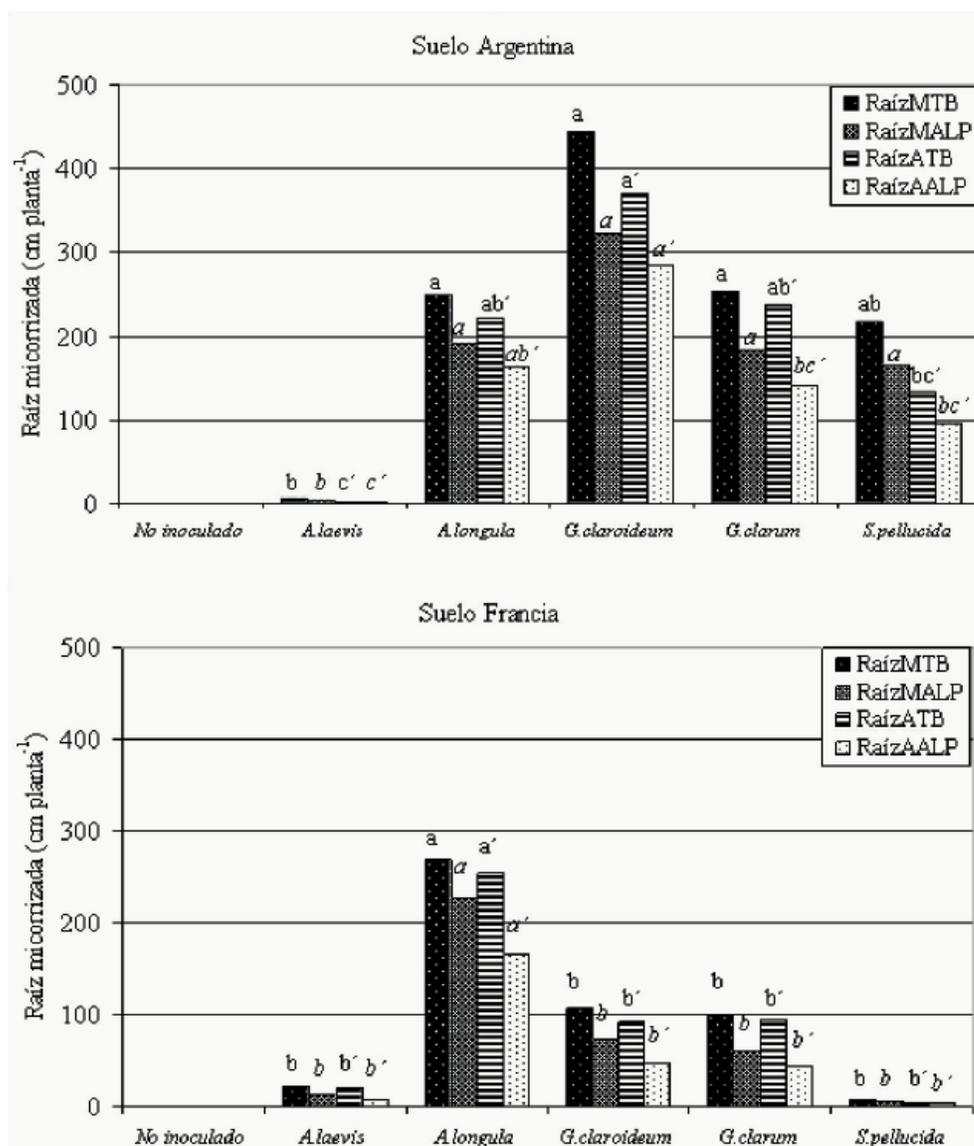


Figura 2. Efecto de la inoculación con hongos formadores de micorrizas sobre la cantidad de raíces colonizadas en plantas crecidas en suelo de Argentina y de Francia.

Para cada tipo de tinción y parámetro de colonización, valores en columnas con letras iguales no presentan diferencias significativas (Test Diferencias Mínimas Significativas,  $P < 0,05$ , para cada suelo y tratamiento  $n=5$ ).

Figure 2. Effect of arbuscular mycorrhizal inoculation on amount of colonized roots of plants growing in soil from Argentina and from France.

For each staining procedure and colonization parameter, values on columns with similar letters are not different (Test Least Significant Difference,  $P < 0.05$ , for each soil and treatment  $n=5$ ).

RaízMTB: cantidad de raíces colonizadas teñidas con Azul de tripán

RaízATB: cantidad de raíces con arbuscúlos teñidas con Azul de tripán

RaízMALP: cantidad de raíces colonizadas con actividad fosfatasa alcalina

RaízAALP: cantidad de raíces con arbuscúlos con actividad fosfatasa alcalina

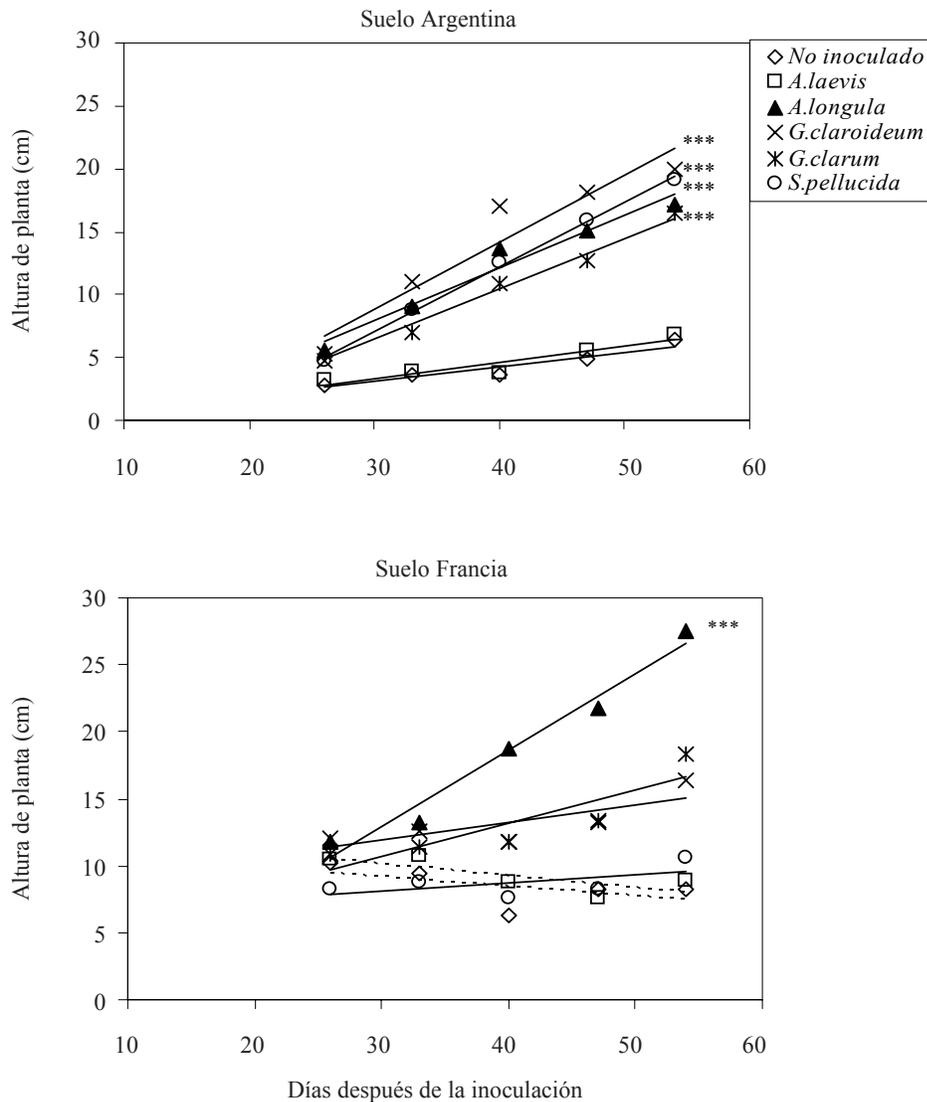


Figura 3. Efecto de la inoculación con hongos formadores de micorrizas sobre la altura de plantas crecidas en suelo de la Argentina y de Francia.

Asteriscos (\*\*\*) indican que las líneas de regresión en los tratamientos inoculados son significativamente ( $P < 0,001$ ) diferentes del tratamiento no inoculado. Para cada suelo, día después de la inoculación y tratamiento,  $n=5$ ). Líneas punteadas indican que la regresión es no significativa.

Figure 3. Effect of arbuscular mycorrhizal inoculation on height of plants growing in soil from Argentina and from France. Asterisks (\*\*\*) indicate that regression lines of inoculated treatments are significantly ( $P < 0.001$ ) different from the uninoculated treatment. For each soil, day after inoculation and treatment,  $n=5$ ). Dashed lines indicate that regression is not significant.

Líneas de regresión para tasa de crecimiento en altura (TCA) de plantas crecidas en suelo de la Argentina:

DDI: Días después de la inoculación

TCA No inoculado=  $0,12 \text{ DDI} + 0,45 \text{ r}^2 = 0,89$

TCA *A. laevis*=  $0,13 \text{ DDI} + 0,50 \text{ r}^2 = 0,88$

TCA *A. longula*=  $0,42 \text{ DDI} + 4,52 \text{ r}^2 = 0,96$

TCA *G. claroideum*=  $0,54 \text{ DDI} + 7,32 \text{ r}^2 = 0,90$

TCA *G. clarum*=  $0,40 \text{ DDI} + 5,54 \text{ r}^2 = 0,98$

TCA *S. pellucida*=  $0,51 \text{ DDI} + 8,37 \text{ r}^2 = 0,99$

Líneas de regresión para tasa de crecimiento en altura (TCA) de plantas crecidas en suelo de Francia:

TCA No inoculado=  $-0,02 \text{ DDI} + 9,03 \text{ r}^2 = 0,04$

TCA *A. laevis*=  $-0,009 \text{ DDI} + 9,27 \text{ r}^2 = 0,007$

TCA *A. longula*=  $0,53 \text{ DDI} - 1,71 \text{ r}^2 = 0,98$

TCA *G. claroideum*=  $0,16 \text{ DDI} + 6,88 \text{ r}^2 = 0,80$

TCA *G. clarum*=  $0,25 \text{ DDI} + 3,37 \text{ r}^2 = 0,89$

TCA *S. pellucida*=  $0,12 \text{ DDI} + 3,70 \text{ r}^2 = 0,65$

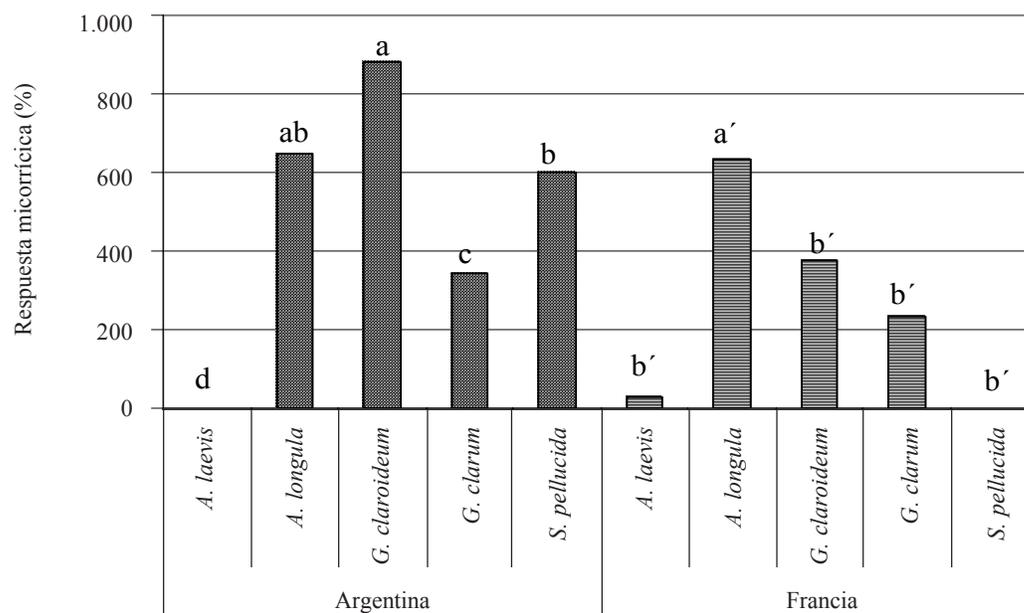


Figura 4. Respuesta micorrizica en plantas crecidas en suelo de la Argentina y de Francia.

Para cada tipo de suelo, valores en columnas con letras iguales no presentan diferencias significativas (Test Diferencias Mínimas Significativas,  $P < 0,05$ , para cada suelo y tratamiento  $n=5$ ).

Figure 4. Mycorrhizal response of plants growing in soil from Argentina and from France.

For each soil, values on columns with similar letters are not different (Least Significant Difference Test,  $P < 0.05$ , for each soil and treatment  $n=5$ ).

nentes (C), siendo que el 86,2% está relacionado a la C1 y el 10,0% a la C2. En la Figura 5 están representadas las proyecciones de los indicadores y la respuesta micorrizica obtenida por la inoculación para los dos primeros planos factoriales. Se evidencian elevadas correlaciones positivas entre sí para las variables relacionadas a la presencia y actividad de los HMA (MTB, MALP, ALP y ATB), presencia y actividad de los HMA relativa al crecimiento de las raíces (RaízATB, RaízMTB, RaízAALP, RaízMALP y altura) y propias del crecimiento de la planta (PFA, PFR y PSA). El primer eje (C1) traduce la correlación positiva entre todas las variables. El segundo eje (C2) evidencia una oposición entre los indicadores que se relacionan con la presencia y actividad de los HMA con aquellos relacionados puramente con el crecimiento de la planta. La proyección de los tratamientos en el plano de los dos primeros ejes permite diferenciar tres grupos: aquel que no presentó relación con los indicadores cuantificados (grupo A), el que se asoció con los mayores valores de los indicadores de actividad y presencia de los hongos (grupo B) y el que presentó los mayores valores en los indicadores referentes al crecimiento de la planta (grupo C). Por otra parte, los indicadores que considera-

ron tanto la presencia y actividad del hongo como al desarrollo radical, así como también el crecimiento en altura, presentaron una posición intermedia.

## DISCUSIÓN

La receptividad de un suelo a la inoculación con HMA es una importante propiedad según Plenchette (2000). Covacevich & Echeverría (2008) han demostrado que la selección de HMA receptivos a un tipo de suelo constituye un factor clave para seleccionar inóculos potencialmente eficientes para incrementar el crecimiento de las plantas. En líneas generales, los dos suelos utilizados presentaron características similares en cuanto al pH, contenido de sales y materia orgánica, mientras que el contenido de P fue mayor en el de Francia que en el de la Argentina y también difirieron parcialmente en la textura (Tabla 1). El mayor desarrollo y actividad de los HMA se evidenció en las plantas crecidas en suelo de la Argentina y variaron en función del inóculo utilizado. Al testear la utilidad de los mismos indicadores de desarrollo y eficiencia micorrizica en plantas sometidas a las mismas

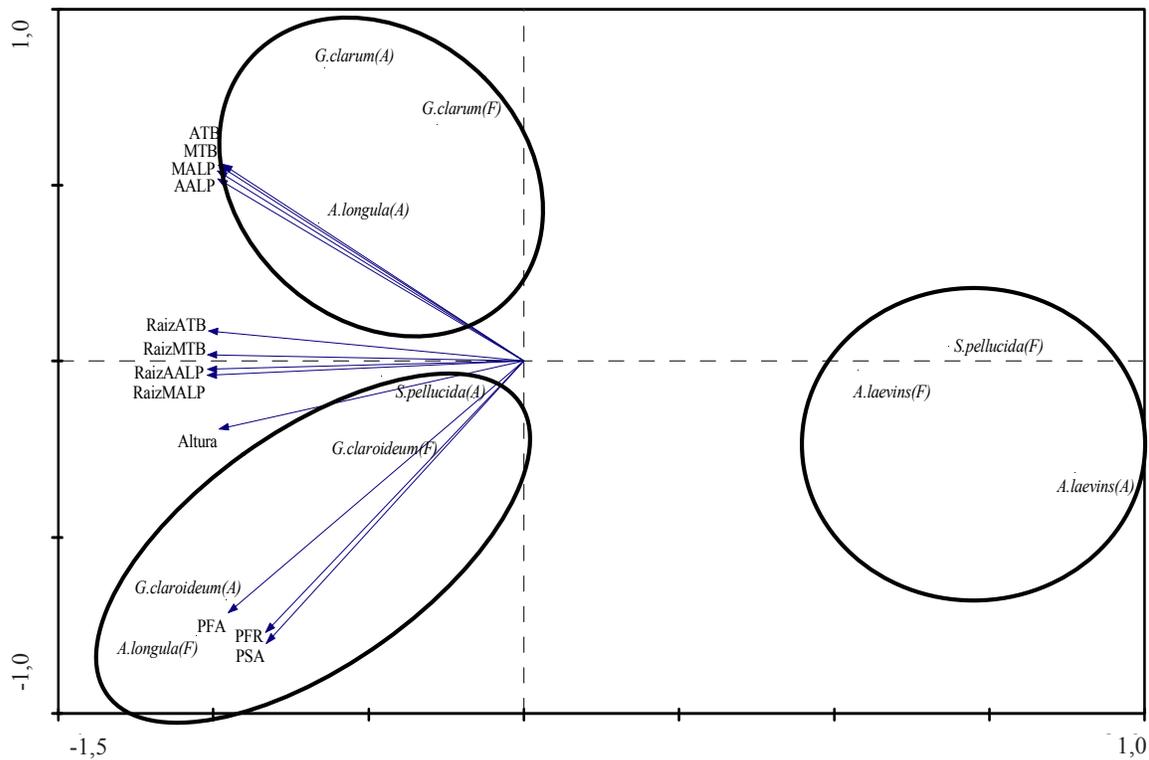


Figura 5. Análisis de componentes principales para los indicadores cuantificados y la respuesta a la micorrización ocasionada por la inoculación con hongos micorrícicos arbusculares en plantas crecidas en suelo de la Argentina (A) y de Francia (F)  
 Figure 5. Analysis of principal components for the indicators and the mycorrhizal response by the inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi of plants grown in soil from Argentina (A) and from France (F)

MTB: intensidad de infección en raíces teñidas con Azul de tripan, ATB: porcentaje de arbusculos en raíces teñidas con Azul de tripan, MALP: intensidad de infección en raíces teñidas para evidenciar la actividad fosfatasa alcalina, AALP: porcentaje de arbusculos en raíces teñidas para evidenciar la actividad fosfatasa alcalina, RaizMTB: cantidad de raíces colonizadas teñidas con Azul de tripan, RaizATB: cantidad de raíces con arbusculos teñidas con Azul de tripan, RaizMALP: cantidad de raíces colonizadas teñidas para evidenciar la actividad fosfatasa alcalina, RaizAALP: cantidad de raíces con arbusculos teñidas para evidenciar la actividad fosfatasa alcalina, PFA: peso fresco aéreo, PSA: peso seco aéreo, PFR: peso fresco raíces.

condiciones (de inoculación y crecimiento) pero diferentes tipos de suelo, los resultados evidencian que la receptividad de los suelos a la inoculación con HMA depende del tipo de suelo y del inóculo de HMA utilizado. De esta manera, la cuantificación de indicadores que permitan evaluar la receptividad de un suelo se tornan factores claves para la elección del HMA potencialmente adecuado para introducir en un suelo.

En concordancia con otros reportes, se obtuvo mayor cuantificación de los indicadores que evidencian el grado de micorrización por la tinción TB que con la tinción que pone en evidencia el tejido ALP activo (Kough & Gianinazzi-Pearson, 1986; Van Aarle *et al.*, 2002). Nuestros resultados muestran que la tinción con TB sobreestima la

actividad micorrícica en relación a la ALP. La inoculación con *G. clarum* ocasionó los mayores niveles de colonización y porcentaje de arbusculos totales y ALP activos, tal como se evidencia en el Grupo B del análisis de componentes principales (Fig. 5). Sin embargo, la mayor micorrización ocasionada por esta cepa no incrementó el crecimiento significativamente en comparación a los otros inóculos, según se evidencia en la RM (Fig. 4). Asimismo, el análisis de componentes principales mostró claramente que si bien la RM ocasionada por *G. clarum* se asoció a los indicadores de cuantificación de porcentaje de micorrización y actividad ALP, se mantuvo alejada de los parámetros de crecimiento de las plantas. Esta situación pondría en evidencia la alta capacidad micotrófica pero la

baja eficiencia de *G. clarum*, que se ha manifestado en los dos suelos testeados. Walley & Germida (1997) también reportaron que la inoculación con *G. clarum* NT4 no afectó o deprimió el crecimiento de plantas de trigo en interacción con *Pseudomonas*. Por el contrario, Talukdar & Germida (1994) y Xavier & Germida (1997) reportaron que la inoculación con *G. clarum* NT4 incrementó el crecimiento del trigo creciendo en un sustrato con pH neutro y 3% de MO. Covacevich & Echeverría (2008) encontraron que la inoculación con *G. clarum* BEG 142 en un sustrato similar al de Argentina utilizado en esta experiencia no fue efectivo para incrementar el crecimiento de plantas de trigo. Esto pondría en evidencia una alta capacidad micotrófica, aunque una baja eficiencia de dicho inóculo para ser utilizado en los suelos testeados.

Las plantas crecidas en suelo de la Argentina e inoculadas con *G. claroideum* presentaron una cantidad de raíces micorrizadas y con arbusculos totales y ALP activos que prácticamente duplicó al obtenido con *G. clarum*. Por otra parte, el análisis de componentes principales mostró claramente que la RM ocasionada por la inoculación con *G. claroideum* en ambos suelos se asociaron principalmente a los parámetros de crecimiento en peso de la planta. Los arbusculos son considerados el principal sitio de intercambio de nutrientes entre los HMA y las plantas hospedadoras (Smith & Smith, 1990; Brundrett, 2004; Fitter, 2006; Bucher, 2007). Esto estaría en concordancia con el hecho de que *G. claroideum* formó más tejido radical con arbusculos ALP metabólicamente activos que *G. clarum*, lo que se evidenció en un mayor crecimiento y beneficio de la micorrización. Aunque la colonización micorrícica no necesariamente determina la eficiencia del HMA como promotor del crecimiento, la abundancia de arbusculos, y en particular los arbusculos ALP activos pueden estar asociados a un mayor crecimiento (Joner *et al.*, 2000; Van Aarle *et al.*, 2002). En los arbusculos, el P traslocado desde el suelo, y a través de las hifas externas hacia las internas es almacenado como gránulos de polifosfato (poli-P). Ezawa *et al.* (2001) sugirieron que las raíces con actividad ALP tienen un rol clave en la hidrólisis y degradación de los gránulos de poli-P, y por lo tanto en la liberación de fosfato inorgánico desde los arbusculos a las células de la raíz. En este trabajo no se ha cuantificado la cantidad de P absorbido por las plantas, dado que los suelos testeados presentaron bajo contenido de P disponible nativo y no se testearon tratamientos de fertilización fosfatada. Sin embargo, la absorción de P, tanto en parte aérea, como en raíces y granos, así como otros parámetros ecofisiológicos también deben ser considerados como parámetros de importancia a medir a efectos de evidenciar la eficiencia de los HMA a inocular.

La inoculación con *A. laevis* presentó los más bajos niveles de colonización y las menores respuestas de cre-

cimiento. El análisis de componentes principales mostró que, la RM de los HMA que no beneficiaron el crecimiento (*A. laevis* en los dos tipos de suelo y *S. pellucida* en el suelo de Francia) no se asociaron a ninguno de los parámetros cuantificados. Aunque la información sobre *A. laevis* hongo es limitada (Tabla 2), otras experiencias han reportado que la inoculación con *A. laevis* en suelos parcialmente ácidos incrementaron la absorción de P y el crecimiento de plantas de trébol (Jakobsen *et al.*, 1992), situación que no se puso en evidencia en los suelos utilizados en esta experiencia.

La combinación entre la cantidad de raíces producidas con el porcentaje de micorrización ha sido un índice que permitió poner en evidencia la cantidad de raíces que se encuentran en simbiosis micorrícica. El análisis de componentes principales ubicó los indicadores de cantidad de raíces micorrizadas asociados con la RM en una posición intermedia entre los indicadores de porcentaje de micorrización y de crecimiento de la planta. De esta manera, es probable que las diferencias en el desarrollo radical ocasionado por la inoculación por las diferentes cepas de HMA haya compensado el grado de colonización micorrícica cuantificado en porcentaje de micorrización. Cabe destacar que para las plantas crecidas en suelo de Francia, las plantas inoculadas con *A. longula* fueron las que ocasionaron la mayor cantidad de raíces micorrizadas, y las que obtuvieron mayor RM. En tal sentido, pareciera que la cantidad de raíces micorrizadas podría ser un buen indicador de los efectos micorrícicos, particularmente cuando la inoculación afecta diferencialmente el desarrollo radical de las plantas inoculadas. Sin embargo, esto presenta la limitación de que cuando las evaluaciones son realizadas a campo, es difícil estimar el desarrollo radical por planta, así como la respuesta a la micorrización, por lo que estos parámetros pueden ser de utilidad en condiciones de experimentos en vivero.

El crecimiento en altura mostró ser un indicador parcialmente confiable para las plantas crecidas en el suelo de Francia donde sólo las plantas inoculadas con *A. longula* se destacaron por su mayor crecimiento y fueron las que obtuvieron el mayor beneficio de la micorrización. Sin embargo, para las plantas crecidas en el suelo de la Argentina no ha mostrado ser un indicador confiable.

## CONCLUSIONES

Para análisis de receptividad es necesario testear más de una cepa de HMA. Una combinación entre los parámetros de crecimiento de planta tales como peso aéreo y de raíces con los de colonización micorrícica resulta ade-

cuada para identificar de manera rápida las potenciales cepas de HMA a introducir. La actividad ALP es un parámetro que evidencia la actividad de los HMA y con buena correlación con las respuestas de crecimiento. El crecimiento de raíces es un parámetro de utilidad, sin embargo hay que considerar que en ocasiones no es factible de realizar.

Además de los indicadores mencionados, en futuros análisis también debería considerarse la cuantificación de la absorción de P por la planta. Asimismo, dado que en el momento de la inoculación a campo existen interacciones entre los HMA a introducir con los nativos, deberían testarse previamente la receptividad en macetas con suelos sin esterilizar.

#### AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido financiado por INTA (proyecto AERN-295561), UNMP (proyecto AGR261/08), y CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas). Los autores agradecen a la Banque Européenne des Glomales (BEG) por proporcionar los inóculos de HMA y la utilización del laboratorio y cámara de crecimiento para la experiencia.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Barreto de Novais, 2009. Coleção de Fungos Micorrízicos Arbusculares. Disponible en <http://www.dcs.ufla.br/micorriza/index.html>
- Blaszkowski, J. 2003. Arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota), Endogone and Complexipes species deposited in the Department of Plant Pathology, University of Agriculture Szczecin, Poland. Disponible en <http://www.agro.ar.szczecin.pl/~jblaszkowski/>
- Bucher, M. 2007. Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytol.* 173: 11-26.
- Brundrett, M. 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biol. Rev.* 79: 473-495.
- Cavagnaro, TR; FA Smith, SM Ayling & SE Smith. 2003. Growth and phosphorus nutrition of a Paris-type arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 157: 127-134.
- Covacevich, F; MA Marino & HE Echeverría. 2006. The phosphorus source determines the arbuscular mycorrhizal potential and the native mycorrhizal colonization of tall fescue and wheatgrass in a moderately acidic Argentinean soil. *Eur. J. Soil Biol.* 42: 127-138.
- Covacevich, F; HE Echeverría & LAN Aguirrezábal. 2007. Soil available phosphorus status determines indigenous mycorrhizal colonization of field and glasshouse-grown spring wheat from Argentina. *Appl. Soil Ecol.* 35: 1-9.
- Covacevich, F & HE Echeverría. 2008. Receptivity of an Argentinean pampas soil to arbuscular mycorrhizal *Glomus* and *Acaulospora* strains. *World J. Agric. Sc.* 4: 688-698.
- Echeverría, HE; R Bergonzi & J Ferrari. 1993. Carbono y nitrógeno en la biomasa microbial de suelos del sudeste bonaerense. *Ciencia del Suelo* 10/11: 36-41.
- Ezawa, T; SE Smith & FA Smith. 2001. Differentiation of polyphosphate metabolism between the extra- and intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 149: 555-563.
- Fitter, AH. 2006. What is the link between carbon and phosphorus fluxes in arbuscular mycorrhizas? A null hypothesis for symbiotic function. *New Phytol.* 172: 3-6.
- Fortin, JA; G Bécard; S Declerck; Y Dalpé; M St-Arnaud; A P Coughlan & Y Piché. 2002. Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. *Can. J. Bot.* 80: 1-20.
- Gianinazzi-Pearson, V & S Gianinazzi. 1978. Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. II. Soluble alkaline phosphatase specific to mycorrhizal infection in onion roots. *Physiol. Plant Pathol.* 12: 45-53.
- Gianinazzi-Pearson, V & SE Smith. 1993. Physiology of mycorrhizal mycelia. In: Ingram DS, Williams PH, Tommerup IC (eds.) *Mycorrhiza synthesis*. Advances in Plant Pathology, Academic Press, London, pp 55-82.
- Hamel, C. 1996. Prospects and problems pertaining to the management of arbuscular mycorrhizae in agriculture. *Agric. Ecos. Env.* 60: 197-210.
- Harley, JL. 1989. The significance of mycorrhiza. *Mycol. Res.* 99: 129-139.
- Harley, JL. 1991. Arbuscular Mycorrhizal Fungi: the state of the art. In: Norris, JR; Read DJ & Varma, AK (eds.), *Techniques for the study of mycorrhiza*. Methods in Microbiology, pp. 1-23. Academic Press. London.
- Hewitt, EJ. 1966. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Technical Communications 22, 2nd edn. Commonwealth Agricultural Bureau, London.
- INVAM, 2000. International culture collection of vesicular and arbuscular mycorrhizal fungi. Species Description. Morgantown: West Virginia Agriculture and Forestry Experimental Station. Disponible en <http://www.invam.caf.wvu.edu>.
- Jakobsen, I; LK Abbott & AD Robson. 1992. External hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi in association with *Trifolium subterraneum* L. 1. Spread of hyphae and phosphorus inflow into roots. *New Phytol.* 120: 371-380.
- Joner, EJ; IM van Aarle & M Vosatka. 2000. Phosphatase activity of extra-radical arbuscular mycorrhizal hyphae: A review. *Plant and Soil* 226: 199-210.
- Kough, JL & V Gianinazzi-Pearson. 1986. Physiological aspects of VA mycorrhizal hyphae in root tissue and soil. In: Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (eds.) *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*. INRA, Paris, pp 223-226.
- Lugo, M & M Cabello. 2002. Native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from mountain grassland (Córdoba, Argentina) I. Seasonal variation of fungal spore diversity. *Mycologia* 94: 579-586.
- Menéndez, AB; JM Scervino & AM Godeas. 2001. Arbuscular mycorrhizal populations associated with natural and cultivated vegetation on a site of Buenos Aires province, Argentina. *Biol. Fertil. Soils* 33: 373-381.

- Moreira, FMS & JO Siquiera. 2006. Micorrizas (Capítulo 10). Pp 543-657. *En: UFLA (Lavras ed.). Microbiología e Bioquímica do Solo*, 2da edn. 729 pp.
- Pfleger, FL & RG Linderman. 1996. Mycorrhizae and plant health. Pfleger, FL & RG Linderman (eds.) APS press, pp 344.
- Phillips, J & D Hayman. 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.
- Plenchette, C. 2000. Receptiveness of some tropical soils from banana fields in Martinique to the arbuscular fungus *Glomus intraradices*. *Appl. Soil Ecol.* 15: 253-260.
- Rillig, MC & DL Mummey. 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol* 171: 41-53.
- SAS Institute Inc. 1990. SAS User's Guide: Statistics, version 6, 3rd edn. Cary, NC.
- Schalamuk, S; S Velazquez; H Chidichimo & M Cabello. 2006. Fungal spore diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with spring wheat: effects of tillage. *Mycologia* 98: 16-22.
- Schenck, NC & Y Perez. 1990. Manual for the Identification of Mycorrhizal Fungi. Synergistic Publications, Gainesville, FL, USA.
- Schüßler, A; D Schwarzott & C Walker. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* 105: 1413-1421.
- Schwarzott, D; C Walker & A Schüßler. 2001. *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is nonmonophyletic. *Molec. Phylogen. and Evol.* 21: 190-197.
- Schweiger, PF; AD Robson; NJ Barrow & LK Abbott. 2007. Arbuscular mycorrhizal fungi from three genera induce two-phase plant growth responses on a high P-fixing soil. *Plant Soil* 292: 181-192.
- Smith, SE & FA Smith. 1990. Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses and they relate to nutrient transport. *New Phytol.* 114: 1-38.
- Sylvia, DM; Hartel, P; Fuhrmann, J & Zuberer D (eds.). 2005. Instructors manual: Principles and applications of soil microbiology. 2nd Edition. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. 73 pp.
- Talukdar, NC & JJ Germida. 1994. Growth and yield of lentil and wheat inoculated with three *Glomus* isolates from Saskatchewan soils. *Mycorrhiza* 5: 145-152.
- Ter Braak, CJF. 1987-1992. CANOCO-a FORTRAN program for canonical community ordination. Microcomputer Power, Ithaca, NY.
- Tisserant, B; V Gianinazzi-Pearson; S Gianinazzi & A Gollote. 1993. In planta histochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular mycorrhizal infections. *Mycol. Res.* 97: 245-250.
- Trouvelot, A; JL Kough & V Gianinazzi-Pearson. 1986. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. *In: Gianinazzi-Pearson, V & S Gianinazzi (eds.) Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*. INRA, Paris, pp 626-630.
- Van Aarle, IM; H Rouhier & M Saito. 2002. Phosphatase activities of arbuscular mycorrhizal intraradical and extraradical mycelium, and their relation to phosphorus availability. *Mycol. Res.* 106: 1224-1229.
- Vierheiling, H & JA Ocampo. 1991. Susceptibility and effectiveness of vesicular-arbuscular mycorrhizae in wheat cultivars under different growth conditions. *Biol. Fert. Soils* 11: 290-294.
- Walley, FL & JJ Germida. 1997. Response of spring wheat (*Triticum aestivum*) to interactions between *Pseudomonas* species and *Glomus clarum* NT 4. *Biol. Fert. Soils* 24: 365-371.
- Williams, SCK; M Vestberg; M Uosukainen; JC Dodd & P Jeffries. 1992. Effects of fertilizer and arbuscular mycorrhizal fungi on the post-vitro growth of micropropagated strawberry. *Agron.* 12: 851-857.
- Xavier, LJC & JJ Germida. 1997. Growth response of lentil and wheat to *Glomus clarum* NT4 over a range of P levels in a Saskatchewan soil containing indigenous AM fungi. *Mycorrhiza* 7: 3-8.
- Zhao, B; A Trouvelot; S Gianinazzi & V Gianinazzi-Pearson. 1997. Influence of two legume species on hyphal production and activity of two arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 7: 179-185.