



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA



DEPTO. DE PASANTES Y
EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

INTERACCION DE DOS LEGUMINOSAS Y HONGOS FORMADORES DE MICORRIZA VESICULO-ARBUSCULAR, AISLADOS DE SUELOS MEXICANOS

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a

Adriana Guadalupe Mejía Chávez



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

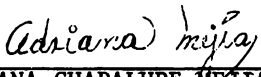
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA

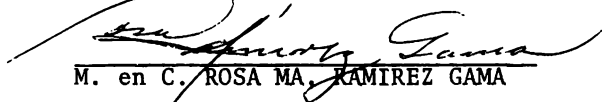
PRESIDENTE	PROF. LILIA VIERNÁ GARCIA
VOCAL	PROF. ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN
SECRETARIO	PROF. ROSA MARIA RAMIREZ GAMA
1er. SUPLENTE	PROF. JORGE SOTO SORIA
2do. SUPLENTE	PROF. BEATRIZ LUNA MILLAN

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA EXPERIMENTAL
FACULTAD DE QUIMICA
U.N.A.M.

NOMBRE Y FIRMA DEL SUSTENTANTE


ADRIANA GUADALUPE MEJIA CHAVEZ

NOMBRE Y FIRMA DEL ASESOR DEL TEMA


M. en C. ROSA MA. RAMIREZ GAMA

JUVENTUD

La juventud es algo más que una etapa de la vida. Es - una actitud mental frente a ella. Ser joven es tener temple en la voluntad, calidad y altura en la imaginación, vigor en las emociones.

Sólo seremos viejos cuando hayamos perdido nuestros - ideales.

Seremos jóvenes en la medida de nuestra fé, de la con-- fianza en nosotros mismos, y en tanto la esperanza aliente - nuestro ánimo.

Mientras nuestro corazón sea capaz de recibir mensaje - de belleza, de alegría y de entusiasmo, seguiremos siendo jóvenes. Sólo habremos envejecido si al corazón lo cubren las nieves del escepticismo y los hielos de la derrota.

Douglas MacArthur.

Con amor, respeto y admiración
para mi madre, por la fé depo-
sitada en mí y porque sin ella
jamás hubiera tenido una prepa-
ración profesional.

A la Fam. Ruíz con cariño y
agradecimiento por el apoyo
brindado en todo momento.

Con agradecimiento a la M. en C.
Rosa M. Ramírez Gama, por la di-
rección de este trabajo.

A Rogelio, con cariño.

Mi más sincero agradecimiento a las siguientes perso
nas e instituciones, cuya valiosa ayuda hizo posible la rea
lización de este trabajo:

Al laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad
de Química de la U.N.A.M., por haberme permitido trabajar -
en él.

Al M. en C. Alfredo Echegaray por el invaluable apoyo brin-
dado.

Al Q.B.P. René Grada Y. de la Escuela Nacional de Ciencias-
Biológicas del I.P.N., por la asesoría.

A la Universidad, Facultad de Química y a mis maestros a -
los que debo mi formación profesional.

Al Prof. Salvador Corral de la Facultad de Ciencias por per
mitirme el uso del invernadero.

A mis compañeros y amigos que contribuyeron de una u otra -
forma para la elaboración de este trabajo.

I N D I C E

RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
OBJETIVO DEL TRABAJO	7
CAPITULO I. LA ENDOMICORRIZA VESICULO-ARBUSCULAR (V-A).	
1.1 Historia	9
1.2 Distribución geográfica y ecológica de la Micorriza V-A.	11
1.3 Tipos de micorriza y taxonomía de los hongos formadores de micorriza V-A	13
1.4 Morfología de la endomicorriza V-A y el proceso de infección	19
1.5 Fisiología de la Endomicorriza V-A	!
1.5.1 Función de las hifas	24
1.5.2 Función de los arbuscúlos	25
1.5.3 Función de las vesículas	27
1.5.4 Función de las esporas	27
1.5.5 Función y especificidad del endofito.	27
CAPITULO II. INTERACCION DE LOS HONGOS FORMADORES DE MICORRIZA V-A CON LA PLANTA RECEPTORA.	
2.1 Importancia del fósforo en el establecimiento de la simbiosis.	30

2.2 Mecanismos de intercambio de nutrientes entre los simbioses.	39
2.3 Interacción con otros elementos minerales.	42
2.4 Efectos sobre la absorción del agua.	45
2.5 Efectos sobre algunos procesos bioquímicos.	46
2.6 Efectos de otros factores ecológicos.	
2.6.1 Temperatura	46
2.6.2 La luz	47
2.6.3 Las características del suelo	49
2.6.4 Interacción de la endomicorriza V-A con otros microorganismos.	52
2.6.5 Impacto de los fungicidas.	55

CAPITULO III . MATERIAL Y METODOS.

Anexo I; Tinción de raíces para investigar la presencia de micorriza V-A.	63
Anexo II; Esporas de hongos formadores de micorriza V-A extraídas del suelo -- por la técnica de tamizado húmedo y decantación.	67
Anexo III; Técnica de conservación de esporas de hongos micorrízicos.	69
Anexo IV; Solución mineral de Long Ashton - modificada.	71

Anexo V:	Microdeterminación de ni- trógeno en plantas.	74
Anexo VI:	Determinación de fósforo- total en plantas.	79
CAPITULO IV.	RESULTADOS.	84
CAPITULO V.	CONCLUSIONES.	88
CAPITULO VI.	BIBLIOGRAFIA.	91

RESUMEN.

La micorriza es una asociación simbiótica formada por las raíces de algunos vegetales superiores y las hifas de ciertos hongos. Está dividida en: Ectomicorriza, Endomicorriza y Ecto-Endomicorriza. A su vez la segunda está dividida en tres clases: Vesículo-Arbuscular, Ericacea y Orquidácea. De la que se ocupa el presente trabajo es de la Endomicorriza vesículo-arbuscular. El nombre es debido a dos estructuras típicas de la asociación: Las vesículas, que corresponden a ensanchamientos terminales de las hifas entre las células corticales, y los arbuscúlos, que son ramificaciones de las hifas dentro de algunas células.

Esta simbiosis hongo-planta desempeña un importante papel en ecología y nutrición vegetal. Formada por la mayoría de las plantas existentes, comienza a estudiarse su aplicabilidad en agricultura como fertilizante microbiano, ya que, estos hongos aumentan la superficie de absorción de la raíz y, por consiguiente, facilita la obtención de nutrientes, principalmente fósforo y en segundo término nitrógeno, potasio y otros.

Debido a que en nuestro país existen pocos reportes relacionados con el tema, este trabajo pretende contribuir

al conocimiento de algunos aspectos de esta simbiosis.

Se emplearon como hospederos dos leguminosas: frijol y soya, el inóculo estuvo constituido por: esporas de hongos formadores de micorriza V-A aisladas de suelos mexicanos y raíces infectadas por dichos hongos, tanto desinfectadas como no desinfectadas, el soporte fue vermiculita a la que se le ajustó el pH a un valor de siete. El experimento fue llevado a cabo en un invernadero, cosechándose después de ciento diez días.

La evaluación de los resultados se hizo mediante determinaciones de: presencia de infección micorrícica, altura de la parte aérea de la planta, peso húmedo y peso seco de la parte aérea, peso húmedo de la raíz, contenido de nitrógeno y fósforo total en la parte aérea.

INTRODUCCION

Hoy se reconoce que los microorganismos que viven en el suelo desarrollan en su hábitat natural actividades de gran interés por su repercusión directa en el crecimiento y nutrición de las plantas, e indirectamente, en la nutrición de los animales.

Mayoritariamente se acepta que las plantas se originaron a partir de las algas verdes. El tránsito de éstas, desde su hábitat acuático a ambientes secos, y la evolución de ellas a plantas con raíces antecesoras de los vegetales superiores actuales fue un punto crucial en la historia de la vida sobre la Tierra. La opinión común sostiene que la colonización de aquel suelo, seco y pobre, por las algas fue posible gracias a que éstas se asociaron con otros microorganismos, lo que permitió que pudieran captar mejor sus alimentos minerales; por un lado, hongos microscópicos formaron las primeras micorrizas, y por otro, las plantas se asociaron con microorganismos fijadores de nitrógeno atmosférico.

En la naturaleza existen diferentes simbiosis, una de ellas es la formada por las hifas de algunos hongos con las raíces de ciertas plantas superiores, denominándosele mico-

rriza, palabra de origen griego (mykes = hongo, rhiza = raíz) dada por Frank en 1885 (Harley 1969) y que prevalece en la actualidad.

La micorriza es una asociación simbiótica caracterizada por un estado de equilibrio fisiológico que permite a los organismos implicados sacar beneficios mutuos, porque los simbioses son más capaces de sintetizar o liberar, recíprocamente, sustancias indispensable para su metabolismo las que no pueden ser elaboradas u obtenidas fácilmente, cuando cada uno vive por separado.

La planta suministra al hongo fuentes de carbono procedentes del producto de la fotosíntesis así como un nicho ecológico protegido de los fenómenos de antagonismo microbiano en la rizosfera. Por su parte, el hongo ayuda a la planta a absorber sus nutrientes minerales del suelo. Se sabe que las hifas del hongo que se desarrollan en la raíz y emergen de ella desempeñan un importante papel en la traslocación hacia la planta de iones, especialmente de fosfato, por lo que, en suelos con un contenido bajo en fósforo asimilable, la micorriza V-A representa una contribución fundamental para la economía nutritiva de la planta.

Debido a la amplia distribución de las micorrizas, pue

de afirmarse que las plantas cuando crecen en condiciones naturales son en su mayoría organismos dobles, en el sentido de que el órgano a través del cual absorben agua y nutrientes está constituido por la raíz propiamente dicha y un hongo que vive simbióticamente con ella.

Es un hecho incuestionable que la necesidad de incrementar la calidad y cantidad de cosechas agrícolas, ante la creciente demanda de alimentos, condiciona el progresivo agotamiento de los suelos, lo que, a su vez, induce a aumentar el consumo de fertilizantes químicos, de elevado costo. Estos hechos han animado a investigar la posibilidad de manipular las poblaciones microbianas que habitan en el suelo y que intervienen en los ciclos de los nutrientes, con el fin de mejorar el contenido de sus formas asimilables por las plantas cultivadas. La idea, lógicamente, es incrementar la producción vegetal, reducir el consumo de fertilizantes de elevado costo y contaminantes de los ecosistemas.

Actualmente, la atención se ha centrado en el estudio de microorganismos capaces de formar asociaciones simbióticas con las plantas.

Tal es el caso de la simbiosis Rhizobium-leguminosa, que como se sabe, representa un importante aporte de nitró-

geno a esas plantas y a través de ellas a la biosfera.

Igualmente, se encuentra en estudio la posibilidad de utilizar la micorriza vesículo-arbuscular como fertilizante biológico. En este sentido, se han llevado a cabo ensayos, generalmente en invernadero, en los que se ha puesto de manifiesto la ventaja de la inoculación con hongos micorrícicos. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con la simbiosis Rhizobium-leguminosa, en que el nitrógeno fijado procede de la atmósfera, la micorriza V-A mejora la captación, del fósforo y otros iones existentes en el suelo, por la planta. - Por lo tanto, con el uso de la micorriza no se pretende sustituir a los fertilizantes químicos, sino reducir su empleo; de esta manera, deberán usarse conjuntamente para obtener - una producción vegetal óptima.

Cuando se quiera llevar a cabo un ensayo de fertilización biológica en campo, debe desarrollarse antes una investigación que permita establecer la necesidad de inocular, - seleccionar los microorganismos adecuados y estudiar su interacción con los fertilizantes químicos.

OBJETIVO DEL TRABAJO

Uno de los problemas que aquejan a ciertas zonas de la República Mexicana es la existencia de suelos con bajo contenido de nutrientes o agotamiento de ellos, tales como el nitrógeno y el fósforo, entre otros. De esta forma ha tenido que recurrirse a la aplicación de fertilizantes químicos para aumentar la productividad o bien mantener el equilibrio de nutrientes en el suelo, pero debido a su enca recimiento y la importancia ecológica que esto tiene, en la actualidad existen reportes de otros países acerca del interés de utilizar los hongos formadores de micorriza V-A como fertilizantes biológicos (inoculantes), para favorecer la captación de nutrientes por los vegetales.

Pero antes que ésto se convierta en una práctica agronómica común, es necesario hacer una serie de experimentos con diferentes hospederos y condiciones experimentales, tanto en invernadero como en campo, con el objeto de optimizar esta asociación natural e incrementar la productividad agrícola y sobre todo vencer el obstáculo que implica la obtención de inóculo a gran escala para ser utilizado como fertilizante biológico. A pesar de la importancia que este tipo de simbiosis tiene, en nuestro país existen estudios muy aislados sobre este tema, en especial los proporcionados por:-

El Colegio de Postgraduados de la Universidad Autónoma de Chapingo y la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

Por lo que los objetivos del presente trabajo son:

a) Aislar a partir de suelos mexicanos cepas de hongos formadores de micorriza V-A que infecten leguminosas y favorezcan la captación de nutrientes.

b) Comparar la efectividad de tres técnicas de inoculación: esporas, raíces infectadas no desinfectadas y raíces infectadas desinfectadas.

c) Conservación de las cepas obtenidas para experimentos posteriores.

De esta forma se pretende contribuir al conocimiento de algunos aspectos relacionaos con esta simbiosis y fomentar la investigación de la micorriza V-A.

CAPITULO PRIMERO

LA ENDOMICORRIZA VESICULO-ARBUSCULAR (V-A)

1.1 Historia

Hace unos 400 millones de años, las plantas empezaron a colonizar la superficie terrestre, ésto constituyó un hecho importante en la evolución de los seres vivos. Mediante su capacidad fotosintética, los vegetales transforman la energía solar en energía química, utilizable por otros organismos. Para llevar a cabo tal actividad, aquellas primeras plantas requerían, como las actuales, una serie de nutrientes que debieron captar de la atmósfera (anhídrido carbónico) y del suelo (agua, nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, hierro, etcétera).

La planta fósil más antigua que ha podido ser estudiada pertenece al género Rynia y data de hace 370 millones de años, de ella se han obtenido microfotografías de las "raíces" en donde se aprecia claramente la presencia de una formación fúngica en su interior de gran similitud con las actuales especies de hongos formadores de micorriza V-A. Algunos autores consideran que, en ciertos casos, tales asociaciones "hongos-raíz" eran ya micorrizas.

Es muy probable que las primeras plantas que evolucio
naron a establecerse en un ecosistema terrestre, encontra--
ron un suelo ya colonizado por poblaciones microbianas, en-
tre las cuales posiblemente hubiera cianobacterias y bacte-
rias fijadoras de nitrógeno.

Posiblemente no fué el nitrógeno el factor limitante,
sino el fósforo, en la colonización de nuevos hábitats. En-
tales condiciones, cualquier asociación planta-microorganismo
que mejore la extracción de elementos minerales, se selec
ciona y perpetúa.

Se ha sugerido que ahí podría radicar el origen de la
micorriza V-A. De este modo la nutrición por medio de hon-
gos, no es un proceso nuevo, sino que nació con la apari- -
ción de plantas con raíces.

Comúnmente se acepta que las plantas vasculares se -
originaron a partir de las algas verdes. En este sentido,-
se ha propuesto una hipótesis según la cual, para que el al
ga semiacuática pudiera superar los problemas de deseca- -
ción y nutrición que suponía el paso a un hábitat terrestre,
debieron asociarse simbióticamente con hongos acuáticos. -
De acuerdo con esta hipótesis, las plantas serían el producto
de tal simbiosis, que permitieron la colonización de la-
tierra durante el Silúrico y el Devónico. La conclusión de

esta hipótesis es: Las plantas terrestres nunca tuvieron independencia, porque si la hubiesen tenido jamás hubieran colonizado la tierra. La simbiosis fué, posiblemente, de tipo endotrófico, modelo de asociación mantenida hoy día por casi todas las plantas en forma de micorriza V-A.

Finalmente se dirá que la micorriza se originó prácticamente con las plantas, permitieron su evolución y a su vez, evolucionaron con ellas y con ellas se han perpetuado.

1.2 Distribución Geográfica y Ecológica de la Micorriza V-A.

Su distribución es muy amplia sobre la superficie terrestre, se han descrito micorrizas V-A en todos los continentes, excepto en la Antártida. Reportándose en asociación con todo tipo de vegetales de interés agrícola e industrial, como en: gramíneas, leguminosas, cítricos, árboles maderables, etcétera, también se encuentran en aquellos suelos que soportan condiciones extremas de humedad por ejemplo en: zonas pantanosas, encontrándose circunscritas a las áreas superficiales en donde hay una difusión de oxígeno limitado. Recientemente se descubrieron plantas micorrizadas en zonas acuáticas de la India. (Rikhy, 1974).

Solo un 3%, aproximadamente de las fanerógamas tienen micorriza formadora de manto, el resto posee micorriza V-A.

Hasta la fecha no se ha reportado micorriza en las siguientes familias: Chenopodiaceae, Cruciferaeae, Cyperaceae, Urticaceae y Poligonaceae. No obstante, algunas especies de estas familias se han definido recientemente como micorrizables y es lógico pensar, que plantas supuestamente no micorrizables en condiciones normales puedan serlo en otras condiciones de cultivo. Existe también cierto grupo de plantas que tienen tanto micorriza formadora de manto como micorriza V-A; tal es el caso de Salicaceae, Juglandaceae, Tiliaceae, Mirtaceae y Caesalpinaceae.

Aunque no se tienen datos estadísticos oficiales sobre el porcentaje de especies micorrizadas y no micorrizadas, se ha observado que las plantas micorrizadas constituyen la mayor parte, y de estas el 80% presentan endomicorriza V-A, 10% ecto-endomicorriza, cerca del 5% ectomicorriza y el resto corresponde a otras micorrizas como: Ericaceas y Orquidáceas.

Gerdemann (1971) indicó que "El estado de micorrización en las plantas es la regla y el no estarlo la excepción".

Sin lugar a duda, la más extendida es la de tipo vesículo-arbuscular, encontrándose en la mayor parte de los climas que permiten el desarrollo vegetal sobre el planeta.

La micorriza V-A se conoce desde el siglo pasado, pero a pesar del interés ecológico que se deriva de su casi omnipresencia, no se le prestó demasiada atención, y, en los últimos años, ante la evidente repercusión de esta simbiosis en la nutrición vegetal, se inicio un movimiento de investigación cada vez más intenso sobre el tema.

1.3 Tipos de Micorriza y Taxonomía de los Hongos formadores de Micorriza V-A.

La micorriza se ha venido clasificando, en base a su estructura y morfología, en tres grandes grupos:

- a) Ectomicorriza o micorriza ectotrófica.
- b) Endomicorriza o micorriza endotrófica y
- c) Ecto-endomicorriza o micorriza ecto-endotrófica.

En las primeras se incluyen micorrizas en las cuales el hongo, normalmente de micelio tabicado, forma un manto fúngico que se extiende desde el exterior de la raíz hasta los espacios intercelulares, dando aspecto de red (red de Hartig).

En la endomicorriza, a diferencia de la anterior, el hongo no forma manto sobre la raíz y las hifas penetran al interior de las células de la corteza.

No obstante, hoy día se sabe que los hongos formadores de endomicorriza están muy distanciados taxonómica y fisiológicamente, por lo que ha sido necesario modificar esta clasificación y subdividir a la endomicorriza en varios subgrupos: el que esta formado por hongos septados (Ascomicetos, Basidiomicetos y Hongos imperfectos), y que esta presente, por ejemplo en Orquidáceas y Ericaceas; y el formado por hongos no septados que frecuentemente son Ficomicetos - microscópicos pertenecientes a la familia Endogonaceae, o - también conocidos como hongos formadores de micorriza vesículo-arbuscular (V-A), presentes en Briofitas, Gramíneas y Leguminosas, entre otras.

La taxonomía de los hongos micorrizícos es muy compleja y aún no se ha establecido una división definida, porque cada año se descubren nuevas especies.

El parecido anatómico de las infecciones V-A hizo pensar que la mayoría de ellas eran causadas por el mismo hongo; de hecho, hasta la revisión de Mosse en 1973 se aceptó que los endofitos V-A pertenecían, en su mayoría al género Endogone, del que se habían descrito diversidad de tipos. -

De acuerdo con las clasificaciones clásicas, todas las especies de Endogone forman un tipo especial de esporas, sin embargo, ante el descubrimiento de nuevas formas unidas al micelio externo de raíces micorrizadas, se planteó la necesidad de revisar la taxonomía. En este sentido se han llevado a cabo varias investigaciones que han permitido clasificar a los hongos micorrícicos, según Alexopoulos (1966) y Gerdeman (1971), en:

Reino	Plantae
División	Mycota
Subdivisión	Eumycotina
Clase	Phycomycetes
Orden	Mucorales
Familia	Endogonaceae
Género	Están agrupados en 9. (Ver tabla No. 1)

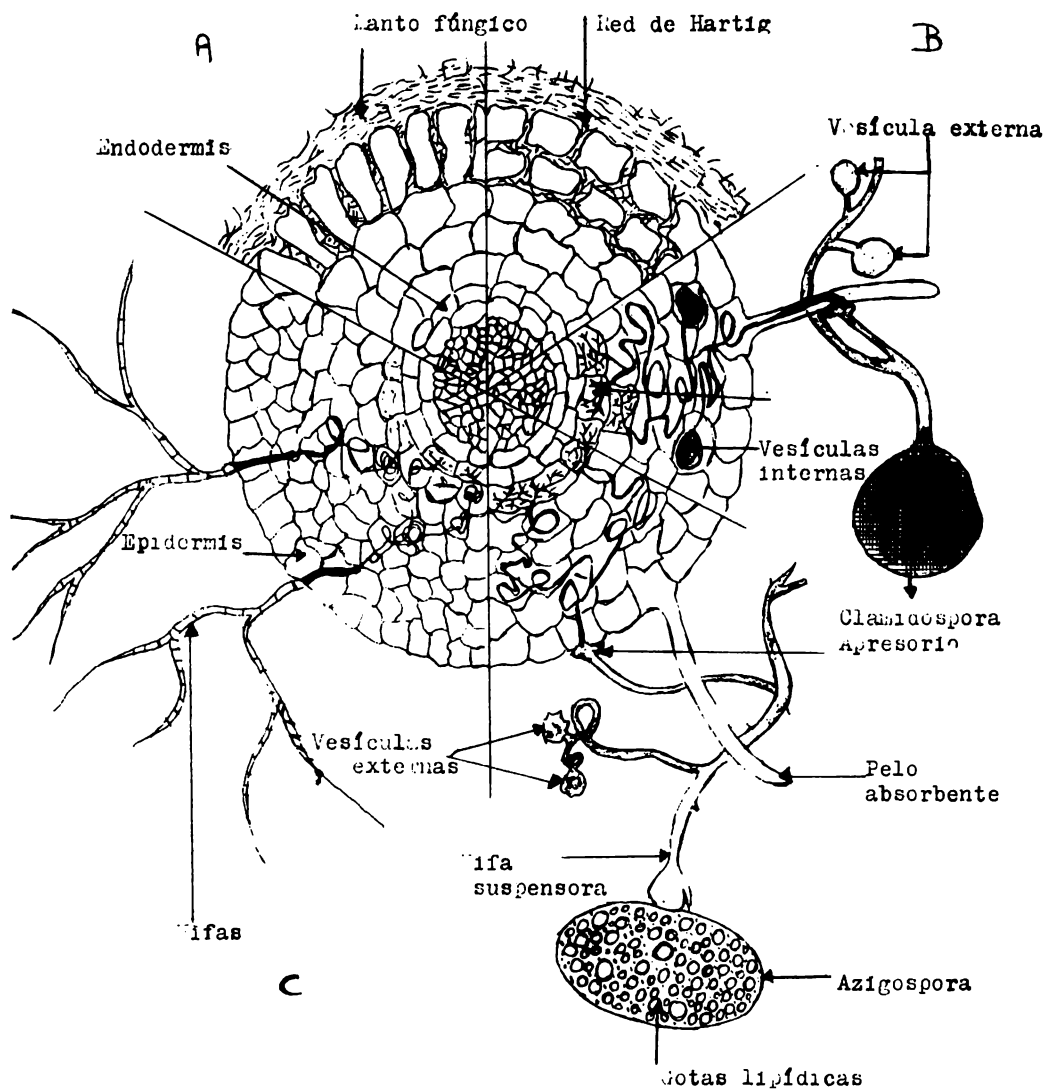
Anteriormente 40 especies fueron descritas como pertenecientes al género Endogone, actualmente la familia Endogonaceae tiene nueve géneros, en donde el de Endogone forma ectomicorriza y los demás micorriza V-A, de los que se conocen aproximadamente 80 especies y cuya descripción se ha hecho en base a las características morfológicas que presentan en sus hábitats naturales porque hasta la fecha ninguno de los hongos formadores de micorriza V-A ha podido ser cul

TABLA No. 1

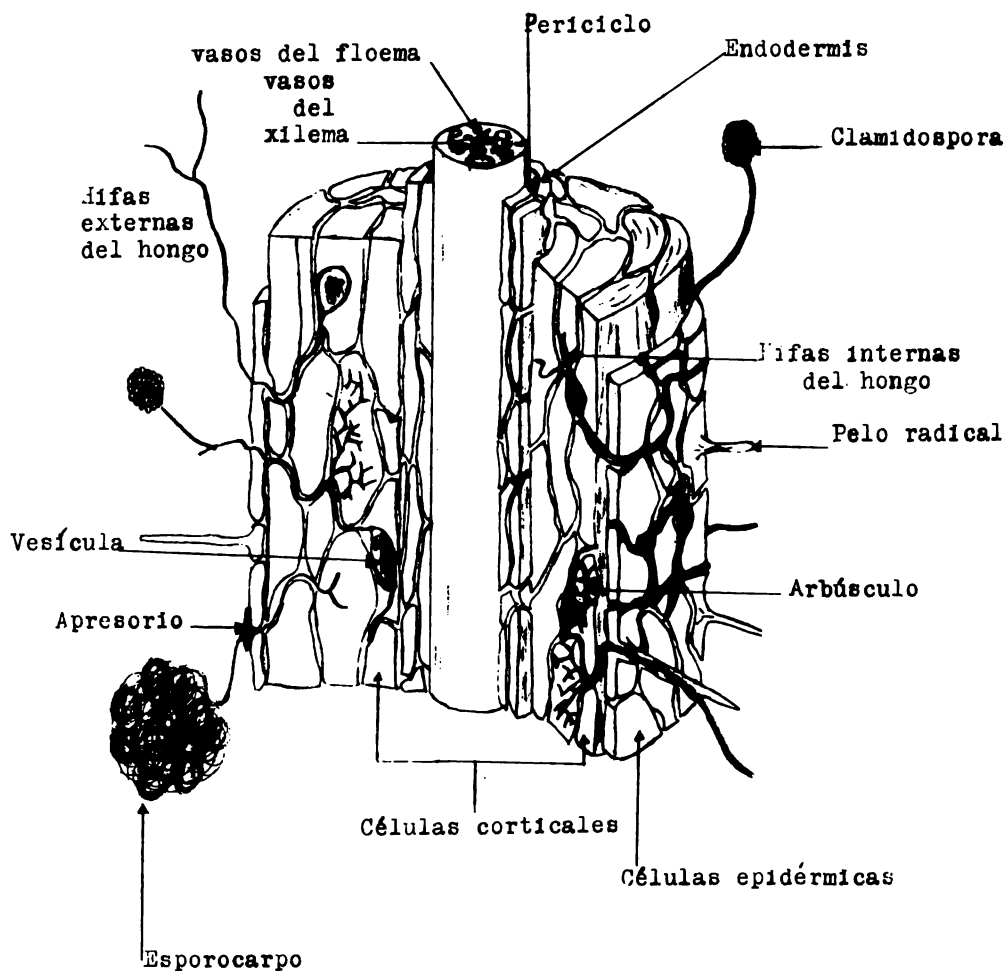
Fam. ENDOGONACEAE: GENEROS Y ESPECIES

<u>Endogone</u>	<u>Gigaspora</u>	<u>Glomus</u>	<u>Glomus</u>
<u>acrogena</u>	<u>aurigloba</u>	<u>borealis</u>	<u>pallidus</u>
<u>aggregata</u>	<u>calospora</u>	<u>caledonius</u>	<u>pubescens</u>
<u>alba</u>	<u>coralloidea</u>	<u>canadiensis</u>	<u>pulvinatus</u>
<u>crassa</u>	<u>gigantea</u>	<u>clarus</u>	<u>radiatus</u>
<u>flammicorona</u>	<u>gilmorei</u>	<u>constrictus</u>	<u>scintillans</u>
<u>incrassata</u>	<u>gregaria</u>	<u>convolutus</u>	<u>segmentatus</u>
<u>lactiflua</u>	<u>heterogama</u>	<u>epigaeus</u>	<u>tener</u>
<u>multiplex</u>	<u>margarita</u>	<u>etunicatus</u>	<u>tenuis</u>
<u>oregonensis</u>	<u>nigra</u>	<u>fasciculatus</u>	<u>tubaeformis</u>
<u>pisiformis</u>	<u>pellucida</u>	<u>flavisporus</u>	<u>vesiculifer</u>
<u>reticulata</u>	<u>rosea</u>	<u>fragilis</u>	
<u>stratosa</u>		<u>fuegianus</u>	<u>Complexipes</u>
<u>tuberculosa</u>	<u>Sclerocystis</u>	<u>fulvus</u>	<u>monifiliformis</u>
<u>verrucosa</u>	<u>clavispora</u>	<u>gerdemannii</u>	
<u>Acaulospora</u>	<u>coccogena</u>	<u>halonatus</u>	<u>Glaziella</u>
<u>bireticulata</u>	<u>coremioides</u>	<u>invermaius</u>	<u>aurantiaca</u>
<u>elegans</u>	<u>dussii</u>	<u>lacteus</u>	
<u>gerdemannii</u>	<u>rubiformis</u>	<u>macrocarpus</u>	<u>Entrophospora</u>
<u>laevis</u>	<u>sinuosa</u>	<u>magnicaulis</u>	<u>infrequens</u>
<u>scrobiculata</u>		<u>melanosporus</u>	
<u>trappei</u>	<u>Modicella</u>	<u>microcarpus</u>	
	<u>malleola</u>	<u>monosporus</u>	
	<u>reniformis</u>	<u>mosseae</u>	
		<u>multicaulis</u>	

ILUSTRACION ESQUEMATICA DE LOS TRES TIPOS PRINCIPALES
 DE MICORRIZA: A. ECTOMICORRIZA, B: ENDOMICORRIZA VESICULO-ARBUSCULAR
 C: ENDOMICORRIZA ORQUIDACEA
 (Purlan, 1972)



ESQUEMA DE LA MICORRIZA V-A



Micorriza Vesículo-Arbuscular: constituye el tipo de micorriza ampliamente distribuido en la naturaleza. Se desarrolla en el interior de la raíz, dando lugar a los elementos morfológicos típicos de esta infección: los arbúsculos y las vesículas. En el esquema se muestra un corte longitudinal de una micorriza V-A. (Azcón, 1980).

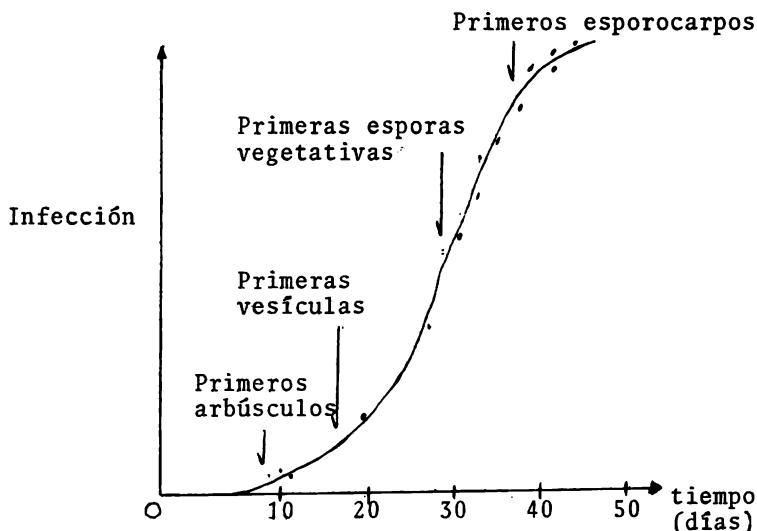
tivado en un medio sintético y, por consiguiente no se conoce con detalle su ciclo de vida.

1.4 Morfología de la Endomicorriza V-A y el Proceso de Infección.

A diferencia de la ectomicorriza que se reconoce por el manto de micelio externo, la endomicorriza V-A se desarrolla en el interior de la raíz y su estudio debe ser llevado a cabo por una técnica de clarificación y tinción seguido del examen microscópico de la raíz, en donde se observan las siguientes estructuras: hifas, arbuscúlos y/o vesículas. Los arbuscúlos son de forma coraloide o arborescente; las vesículas presentan forma cilíndrica o esférica, su diámetro varía de 100 a 800 μ m, normalmente tienen paredes gruesas, contienen mucho material lipídico, su color va del amarillo pálido a negro cuando maduran. Las vesículas ocasionalmente pueden contener otras esporas de paredes delgadas, no obstante, no se conoce la naturaleza de estas esporas, las vesículas son inter o intracelulares, observándose fuera o dentro de la raíz, generalmente estas estructuras son terminales. Las esporas tienen diferente diámetro, varía de 180 a 500 μ m, presentan formas diferentes pero típicas, lo cual permite distinguirlas de las formadas por otras clase de hongos, se consideran como clamidosporas o zigosporas.

En contraste con lo que sucede con la ectomicorriza, la infección V-A origina pocos cambios morfológicos en exterior de la raíz.

Respecto al mecanismo de infección éste es diferente en cada especie y, a su vez, éste es modificado por los factores ecológicos, en general, la dinámica del desarrollo de la infección V-A se caracteriza por seguir un modelo de - tres fases: fase lag o lenta, en donde tiene lugar la germinación de las esporas y comienza la colonización de las - raíces por las hifas; a continuación, sigue una fase rápida o de desarrollo intensivo de la infección y, por último, se llega a la fase de constancia o de atenuación.



Dinámica del desarrollo de la infección V-A en una planta - hospedadora adecuada (Azcón, 1980).

La infección se inicia a partir de las clamidosporas (esporas de resistencia formadas por el hongo) o bien, a partir del micelio originado de una raíz previamente infectada. Las esporas que resisten condiciones adversas en el suelo, como el calor y la sequía, germinan cuando las circunstancias son favorables, pero, los tubos de germinación producidos dejan de ser funcionales, a no ser que encuentren una raíz hospedera y penetren con éxito en ella.

Cuando una espora germina, las hifas desarrolladas pueden penetrar a la raíz de dos formas: Por la epidermis o por los pelos absorbentes. La hifa infectiva forma un apresorio sobre la superficie de la raíz que tiene lugar normalmente entre las células epidérmicas, a continuación, la hifa invasora se ramifica rápidamente entre las células corticales de la raíz, sin invadir endodermis, tejidos vasculares ni meristemas.

Se ha observado que los pelos próximos al pelo infectado son atrofiados y cuanto más distantes estén, la atrofia es menor, esto no lesiona a la planta, por el contrario facilita la absorción de sustancias minerales presentes en el suelo.

Poco tiempo después de iniciada la infección se desarrollan los arbúsculos, mediante la ramificación dicotómica

de las hifas intracelulares, hasta la formación de hifas de menos de 0.2 micrometros de diámetro. Cuando se forma un arbúsculo, el almidón de la célula invadida desaparece, al tiempo que el núcleo se alarga y divide; los arbúsculos son digeridos rápidamente, empezando por la extremidad más fina del hongo, las sustancias que tienen en el interior son liberadas y absorbidas por las plantas para su metabolismo. Después de ser digeridos, los núcleos celulares vuelven a su tamaño original y en este momento los granos de almidón suelen reaparecer, lo que ha hecho pensar que cuando los granos de almidón no se forman hay una traslocación de azúcares al hospedero. Los arbúsculos presentan forma coraloide que aumenta la dimensión del endofito al interior de la raíz.

Posteriormente a los arbúsculos se forman las vesículas, estructuras de forma ovoide y que contienen muchas gotitas lipídicas.

El desarrollo de la infección en el interior de la raíz está acompañado por un crecimiento exterior de las hifas que emergen de la raíz se extienden por el suelo varios centímetros, dando lugar al micelio externo, que constituye el sistema de absorción de nutrientes. Este consta de una red tridimensional de hifas; de 8 a 38 micrometros de diáme

tro, que son consideradas la base permanente del micelio y otras más delgadas (2-7 μ m) de posible función rizoidal más efímeras que las anteriores. Sobre el micelio externo se forman grandes esporas vegetativas que van madurando hasta convertirse en clamidosporas y algunas especies desarrollan esporocarpos.

Las esporas son divididas en varios tipos y son reconocidas por su forma, la cual puede ser esférica, ovoide o irregular, por su medida promedio, espesor de la pared, por su color característico que va del amarillo al negro, pasando por café; y por la morfología de la unión de la hifa con la espora.

Gerdemann (1955), Hayman (1970) y Moose (1953) señalan que las hifas externas del micelio se extienden en el suelo a distancias de 10 a 70 cm. de la raíz, la planta al tener raíces con hifas puede absorber más fósforo, debido a que las hifas exploran una extensión mayor de suelo, actividad que la raíz por si sola no puede desarrollar.

Mejstrik (1972) menciona que el número de hifas potencialmente activas depende de: la especie de hongo, tipo de hospedero, profundidad a la que esta situada y características del suelo.

Mosse en 1953, por vez primera observó que las raíces infectadas por hongos micorrícicos atadas a la raíz del hospedero, podían ser empleadas como inóculo para inducir la micorrización.

1.5 Fisiología de la Endomicorriza V-A.

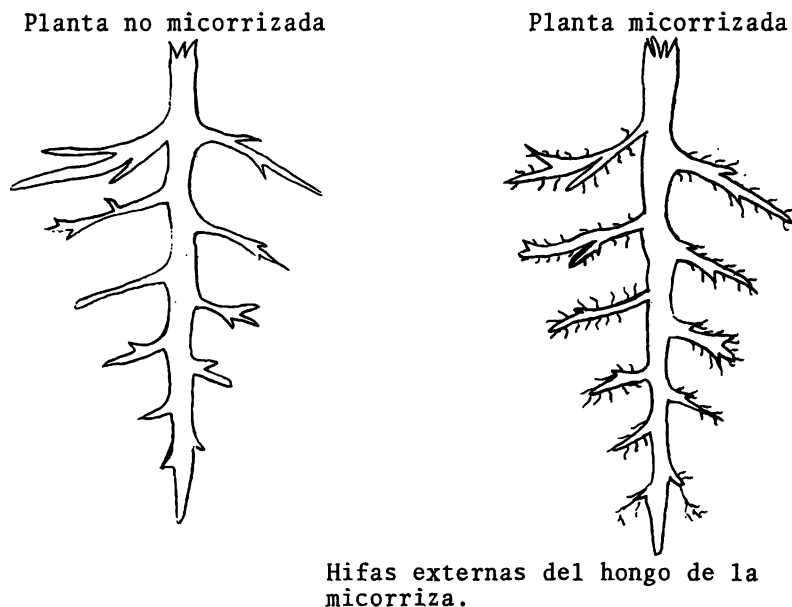
1.5.1 Función de las hifas.

Un estudio fisiológico completo del endofito no ha sido realizado, porque, como se mencionó anteriormente, estos hongos no crecen en medios sintéticos. Hasta la fecha solo se ha logrado que la espóra germine en el medio, lo que se atribuye a la utilización de las sustancias de reserva de la misma espóra. Los medios que se han empleado están constituidos por: agua, elementos minerales, vitaminas, azúcares, aminoácido, hormonas, extracto de suelo y/o fragmentos de raíz.

Los conocimientos actuales de la endomicorriza V-A se basan, principalmente en: observaciones al microscopio de fragmentos de raíz, análisis histoquímicos, uso de elementos radioisotópicos, empleo de diferentes hospederos sometidos a diversos tratamientos. Estas técnicas han ayudado a visualizar, en forma indirecta, la función de cada uno de -

elementos morfológicos típicos de la infección micorrícica.

Se ha deducido que la función de las hifas es aumentar el volumen de suelo explorado, para tener una superficie de absorción mayor a la de las plantas no micorrizadas, lo que reviste gran interés en la nutrición vegetal.



1.5.2. Función de los Arbúsculos.

Estas estructuras desempeñan un papel muy importante en la vida del hongo, porque si no hay arbúsculo no habrá producción de vesículas al interior, ni producción de esporas al exterior.

Parece que los arbúsculos tienen doble función: Ver--
ter a las células del hospedero sustancias nutritivas prove--
nientes del exterior por intermedio de las hifas y funcio--
nar como órganos de reserva. Según expresiones de Gallaud--
(1905) quién hizo trabajos muy importantes sobre la morfolo--
gía y fisiología de la micorriza V-A, afirma que estos ór--
ganos son para extraer sustancias orgánicas sintetizadas -
por la planta y que son esenciales para el metabolismo del--
endofito y de su desarrollo al interior o exterior de la -
raíz. Los arbúsculos son estructuras que sólo se observan--
en la endomicorriza V-A.

La presencia de arbúsculos en la célula determina la--
traslocación de sustancias en la siguiente forma: Hay libe--
ración de elementos minerales hacia la planta y absorción -
de compuestos orgánicos necesarios para el desarrollo del -
hongo. Es posible que la difusión de elementos se haga por
medio de transportadores que están en la célula.

En una célula no puede haber dos arbúsculos, si llega--
ra a presentarse el caso, se debe a que uno se encuentra en
formación y el otro en proceso de digestión.

1.5.3 Función de las Vesículas.

La función de estas estructuras aún no esta bien definida y se cree que actúan como órganos de reserva y de reproducción.

McLennan (1926) demostró que los lípidos contenidos en las vesículas son las sustancias principales en el desarrollo de la infección. Estas reservas pueden ser empleadas por la planta hospedadora cuando la pared de las vesículas sufre lisis.

1.5.4 Función de las Esporas.

Las esporas y los esporocarpos son reconocidos como estructuras de infección, además, su contenido lípidico y de glúcidos permite considerarlas como órganos de reserva, de supervivencia y de resistencia. Gerdemann (1964) demostró la capacidad que tienen las esporas para conservar su potencial de infección después de un período de tres años, en un suelo no cultivado.

1.5.5 Función y Especificidad del Endofito.

La función del hongo es de aumentar la superficie de absorción de la raíz, explorando un volumen de suelo supe-

rior al que pueden hacer las plantas por sí solas y de esta manera, aumentar la captación de nutrientes con el objeto - de obtener un desarrollo vegetal óptimo.

Los hongos formadores de micorriza V-A tienen un espectro de hospederos muy amplio, lo que obliga a catalogarlos como inespecíficos, no obstante, se registran diferencias en el grado de susceptibilidad de las plantas y en la adaptabilidad del hongo a determinadas condiciones ambientales. Por ejemplo, hay hongos más adaptados a especies forestales y otros a cultivos agrícolas, así mismo, se sabe que el pH y contenido de nutrientes en el sustrato son factores importantes en el desarrollo y efectividad de las esporas. - Esto indica que hay marcadas diferencias en la facilidad e intensidad que tienen los endofitos de infectar, desarrollarse y operar en distintos hospederos bajo diversas condiciones ecológicas.

Las consideraciones anteriores permiten concluir que existe cierta especificidad en el establecimiento de la micorriza V-A, en términos de efectividad de la simbiosis, - aunque, esta parece depender más de la interacción con el suelo y condiciones ecológicas de cultivo que con un hospedero particular.

Baylis (1971) y Crush (1973) observaron que una especie de hongo micorrhízico puede tener efectos patógenos sobre una planta determinada, mientras que a otra, ya sea de igual o diferente especie, no le cause daño alguno; por lo tanto, la interacción del endofito con la planta esta en función de algunos factores del medio ambiente, naturaleza del suelo u otro soporte, interacción con otros microorganismos, tales como bacterias y algunas propiedades metabólicas de la raíz.

El potencial infectivo de un suelo esta determinado por: el número y calidad de esporas presentes, el contenido de raíces infectivas, y sobre todo, la cantidad de oxígeno existente.

CAPITULO SEGUNDO

INTERACCION DE LOS HONGOS FORMADORES DE LA MICORRIZA V-A CON LA PLANTA RECEPTORA

El principal elemento implicado en esta simbiosis es el fósforo; la micorriza V-A estimula la nutrición, desarrollo y crecimiento de las plantas, especialmente en suelos de baja fertilidad. Los estudios llevados a cabo han puesto de manifiesto que dichos efectos se deben a un aumento sustancial de la absorción de nutrientes y de agua por la planta micorrizada, porque la longitud y distribución de las hifas permiten aumentar el volumen de suelo explorado, y por consiguiente, aumentan el campo de absorción de fósforo, principalmente.

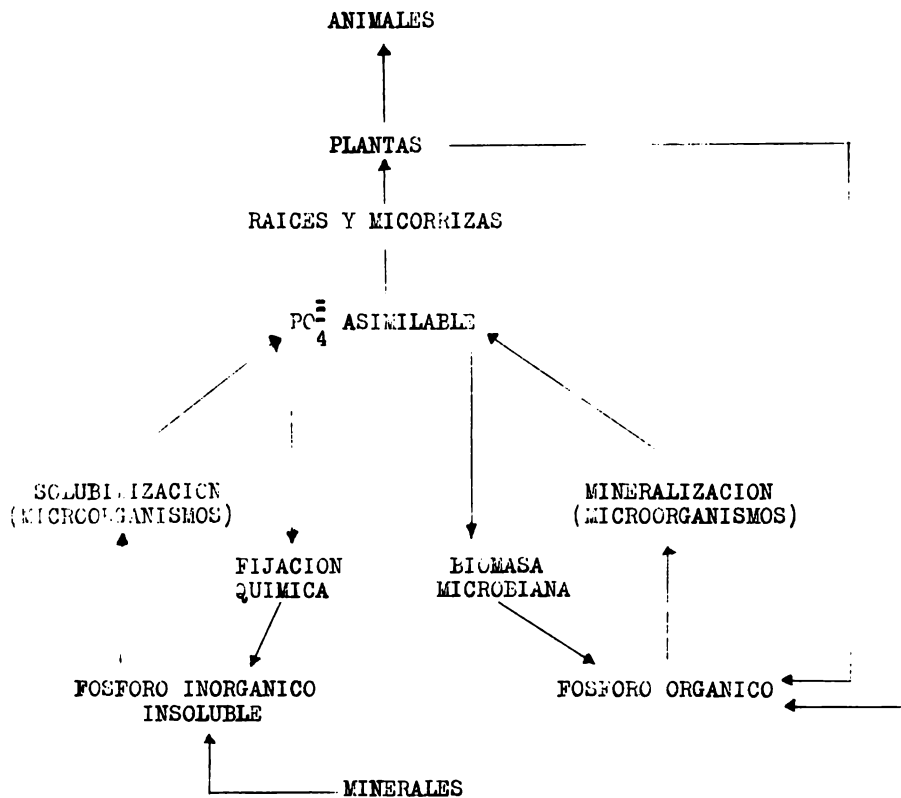
2.1 Importancia del Fósforo en el Establecimiento de la Simbiosis.

Es sabido que la mayor parte de los suelos naturales tienen un bajo contenido de fosfato asimilable e incluso la mayor parte de los suelos de cultivo necesitan un aporte considerable de fertilizante fosfatado para mantener su fertilidad, ya que, del 95 al 99 por ciento del fósforo del suelo esta integrado por compuestos orgánicos e inorgánicos insolubles; por otro lado, se conoce que el ritmo de absor-

ción de los iones fosfato por la planta es superior al de desplazamiento de dichos iones desde el suelo no rizoferico hacia la raíz. Ello condiciona que se forme una zona de agotamiento del elemento en la rizofera, esta zona se ha puesto de manifiesto por autorradiografías, demostrándose que el desplazamiento del ión fosfato hacia la raíz tiene lugar por difusión y en su camino hacia la planta se fija fácilmente a arcillas y coloides del suelo por medio de combinaciones insolubles con calcio, hierro o aluminio.

La cantidad de fósforo en donde se desarrollan las plantas es muy importante, sobre todo, en el establecimiento de la simbiosis, puesto que, concentraciones altas del elemento la inhiben y cantidades bajas la favorecen. La concentración limitante para el crecimiento de las plantas "sin micelio" es de 50 ppm, abajo de esta cantidad no pueden absorberlo, por lo que necesitan de las hifas de los hongos micorrícicos para captarlo a un umbral hasta de 10 ppm, en el que la hifa puede obtenerlo en forma soluble o ligeramente soluble, por otra parte, no se debe olvidar que la capacidad que tienen las plantas de absorber el fósforo varía de una a otra planta, del endofito con el que está asociado y de las condiciones ecológicas en que se desarrollan. Baylis (1959), Gerdemann (1964) y Holevas (1966) sugirieron que el aumento de crecimiento de las plantas micorrizadas estaba en función de una absorción alta de fósforo.

Ciclo del fósforo



El fósforo es un nutriente fundamental para el crecimiento vegetal, por formar parte de moléculas de gran importancia en la economía celular, como son los ácidos nucleicos, así como de los compuestos encargados de la captación, almacenamiento y transferencia de la energía, por ejemplo el ATP. Las hifas externas de los hongos micorrízicos canalizan el fósforo desde el suelo hasta la planta. (Azcón, 1980)

Los mecanismos propuestos para explicar la mayor capacidad de absorción de fósforo por las plantas micorrizadas están basados en lo siguiente:

a. La micorriza induce cambios morfológicos en la planta.

b. La micorriza induce cambios fisiológicos, lo que provoca un incremento en la capacidad de absorción del fósforo por parte de la planta.

c. La micorriza proporciona una superficie adicional de absorción (hifas de hongo) más eficaz.

d. Las hifas o las raíces micorrizadas tienen capacidad para solubilizar fuentes de fósforo no disponible para raíces no infectadas.

e. La raíz micorrizada tiene mayor longevidad que la que no lo esta.

La posibilidad (d) ha sido objeto de investigación exhaustiva y controversia. De un lado, hechos experimentales indican que las plantas micorrizadas crecen mejor que las que no lo están en suelos que tienen formas de fósforo difícilmente solubles, tales como: fitato y fosfatos de

calcio, aluminio o hierro, esto hizo pensar en una posible solubilización de fosfatos por las hifas de los hongos micorrícicos, sin embargo, Hayman y Mosse (1972 a, b) demostraron que la endomicorriza V-A no aumenta la absorción del fósforo por la solubilización de compuestos fosfatados insolubles, porque el hongo no es el responsable de la solubilización, sino otros microorganismos, como por ejemplo las fosfobacterias.

El papel más importante que tiene la micorriza es el de absorber una mayor cantidad de fósforo para la planta. La eficacia de las raíces en la absorción de fosfatos se ha valorado midiendo la cantidad de P^{32} captado por unidad de longitud de la raíz (Sanders y Tinker, 1971), determinándose que éste parámetro es cuatro veces mayor en las raíces micorrizadas que en las no micorrizadas, lo que indica que las primeras absorben los fosfatos mucho más eficazmente que las segundas.

Las explicaciones basadas en cambios morfológicos de la raíz (hipótesis a) no justifican ese considerable incremento en la eficacia, especialmente cuando se conoce que los cambios morfológicos que originan las micorrizas V-A son insignificantes. Por otra, parte, las razones basadas en suponer una mayor longevidad de las raíces micorrizadas no son aceptables, (hipótesis e), si se tiene en cuenta que

las raíces no micorrizadas son capaces de absorber fósforo durante largos períodos de tiempo.

La hipótesis (c), correspondiente a que la micorriza proporciona una superficie de absorción adicional, es considerable hoy día la más acortada y se acepta que el papel fundamental de la micorriza estriba en que las hifas externas amplían el campo de absorción de la planta más lejos de la zona de agotamiento que rodea a la raíz. Esto fué confirmado por los trabajos de Gray y Gerdemann (1967), quienes demostraron que la captación de P^{32} por raíces micorrizadas era superior al de las no micorrizadas, colocando el isótopo a una distancia no accesible a las "raíces sin micelio", observaron que las hifas de los hongos micorrícicos se extendían hasta siete centímetros, a partir de la superficie de la raíz, aumentando, por consiguiente, la zona de captación.

Por otra parte es importante mencionar que Baylis (1972 b) afirma que un centímetro de raíz micorrizada puede tener hasta 80 centímetros de hifas externas. Resultados similares reportan Hatting, Gray y Gerdemann (1973) quienes utilizaron P^{32} , cebolla como hospedero y Glomus mosseae como endofito.

Con el uso del P^{32} se puso de manifiesto que el incremento de la captación de fosfato por las hifas depende más de su posición, longitud y número que de alguna propiedad especial de su superficie que agilice la captación. Estas apreciaciones descartan la hipótesis (b).

Respecto al fósforo soluble aplicado foliarmente, se ha demostrado que tiene influencia negativa en la infección es decir, la concentración del ión dentro de la planta tiene más influencia en la reducción de la infección, que el existente en el suelo.

Sanders (1973) obtuvo resultados muy importantes, al respecto, en cebollas micorrizadas a las que les inyectó fósforo en las hojas, y los resultados fueron los siguientes:

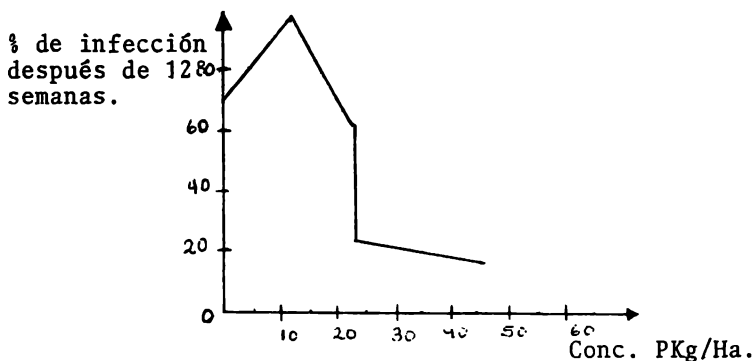
a. Reducción del nivel de extensión y de la colonización por los hongos formadores de la micorriza V-A.

b. Disminución en el peso seco del micelio externo asociado con cada centímetro de raíz infectada, lo que determina un descenso en la cantidad de micelio de la rizosfera.

c. Reducción del abastecimiento de fósforo a la plan-

ta en vías de micorrización, con ésto, el endofito se comporta como parásito, ya que, al haber una cantidad adecuada de fósforo dentro de la planta, no es necesario obtener más de la rizosfera y el hongo queda en la raíz sin efectuar ningún trabajo, a menos que la cantidad de fósforo baje.

Sanders emitió la hipótesis de que el control de la extensión de la colonización de la raíz dependía de las reservas de fósforo en la planta, Khan (1973) observó que las plantas micorrizadas con mucho fósforo se desarrollan bien, pero que su crecimiento se ve estimulado cuando el abastecimiento de este elemento no es grande, por lo tanto, esta simbiosis es de gran utilidad en aquellos suelos que tienen poco fósforo disponible.



Efecto del fósforo en el desarrollo de la infección -
(Mosse, 1973).

De todos estos trabajos en los que se ha determinado la penetración de las hifas, el tiempo de penetración, el efecto de los endofitos en diferentes plantas, influencia del crecimiento de las hifas externas, tipo de suelo, cantidad de nutrientes en él, tipo de hospedero, ya que, cada uno de estos presentan peculiaridades, tanto en su sensibilidad para ser infectados, como en sus necesidades de fósforo y el efecto de la inoculación, se ha concluido que este tipo de hongos favorece la absorción, no solo de fósforo, sino de otros nutrientes, lo que ha llevado a efectuar estudios relacionados con su posible aplicación como inoculantes biológicos, entre los que destacan los trabajos de Menge (1977), quien determino el efecto de los fertilizantes fosfatados y la micorriza V-A en el desarrollo de un híbrido del limón y del naranjo, reportando lo siguiente:

a. Las plantas de cítricos que son micorrizadas en los viveros y que no reciben fertilizante, son de mejor calidad que las no micorrizadas, particularmente, cuando son trasplantadas a suelos fumigados y de baja fertilidad.

b. Con el uso de los hongos formadores de micorriza V-A se reduce la aplicación de cinc y cobre en los viveros.

c. La presencia de endomicorriza es útil en la agricultura por reducir el consumo de fertilizantes y generar -

una economía bastante considerable.

Para finalizar este punto, se tiene que la morfología de la raíz, mecanismo fisiológico, formas de inoculación, - absorción de diferentes elementos minerales, especificidad del endófito, tipo de hospedero y condiciones ecológicas - son factores no despreciables en un experimento.

2.2. Mecanismos de Intercambio de Nutrientes entre - los Simbiontes.

Se ha calculado que el flujo de fosfato en el interior de las hifas es del orden de 10^{-8} a 10^{-9} moles/cm²/seg² proponiéndose varios mecanismos para explicar este movimiento, algunos indican la existencia de corrientes protoplásmicas bidireccionales en el interior de la hifa, aceptándose que éstas desempeñan un papel muy importante en la traslocación del fosfato.

Este modelo de traslocación fué comprobado mediante trabajos histológicos, en los que se observaron gránulos de polifosfato en las vacuolas de las hifas y de los arbuscúlos particularmente cuando la infección se encuentra en sus estadios jóvenes y vigorosos. En base a estas observaciones se propuso que el ión fosfato es traslocado como gránulo de polifosfato, que se depositan en las vacuolas, incrementan-

do o disminuyendo su tamaño. La funcionalidad de este mecanismo está asegurado con la existencia de poliosfatasas ácidas, y sobre todo alcalinas, localizadas en los arbusculos-maduros e hifas intercelulares descritas por varios autores. (Gray 1969, Mosse 1973 b).

Respecto al mecanismo de transferencia de fosfatos, - del hongo a la planta, desde hace tiempo se acepta que tiene lugar en los arbusculos, los cuales al degenerar y ser - lisados, liberan el fósforo que contienen. Las observaciones a nivel estructural confirman este hecho, determinándose que estas estructuras tienen una vida media de siete a - once días, lo que varía, dependiendo de la planta y del endófito de que se trate.

Se ha hecho una serie de hipótesis para explicar la - formación de los arbusculos y de sus actividades, a continuación se presenta un resumen de dichas hipótesis:

El proceso de formación de los arbusculos y de sus actividades es considerado en tres etapas:

1. La planta emite una señal indicando que falta un - abastecimiento de fósforo.

2. El hongo recibe la señal y reacciona dentro de las

células del hospedero formando los arbúsculos, y

3. La planta ejerce acción sobre el hongo, de tal manera que el fósforo transportado pase del hongo a la planta. De esta forma el fósforo contenido en los arbúsculos no puede regresar sin que sea absorbido por la planta.

A pesar de esto, no hay que descartar la posibilidad de que ocurra una transferencia de fosfato y otros materiales a través de los plasmalemas fúngicos a la planta. La transferencia puede tener lugar en otras partes del micelio interno y no sólo en los arbúsculos (intracelulares), por lo tanto, se puede concluir que el sitio fundamental de transferencia de fosfato es el arbúsculo, pero no exclusivamente.

Por otra parte, se ha observado que cuando hay deficiencia de fósforo en el medio ambiente la concentración de fosfatasas de la raíz aumentan a nivel de la superficie celular. Estas enzimas parecen tener un papel muy importante en la movilización de los fosfatos insolubles y alternativamente están implicadas en la regulación del desarrollo del micelio en el interior de las células y la formación subsecuente de los arbúsculos. Vozzo y otros investigadores (1964) sugieren que cuando se forman estas estructuras, las

fosfatasas posiblemente actúan de manera análoga a las lectinas vegetales, éstas son glicoproteínas ricas en hidroxiprolina y le sirven a la célula de defensa por inhibir el desarrollo de bacterias y de hongos; esta función es realizada por las glicoproteínas en condiciones normales, pero cuando las fosfatasas son producidas por la raíz por deficiencia de fosfato se rompe este mecanismo y favorecen la penetración del hongo en la célula y la colonización de la raíz.

Respecto a los carbohidratos procedentes del aparato fotosintético de la planta, se ha demostrado que estas sustancias son transferidas al hongo, llegando hasta su micelio externo, aunque no se conoce el mecanismo de transferencia, se acepta que éste tiene también lugar en los arbuscúlos. Con ayuda del C^{14} se demostró que parte de los carbohidratos encontrados en el endofito son producto de la fotosíntesis.

2.3. Interacción con otros Elementos Minerales.

Cabe considerar que durante años se han llevado a cabo muchos experimentos en los que se ha hecho hincapié en el fósforo y de la importancia que tiene en el establecimiento de la infección, descuidándose, en cierto modo, a los demás elementos que también son necesarios para el buen

desarrollo de los vegetales. No fué sino hasta hace poco - tiempo que se observó el efecto del nitrógeno y del potasio, tanto sólo como combinados, en el desarrollo de la simbiósis.

De esos trabajos, se ha obtenido la siguiente información:

La adición de nitrógeno ha dado como respuesta resultados contradictorios, por un lado Schenck (1973) reportó - aumento en la infección, en tanto que Mosse (1971) observó - una disminución en el por ciento de infección en plantas en vías de micorrización.

Por otro lado, la producción de esporas y el por ciento de infección son estimulados al aumentar la cantidad de nitrógeno y potasio, éste último activa numerosas enzimas, - interviene, en cierto, modo, en la síntesis de proteínas, - además está directamente relacionado con la fotosíntesis, - por estimular la traslocación de los productos de esta reacción hacia el hongo. Trolldenier (1972) analizó los exudados de plantas que contenían sustancias marcadas con C^{14} , - unas habían recibido un abastecimiento adecuado de potasio - y otras no, él constató que las primeras transportaban y - acumulaban una cantidad más grande de C^{14} en la raíz, que - aquellas que crecían en suelos deficientes del elemento.

Otros investigadores, como Hinson (1971), mencionan - que las plantas crecidas en suelos ricos en potasio transportan al interior más azúcares y no los exudan a la raíz y cuando hay deficiencia del elemento, la exudación aumenta.- Liebhardt (1968) mencionó que la transformación de azúcares simples (sacarosa) en azúcares complejos (almidón) es inhibida por la deficiencia de potasio. Trolldenier (1972) supuso que la exudación de compuestos de bajo peso molecular es una respuesta a la deficiencia de potasio y se debe al - bloqueo en la síntesis de compuestos de peso molecular elevado. El efecto de la interacción planta-suelo-microorganismo fué reportada por Tolle (1958) el que observó que - cuando el frijol se desarrolla en suelos deficientes de potasio presentan una mayor exudación de compuestos en la rizosfera, lo que estimula el desarrollo de los microorganismos.

Respecto al cinc y al cobre se ha observado que se - puede reducir su aplicación tanto en los viveros como en el campo, cuando estan presentes los hongos micorrhizicos en el cultivo.

Sin embargo, hasta la fecha, existen contradicciones- para éstos y otros nutrientes, por lo que no se pueden generalizar estas apreciaciones. Ante todo, se afirma que lo - que ocurre, es que al constituir el fósforo un factor limi-

tante del crecimiento, las plantas micorrizadas están más - equilibradas fisiológicamente, condicionando una mejor absorción de los otros nutrientes.

2.4. Efectos sobre la Absorción del Agua.

Se ha sugerido que la micorria V-A estimula la captación de agua, esto reviste gran importancia en la agricultura, sobre todo en los suelos áridos, no obstante, este efecto ha sido cuestionado, necesitándose de más estudios para elaborar las conclusiones definitivas.

Entre los experimentos que hay al respecto estan los de Safir y Boyer (1972) y Gerdemann (1971), quienes mencionan que el flujo de agua en raíces de soya es mayor en las que están micorrizadas que en las que no lo estan, esto se debe a que las primeras poseen hifas de tipo cenocítico, con lo que el flujo del líquido aumenta y las segundas presentan deficiencia porque las raíces por sí solas no pueden buscar el líquido más allá de la zona donde crecen.

2.5. Efectos sobre algunos Procesos Bioquímicos.

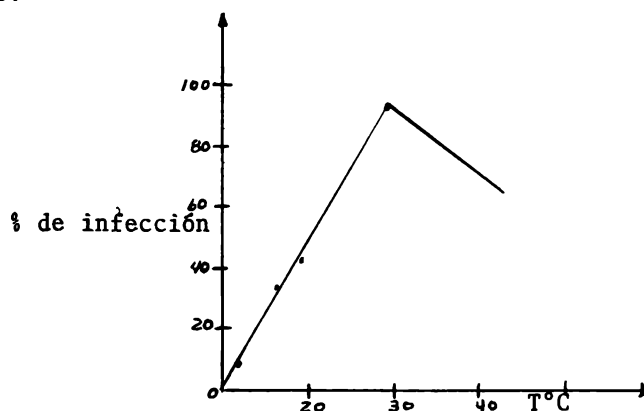
Vozzo y Hacskeylo (1974) observaron en unas especies de Populus un nivel de respiración más grande en plantas micorrizadas que en no micorrizadas, para las primeras fué-

de 3.0 μ l de O_2 /mg/hr y para las segundas de 1.8 μ l de O_2 /mg/hr, las plantas micorrizadas tenían su metabolismo incrementado y una síntesis de proteínas más activa que las que no lo estaban y se registro también la presencia de arginina, aspargina, histidina y taninos en plantas micorrizadas.

2.6. Efectos de otros Factores Ecológicos.

2.6.1 Temperatura.

Diversos factores ecológicos afectan el desarrollo y actividad de la micorriza V-A. La temperatura es uno de esos factores más importantes en el establecimiento de la infección. Furlan (1973) y Hayman (1974) reportan que el aumento de temperatura, hasta cierto, limite, estimula la infección y la producción de esporas, en cambio, con temperaturas bajas, la infección y el nivel de esporas son nulas o bajas.



Efecto de la temperatura en la micorriza V-A (Furlan, 1973).

Experimentos hechos en cámaras de crecimiento de poliéstireno pusieron de manifiesto que a bajas temperaturas la fotosíntesis es lenta y por ende, la producción de esporas es menor.

Schenck y Schroder (1974) señalan que en raíces de soya micorrizadas el máximo desarrollo de arbusculos se observa a temperaturas de 30°C, el de micelio entre 28 y 34°C y el de esporas y vesículas a 35°C, y se espera que estos resultados varíen con otros hospederos y endofitos.

Así por ejemplo en Gramíneas micorrizadas el crecimiento máximo se registró a 30°C y en las no micorrizadas a 28°C. (Hayman, 1970).

Moaward (1979) señala que la temperatura del suelo afecta la fisiología de la micorriza y reporta que la mejor absorción para plantas no micorrizadas esta a temperaturas entre 30°C y 35°C y para plantas micorrizadas entre 25 y 30°C.

2.6.2 La Luz.

La luz, al igual que la temperatura, juega un papel decisivo en el establecimiento de la simbiosis. Las plantas colocadas en ligera penumbra no sufren alteraciones de-

relieve en el desarrollo de la infección, pero cuando se les somete a grandes sombras, la infección se reduce drásticamente y la producción de esporas baja en un 80%.

El primero en observar el efecto que tiene la cantidad de luz recibida por la planta en el desarrollo de la micorriza V-A fue Peyronel (1940), él señala que los cereales cultivados al sol presentan un mejor desarrollo que aquellos que son cultivados bajo poca cantidad de luz, estos resultados fueron confirmados por Nicolson y Gerdemann (1968) quienes señalaron que la infección aumenta paralelamente al incremento del fotoperíodo, además notaron que una alta intensidad de luz provoca la formación de arbuscúlos grandes.

El contraste, Baylis (1972 b) señala que la infección micorrizica en determinadas plantas no sufrió modificaciones al variar la cantidad de luz en el invernadero, sin embargo, no menciona cual es el punto óptimo.

La endomicorriza V-A aumenta la capacidad de absorción del fósforo y de agua, al haber una intensidad de luz adecuada, la maduración de las esporas se efectúa en menor tiempo, por lo tanto, a menor intensidad de luz la cantidad de esporas disminuye, por tomarles más tiempo en madurar, ya que les falta una traslocación adecuada de los azúcares producidos por la planta.

2.6.3 Las Características del Suelo.

La naturaleza del suelo es un factor determinante en el desarrollo de la infección e influye en la eficacia del simbionte frente al hospedero. En relación a esto Mason (1928) y Nicolson (1960) observaron plantas micorrizadas crecidas en zonas salinas. Khan, además de observar infección aisló e identificó las esporas existentes en la rizosfera de suelos salinos.

Daft y Nicolson (1974) demostraron que algunas especies de plantas crecidas sobre residuos viejos de carbón presentan también endomicorriza. Ciertas observaciones hechas al respecto, sugirieron que las diferencias en el grado de infección, asociados con la fertilidad que posee el suelo, están relacionados con el ritmo de crecimiento de la raíz.

Respecto a la humedad del suelo se han obtenido diversos resultados, por un lado, Gerdemann (1974) y colaboradores reportan que las plantas hidrófilas no micorrizan a menos que se les reduzca la cantidad de agua y sean trasplantadas a medios secos, esto fué confirmado por Maeda (1974) y Rikhy (1974), los que señalaron la presencia de endomicorriza en plantas acuáticas como Elodea canadensis la que proporciona bastante oxígeno, factor no despreciable en la

relación simbiótica.

En cuanto a las hormonas vegetales, se sabe que estas sustancias controlan la formación y desarrollo de las raíces, por lo tanto, es lógico pensar que estas hormonas intervienen de alguna manera en el establecimiento de la simbiosis. La posibilidad de llevar a cabo experimentos al respecto se ha visto obstaculizada, en determinada forma, porque todavía no es posible obtener cultivos artificiales de estos hongos, ahora bien, el empleo de técnicas muy especializadas, permitió comprobar la producción de auxinas, giberilinas y citoquininas por estos hongos.

Existen ciertas especies de plantas, que debido a su naturaleza o condiciones del suelo, son dependientes de la micorriza V-A. La dependencia de la micorriza se define como: "El grado en que una planta depende de la condición de estar micorrizada para producir su máximo crecimiento y rendimiento a un nivel de fertilidad del suelo".

En un extremo de esta graduación están las plantas no micorrizadas, absolutamente no-dependientes de la micorriza, y en otro lado se sitúan ciertas variedades de cítricos que son "altamente dependientes de la micorriza", ya que ni siquiera una fertilidad elevada les proporciona los beneficios de la micorrización. La mayor parte de las plantas se en-

cuentran en éstos extremos y para cada especie y situación se supone la existencia de un nivel de fertilidad adecuado (fundamentalmente de fosfato asimilable) en el que crecen igual las plantas micorrizadas que las que no lo estan.

Generalmente, las plantas con alta demanda de fósforo (como las leguminosas) o con sistema radical pobre (por ejemplo: la papa) responden mejor a la micorriza. Se ha indicado que la capacidad de las plantas para crecer en suelos que tengan muy poco fósforo disponible, pueden depender del desarrollo de los pelos radicales, de esta forma, las plantas con pelos radicales cortos o en número limitado, dependen más de la formación de la micorriza que las dotadas de pelos bien desarrollados, sin embargo, se hallan implicados otros factores, además de la cantidad y tamaño de los pelos, pues plantas como Paspalum notatum y Centrosema pubescens, con pelos radicales largos no toman eficazmente el fósforo del suelo, a no ser que esten micorrizadas.

Para finalizar, se dirá que la cantidad de humus, calidad del suelo, tipo de fertilización, modo de cultivo, grado de humedad y el pH influyen de manera notable en el establecimiento y desarrollo de la micorriza V-A. Se ha indicado que el pH no debe descuidarse, particularmente cuando el rango de tolerancia del hongo es reducido a un pH muy específico, en unos casos puede ser de 5 a 8 y en otros de-

5.0 a 5.5.

2.6.4 Interacción de la Endomicorriza V-A con otros -
Microorganismos.

Varios trabajos experimentales han apuntado la existencia de interacciones entre hongos micorrícicos y otros microorganismos de la rizosfera. Hay que tener en cuenta que los exudados radicales de la planta micorrizada difieren de la que no lo esta, no sólo porque cambia el estado nutricional de la planta, sino también, debido a la gran cantidad de tejido del hongo presente en la raíz micorrizada que afecta más directamente a los exudados.

Zack en 1944 sugirió cuatro mecanismos por los que las ectomicorrizas protegen las raíces.

1. El hongo ectomicorrícico utiliza los glucidos producidos en exceso.

2. Las ectomicorrizas forman una barrera física.

3. La ectomicorrizas secretan algunos antibióticos.

4. Las ectomicorrizas favorecen el crecimiento de los organismos protectores de la rizosfera.

Todas estas características, menos la segunda, se observan en la micorriza V-A.

Se ha señalado un efecto benéfico de Pseudomonas sp.- en el establecimiento de la infección, así como la cooperación entre los hongos micorrícicos y las bacterias solubilizadoras de fosfatos, en cuanto a sus efectos sobre el crecimiento y nutrición de las plantas y en el establecimiento de la infección. De igual forma se han sugerido interacciones entre Azotobacter y hongos V-A.

Toda forma de simbiosis susceptible de mejorar el crecimiento de un cultivo y de su repercusión en la agricultura, necesita de una atención especial. Una de las simbiosis que esta siendo objeto de intensa investigación es la integrada por hongos V-A, Rhizobium sp. y leguminosas, Azcón y Barea (1972) reportan un mayor desarrollo de estas plantas cuando se inoculan simultáneamente a los dos tipos de microorganismos, que cuando los inoculan por separado. Con este mismo tipo de experimentos Schenck (1973) reportó un incremento del 53% en comparación con plantas testigo y lo atribuye a que se efectúa una mejor absorción de fósforo por la planta y, por consiguiente, se favorece la captación de nitrógeno por las leguminosas, Crush (1974) mencionó que la endomicorriza V-A produce excudados que modifican la constitución de la rizosfera, estimulando la simbiosis con

Rhizobium. Khan (1972 a) indico que estas dos simbiósis son importantes en los suelos de baja fertilidad.

Con respecto a la relación entre hongos V-A y microorganismos patógenos se ha observado que en vista de la diferencia entre los exudados de plantas micorrizadas y no micorrizadas, la influencia sobre los microorganismos de la rizosfera es diferente y que las raíces micorrizadas son más resistentes a la infección por patógenos que las que no lo están. Daft y Okusanya (1973) señalaron que las plantas de tabaco micorrizadas resultaron menos dañadas por Thielaviopsis basicola que las que no tenían micorriza. Ross (1972) reportó que la presencia de Phytophthora en cultivos de soya benefició la infección micorrícica, no obstante, que este hongo es causante de muchos daños a los cultivos, Deal y Boothroyd (1972) observaron un mayor porcentaje de infección micorrícica en plantas de vid infectadas con patógenos, que en aquellas que sólo tenían micorriza V-A, lo que indica diferentes grados de interacción entre patógenos y hongos formadores de micorriza V-A, así como de diferentes efectos. Por ejemplo, de 38 experimentos realizados con hongos V-A y simbiontes patógenos; 7 casos presentaron aumento de daños, en 22 hubo disminución y en 9 no se presentó cambio alguno.

Desafortunadamente hasta la fecha no se han dado explicaciones satisfactorias de la relación entre éstos hongos y los microorganismos patógenos y de sus efectos.

2.6.5 Impacto de los Fungicidas.

Finalmente cabe señalar, aunque solo sea brevemente, la influencia negativa que sobre la micorriza ejercen ciertos compuestos, como los pesticidas, normalmente usados en la agricultura.

Los fungicidas han sido usados para eliminar los microorganismos patógenos del suelo y de esta forma tener mejores cosechas, no obstante, algunos pueden causar daños al simbiote y, después a la planta, por lo que el fungicida a emplear y su modo de aplicación debe ser analizado con de talle.

Nesheim y Linn (1969) examinaron la acción de varios fungicidas a diferentes concentraciones en plantas de maíz micorrizadas, todos dieron efectos negativos en el desarrollo de la infección, pero entre los empleados (Meylone, Vapam, etc.) el Captam fué el menos tóxico.

Schenck y Tucker (1974) señalaron que el tratamiento mecánico del suelo antes de la siembra, modifican el efecto de la fumigación y de la incidencia de la micorriza V-A en las plantas de cítricos.

CAPITULO TERCERO

MATERIAL Y METODOS

Recolección e Identificación de Cepas.

Para efectuar el aislamiento de las esporas de hongos micorrícicos y de raíces infectadas por dichos hongos, se hizo un muestreo de una parcela cultivada con maíz, localizada en el estado de Tlaxcala, seleccionándose aquellas plantas que estuviesen más altas y frondosas.

Posteriormente se separó la raíz del tallo, almacenándose en bolsas de plástico, para tener una mejor conservación de las raíces. Una vez recolectadas se procedió a hacerles un examen microscópico, empleando la técnica de tinción y clarificación de raíces descritas por Phillips y Hayman (1970), esta permite detectar si hay o no infección, poniendo de manifiesto los elementos morfológicos típicos de la micorriza V-A (hifas, arbuscúlos y/o vesículas), Anexo 1.

Los lotes de raíces que presentaron infección se mantuvieron en bolsas de plástico y se conservaron en refrigeración, parte del lote se usó tal cual y la otra parte se -

desinfectó con hipoclorito de sodio al 5% durante 5 minutos, después se enjuago con agua, esto se realizó una hora antes de colocarlas en las macetas como inóculo.

Por otra parte, en la misma parcela se tomo uan mues-
tra de la rizosfera de los cultivos de maíz para el aisla--
miento de las esporas de acuerdo a la técnica descrita por-
Gerdemann y Nicolson (1963), Anexo 2.

Plantas de Ensayo.

Se emplearon plantas de frijol soya variedad júpiter-
y frijol tipo canario. El porciento de germinación para so-
ya fue de 80% y para el frijol de 95%. Este valor fué ob-
tenido de la siguiente manera:

$$\% \text{ de germinación} = \frac{\text{Número de semillas germinadas}}{\text{Número total de semillas}} \times 100$$

Las semillas fueron seleccionadas manualmente, de tal
forma que todas tuvieran un tamaño uniforme. Las semillas-
de frijol fueron lavadas con bastante agua para eliminar el
pesticida.

Posteriormente se desinfectaron superficialmente con-
hipoclorito de sodio al 5%, durante 7 minutos, para después

ser enjuagadas con abundante agua estéril, finalmente se colocaron cuatro semillas por maceta, después de germinar en el invernadero y alcanzar una altura de 2 a 3 cm. se dejados plántulas en cada maceta.

Soporte.

El tipo de soporte empleado fué vermiculita exfoliada de pH 11.9 el que se ajusto a 7.0 con agua acidulada (0.1 ml. de ácido sulfúrico concentrado en un litro de agua). El tiempo de interacción fué de 5 a 10 minutos, enseguida se enjuago con bastante agua. El valor de pH fué determinado por medio de un potenciómetro Digi-Sense modelo 5985-40- (Cole-Parmer Instrument Co.; Illinois, EUA).

Solución Nutritiva.

Se uso la solución nutritiva de Long Ashton modificada. Las plantas fueron regadas cada semana con dicha solución. La preparación de la solución se indica en el Anexo-4. (Hewitt, 1966).

Macetas.

Se utilizaron macetas de plástico de 2 Kg. de capacidad en las que se colocó la vermiculita, que fué humedecida

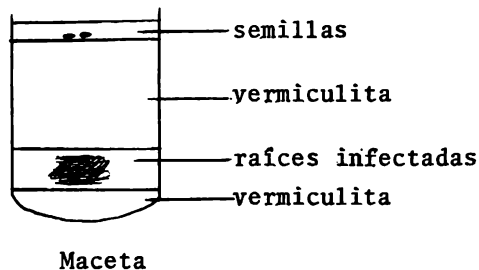
con solución nutritiva antes de colocar las semillas.

Testigos.

En el experimento se incluyeron testigos sin inocular.

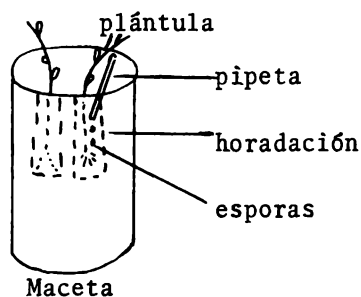
Inóculo.

El inóculo empleado estuvo constituido por esporas de hongos formadores de micorriza V-A y raíces infectadas por dichos hongos. La inoculación con raíces se llevó a cabo - en la siguiente forma: Primero se colocó una capa de vermiculita húmeda, enseguida una "colchón" de raíces infectadas, aproximadamente 25 gramos, después se puso otra capa de vermiculita y encima se colocaron las semillas en cuestión, - según se indica en el esquema:



Con respecto a las esporas, el procedimiento es diferente, una vez que las plántulas han alcanzado una longitud

de 8 a 10 cm. se procedió a inocularlas, haciendo una horadación pequeña alrededor del hospedero y se depositaron las esporas con pipeta, de acuerdo con el siguiente dibujo:



Diseño del Experimento.

Se probaron 4 tratamientos con 5 repeticiones y cada unidad experimental con dos plantas, según se indica a continuación:

Tratamiento	Hospederos	
	Frijol	Soya
Testigo	5 macetas	5 macetas
Esporas	5 macetas	5 macetas
R+	5 macetas	5 macetas
R-	5 macetas	5 macetas

R+ = raíces desinfectadas.

R- = raíces no desinfectadas.

Cosecha.

Las plantas fueron cosechadas a los 110 días de desarrollo, el que se efectuó bajo condiciones controladas de invernadero.

Determinaciones.

Las determinaciones que se efectuaron fueron: Porcentaje de infección, altura de la planta, peso húmedo y peso seco de la parte aérea, peso húmedo de la raíz, contenido de nitrógeno y fósforo total en la parte aérea.

Determinación de Infección Micorrícica.

Se siguió la técnica descrita en el Anexo 1.

Determinación de Nitrógeno Total.

La parte aérea de las plantas fué secada y molida, posteriormente se hizo la determinación de acuerdo a la técnica descrita en el Anexo 5.

Determinación de Fósforo Total.

Este elemento fué determinado por el método del azul de molibdeno, la técnica se describe en el Anexo 6.

ANEXO 1

TINCION DE RAICES PARA INVESTIGAR LA PRESENCIA
DE MICORRIZA V-A

MODIFICADAS POR PHILLIPS Y HAYMAN (1970)

1. Las raíces pueden ser frescas o estar fijadas en FAA.+ Las raíces se lavan delicadamente con agua de la llave para quitar las partículas de suelo adheridas.

2. Calentar las raíces en una solución de KOH al 10%, P/V en autoclave a 15 libras de presión durante tres minutos, aproximadamente. El tiempo de calentamiento depende de la intensidad de la pigmentación que presenten.

3. Eliminar la solución de KOH y enjuagarlas con agua de la llave.

4. Colocarlas en agua alcalina^a a 20°C para eliminar los residuos de pigmentos que puedan perjudicar la observación.

5. Lavar cuidadosamente con agua de la llave para remover el agua alcalina.

6. Poner las raíces en una solución de HCl al 1% durante 3 minutos.

7. Teñirlas con fusina ácida al 0.01%, disuelta en la siguiente solución: ácido láctico al 85% 875 ml., glicerina 63 ml. y agua 62 ml., se ponen en autoclave 3 minutos a 15 libras.

8. Se deja enfriar los recipientes que contienen las raíces, después se escurre el exceso de colorante en el fregadero, enseguida se colocan las raíces en una caja Petri - que contenga la solución anterior y se dejan de 10 a 20 minutos.

9. Cortar las raíces en fragmentos de 1.5 cm. de longitud y colocar de 8 a 10 segmentos en forma paralela en un portaobjeto, poner un cubreobjeto y apretar uniforme y gradualmente.

10. La observación de las raíces se hace al microscopio, empleando los diferentes objetivos.

11. El por ciento de infección se obtiene sumando el número de campos en donde se haya observado alguna estructura característica de simbiosis.

°Solución alcalina

H_2O_2 al 10% 30 ml. (10 ml. de H_2O_2 al 30% + 20 ml. -
de H_2O).

H_2O 600 ml.

NH_4OH 3 ml.

ANEXO 2

ESPORAS DE HONGOS FORMADORES DE MICORRIZA V-A EXTRAIDAS DEL
SUELO POR LA TECNICA DE TAMIZADO HUMEDO Y DECANTACION.

(Gerdemann y Nicolson, 1963)

1. Del suelo recolectado se hace un homogenizado (60-gramos de suelo en 500 ml. de agua de la llave, aproximadamente).

2. La mezcla se pasa a través de cinco tamices de diferente malla, (2, 0.5, 0.17, 0.12 y 0.07 mm. de abertura). En los dos primeros queda retenida el material vegetal y las piedras. El material contenido en los otros tres, es lavado varias veces con agua de la llave, hasta que ésta salga clara.

3. El contenido de los tres últimos tamices es vaciado, en pequeñas porciones en las cajas Petri, las que son llenadas con agua para favorecer el desplazamiento de las esporas a la superficie.

4. El sobrenadante de las cajas anteriores es decantado a otras cajas y observado al microscopio, empleando el objetivo seco débil.

5. Cada espora recolectada con pipeta Pasteur es almacenada en la solución Ringer.

6. Una vez que se han recolectado alrededor de 200 esporas se procede a su desinfección y almacenamiento, según la técnica descrita por Furlan. (Anexo 3).

Solución Ringer

NaCl	6 g.
KCl	0.1 g.
CaCl ₂	0.1 g.
H ₂ O	100 ml.
pH = 7.4 ± 0.2	

Se reparten en frascos de 250 ml. y se esterilizan a 121°C durante quince minutos.

ANEXO 3

TECNICA DE DESINFECCION Y CONSERVACION DE ESPORAS DE HONGOS
MICORRICICOS. (Furlan, 1975)

1. Las esporas almacenadas en la solución Ringer se colocan en Cloramina T de quince a veinte minutos.

2. Después se lavan con agua destilada estéril tres veces.

3. Finalmente se conservan en la solución Ringer adicionada de antibióticos.

Cloramina T

Cloramina T	2%
Estreptomicina	200 ppm.
Detergente	50 mg.
Agua	1000 ml.

Solución Ringer más Antibiótico.

Se prepara en la misma forma que se describió en el anexo 2, y además se le adicionan los antibióticos en la siguiente proporción:

Estreptomicina 200 ppm.

Gentamicina 100 ppm.

ANEXO 4

SOLUCION MINERAL DE LONG ASHTON MODIFICADA

(Hewitt, 1966)

Macroelementos.

Solución A

Disolver en 8 litros de agua destilada las siguientes sustancias:

1. KNO_3	8.08 g.
2. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	9.44 g.
3. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.84 g.
4. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.0 g.

Disolver los compuestos 1,2 y 3 por separado y una vez que cada uno este disuelto agregar el siguiente. Disolver aparte el sulfato de magnesio en agua destilada, antes de - agregarselo a la solución, esto evitará la formación de pre-
cipitado.

OligoelementosSolución B

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.223 g.
--	----------

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025 g.
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.029 g.
H_3BO_3	0.310 g.
NaCl	0.590 g.
Agua	1000 ml.

Solución C

Disolver 1.76 g. de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en un litro de agua destilada.

Solución D

Preparar la solución de citrato férrico como sigue:

Citrato férrico	10 g.
Ácido cítrico	10 g.
Agua	1000 ml.

Agitar y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Las soluciones B, C y D se guardan en el refrigerador a 4°C .

Cada vez que se vaya a preparar la solución se procede de la siguiente forma:

- a. Preparar la solución A.
- b. De la solución B adicionar 250 ml. a la solución A.
- c. De la solución C adicionar 1 ml. a la solución A.
- d. De la solución D agregar 20 ml. a la solución A.
- e. Finalmente llevar a un volumen final de 10 litros.

ANEXO 5

MICRODETERMINACION DE NITROGENO
EN PLANTAS (Mitchell, 1972)Reactivos

Solución A: Disolver 4.8 g. de NaOH en H_2O y diluir a un litro.

Solución B: Disolver 5 g. de fenol y 25 mg. de nitroprusiato de sodio en H_2O y diluir en 500 ml.

Solución C: Disolver 2.5 g. de NaOH, 1.87 g. de Na_2HPO_4 anhidro, 15.9 g. de $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$ y 5 ml. de Cloralex en agua y diluir a 500 ml. Almacenar la solución B y C en botellas-
ambar en refrigeración y calentar a temperatura ambiente an
tes de usar.

EDTA: Suspender un gramo de EDTA en 100 ml. de agua-
y adicionar NaOH concentrada para ajustar el pH a 10, mi-
diendo con potenciómetro.

Catalizador para la digestión: 2 g. de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ y -
30 g. de K_2SO_4 ó 6 g. de HgO y 20 g. de K_2SO_4 . Moler cada-
mezcla perfectamente en el mortero.

Solución estándar de nitrógeno: Disolver 0.4720 g.- de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en agua y diluir a un litro. Diluir 10 ml de ésta solución a un litro, (contiene $1\mu\text{g}$ de $\text{N}_2/\text{ml.}$)

Procedimiento

1. Pesar 50 mg. de muestra de planta homogenizada sobre una porción de papel glacine de un peso determinado - (el peso del papel deberá ser el mismo para todas las muestras).

2. Colocar la muestra y el papel dentro del matraz de digestión.

3. Agregar un gramo de catalizador y un ml. de H_2SO_4 - concentrado.

4. Colocar el matraz inclinado sobre la flama, controlando ésta última para evitar proyecciones del contenido - del matraz.

5. Rotar el matraz de tiempo en tiempo.

6. Cuando el contenido del matraz este transparente - (verde claro por el sulfato de cobre) retirar de la flama -

y dejar enfriar y agregar agua destilada caliente, mezclar y vaciar a un matraz volumétrico de 250 ml.

7. Lavar varias veces el matraz de digestión, vaciando siempre al matraz de 250 ml. Aforar con agua destilada.

8. Proceder para el desarrollo de color.

9. Del matraz volumétrico transferir 5 ml. de digesto a un matraz de 100 ml. aforado.

10. Adicionar 1 ml. de EDTA y 5 ml. de la solución A.- Agregar 10 ml. de la solución B, seguida de 10 ml. de la solución C. aforar con agua destilada.

11. Dejar reposar una hora a temperatura ambiente y medir la absorvancia a 625 mm. en un espectrofotómetro marca-Zeiss PMZA (Industrias Carl Zeiss de México, S.A.)

12. Para el desarrollo del testigo y de la curva estándar se digiere una porción de papel glacine del mismo peso que el utilizado para las muestras, se siguen los pasos anteriores, excepto el uno.

DETERMINACION DE NITROGENO POR EL METODO
DE MICRO-KJELDAHL

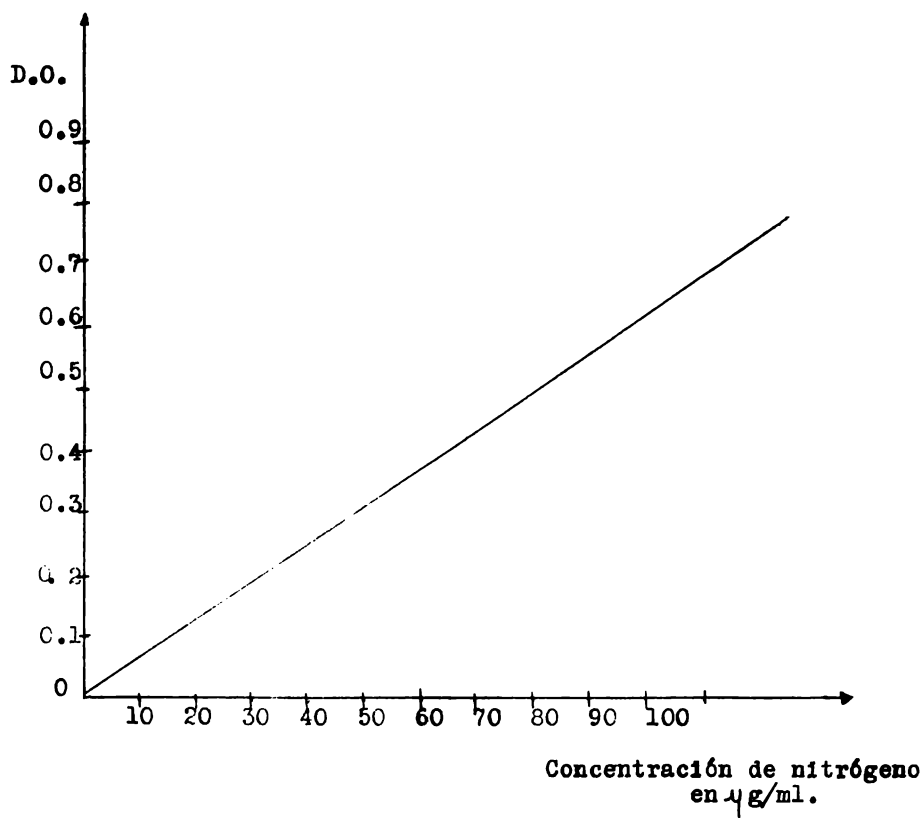
Datos de la curva estándar

Concentración (1 g de N ₂ /ml.)	D.O.
0	0
0.5	0.005
1	0.028
5	0.060
10	0.12
15	0.16
20	0.23
25	0.30
30	0.355
35	0.43
40	0.46
45	0.51
50	0.56
60	0.68

Concentración del estándar de nitrógeno = 1 g de N₂/ml.

Longitud de onda utilizada 625 nm.

CURVA ESTANDAR PARA LA DETERMINACION DE
NITROGENO





ANEXO 6

DETERMINACION DE FOSFORO TOTAL EN PLANTAS

(Chapman, 1973)

El contenido de fósforo total en el material vegetal-varía comúnmente de 0.03 a 0.3 por ciento de fósforo. En las semillas los valores llegan habitualmente al 1.5 por ciento.

Obtención de cenizas con nitrato de magnesio.

Principios

El material de plantas se aceniza en seco con un exceso de nitrato de magnesio, para evitar las pérdidas de fósforo por volatilización. Las cenizas se disuelven con un ácido y se determinan los fosfatos por el método del amarillo de vanadato-molibdato en donde los vanadatos, los molibdatos y los ortofosfatos reaccionan para dar un complejo - amarillo en soluciones ácidas.

Reativos

Nitrato de magnesio: Cincuenta por ciento de $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$.

Molibdato de amonio-vanadato de amonio en ácido nítrico. Se disuelve 22.25 gramos de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 400 - ml. de agua. Luego se disuelve 1.25 gramos de vanadato de amonio en 300 ml. de agua hirviendo. Se agrega la solución de vanadato de amonio a la de molibdato de amonio y se enfría a la temperatura ambiente. Añadir 250 ml. de ácido - nítrico concentrado Q.P. y diluír a un litro.

Estándard de fosfato: Disolver 0.2195 gramos de - KH_2PO_4 y diluír a un litro. Esta solución contiene 50 ppm. de fósforo.

Carbonato de sodio: Se prepara una solución de carbonato de sodio 1 N.

Rojo de Metilo: Preparar una solución al 0.1% en alcohol.

Procedimiento

Pesar un gramo de material seco y molido de plantas - en un crisol de porcelana para evaporaciones. Se añaden - tres mililitros de solución de nitrato de magnesio al 50% y se mezclan íntimamente. Evaporar casi hasta sequedad como - sea posible, en un baño de vapor y, a continuación, se - transfiere a una mufla calentada a baja temperatura, incre-

mentándose gradualmente el calor y se lleva hasta 500°C durante una hora o por debajo del color rojo bruto hasta obtener cenizas blancas. Se enfría y cubre con un vidrio de reloj y se añade un mililitro de agua y dos mililitros de ácido nítrico concentrado. Procediendo a la digestión en un baño de vapor a temperatura ambiente, hasta que se encuentren en solución todos los elementos químicos, excepto el silicio y los residuos ligeros de carbono. Se transfiere a un matraz volumétrico de 100 ml., y aforar con agua destilada, agitándose y permitiendo que los residuos se asienten para tomar una alícuota de la solución sobrenadante y determinar la cantidad de solución de carbonato de sodio 1N que se necesita para neutralizar, utilizando rojo de metilo como indicador. Tomar otra alícuota similar y añadir la cantidad de carbonato de sodio para neutralizar sin la adición de indicador y determinar colorimétricamente el fósforo de esa alícuota por el siguiente método:

Transferir la alícuota a un matraz volumétrico de 50 ml. Añadir 10 ml. del reactivo de molibdato de amonio-vanadato de amonio, mezclar y diluir al volumen, mezclándose nuevamente. Al cabo de 30 minutos leer la transmitancia de color en un espectrofotómetro, empleando una longitud de onda 470 nanómetros y determinar la cantidad de fósforo en base a la curva patrón. Los estándares recomendados son: Tomar alícuotas de 0,5, 10, 15 y 20 ml. de la solución estándar de fósforo que contiene 50 ppm.

DETERMINACION DE FOSFORO TOTAL EN PLANTAS POR EL
METODO DE AMARILLO DE VANADATO-MOLIBDATO

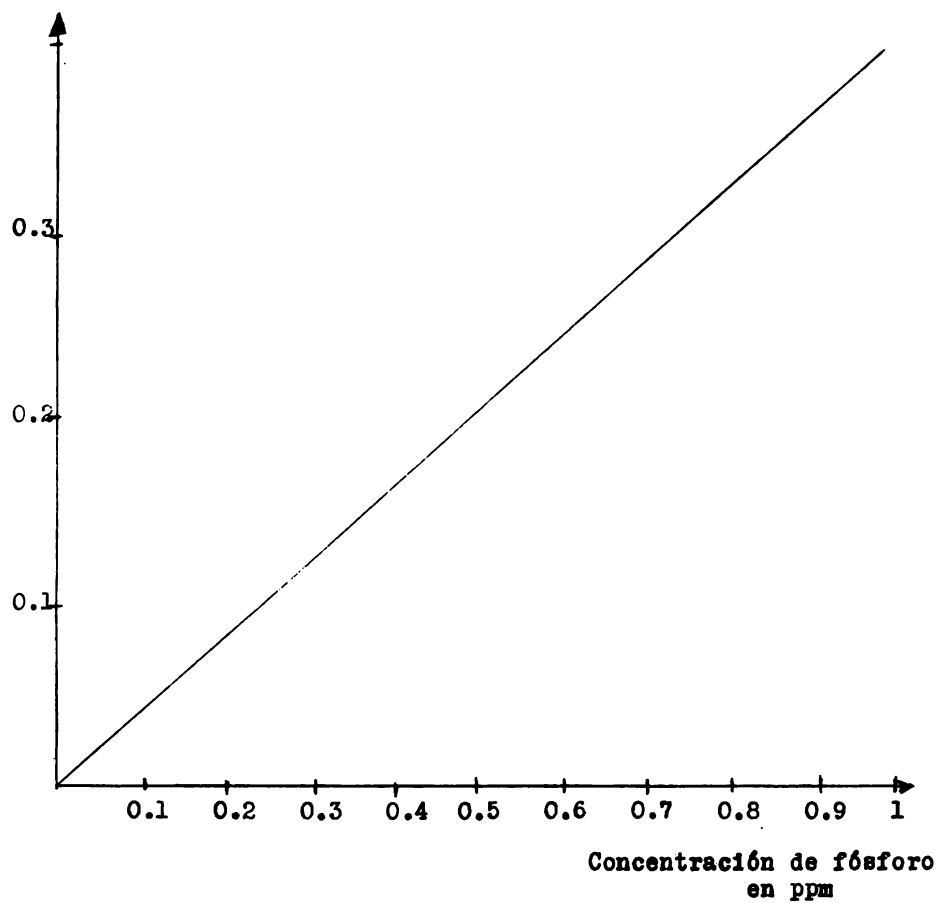
Datos de la Curva Estándard

Concentración (ppm)	D.O.
0.0	0
0.025	0.04
0.050	0.021
0.250	0.095
0.500	0.190
0.750	0.280
1.000	0.375

Concentración del estándar de fosfato = 50 ppm

Longitud de onda empleada 470 nm.

CURVA ESTANDAR PARA LA DETERMINACION DE
FOSFORO



CAPITULO CUARTO

RESULTADOS

Los valores presentados en el cuadro 1 y 2 corresponden a la media aritmética ($\bar{x}$) de cinco repeticiones.

En la fotografía número uno se presenta una espora típica de los hongos formadores de micorriza vesículo-arbuscular, aislada de una parcela situada en el estado de Tlaxcala.

En la fotografía número 2 se muestra una de las estructuras características de la infección micorrícica, las vesículas, formadas en las raíces de soya, las raíces están teñidas con fucsina ácida, se observan a un aumento de 10 x.

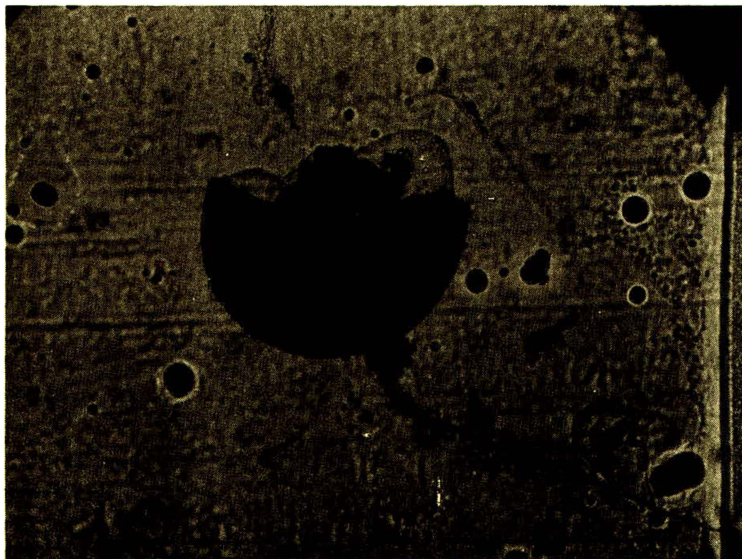


Foto No. 1

✓

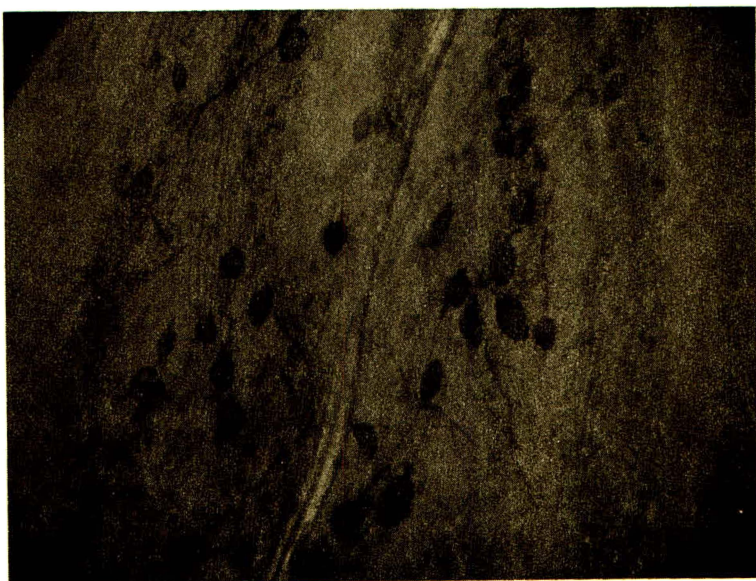


Foto No. 2

EFECTO DE LA INOCULACION DE HONGOS FORMADORES DE MICORRIZA V-A
SOBRE EL DESARROLLO DE FRIJOL

Tratamiento	Por ciento de Infección	Longitud de la parte aérea (cm.)	Nitrógeno total (g/ml.)	Fósforo total (ppm)
Testigo	0	36	50.5	0.32
Esporas	19.4	35.9	52.9	0.42
R+	76.8	43.0	55.2	0.55
R ⁻	78.6	39.4	56.1	0.58

Tratamiento	Número de vainas	Número de frijoles	Peso húmedo de la raíz (g.)	Peso húmedo de la parte aérea (g)	Peso seco de la parte aérea(g.)
Testigo	3.6	8.6	38	33.5	2.88
Esporas	3.4	9.0	42	28.8	3.60
R+	4.6	10.8	48.1	34.8	4.50
R ⁻	5.2	12.4	49.7	39.5	4.90

R+ = Raíces desinfectadas

R⁻ = Raíces no desinfectadas

Cuadro No. 2

EFFECTO DE LA INOCULACION DE HONGOS FORMADORES DE MICORRIZA V-A SOBRE
EL DESARROLLO DE LA SOYA

Tratamiento	Porciento de infección	Longitud de la parte aérea (cm.)	Peso húmedo de la raíz (g.)	Peso húmedo de la parte aérea (g.)
Testigo	0	86.2	20	25.6
Esporas	30.2	88.4	21	27.9
R+	77.2	90.6	28.8	30.4
R ⁻	80.8	92.0	34.8	31.2

Tratamiento	Peso seco de la parte aérea (g.)	Nitrógeno total (g/ml.)	Fósforo total (ppm)
Testigo	2.56	33.3	0.30
Esporas	2.76	36.4	0.34
R+	3.70	44.9	0.47
R ⁻	3.80	46.9	0.48

R+ = Raíces desinfectadas

R⁻ = Raíces no desinfectadas

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que el objetivo principal se alcanzó, es decir, el inóculo empleado fué capaz de producir la infección micorrizica V-A en las dos leguminosas empleadas.

De los tres métodos de inoculación probados el que -
dió mejores resultados corresponde a la adición de raíces -
infectadas por hongos endomicorrizicos no desinfectadas, lo
que sugiere que la población microbiana existente en el -
suelo, el cual iba adherido a las raíces, aunque sea en pe-
queña cantidad ejerce cierto efecto en el establecimiento -
de la simbiosis.

Se empleó vermiculita como soporte porque se quería -
ver la interacción hongo-planta únicamente, antes de obser-
var la relación con otros microorganismos bajo diferentes -
condiciones experimentales.

Respecto al tratamiento con esporas, no hubo grandes -
diferencias entre el testigo y el inoculado, esto pudo ser -
debido a varios factores, entre ellos, que algunas de las -
esporas empleadas no estuvieran viables, que la cantidad de
esporas empleadas como inóculo no fué suficiente para provo-
car la infección, o bien, que hayan necesitado más tiempo -

para provocarla.

Aún cuando las diferencias obtenidas entre el testigo y los tratamientos inoculados son muy inferiores a los reportados en la literatura, se observó un efecto positivo de los hongos probados sobre los hospederos empleados.

Se considera que estos resultados pueden ser consecuencia de los siguientes efectos:

- Utilización de un endofito no específico para los hospederos, porque aún cuando son de distribución casi universal se reporta que existe cierta especificidad en cuanto a la asociación y sus efectos.

- Adición de una concentración baja de inóculo, tanto de esporas como de raíces.

- Variaciones de las condiciones experimentales, ya que, durante el desarrollo del experimento se registró un descenso de la temperatura que fué controlado después de veinte días, lo que probablemente limitó las funciones de las plantas y del hongo, y aún cuando se estableció la asociación, el efecto de la misma sobre el desarrollo de las plantas fué disminuído.

- Presencia de una plaga de insectos que se manifestó a los 80 días de desarrollo, la cual fué controlada rápidamente.

No obstante de que existen abundantes datos acerca de este tipo de asociación y de los factores ambientales que la favorecen o la limitan; en nuestro país se requiere de más información acerca del efecto de los hongos endomicorrícicos locales, así como de su relación con los factores ecológicos con objeto de ampliar y generalizar resultados, que hagan posible la inoculación en campo de estos hongos en un futuro.

Uno de los aspectos básicos en el establecimiento de la simbiosis es la obtención de inóculo en cantidades grandes, actualmente presenta muchas dificultades, entre ellas que el hongo es simbiote obligado y no crece en medios sintéticos, por lo que debe multiplicarse en las raíces de una planta hospedera adecuada, sin embargo, la producción de inóculo por este método, además de ser caro y lento, para poder usarlo con fines comerciales, tiene el peligro de contaminación por hongos patógenos que pueden desarrollarse simultáneamente al hongo de la endomicorriza. Por lo tanto, habrá que desarrollar nuevos métodos para la producción de inóculo.

BIBLIOGRAFIA

Alexopoulos, C.J., 1966. Introducción a la Micología. Ed. -
Universitaria de Buenos Aires., Buenos Aires., Argentina, -
p. 185, 198.

Azcón R. and Barea J.M., 1972. Effects of interactions between different culture fractions of "phosphobacteria" and -
Rhizobium on mycorrhizal infection, growth and nodulation -
of Medicago sativa., Can. J. Microbio., 24: 520-524.

AZCON R. and BAREA J. 1975.' Synthesis of auxins, gibbere--
llins and cytokinins by Azotobacter vinelandii and Azotobac
ter beijerinckii related to effects produced on tomato -
plants. Pl. Soil, 43: 609.

AZCON R. y BAREA J. 1980. Micorrizas. Scientific American-
160: 8-16.

Baylis, G.T.S., 1959. Effect of vesicular-arbuscular myco--
rrhizas on growth of Griselina littoralis., New. Phytol., -
58: 274-280.

Baylis, G.T.S., 1970. Root hairs and phycomycetous mycorrhi-
zas in phosphorus deficient soil. Plant. Soil., 33: 713-716.

Baylis, G.T.S., 1971. Endogonaceous mycorrhizas synthetised in Leptospermum. N.Z.J., Bot., 9: 293-234.

Baylis, G.T.S., 1972 a. Minium levels of available phosphorus for non-mycorrhizal plants. Plant. Soil., 36: 233-234.

Baylis, G.T.S., 1972b. Fungi, phosphorus, and the evolutions of root systems. Search, 3: 257-258.

BECKER, W. and GERDEMANN W., 1977. Colorimetric quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in onion. New. Phytol. 78: 289-295.

Bieleski, R.L., 1973. Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. Ann. Rev. Plant. Physiol., 24: 225-232.

Chapman, Homer D. y Pratt Parker F., 1973. Métodos de análisis para suelos, plantas y aguas. Ed. Trillas. México., p. 108-115.

Crush, J.R., 1973. Significance of endomycorrhizas in Tussock Grassland in Otago, New Zealand, N.Z. J. Bot., 11: 645-660.

Crush, J.r., 1974. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. VII. Growth and nodulation of some herbage legumes. New. Phytol., 73: 743-749.

Daft, M.J. and Nicolson, T.H., 1969a. Effect of Endogone mycorrhiza on plant growth. New Phytol., 68: 945-952.

Daft, M.J. and Okusanya, B.O., 1973. Effect of Endogone mucorrhiza on plant growth. V. Influence of infection on the multiplication of virus in tomato, petunia and strawberry. New. Phytol., 72: 975-983.

Daft, M.J. and Nicolson, T.H., 1974. Arbuscular mycorrhizas in plants colonizing coal wastes in Scotland. New. Phytol., 73: 1129-1138.

Deal, D.R., Boothroyd, C.W. and Mai, W.F., 1972, Replanting of vineyards and its relationship to vesicular-arbuscular mycorrhiza. Phytopathology. 62: 172-175.

FURLAN, V. et FORTIN, J.A., 1972. Premieré mention de 1'Endogone calospora au Québec. Naturaliste can., 99: 127-129.

FURLAN, V. and FORTIN, J.A. 1973. Formation of Endomyco-
rrhizae by Endogone calospora on Allium cepa under three
temperature regimes. Naturaliste can., 99: 127-129.

FURLAN, V. and FORTIN, J.A., 1975. A flotation-bubbling
system for collecting Endogonaceae spores from sieved soil.
Naturaliste can., 102: 663-667.

Gallaud, I., 1905. Etudes sur les mycorrhizes endotrophes,
Rev. Gén. Bot., 17: 223-229.

Gerdemann, J.W., 1955. Relation of a large soil-borne spore
to phycomycetous mycorrhizal infections. Mycologia, 47:
619-629.

Gerdemann, J.W., 1964. The effect of mycorrhiza on the
growth of maize. Mycologia, 56: 342-349.

Gerdemann, J.W., 1971. Fungi that form the vesicular-arbus-
cular type of endomycorrhiza. p. 9-18 In: E. Haeskeylo (Ed.)
Mycorrhizae. Misc. Publs. U.S. Dept. Agric., No. 1189.
255 p.

Gerdemann, J.W. and Nicolson, T.H., 1963. Spores of myco-
rrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving
and decanting. Trans. Brit. Mycol. Soc. 46: 235-244.

Gerdemann, J.W. and Trappe, J.M., 1974. The endogonaceae - in the pacific northwest. Mycologia memoirs No. 5. Published by the New York Botanical Garden, Bronx, New York, 76 p.

GIOVANNETTI, M. and MOSSE B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. New. Phytol. 84: 489-500.

Gray, L.E., 1971. Physiology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. p. 145-150. In: Mycorrhizae, Ed. E. Hacskeylo. - Misc. Publs, U.S. Dept. Agric., No. 1189, 255 p.

Gray, L.E. and Gerdemann, J.W., 1969. Uptake of phosphorus-32 by vesicular-arbuscular mycorrhizae. Plant. Soil., 30: 415-422.

HARLEY, J.L. 1969. The biology of mycorrhiza, 2nd Ed. - Leonard Hill, London 334 p.

Hatting, M.J., GRAY, L.E., 1973. Uptake and translocation of p^{32} -labeled phosphate to onion roots by Endomyc. Fungi. - Soil. Sci., 116: 383-387.

Hayman, D.S., 1974. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhizae. VI. Effects of light and temperature. New. Phytol., 73: 71-80.

Hayman, D.S. and Mosse, B., 1972a. Plant growth responses - to vesicular arbuscular mycorrhiza. III. Increased uptake-of labile P from soil. *New Phytol.*, 71: 41-47.

Hewitt, E. J. 1966. Sand and Water culture methods used - in the study of plant nutrition. Technical communication 22-(2 nd ed)Revised, Commonwealth Agricultural. Bureau, 147.

Ho., I. and Trappe, J.M., 1973. Translocation of ^{14}C from - Festuca plants to their endomycorrhizal fungi. *Nature* - 244: 30-31.

Holevas, C.D., 1966. The effect of vesicular-arbuscular mycorrhiza on the uptake of soil phosphorus by strawberry. - *J. Hort. Sci.* 41: 57-60.

Khan, A.G., 1975. The effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations on growth of cereales. II. Effects on - Wheat Growth. *Ann. Appl. Biol.*, 80: 27-36.

Khan, A.G., 1974. The occurrence of mycorrhizas in halophytes, hydrophytes and xerophytes, and of Endogone spores in-adjacent soils. *J. Gen. Microbiol.*, 81: 7-14.

KORMANIG, P. and GRAIG W. 1980. Procedures and equipment - for staining large numbers of plant root samples for endomycorrhizal assay. Can. J. Microbiol. 26: 536-538.

Lewis, D.H. and Harley, J.L. (1965). Carbohydrate physiology of mycorrhizal roots of beech. III. Movement of sugars between host and fungus. New. Phytol. 64: 256-269.

Liebhardt, W.C., 1968. Effect of potassium on carbohydrate metabolism and translocation, p. 147-164. In: Kilmer, V.J. S.E. Younts and N. C. Brady, Eds., The role of potassium - in agriculture. American Society of agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA. 509. p.

Maeda, M., 1974. The meaning of mycorrhiza in the regard to systematic botany. Kumamoto J. Sci., Ser. B., 3: 57-84. (In: Gerdemann, 1968).

Mason, D.T., 1964. A survey of numbers of Endogone spores - in soil cropped with barley, raspberry and strawberry. Hort Res., 4: 98-103.

Mejstrik, V.K., 1972. Vesicular-arbuscular mycorrhizas of the species of a Moliniatum coeruleae L. II Association: - The Ecology. New. Phytol., 71: 883-890.

Mitchell, H.L. (1972). Microdetermination of nitrogen in-plant tissues. Journal of the AOAC, 55: 1-3.

Mosse, B., 1953. Fructifications associated with mycorrhizal strawberry roots. Nature, 171:974.

Mosse, B., 1957. Growth and chemical composition of mycorrhizal and non-mycorrhizal apples. Nature, 179: 922-924.

MOSSE, B., 1961. Experimental techniques for obtaining a pure inoculum of an Endogone sp., and some observations on the vesicular-arbuscular infections caused by it and by other fungi. Rec. Advan. Bot., 2: 1728-1732.

MOSSE, B., 1962. The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. J. Gen. Microbiol., 27: 509-520.

Mosse, B., 1973a. Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. Ann. Rev. Phytopathol., 11: 171-177.

MOSSE, B. and PHILLIPS, J.M., 1971. The influence of phosphate and other nutrients on the development of vesicular-arbuscular mycorrhiza in culture. J. Gen. Microbiol., 69: 157-166.

Mosse, B., Hayman, D.S. and Arnold, D.J., 1973. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. V. Phosphate uptake by three plant species from P-deficient soils labeled with ^{32}P . New Phytol., 72: 809-810.

Neshzim, O.N. and Linn, M.B., 1969. Deleterious effect of certain fungi-toxicants on the formation of mycorrhizae on corn by Endogone fasciculata and on corn root development. - Phytopathology, 59: 297-300.

Nicolson, T.H., 1960. Mycorrhiza in the gramineae. II. Development in different habitats, particularly sand dunes. - Trans. Brit. Mycol. Soc., 43: 132-137.

Nicolson, T.H. 1967. Vesicular-arbuscular mycorrhiza V-A - universal plant symbiosis. Sci. Prog., Oxf., 55: 561-581.

Nicolson, T.H. and Gerdemann, J.W., 1968. Mycorrhizal Endogone species. Mycologia, 60: 313-325.

Phillips, J.M. and Hayman, D.S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Brit. Mycol Soc., 55: 158-161.

Rikhy, M. and Mukerji, K.G., 1974. Studies on Indian Endogonaceae. I. Four new records. Trans. Mycol. Soc. 15: 47-50.

Ross, K.P., 1972. Influence of Endogone mycorrhiza on Parto phthora root of soybean. Phytopathology, 62: 896-897.

RUEHLE J. and MARX D., 1979. Fiber, food, fuel, and fungal-symbionts. Science 206: 419-422.

Safir, G.R., Boyer, J.S. and Gerdemann, J.W., 1972. Nutrient status and mycorrhizal enhancement of water transport in - soybean. Plant physiol., 49: 700-703.

Sanders, F.E. and Tinker, P.B., 1971. Mechanism of absorption of phosphate from soil by Endogone mycorrhizas. Nature, 233: 278-279.

Schenck, N.C. and Hinson, K., 1971. Endotrophic vesicular - arbuscular mycorrhiza on soybean in Florida. Mycologia, - 63: 672-674.

Schenck, N.C. and Schroder V.N., 1974. Temperature response of Endogone mycorrhiza on soybean roots. Mycologia, - 66: 600-605.

Schenck, N.C. and Tucker, D.P.H., 1974. Endomycorrhizal -
fungy and the development of Citrus seedlings in Florida -
fumigated soils. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 99: 284-285.

Trolldenier, G., 1972. L' influence de la nutrition potas-
sique de haricots nains (Phaseolus vulgaris var. manus) sur
l' exudation de substances organiques marquées au ^{14}C . Rev.
Ecol Biol. Sol. 9: 595-598.

Vozzo, J.A. and HacsKaylo, E. 1974. Endo-and ectomycorrhizal
associations in five Populus species. Bull. Torrey -
Bot. Club. 101: 182-183.

WALKER G. and POWELL C., 1979. Vesicular-arbuscular myco--
rrhizas in white clover: a scanning electron microscope and-
X-ray microanalytical study. New. Zealand J. of Bot. 1979:
55-59.

ZACK, B., 1964. Role of mycorrhizas in root disease. A. -
Rev. Phytopathol., 2: 377-392.