

Libros de **Cátedra**

Micorrizas arbusculares

Biología y aplicaciones
en el sector agro-forestal

Mario Carlos Nazareno Saparrat, Marcela Fabiana
Ruscitti y Maria Cecilia Arango (coordinadores)

FACULTAD DE
CIENCIAS AGRARIAS
Y FORESTALES

FACULTAD DE
CIENCIAS NATURALES
Y MUSEO

n
naturales


EDITORIAL DE LA UNLP



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

MICORRIZAS ARBUSCULARES

BIOLOGÍA Y APLICACIONES EN EL SECTOR AGRO-FORESTAL

Mario Carlos Nazareno Saparrat

Marcela Fabiana Ruscitti

Maria Cecilia Arango

(coordinadores)

Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales

Facultad de Ciencias Naturales y Museo



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA


EDITORIAL DE LA UNLP

A la Universidad Nacional de La Plata que a través de su Editorial nos ha permitido plasmar este trabajo. A los estudiantes, docentes y directivos de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales y de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata. A los autores y a todos aquellos que de alguna manera colaboraron en la concreción de esta obra, a través de ideas y sugerencias para mejorarla, o a través de palabras para motivarnos a llevarla adelante. Al Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE), nuestra casa de todos los días, en conmemoración a los 50 años de su creación.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de La Plata que a través de su Editorial nos ha permitido concretar este trabajo. A nuestro querido José Beltrano, ex-Profesor de Fisiología Vegetal, por redactar el prólogo con tanta calidez y originalidad, gracias por su apoyo. A la Dra. Alicia Godeas, investigadora superior ad-honorem CONICET y directora del laboratorio de Microbiología del Suelo Del Depto. de Biodiversidad y Biología Experimental – Facultad de Cs. Exactas y Naturales – UBA, y a la Dra. Marta Cabello, investigadora principal CICPBA en el Instituto Spegazzini (Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP) y profesora de Micología de la Fac. Ciencias Naturales y Museo, UNLP, por sus valiosas sugerencias, por ser quienes sembraron el interés en este tema en varios de sus discípulos doctorales formados así como por su apoyo en la conexión con varios de los participantes de este proyecto. A los coordinadores y autores por el esfuerzo realizado y la vocación docente vertida en la confección de esta obra. A la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales y a la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, nuestro ámbito de trabajo, y en especial al INFIVE, donde día a día muchos de los autores llevan adelante sus actividades de docencia, investigación y extensión. A Sofía Miranda Ruscitti por su asistencia en el diseño y organización de las figuras de este libro.

Hay muchos que se van por las ramas, por uno que se va directamente a la raíz.

Henry David Thorea

GREGORIO FERNÁNDEZ-BALAGUER Y JAVIER MOLINA ACEBO. EL PLAN DE VENTAS (5ª ED.), 2011.

Índice

Prólogo	8
Capítulo 1	
Introducción y generalidades	11
<i>Fabricio Emanuel Valdés, Camila Abarca, Roxana Paula Colombo y Vanesa Analía Silvani</i>	
Capítulo 2	
¿Cómo se establece la simbiosis?	36
<i>Marcela Ruscitti y Mario Saparrat</i>	
Capítulo 3	
Hongos rizosféricos y el movimiento del fósforo en el suelo	52
<i>Mario Saparrat, Valeria Bernardo, Marcela Ruscitti, Lorena Elíades y Pedro Balatti</i>	
Capítulo 4	
Micorrizas arbusculares, aplicaciones en el sector agro-forestal	64
<i>Valeria Bernardo, Sebastián Garita, Juan Ignacio Ripodas, Matías Gonzalez, Cecilia Arango y Marcela Ruscitti</i>	
Capítulo 5	
Micorrizas arbusculares y la restauración de ecosistemas degradados	89
<i>Matias Gonzalez, Cecilia Arango, Graciela Pastorino y Marcela Ruscitti</i>	
Capítulo 6	
Tecnología de la inoculación	106
<i>Silvana Velazquez, Fabricio Valdés y Camila Abarca</i>	

Capítulo 7

Técnicas empleadas en el muestreo de hongos micorrícicos arbusculares _____ 115

Valeria Bernardo, Sebastián Garita, Juan Ignacio Rípodas, Cecilia Arango,

Graciela Pastorino y Marcela Ruscitti

Los autores _____ 130

Prólogo

Para mí es un honor aportar el Prólogo de esta obra. A muchos de los autores los he acompañado como alumnos, compañeros de trabajo o amigos. Aprovechando la temática, se me ocurre decir que con varios de ellos hemos logrado una simbiosis entre amistad y trabajo responsable. Un libro nunca nace de la nada, dice el Dr. Manes en el prólogo de “El cerebro argentino”, en coincidencia, este libro no nace de la nada, sino que es el resultado del esfuerzo de personas que aportaron su conocimiento y su experiencia en un tema apasionante que se inicia casi con la historia del mundo. Se sabe que los hongos micorrícicos y las plantas hospedantes evolucionaron en común a través de más de 450 millones de años. Los autores nos guían acertadamente en este largo camino, hasta nuestros días. Han logrado generar una obra en la que comentan los diferentes pasos de este fascinante mundo de la simbiosis para luego proceder a la sutil explicación de los detalles, con la presentación sucinta de los participantes, hongos-plantas-ambientes y así permitir que el lector entienda lo acaecido y de esta manera propiciar el acceso al conocimiento. Al avanzar en la lectura disfruto de un texto organizado, con una secuencia que puede considerarse correcta de acuerdo al gusto de los autores. La obra tiene rigor científico, con vocabulario claro y preciso; pero tiene un adecuado puente de conocimiento hacia el público en general como para que resulte interesante aun para el lector foráneo a la temática. El avance sin cesar de la investigación aporta información a diario y en este compendio podemos observar como el conocimiento ha ido escalando un tortuoso camino que, como fue dicho, se inició hace más de 450 millones de años y que hoy tiene plena vigencia. Los hongos micorrícicos y la mayoría de las plantas hacen uso y abuso de esta interacción que, como se muestra favorece a todos los participantes y los hace más eficientes en el uso de los recursos del medio. Se describen con claridad los conceptos básicos que hacen a la relación simbiótica y a los hongos formadores de micorrizas, se actualiza la sistemática y se comentan sus principales funciones y utilidades. Se hace hincapié en la importancia de esta asociación por la cual las plantas pudieron colonizar el medio terrestre y lograr su amplia distribución en los sistemas actuales. Luego, los autores nos permiten realizar un viaje singular desde la simple espora de un hongo benéfico, hasta el contacto con el hospedador, el reconocimiento mutuo y la interacción o conexión que se establece entre la planta y el hongo.

Como dicen los autores la simbiosis entre la planta y el hongo requiere de la coordinación de complejos procesos, los cuales conducen al establecimiento de esta relación simbiótica. Se describen cuidadosamente los actos que conducen a la concreción de esta relación. Señales, elicitores, hormonas, exudados de diferentes composiciones que hacen a la localización del objetivo

planta y al acto final de la invasión. Esta interacción se relata de manera fluida, se incursiona sutilmente en la participación de diferentes genes, metabolitos y reguladores y hace de este difícil y complejo proceso, una marcha interactiva e intrigante para el lector.

Como corolario plantea incógnitas sobre cómo se establece y perdura esta asociación, que supera el sistema de defensa de la planta y que además le permite aprovecharla para hacer más eficientes los cultivos, sobre todo en situaciones de estrés. Sin percibirlo, porque se desarrolla sutilmente, se incursiona en la morfo-fisiología fina de la interacción hongo-planta y nos lleva a comprender como se comporta la rizósfera en estas relaciones complejas entre la planta y la microbiología del suelo.

Así, a fin de hacer interesante la lectura se desarrollan algunos mecanismos y regulaciones involucradas para hacer más eficiente a las plantas en lo que hace a la absorción de agua y nutrientes, aumentar la tolerancia a los estreses abiótico y biótico y a la resistencia a enfermedades. Naturalmente, el crecimiento de las plantas es afectado por la deficiencia de agua y nutrientes minerales y los cultivos en general sufren situaciones de estrés. Hace más de 50 años, el Profesor Eurípides Malavolta nos comentaba que el factor estratégico en el futuro no sería el petróleo, que de hecho vemos como se lo va reemplazando, sino que ese papel central estaría representado por el elemento fósforo (P), y hoy asistimos a esta realidad. En este nuevo paradigma, el estudio de las relaciones simbióticas en general y de las micorrizas en particular adquiere una importancia suprema. En consecuencia y como es lógico, en el capítulo respectivo se comenta con detalles los mecanismos y las complejas vías metabólicas que se desencadenan ante situaciones de estrés, mediante las que las plantas asociadas a los hongos micorrícicos morigeran los efectos detrimentales de los estreses. Se plantean incógnitas, sobre las posibles respuestas de las plantas micorrizadas en condiciones de estrés, que generan intriga y motivación para continuar con la lectura. Luego de recorrer el camino de la inoculación los autores nos sumergen en la difícil tarea de cuantificar el potencial del inóculo y las técnicas que se relacionan con la propagación, conservación y almacenamiento del inóculo. No obstante lo cual, a pesar de los conocimientos adquiridos, se plantea que la producción de inóculo puro o mixto a gran escala constituye aún un gran desafío.

Finalmente, ingresamos al laboratorio y allí nos muestran algunas de las técnicas comúnmente empleadas en el muestreo y seguimiento de los hongos micorrícicos arbusculares, como la tinción de las raíces para su observación y cuantificación entre otras actividades. Los autores expresan acertadamente que en la actualidad se considera que en un ambiente natural, una condición no micorrícica debe observarse como anormal para la mayoría de las especies, además resaltan la participación de este artificio biológico como una alternativa favorable a las prácticas de fertilización convencionales, con vistas a una agricultura sustentable. Con claridad se plantea la utilidad de esta asociación, que acompaña al hombre desde siempre y que se proyectará con él hacia un futuro en el que estará obligada a ser protagonista, en un medio en el que el requerimiento de alimentos irá en aumento mientras que la disponibilidad de recursos no renovables irá decreciendo. Este simple comentario es suficiente para justificar el trabajo invertido en la concreción de esta obra y el afán de su lectura. El hombre se ha encargado de

contaminar el aire, el agua y el suelo, en este ambiente tóxico y degradado, en el que las plantas deben convivir con plagas y enfermedades este artificio natural, la simbiosis micorrícica será uno de los responsables de dar estabilidad al sistema mundo. Considero que la propuesta de leer esta obra es motivante y que el lector se verá satisfecho en sus intrigas, por lo cual es una invitación a su lectura.

JB

La Plata, junio de 2019

CAPÍTULO 1

Introducción y generalidades

Fabrizio Emanuel Valdés, Camila Abarca, Roxana Paula Colombo y Vanesa Analía Silvani

La vida (...) es también una unión simbiótica y cooperativa, que permite triunfar a los que se asocian.

LYNN MARGULIS, LA VIDA COMO LIBERTAD Y COOPERACIÓN

Toda disciplina científica conserva, en sí misma, un interés que a través de estudios, observaciones y demostraciones, intenta satisfacerse de conocimiento, tratando de explicar o brindar una organización a patrones que se observan en la naturaleza, y se perciben consciente o inconscientemente. Así es como se despierta el interés y se transforma en una ciencia básica.

A lo largo de este capítulo comenzaremos dando una breve introducción, así como los conceptos básicos que entendemos importantes para poder adentrarnos en la temática de los hongos formadores de micorrizas arbusculares (abreviadamente en lo sucesivo como hongos MA). Partiendo desde el entendimiento del concepto de micorriza, su origen y su evolución histórica, hasta los actuales avances en la sistemática, los caracteres por los cuales se identifican y sus principales utilidades que apuntan a las incumbencias en las ciencias aplicadas.

La Simbiosis Micorrícica

Las micorrizas son asociaciones simbióticas que se producen entre ciertos hongos del suelo y las raíces de las plantas. El término micorriza proviene del griego *mykos* (hongo) y *rhiza* (raíz) y fue utilizado por primera vez por Frank (1885) para describir un fenómeno común que observó en las raíces de árboles de los bosques templados de Norteamérica. Estos órganos vegetales se diferenciaban morfológicamente a otras raíces cuando se encontraban asociados a ciertos hongos del suelo. Actualmente, el concepto de micorriza se utiliza de una manera más amplia

para hacer referencia a una gran diversidad de asociaciones de este tipo, incluyendo angiospermas, gimnospermas y pteridofitos que tienen raíces, así como los gametofitos de algunos musgos, licopodios y psilotales, que no poseen raíces verdaderas (Smith y Read, 2008).

En una relación simbiótica dos organismos de especies diferentes viven conjuntamente. Ésta es una definición muy amplia, ya que en la naturaleza las interacciones de este tipo son diversas y pueden clasificarse de acuerdo a distintos criterios. La simbiosis puede ser perjudicial para alguno de los organismos involucrados y beneficiosos para el otro, y en ese caso se denomina simbiosis parasítica o parasitismo. También existen asociaciones que pueden ser beneficiosas para ambas partes, y entonces se trata de una simbiosis mutualista o mutualismo (Bary y Garnsey, 1887). Comúnmente el término “simbiosis” se utiliza para hacer referencia sólo a relaciones de mutuo beneficio entre especies diferentes, de manera opuesta al concepto de parasitismo. Además estas relaciones pueden ser facultativas o temporales, cuando no son imprescindibles y las dos especies pueden vivir tanto juntas como separadas, u obligadas o permanentes, cuando una de las partes (o ambas) es dependiente de la otra y no puede sobrevivir sin su simbiote.

Allen y Allen (1991) definieron a las micorrizas como simbiosis generalmente mutualista que se encuentran en una raíz, o en una estructura similar, en la cual la energía se mueve de la planta al hongo y los recursos inorgánicos del hongo a la planta. Los hongos son seres vivos heterótrofos y, por lo tanto se benefician con los hidratos de carbono sintetizados por la planta. A su vez, éstos toman y transfieren nutrientes del suelo a la raíz (principalmente fósforo y nitrógeno) y le proveen protección contra patógenos y condiciones hídricas desfavorables (Smith y Read, 2008).

Además de mejorar el estado nutricional y el crecimiento de su hospedante vegetal, la simbiosis micorrícica ofrece otros beneficios, entre los que se destacan: la protección ante el ataque de parásitos, hongos patógenos y nemátodos, el aumento de la resistencia a la herbivoría, ya que influyen en la producción de sustancias defensivas por parte de la misma planta, la limitación de la absorción de metales pesados como el zinc y el cadmio, que son retenidos en las hifas del hongo, y el aumento del área de exploración de la raíz, permitiendo incrementar el flujo de agua del suelo a la planta. Además, los hongos contribuyen a mejorar las propiedades físico-químicas del suelo mediante el enriquecimiento de materia orgánica y, en el caso de los hongos MA, estimulan la formación de agregados de partículas mediante el exudado de un grupo de glicoproteínas hidrofóbicas, denominadas glomalina. Esto mejora la estructura y estabilidad del suelo, reduciendo su erosión y aumentando su capacidad de retención de agua (Finlay, 2008).

La formación de micorrizas resulta fundamental para la supervivencia de muchos taxones de plantas en diversos ecosistemas, incluyendo especies de cultivo de interés agronómico (Bethlenfalvay y Linderman, 1992). Esta asociación se presenta en aproximadamente el 90% de las plantas, por lo que se ubica en todos los ecosistemas del mundo. Algunas especies de MA pueden encontrarse en los más variados tipos de suelo y regiones climáticas teniendo una distribución mundial (Read, 1991), por lo que las asociaciones micorrícicas pueden considerarse, en

cierto grado, cosmopolitas y generalistas. Esto es el resultado de un proceso de co-evolución entre hongos y plantas que ha ocurrido de forma convergente en diferentes ambientes y momentos de la historia de la vida en la tierra (García, 2009). Existe evidencia fósil del Ordovícico medio ~475 millones de años (Ma) que demuestra que las primeras plantas terrestres se asociaron con hongos para poder establecerse en suelos pobremente desarrollados (Redecker et al., 2000a; Wellman et al., 2003). Actualmente se considera que los hongos micorrícicos fueron cruciales para que las plantas pudieran colonizar el medio terrestre y responder adecuadamente a las condiciones ambientales cambiantes (Smith y Read, 1997).

En el medio natural, las micorrizas no son simplemente interacciones entre la raíz de una planta y una especie de hongo en particular, sino que constituyen una comunidad compleja formada por diferentes especies fúngicas y los sistemas radiculares. Existen estudios que reportan que la micorriza genera una extensa red de micelio externo que explora el suelo en la búsqueda de recursos e interconecta a las raíces de plantas de la misma especie o de especies diferentes (Simard y Durall, 2004). Esta asociación se define como un continuo “mutualismo-parasitismo”; es decir, se analiza desde una perspectiva de “costo-beneficio”, considerando el desarrollo tanto de las plantas como de los hongos, las condiciones ambientales y edáficas y los factores de reconocimiento genético mutuo (Johnson et al., 1997). En los distintos ecosistemas de la tierra, la selección parece haber favorecido ciertos atributos de las micorrizas y sus simbioses involucrados, dando lugar a una gran diversificación estructural y funcional.

Las Micorrizas y su Clasificación

Las micorrizas se pueden clasificar principalmente mediante ciertas características morfológicas del hongo, como la forma y el tipo de hifas, el nivel de penetración en la raíz o el tejido, así como los taxones involucrados (**Cuadro 1.1**). Podemos reconocer de manera consensuada, dos grandes tipos de micorrizas de acuerdo a la forma de penetración de las hifas en las células de la raíz: ectomicorrizas y endomicorrizas (**Figura 1.1**). Se describen también formas intermedias: las ectendomicorrizas (Frioni, 2006).

Las micorrizas de tipo *arbutoides* son ectendomicorrizas y presentan manto hifal, red de Hartig y una penetración intracelular desarrollada. Dentro de las endomicorrizas se describen diferentes subtipos: *monotropoide*, *ericoide*, *orquideoide* y *micorrizas arbusculares*; en las primeras tres no se observan vesículas ni arbuscúlos, estructuras típicas del subtipo MA.

Cuadro 1.1: Clasificación de los tipos de micorrizas de acuerdo a las características generales de los hongos y las plantas involucradas en la asociación

Tipos de micorrizas	Ectomicorrizas	Ectendomicorrizas		Endomicorrizas			
		Otras	<i>Arbutoide</i>	<i>Monotroipoide</i>	<i>Ericoide</i>	<i>Orquideoide</i>	MA
<i>Hifas</i>	septadas	septadas	septadas	septadas	septadas	septadas	sin septos
<i>Penetración</i>	inter-celular	intra-celular	intra-celular	intra-celular	intra-celular	intra-celular	intra-celular
<i>Manto hifal</i>	presente	presente/ausente	presente	presente	ausente	ausente	ausente
<i>Simbionte fúngico</i>	Basidio/Asco	Basidio/Asco	Basidio	Basidio	Asco	Basidio	Glomero
<i>Simbionte vegetal</i>	Gymno Angio	Gymno Angio	Ericales	Monotroipoideae	Ericales Bryo	Orchidales	Bryo Pterido Gymno Angio

MA: Micorrizas Arbusculares; Basidio: Basidiomycota; Asco: Ascomycota; Glomero: Glomeromycota; Gymno: Gymnosperma; Angio: Angiosperma; Bryo: Bryophyta; Pterido: Pteridophyta. (Smith y Read, 2008).

Ectomicorrizas (ECM)

El carácter distintivo de las ECM es la formación de un manto de hifas alrededor de las raíces absorbentes, lo cual produce una modificación de la morfología de la raíz (Harley y Smith, 1983). Respecto de las hifas y su interacción a nivel ultraestructural dentro de la raíz, no penetran en el interior de las células de la planta hospedadora, sino que crecen únicamente de manera intercelular, pudiéndose analogar con la vía de transporte del agua, es decir, que colonizan el apoplasto radical. De esta manera se puede observar una disposición hifal en las primeras células del tejido radical, llamada "Red de Hartig". La red de hifas conforma un manto fúngico que rodea las raíces, las células corticales se alargan transversalmente y los pelos suelen estar ausentes o totalmente cubiertos. Este manto hifal puede llegar a representar el 40% del órgano (Frioni, 2006).

Las ECM son formadas por hongos pertenecientes al grupo de los *Basidiomycetes* y varios grupos de plantas de porte arbóreo o arbustivo, tales como las familias *Pinaceae*, *Araucariaceae*, *Cupressaceae*, *Gnetaceae*, *Polygonaceae*, *Nyctaginaceae*, *Myrtaceae*, *Salicaceae*, *Fabaceae*, y los órdenes *Fagales* y *Malvales*. Así también, algunas hepáticas foliosas pueden formar este tipo de asociaciones. Es importante notar que las ECM ocurren en menor porcentaje que las endomicorrizas, dado que tienen un menor rango de hospedantes vegetales y se limitan principalmente a regiones templadas y frías (Wang y Qiu, 2006).

Se estima que más de 6000 especies de hongos formadores de setas son, a su vez, formadores de ECM. Entre algunas especies comestibles podemos nombrar a *Lactarius deliciosus* (niscaló, robellón), *Amanita caesarea* (oronja o huevo de Rey), *Pleurotus ostreatus* (gírgola),

además de otras especies tóxicas y carentes de interés culinario (Martínez y De Aguilar, 2004). También existen especies con diferentes grados de especificidad, es decir que crecen sólo asociadas con ciertas familias, géneros o especies de plantas.

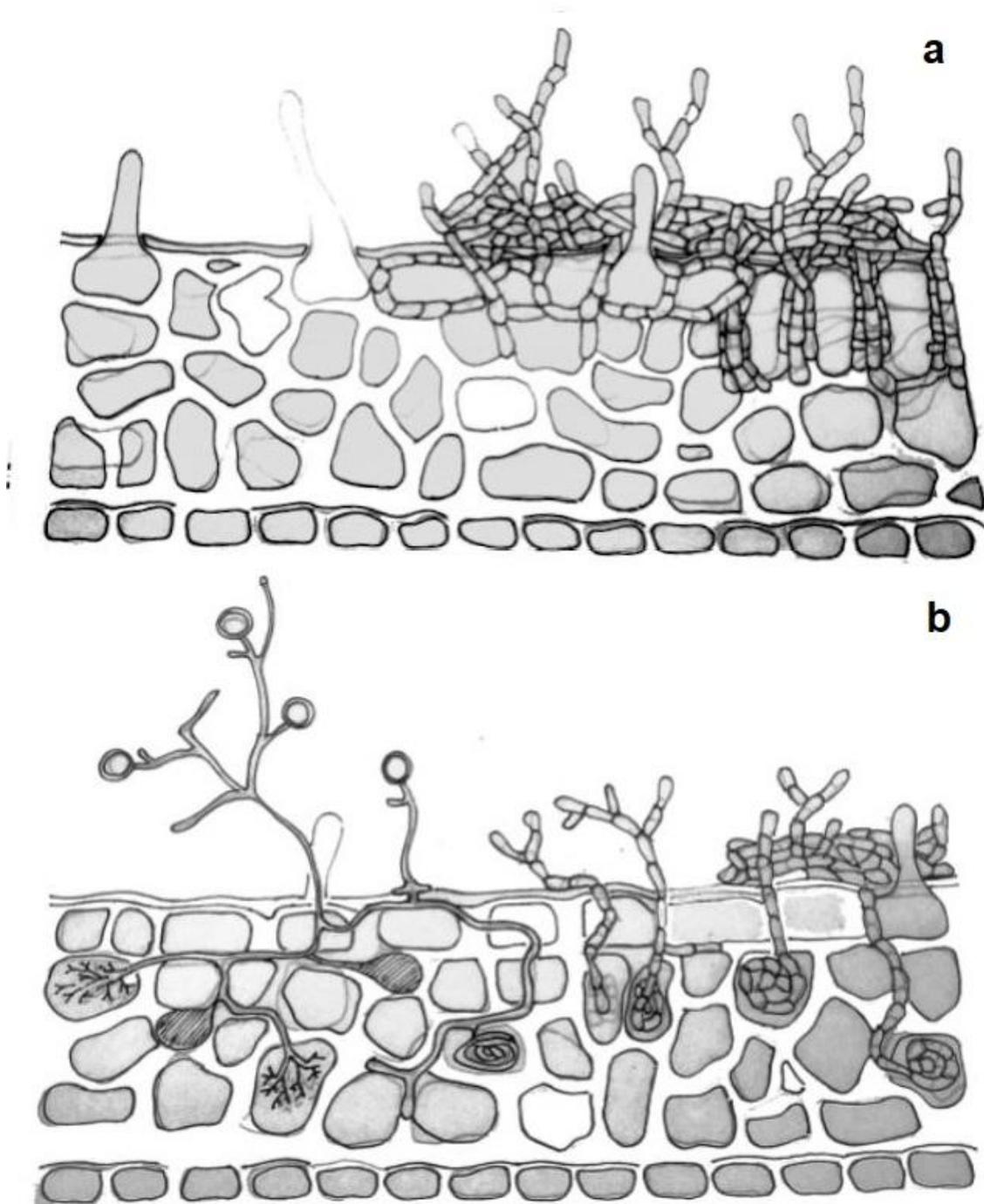


Figura 1.1: Representación esquemática del micelio intercelular en una ectomicorriza (a) e inter-intracelular de una endomicorriza (b).

Endomicorrizas

En las endomicorrizas las hifas de los hongos crecen tanto inter como intracelularmente en la raíz, es decir, por vía apoplástica y simplástica. La presencia de un manto hifal alrededor de las raíces no es una característica propia de este tipo de micorrizas, aunque algunos subtipos de endomicorrizas suelen tenerlo (Harley y Smith, 1983). Dentro de la raíz, el hongo coloniza las células de la corteza, pero no alcanza la endodermis.

El grupo más grande y más frecuente de endomicorrizas es el de las MA, siendo los arbuscúlos, las estructuras típicas de la simbiosis. Los hongos asociados en las MA pertenecen al *Phylum Glomeromycota* (Schüßler et al., 2001; Błaszkowski, 2003), se caracterizan por sus hifas carentes de septos y su biotrofia obligada. Sobre este grupo en particular, es que se hará énfasis a lo largo de este capítulo.

Su temprana aparición en el registro fósil sugiere que esta asociación representa el tipo más ancestral de micorrizas en las plantas terrestres (Strullu-Derrien et al., 2018). Esto explicaría su presencia en la mayoría de las especies vegetales y su amplia distribución cosmopolita, que permite encontrarlas tanto en ambientes naturales como en casi todos los cultivos agrícolas.

A continuación se muestra un cuadro comparativo entre las ECM y las MA según algunas características generales (**Cuadro 1.2**).

Cuadro 1.2: Cuadro comparativo de aspectos generales entre ECM y MA.

ECTOMICORRIZAS	MICORRIZAS ARBUSCULARES
Regiones frías a templadas	Amplia distribución geográfica
Árboles y arbustos	Todos los tipos de vegetación
+ de 6000 especies principalmente <i>Basidiomycota</i>	Cerca de 200 especies de <i>Glomeromycota</i>
Cambia la morfología de la raíz	La morfología de la raíz no cambia
La planta es simbionte obligado	La planta es simbionte facultativo
El hongo es simbionte facultativo	El hongo es simbionte obligado

La Biología de los hongos MA

Los hongos MA (anteriormente conocidos como vesículo-arbusculares) se caracterizan por el desarrollo de hifas inter e intracelulares y estructuras de intercambio denominadas arbuscúlos dentro de las células corticales de la raíz y por la producción de esporas intra y extraradicales. Además algunas especies desarrollan vesículas dentro de las raíces.

Un requisito básico para la manipulación y el manejo de las MA es el conocimiento de su biología, desarrollo simbiótico en los tejidos vegetales, y de su identificación y ocurrencia en el reino vegetal. Para determinar la presencia de MA y eventualmente cuantificarlas es necesario

realizar observaciones microscópicas de las raíces. Las raíces pueden observarse directamente bajo lupa binocular para el reconocimiento de las estructuras fúngicas. Sin embargo, esta metodología requiere de gran experiencia por parte del observador, ya que el micelio de los hongos MA y otras estructuras son generalmente hialinas, dificultando su diferenciación con otros hongos endófitos, saprófitos o parásitos (**Figura 1.2**). Por lo tanto, es habitual utilizar diferentes protocolos de tinción de las raíces para el reconocimiento de estructuras fúngicas como proponen Phillips y Hayman (1970).

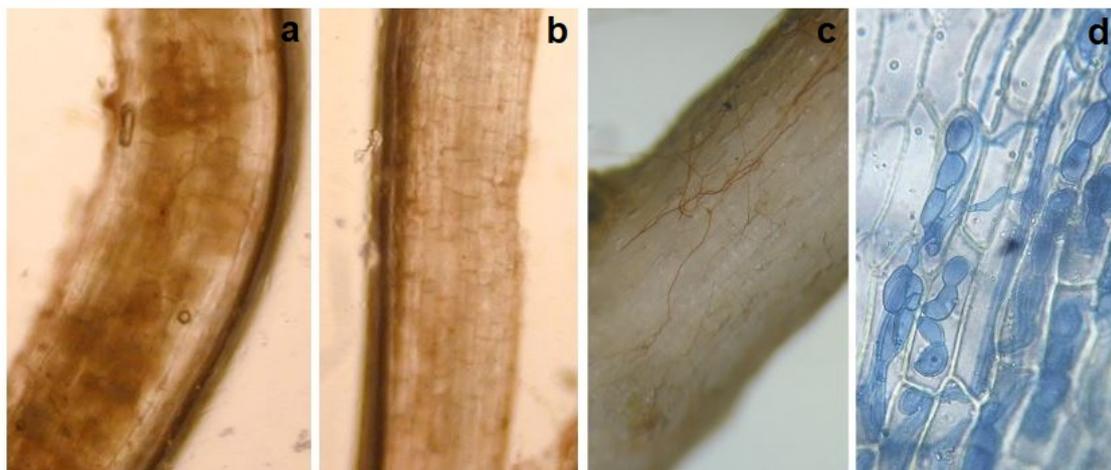


Figura 1.2: Raíz de tomate colonizada por MA (a); raíz de tomate no colonizada (b); raíz de *Paspalum dilatatum* colonizada por otro endofito (c); tejido de Bryophyta (hepática) colonizada por endofitos tabicados (d).

Según Bowen (1987) pueden identificarse diferentes etapas de la simbiosis MA:

a) Pre-Infeción: en el suelo pueden encontrarse tres tipos de propágulos: esporas, hifas o fragmentos de raíces colonizadas. La germinación de los mismos se verá afectada por determinados factores edáficos físico-químicos como: O_2 , CO_2 , temperatura, humedad, pH, fuentes de nutrientes y su disponibilidad, y efectos fungistáticos del suelo, entre otros.

Durante la germinación de las esporas se lleva a cabo la división de núcleos, los cuales oscilan entre 2.000 - 3.000 en cada una, y se distribuyen a lo largo de las hifas germinativas recién formadas (Burggraaf y Beringer, 1987). Si las mismas no entran en contacto con algún hospedante, el potencial de infección del propágulo germinado se pierde en unos pocos días. En cambio, la cercanía de la planta hospedante, desencadena una ruta de señalización entre el hongo MA y la planta que promueven la proliferación de las hifas hacia la raíz. Lo mismo sucede con los restantes tipos de propágulos de MA.

b) Infeción primaria: Los hongos MA pueden infectar una gran variedad de especies de plantas, su compatibilidad es un fenómeno generalizado y no existe una especificidad en el mecanismo de reconocimiento del hongo. Sin embargo, algunas familias de plantas como las *Che-
nopodiaceae*, *Brassicaceae* y *Caryophyllacea* no son micorrizadas.

Una serie de cambios en las células de la raíz permiten que se forme el aparato de pre-penetración (APP) (Genre et al., 2005), el cual es una estructura subcelular que predetermina la senda de crecimiento del hongo a través de la célula de la planta. La formación del APP es precedida por la formación del apresorio que es una hinchazón de la hifa que se adjunta a la epidermis de la planta huésped para iniciar la colonización.

c) Formación de arbusculos y vesículas: Las hifas penetran inter e intracelularmente. El crecimiento está restringido a la epidermis y parénquima cortical, donde se desarrollarán los arbusculos, que constituyen los principales indicadores de una colonización funcional. Los demás componentes radiculares y las partes de plantas clorofílicas no son alcanzados por el hongo.

Los arbusculos son los principales sitios de intercambio de nutrientes entre la planta hospedadora y el hongo (Gianinazzi et al., 1979), se forman dentro de las células corticales poco después de la penetración a la raíz (2 a 5 días). Las hifas finamente ramificadas aumentan el contacto con el lumen celular. Sin embargo, el contacto entre el arbusculo y el citoplasma celular no es directo, sino que se encuentra separado a través de una membrana periarbuscular que deriva de la planta (Parniske, 2008).

La formación de los arbusculos aumenta la actividad metabólica de la célula huésped, lo que se debe principalmente a la transferencia bidireccional de metabolitos y nutrientes. Los arbusculos viven entre 4-15 días (aunque esto varía según la bibliografía), luego se degeneran y son digeridos por la célula huésped. El proceso de formación y degeneración de los arbusculos ocurre simultáneamente en la raíz, y a menudo se observan todas las etapas del ciclo.

Poco después de la formación de los arbusculos, algunas especies de MA forman vesículas intercelulares, ya sea en posición apical o intercalar, cuya función es el almacenamiento de lípidos, fósforo y otros elementos químicos, pero que también pueden actuar como estructuras de propagación vegetativa ya que poseen numerosos núcleos. Las especies de hongos que pertenecen a los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora* nunca forman vesículas, sin embargo, producen células auxiliares en el micelio externo.

d) Extensión del hongo en las raíces y en la rizósfera: La extensión del hongo en la raíz se divide en tres fases. (i) La fase inicial durante la cual se produce la infección primaria. (ii) La fase exponencial durante la cual el hongo se propaga inter- e intracelularmente, especialmente en las raíces secundarias finas, de manera que el hongo crece más rápido que la raíz. Las hifas que crecen por fuera de la raíz, penetran la raíz nuevamente a distancias irregulares. La propagación de la infección es interna o en la superficie de la raíz. (iii) La fase meseta durante la cual el crecimiento de la raíz y el hongo son similares. El nivel de infección de la meseta no es constante. Los factores que afectan la tasa de crecimiento relativo de la raíz y el hongo pueden ir cambiando según el equilibrio entre el desarrollo de la raíz y el hongo. Los arbusculos y las vesículas se forman y degradan continuamente durante las fases exponenciales y de meseta.

e) Propagación del hongo a través del suelo: Después de la infección primaria y durante la primera fase de la propagación en la raíz, crecen hifas desde la raíz hacia la rizósfera en el

suelo. Esta parte externa del micelio es el que lleva a cabo la absorción de nutrientes de la solución del suelo y su transporte hacia la raíz. La red de micelio consiste en hifas principales de 5 a 20 μm de diámetro que pueden ramificarse dicotómicamente, e hifas secundarias más finas de 1 a 5 μm de diámetro. Las distintas especies difieren notablemente en la extensión y arquitectura del micelio externo, pero hay que tener en cuenta que el crecimiento del micelio externo puede estar influenciado por diferentes factores bióticos y abióticos del suelo.

f) Formación de estructuras reproductivas: Los hongos MA forman esporas a partir de las hifas del micelio externo. Las esporas son células únicas multinucleadas producidas blásticamente a partir de las hifas esporógenas en posición apical o intercalar. El diámetro de las esporas varía entre las especies de hongos y pueden medir entre 15 a 800 μm . En ciertos casos es posible encontrar la formación de estructuras esporocárpicas.

La formación de esporas puede comenzar muy pronto, entre las primeras 3 a 4 semanas, o demorar hasta 6 meses dependiendo de las especies. La esporulación fúngica es un proceso dinámico, mientras algunas esporas se forman otras están germinando. El micelio fúngico externo e interno en fragmentos de raíces colonizadas, también funciona como una estructura reproductiva de estos hongos, ya que puede germinar e infectar nuevas raíces. Sin embargo, mientras que las esporas pueden sobrevivir hasta varios años en el suelo, la infectividad del micelio fúngico externo, separado de la planta huésped o después de la muerte del huésped, dura solo 2 a 4 semanas. En cambio, los fragmentos de raíces colonizados suelen ser un propágulo infeccioso más viable en el suelo.

Taxonomía, sistemática e identificación de los *Glomeromycota*

Historia de la taxonomía en las micorrizas arbusculares

La taxonomía de los hongos MA comienza en 1844 con las descripciones de las especies *Glomus microcarpus* y *G. macrocarpus* (Tulasne y Tulasne, 1844). Años más tarde, estas especies fueron trasladadas al género *Endogone* por la similitud de sus esporas con las zigasporas de estos últimos (Tulasne y Tulasne, 1851). En 1873, se creó el género *Sclerocystis* agrupando aquellos hongos MA que formaban esporocarpos organizados (Berkeley y Broome, 1873). Así, en 1922 las MA se ubicaban dentro de la familia *Endogonaceae* (Orden *Mucorales*) (Thaxter, 1922), y se comenzó a sugerir que los hongos del género *Endogone* eran los formadores de las 'micorrizas vesículo-arbusculares'. Sin embargo, es Mosse (1953) quien finalmente comprueba que una de las especies de *Endogone* era capaz de formar la simbiosis al inocular esporocarpos en raíces de frutilla creciendo en suelo estéril. Tras este importante hallazgo, se nombró a esa especie como *Endogone mosseae* (= *Glomus mosseae* = *Funneliformis mosseae*), y se confecciona la primera clave para la identificación de las especies *Endogone* (Mosse y Bowen, 1968). Años más tarde, Gerdemann y Trappe (1974) revisaron la familia *Endogonaceae* (*Phylum*

Zygomycota) y reconocieron los siguientes géneros como formadores de MA: *Glomus*, *Sclerocystis*, *Acaulospora*, *Gigaspora* y *Endogone*. Luego, Walker y Sanders (1986) incluirían los géneros *Entrophospora* (Ames y Schneider, 1979) y *Scutellospora*.

En la década de los 80s, los taxónomos Walker (1983) y Morton (1988) realizaron un gran aporte a la taxonomía proponiendo nuevos términos y definiciones a los caracteres morfológicos de las esporas de los hongos MA. En 1990, Morton y Benny agregaron nuevos caracteres de clasificación, como el desarrollo de la espora y el modo de germinación, describiendo detalladamente al orden *Glomales*, que luego pasó a denominarse *Glomerales*, conformado por 3 familias: *Glomeraceae* (*Glomus* y *Sclerocystis*), *Acaulosporaceae* (*Acaulospora* y *Entrophospora*) y *Gigasporaceae* (*Gigaspora* y *Scutellospora*).

A partir de los 90s, las técnicas moleculares comenzaron a ser incluidas en la taxonomía de los hongos MA (Simon et al., 1993; Redecker et al., 2000b). Morton y Redecker (2001) combinaron análisis moleculares, morfológicos y bioquímicos para definir dos nuevas familias a partir del orden *Glomerales* (*Archaeosporaceae* y *Paraglomaceae*). En 1998, una nueva clase es propuesta para los hongos MA (Clase *Glomeromycetes*) dentro del *Phylum Zygomycota* (Cavalier-Smith, 1998). Años más tarde, la demostración de que los hongos MA son un grupo monofilético resulta en la conformación de un nuevo clado con 4 órdenes: *Phylum Glomeromycota* (Schüßler et al., 2001). Desde entonces, numerosos cambios ocurrieron en la taxonomía de las MA, y nuevos órdenes y familias fueron creados (Oehl y Sieverding, 2004; Sieverding y Oehl, 2006; Walker et al., 2007; Schüßler y Walker, 2010; Oehl et al., 2011a,b,c; Goto et al., 2012). Por su parte, Blaszkowski y colaboradores realizaron un importante aporte en la descripción de nuevas especies y géneros (Blaszkowski et al. 2004, 2010, 2015, 2018).

En los últimos años, los avances en el área molecular han permitido una mayor comprensión de las relaciones filogenéticas y han suscitado cambios dentro del sistema de clasificación de estos hongos. En el 2013, se elabora una nueva clasificación del *Phylum Glomeromycota* basada en el análisis consenso de tres regiones ribosomales: la subunidad pequeña (18S), la subunidad grande (28S) y el gen ITS (ITS1-5.8S-ITS2) (Redecker et al. 2013). Bajo esta reconstrucción filogenética, se describieron un total de 9 familias y 18 géneros.

Actualmente, la clasificación de las MA a nivel *Phylum* se encuentra en continuo cambio y debate. Basados en estudios filogenéticos y en la estimación de los tiempos de divergencia, Tedersoo y colaboradores (2018) revalidaron la posición de los hongos MA dentro del *Phylum Glomeromycota*, en lugar del *Phylum Mucoromycota* y *Subphylum Glomeromycotina* propuesto por Spatafora y otros autores (2016). A nivel clase, los *Glomeromycota* se han clasificado como: *Glomeromycetes* (comprendiendo los órdenes *Diversisporales*, *Gigasporales* y *Glomerales*), *Archaeosporomycetes* y *Paraglomeromycetes* (Oehl et al., 2011a).

Los hongos MA pertenecientes a *Glomerales* y *Diversisporales* son capaces de formar vesículas dentro de las raíces de las plantas, mientras que los del orden *Gigasporales* carecen de ellas, aunque forman células auxiliares a partir del micelio extra-radical. Las especies de *Archaeosporomycetes* comprenden familias y géneros bimórficas, y los *Paraglomeromycetes* se

caracterizan por desarrollar esporas glomoides que germinan directamente a través de la pared, y no a partir de su hifa sustentora.

Por lo pronto, la clasificación propuesta por diversos autores es la siguiente:

Phylum Glomeromycota

Subphylum Glomeromycotina

Clase Glomeromycetes

Orden Glomerales

Familia Glomeraceae

Familia Claroideglomeraceae

Orden Diversisporales

Familia Diversisporaceae

Familia Acaulosporaceae

Familia Entrophosporaceae

Familia Pacisporaceae

Orden Gigasporales¹

Familia Gigasporaceae

Familia Scutellosporaceae

Familia Racocetraceae

Familia Dentiscutataceae

Clase Paraglomeromycetes

Orden Paraglomerales

Familia Paraglomeraceae

Clase Archaeosporomycetes

Orden Archaeosporales

Familia Archaeosporaceae

Familia Ambisporaceae

Familia Geosiphonaceae

¹ Al realizar un análisis filogenético exhaustivo usando diferentes regiones del ADN ribosomal, Krüger y colaboradores (2012) eliminaron el orden *Gigasporales*, y lo trasladaron a nivel familia (*Gigasporaceae*) dentro de *Diversisporales*, junto a los géneros *Gigaspora*, *Scutellospora* y *Racocetra*.

Clasificación tradicional de géneros y especies basada en características de la colonización y las esporas

Tradicionalmente, los hongos MA únicamente se diferenciaban entre sí mediante las características de la colonización radical y ciertos caracteres morfológicos de las esporas, tales como su ontogenia y germinación, la conexión hifal, el número y tipo de componentes, la presencia de ornamentaciones, el tamaño y el color, y la reacción al reactivo de Melzer. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, los caracteres moleculares son una herramienta importante en la clasificación actual de las MA.

Para poder estudiar la colonización intraradical de las micorrizas se suelen utilizar diferentes metodologías de coloración de raíces (Vierheilig et al., 2005). Entre ellas, la tinción con azul de Trypan es la técnica más utilizada (Phillips y Hayman, 1970). Cuando se utiliza este colorante, las especies de los géneros *Archaeospora*, *Intraspora*, *Ambispora* y *Paraglomus* se tiñen muy débilmente (Sieverding y Oehl, 2006), mientras que si las especies pertenecen a los órdenes *Glomerales* y *Diversisporales* el tinte azul observado es más oscuro.

Desde hace más de un siglo (Gallaud, 1905) se reporta la existencia de dos morfologías de colonización denominadas *Arum* y *Paris*, según las estructuras intra-radicales formadas por los hongos MA involucradas en el intercambio de nutrientes durante la simbiosis. La colonización tipo *Arum* se caracteriza por la formación de arbuscúlos e hifas intercelulares. La morfología de los arbuscúlos difiere entre géneros. En las especies de *Gigaspora*, los arbuscúlos tienen hifas basales gruesas y ramas hifales que se afinan bruscamente (**Figura 1.3.a**), en cambio, en otros géneros los arbuscúlos tienen hifas basales más estrechas con ramas que se afinan gradualmente (**Figura 1.3.b-c**). Por otro lado, la colonización tipo *Paris* se caracteriza por desarrollar enrollamientos hifales de reducida localización intercelular (**Figura 1.3.d**) (Cuenca, 2015; Blaszkowski, 2012). Anteriormente se pensaba que el tipo de colonización dependía únicamente de la especie de MA (Smith y Smith, 1997), pero hoy se sabe que si bien existe una cierta influencia genética en la formación de uno u otro tipo de estructura (Cavagnaro et al., 2001), también depende de la anatomía radicular (como el tamaño celular y el espacio intercelular) y de la identidad de la planta hospedante (Cuenca, 2015). Actualmente se conoce que los patrones de colonización tipo *Arum* y tipo *Paris* son los dos extremos de un continuo de morfologías intermedias, denominadas enrollamientos arbusculados (**Figura 1.3.e**) (Dickson, 2004).

Determinados géneros de hongos formadores de MA, excepto los pertenecientes al orden *Gigasporales*, pueden formar vesículas dentro de las raíces hospedantes (**Figura 1.3.f**). No todas las especies de MA son capaces de formar vesículas intra-radicales, es por tal motivo que en 1990 se eliminó el término “vesicular” para referirse a la simbiosis como MA (Morton y Benny, 1990).

Otras estructuras típicas de la colonización micorrícica con valor taxonómico a nivel género, son las esporas intraradicales y las células auxiliares. Las especies del género *Rhizophagus*, como *Rhizophagus intraradices*, *R. irregularis* y *R. fasciculatus* suelen formar abundantes esporas en las raíces de sus hospedantes (**Figura 1.3.g**). En cambio, las células auxiliares en el

micelio extraradical indican la presencia de hongos MA de los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora*, pudiéndose diferenciar entre géneros según la superficie espinulada y ondulada de las células, respectivamente (**Figura 1.3.h-i**).

Por otro lado, la arquitectura del micelio extraradical, el patrón de esporulación y la dinámica de crecimiento de hongos MA cultivados en asociación a raíces transformadas son caracteres que permiten diferenciar especies, e incluso a nivel intra-específico (Fortin et al., 2002; Silvani et al., 2014) (**Figura 1.4**).

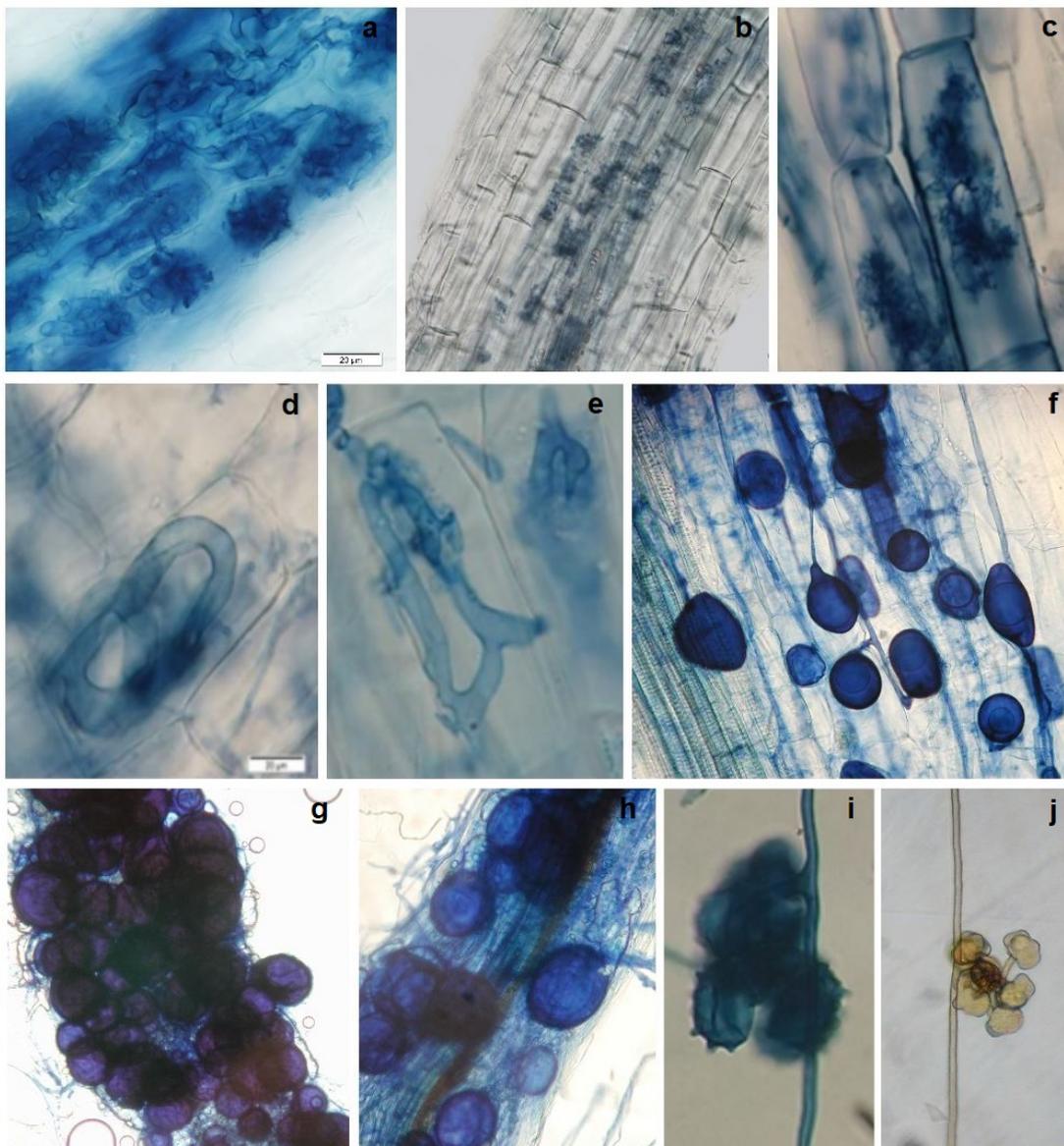


Figura 1.3: (a) Arbúsculos de *Gigaspora rosea*, cepa J1 colonizando, in vitro, raíces transformadas de zanahoria (BGIV); (b). arbúsculos de *Paraglomus* sp. colonizando raíces de *Puccinellia frígida*; arbúsculos (c), enrollamientos hifales (d) y enrollamientos arbusculados (e) en una misma muestra de raíz aislada de suelos de Río Cuarto, Córdoba (Argentina); (f) vesículas de *Rhizophagus* intraradicales cepa GA2 colonizando, in vivo, raíces de tomate (BGIV); esporas intra-radicales de *Rhizophagus* sp. GX11 (g), y GX9 (h); (i) células auxiliares de *Gigaspora* sp. colonizando raíces de maíz; (j) células auxiliares de *Scutellospora* heterogama in vitro (cepa BGIV-IVIC).

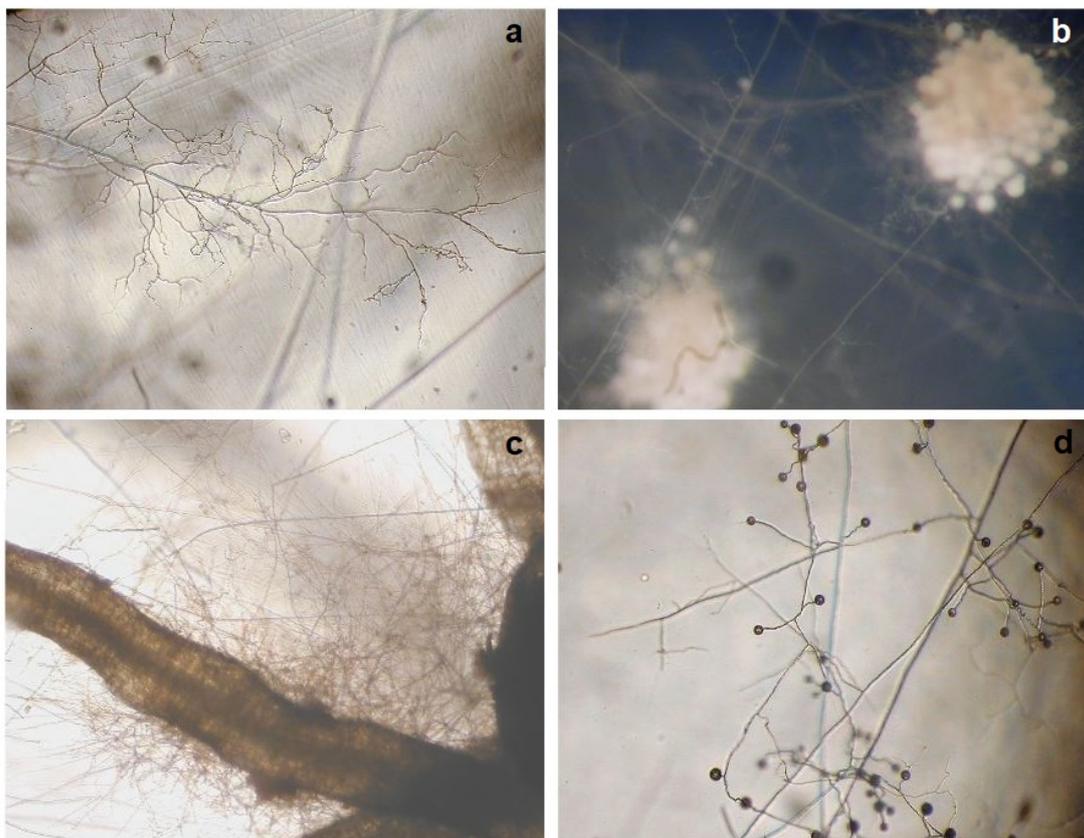


Figura 1.4: Diferentes arquitecturas de micelio extra-radical y patrones de esporulación de hongos MA creciendo in vitro (BGIV) (a) *Rhizophagus fasciculatus* GX5, (b) *Rhizophagus* sp. GB3, (c) *Rhizophagus* sp. GA8, (d) *Rhizophagus* sp. GA4.

1) Número y tipo de componentes de la pared de la espora

Paredes o capas son las diferentes acepciones utilizadas por los autores para referirse a estos componentes de la pared de las esporas de hongos MA de alto valor taxonómico. Los autores que se refieren a las mismas como “paredes” describen meramente la estructura presente (Walker, 1983), mientras que el término “capas” está más relacionado con su naturaleza u origen. La descripción del número y tipo de paredes de una espora es clave para su identificación taxonómica (**Figura 1.5**). A continuación se describen las características generales de los tipos de pared más frecuentemente observados (Walker, 1983, Berch y Koske, 1986, Spain et al., 1989, Brunnett et al., 1996, Cuenca, 2015):

- Componente evanescente: capa única, que suele encontrarse entera, en partes o perderse totalmente a la madurez de la espora. Puede ser mucilaginoso.
- Componente unitario: capa única, rígida.
- Componente laminado: rígida, compuesta por varias capas que se van depositando durante la maduración de la espora.
- Componente membranoso: capa única, muy delgada, flexible e incolora que se arruga o colapsa en alcohol polivinilo- ácido láctico- glicerol (PVLG).

- Componente amorfo: es una capa interior de la espora, incolora, plástica, de tonalidades púrpuras con el reactivo de Melzer.
- Componente germinal (únicamente para el género *Gigaspora*): si bien parece una lámina más de la pared laminada, previamente a la germinación de la espora, produce unas papilas.

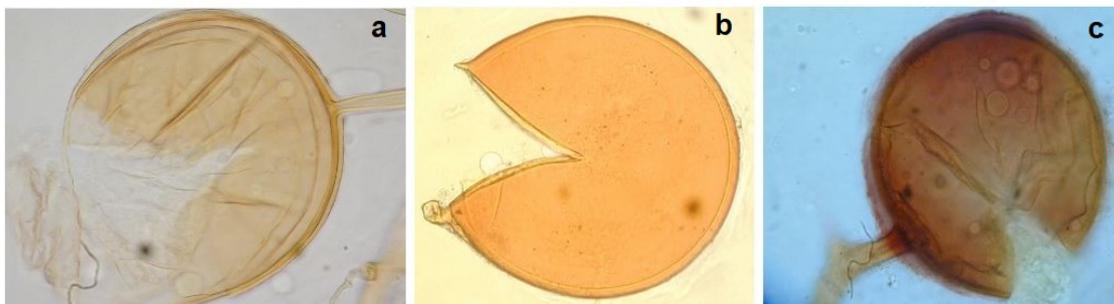


Figura 1.5: (a) Espora rota de *R. intraradices* montada en PVLG, notar el componente de la pared más interno laminado; (b) espora de *Glomus* sp. con pared unitaria; (c) Espora de *Rhizophagus* sp. en PVLG más Melzer con un componente evanescente de la pared.

2) Ornamentación de las paredes

Las ornamentaciones pueden encontrarse en los componentes más externos de la pared de las esporas de casi todos los géneros de MA, excepto en *Gigaspora*. Hay muchas ornamentaciones posibles (espinas, papilas, báculos, domos, muros, cavidades, etc.), pudiendo presentar más de un tipo por especie (**Figura 1.6**).

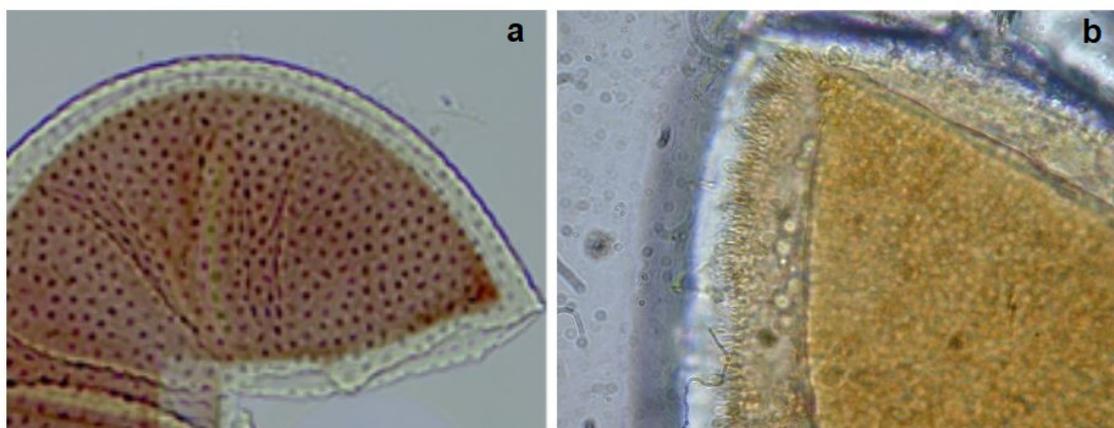


Figura 1.6: Tipos de ornamentaciones en las paredes de las esporas: (a) depresiones cóncavas de *Acaulospora scrobiculata*; (b) espinas de *Entrophospora infrequens*.

3) Conexión hifal y ontogenia de las esporas

La conexión hifal de las esporas está directamente relacionada con su ontogenia. Las esporas pueden ser sésiles (sin conexión hifal visible); éstas se forman a partir de un sáculo esporógeno, como es el caso del género *Acaulospora*, *Archaeospora* y *Entrophospora* (**Figura 1.7.a**) o a

través de un pedicelo formado al extremo de un sáculo esporífero (*Ambispora*). En caso de presentar hifa sustentora o conexión hifal, las mismas pueden presentar morfologías variables. Cuando la espora se forma sobre un suspensor bulboso se dice que la conexión hifal es bulbosa (*Gigasporaceae*) (**Figura 1.7.b**), si en cambio se forma en el extremo terminal de una hifa, de mayor o menor grosor, la conexión con la espora será recta (*Diversispora*, *Glomus*, *Rhizophagus*, *Paraglomus*, etc) (**Figura 1.7.c**). Las esporas pueden formarse también, ordenadamente, alrededor de un plexo central formando esporocarpos (*Sclerocystis*) (**Figura 1.7.d**).

A su vez, muchas especies, particularmente del orden *Glomerales*, forman esporas a partir de ramificaciones hifales simples (**Figura 1.7.e**) o en estructuras hifales ramificadas llamadas en inglés *Branched absorbing structures* “BAS” (**Figura 1.7.f**) en una posición terminal o intercalar de la hifa.

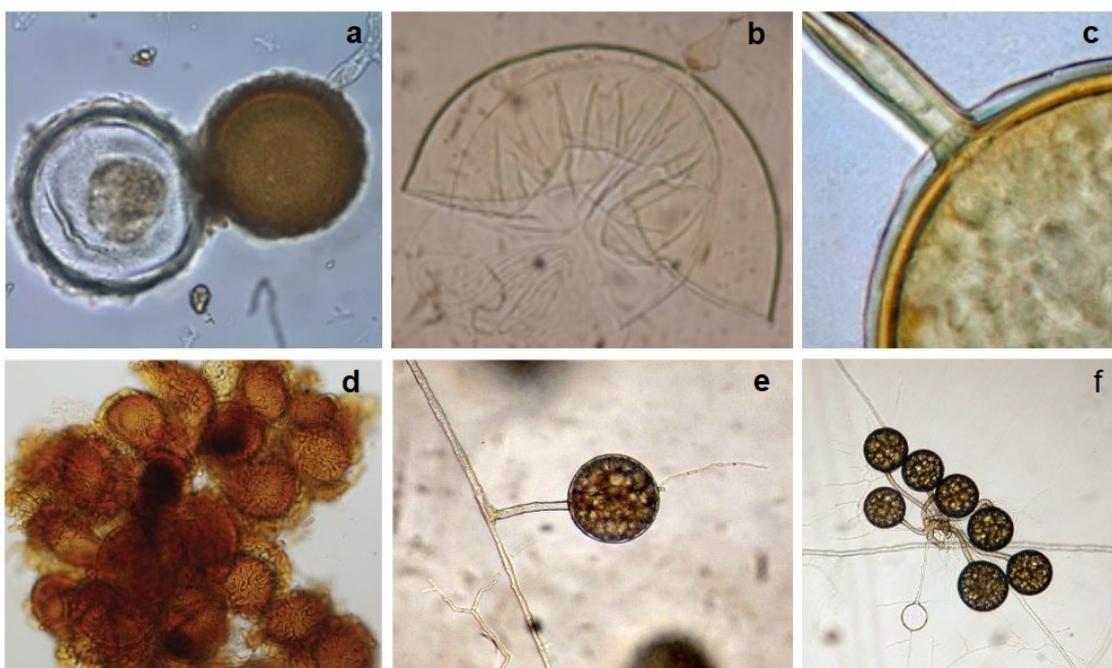


Figura 1.7: Formación de esporas: (a) en *E. infrequens* a partir de un sáculo esporífero; (b) en *Scutellospora pellucida* a partir de un suspensor bulboso; (c) en *R. intraradices* cepa GB2 (BGIV); (d) en *Sclerocystis sinuosa* a partir de un plexo central; (e) en *R. intraradices* cepa GB2 formada a partir de una ramificación simple; (f) en *R. fasciculatus* cepa GX8 formadas a partir de una “BAS”.

4) Germinación de las esporas

La germinación de la espora se da a través de la formación de un tubo germinativo, el cual puede emerger de diferentes maneras (Cuenca, 2015): desde el lumen de la hifa soporte o directamente de la pared de la hifa (*Glomerales*) (**Figura 1.8.a**), a partir de una estructura especializada frágil con forma espiral (*Acaulospora* y *Pacispora*), desde una pared germinal en la espora (*Gigaspora*) (**Figura 1.8.b**) o a partir de escudos germinativos (*Scutellospora* y *Racocestra*) (**Figura 1.8.c**).



Figura 1.8: Germinación de esporas de hongos MA a partir de: (a) el lumen de la hifa de la espóra de *Claroideoglopus etunicatum*; (b) desde la pared germinal de *Gigaspora gigantea*, cepa JX1 (BGIV) (foto cortesía de la Lic. Pégola Mariana FCEyN-UBA); (c) un escudo de germinación de *S. heterogama*.

5) Reacción en Melzer

En algunos casos, uno o más componentes de la pared de las esporas reaccionan al reactivo de Melzer tomando coloraciones rojizas o moradas. Sin embargo, este cambio de coloración varía con la madurez o la viabilidad de las esporas (**Figura 1.9**).

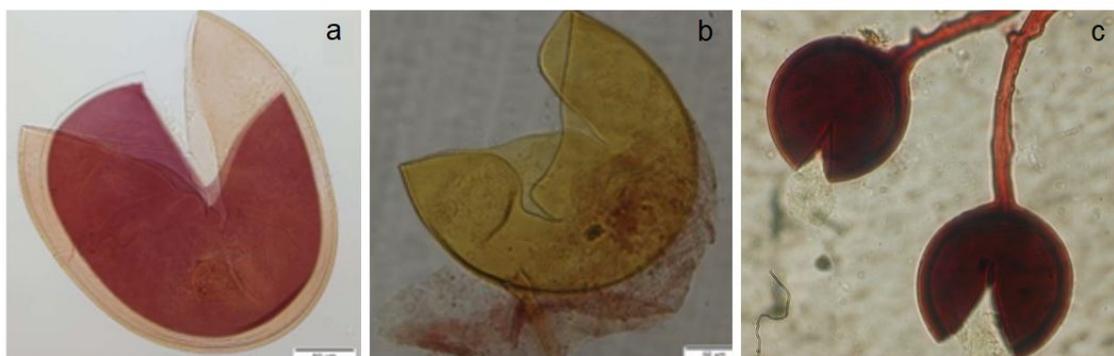


Figura 1.9: Coloración de las paredes de *S. pellucida* (a), *F. mosseae* (b) y (c) *R. fasciculatus* en presencia del reactivo de Melzer.

6) Tamaño, forma y color

Para determinar el tamaño, forma y color de las esporas es necesario evaluar numerosos individuos de forma tal de observar todo el rango posible de valores. El tamaño de las esporas puede variar entre 30 y 500 μm y suele medirse en microscopio con ocular micrométrico teniendo en cuenta el largo y el ancho de las esporas, aún más en aquellos casos en que la forma sea irregular. Las formas que suelen observarse suelen ser globosas, o subglobosas, elipsoidales o irregulares.

El color de las esporas se determina en agua comparando con alguna carta de colores publicada, como la carta Munsell (1905), para eliminar subjetividades. Los mismos pueden variar en una gama entre hialina y marrón oscuro (casi negro). Siempre se observa el color en agua. Hay que tener en cuenta, que tanto tamaño como color, en algunas especies, suelen variar ampliamente según los estados madurativos de la espóra (**Figura 1.10**).



Figura 1.10: Conjunto de esporas de hongos MA aisladas a partir de 50 g de suelo de la Pampa Ondulada, mediante la técnica de tamizado húmedo y decantación.

¿Qué se sabe de la genética de los hongos MA?

Pese a la importancia de los hongos MA, aún se desconoce o se encuentra en debate gran parte de su genética, como el nivel de ploidía y el número de cromosomas, la incidencia de la meiosis, los mecanismos de intercambio genético, la existencia de recombinación o segregación genética. Este escaso conocimiento podría deberse a que gran parte de las investigaciones se realizan sobre los grupos *Ascomycota* y *Basidiomycota*. Y por otro lado, el carácter de simbiote obligado de las MA complica la obtención de material genético puro y en abundancia, así como la presencia de endobacterias y virus en los propágulos de algunas especies (Turina et al., 2018). A su vez, el tiempo entre generaciones suele ser muy largo en comparación a otras familias de hongos, dificultando los experimentos genéticos de varias generaciones. Por último, la aparente ausencia de meiosis no permite experimentos de tipo mendelianos, tan ampliamente utilizados para realizar estudios genéticos. Tampoco se han logrado con éxito transformaciones genéticas a causa de sus múltiples núcleos y diversidad de genes.

El concepto biológico de “especie” no es totalmente apropiado para los hongos MA ya que no hay reproducción sexual probada. La asexualidad conlleva a una evolución de individuos genéticamente distantes (ya que no sucede un entrecruzamiento unificador), derivado en jerarquías genealógicas más complejas, tales como especies fisiológicas o ecotipos. Actualmente existen numerosas teorías que intentan explicar la inusual longevidad evolutiva del *Phylum Glomeromycota* con una reproducción asexual sin acumulación de mutaciones perjudiciales que los condujera a la extinción. La hipótesis heteriocariótica, la posible existencia de eventos de apareamiento convencional de núcleos, el intercambio de núcleos por anastomosis de las hifas, la larga historia de coevolución con sus hospedantes vegetales, son algunas de ellas (Corradi y Brachmann, 2017).

Existen aproximadamente 230 especies fenéticas descritas, pero se cree que el número de especies debería ser mucho mayor al comparar el número de especies filogenéticas (o unidades evolutivas). La dificultad para obtener cultivos puros de la gran mayoría de las especies de MA y la escasez de caracteres morfológicos es lo que limita su correcta identificación. Como consecuencia de todo esto, hoy en día existen pocos estudios filogenéticos con base morfológica, mientras que los estudios filogenéticos con base molecular están en pleno auge, sin embargo, la elevada diversidad intraespecífica complica el hallazgo de marcadores moleculares que permitan una identificación inequívoca de las “especies”. Los genes más utilizados para filogenia son los genes nucleares que codifican para ARN ribosómicos (ARNr). Existen tres subunidades codificantes en el ARN ribosomal: 18S (Subunidad pequeña: SSU), 5.8S y 28S (Subunidad grande: LSU). Las secuencias no codificantes que se encuentran entre las tres subunidades, son conocidas como espaciadores internos de transcripción o regiones ITS (en inglés *internal transcribed spacer*). Si bien estas regiones ITS son de gran importancia filogenética para otros grupos de hongos, en el caso de los miembros de *Glomeromycota*, no siempre logran distinguir variaciones intraespecíficas. Se considera que para lograr una separación filogenética eficiente de los taxones se requieren secuencias de al menos 1500pb.

En resumidas cuentas, ¿Qué es lo que sí se sabe sobre la genética de los hongos MA? Los hongos *Glomeromycota* son organismos multinucleados, capaces de formar esporas unicelulares con decenas a miles de núcleos en su interior. La cantidad de ADN por núcleo (medido por fluorometría) es muy variable a nivel de género y mucho más abundante que en otros hongos (Gianninazzi-Pearson et al., 2001). El estudio del genoma de dos especies indicó que son más grandes que los de otros hongos, y codifican para más de 28000 proteínas en el caso *Rhizophagus irregularis* (Hijiri y Sanders, 2004 y 2005, Turina et al., 2018). El número de cromosomas se estudió en una sola especie (*R. intraradices*) y se determinó que al menos son cuatro (Hijiri et al., 2007).

La variabilidad genética, basándose en genes ribosomales, es muy alta tanto a nivel intraespecífico (individuos de la misma especie), como intra-individuo (esporas de un mismo individuo), e intra-celular (núcleos de una misma espora). Se comprobó que la anastomosis e intercambio de núcleos entre individuos de la misma cepa y de cepas diferentes de la misma especie

aisladas de un mismo sitio, son de importancia para el manteniendo de la variabilidad y diversidad genética en estos organismos clonales (Giovanetti et al., 2004, Croll et al., 2009).

El análisis de los genomas de 9 especies demostró una alta repetición de las secuencias a lo largo de la cadena de ADN, un contenido relativamente bajo de las bases guanina y citosina (35 %) y altos niveles de metilcitosina (Lanfranco y Young, 2012; Boon et al., 2015). Finalmente, en los últimos años se han estudiado con mayor profundidad los mecanismos moleculares involucrados en el establecimiento exitoso de la micorrización, particularmente en relación a la señalización molecular entre huésped y hospedante y la existencia de genes y rutas de señalización específicos de la simbiosis, compartidos con otros microorganismos como rizobios (Parniske, 2008, Luginbuehl y Oldroyd, 2017), siendo este apartado desarrollado ampliamente en el Capítulo 2.

Líneas de investigación actuales

Las principales líneas de investigación sobre micorrizas arbusculares que se desarrollan actualmente presentan los siguientes enfoques:

- a) Agronomía: promoción del crecimiento en plantas de importancia económica, alimentaria y cultural;
- b) Ecología: dinámica de las comunidades fúngicas, su importancia en la estructura dinámica de las comunidades vegetales y ecosistemas;
- c) Taxonomía y Sistemática: inventario de la diversidad de hongos MA y especificidad que pudiera haber con determinadas especies vegetales;
- d) Biología Molecular: herramienta para el conocimiento de la sistemática y la ecología de los hongos MA y la determinación de sus relaciones filogenéticas;
- e) Fisiología de la simbiosis: factores de señalización entre el hongo y la planta, mecanismos de captación y traslocación de los nutrientes;
- f) Biotecnología: manejo de las cepas fúngicas para uso en agronomía y en la restauración de ecosistemas naturales;
- g) Ciencias Ambientales: biorremediación, restauración, rehabilitación o reasignación de ecosistemas deteriorados.

Referencias

Allen, M. F., y Allen, M. F. (1991). *The ecology of mycorrhizae*. Cambridge University Press.

- Ames, R. N., y Schneider, R. W. (1979). *Entrophospora*, a new genus in the *Endogonaceae* (Fungi). *Mycotaxon*, 68, 165–184.
- Bary, A., y Garnsey, H. E. F. (1887). Comparative morphology and biology of the fungi, mycetozoa and bacteria (Vol. 2). *Clarendon Press*, 358-366.
- Berch, W. N. y Koske, R. E. (1986). *Glomus pansihalos* a new species in the *Endogonaceae*, Zygomycetes. *Mycologia*, 78, 832–836.
- Berkeley, M. J., y Broome, C. E. (1873). Enumeration of the Fungi of Ceylon. Part II. Containing the remainder of the *Hymenomyces*, with the remaining established tribes of Fungi. *Journal of the Linnean Society of London Botany*, 14(73), 65–140.
- Bethlenfalvay, G. J., y Linderman, J. A. (1992). Mycorrhizae and crop productivity. *Horticultural Crops Research Laboratory*, USDA-ARS.
- Błaszowski, J. (2003). arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota), Endogone and Complexipes species deposited in the department of Plant Pathology, university of agriculture in szczecin, Poland. Address: <http://www.agro.ar.szczecin.pl/wjblaszowski>.
- Błaszowski, J., Blanke, V., Renker, C., y Buscot, F. (2004). *Glomus aurantium* and *G. xanthium*, new species in *Glomeromycota*. *Mycotaxon*, 90, 447–467.
- Błaszowski, J., Kovács, G. M., Balázs, T. K., Orłowska, E., Sadravi, M., Wubet, T., y Buscot, F. (2010). *Glomus africanum* and *G. iranicum*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). *Mycologia*, 102, 1450–1462
- Błaszowski, J. (2012). Life cycle, significance, and structures of arbuscular mycorrhizae. En: *Glomeromycota*, 15-17. Polonia. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Science.
- Błaszowski, J., Furrázola Gómez, E., Chwat, G., Kozłowska, A., Lukács, F. A., y Kovács, G. (2015). Three new arbuscular mycorrhizal *Diversispora* species in *Glomeromycota*. *Mycological Progress*, 14, 105.
- Błaszowski, J., Kozłowska, A., Niezgodna, P., Goto, B. T., y Dalpé, Y. (2018). A new genus, *Oehlia* with *Oehlia diaphana* comb. nov. and an emended description of *Rhizoglomus vesiculiferum* comb. nov. in the *Glomeromycotina*. *Nova Hedwigia*, 107.
- Boon, E., Halary, S., Bapteste, E., y Hijri, M. (2015). Studying Genome Heterogeneity within the Arbuscular Mycorrhizal Fungal Cytoplasm. *Genome Biology and Evolution*, 7(2), 505–521.
- Bowen, G. D. (1987). The biology and physiology of infection and its development.
- Brundrett, M. C., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., y Malajczuk, N. (1996). Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Australian Centre for International Agriculture Research, Pirie Printers. Australia.
- Burggraaf, A. J. P., y Beringer, J. E. (1987). Nuclear division and VA-mycorrhizal in-vitro culture. In *Mycorrhizae in the next decade: Practical applications and research priorities; Proceedings of the 7th North American conference on mycorrhizae*, 190. University of Florida.
- Cavagnaro, T. R., Gao, L. L., Smith, F. A., y Smith, F. E. (2001). Morphology of arbuscular mycorrhizas is influenced by fungal identity. *New Phytologist*, 151, 469-475.
- Cavalier-Smith, T. (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biological review*, 73(3), 203–266.

- Corradi, N., y Brachmann, A. (2017). Fungal Mating in the Most Widespread Plant Symbionts? *Trends in Plant Science*, 22(2), 175–183. doi:10.1016/j.tplants.2016.10.010.
- Croll, D., Giovannetti, M., Koch, A. M., Sbrana, C., Ehinger, M., Lammers, P. J., y Sanders, I. R. (2009). Nonself vegetative fusion and genetic exchange in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist*, 181(4), 924-937.
- Cuenca, G. (2015). Taxonomía y biodiversidad de los hongos micorrízico-arbusculares (HMA). En: *Las micorrizas arbusculares. Aspectos teóricos y aplicados*, 45-90. Caracas. Ediciones IVIC.
- Dickson, S. (2004). The *Arum-Paris* continuum of mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*, 161, 187-200.
- Finlay, R. D. (2008). Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal of Experimental Botany*, 59, 1115-1126.
- Fortin, J. A., Bécard, G., Declerck, S., Dalpé, Y., St-Arnaud, M., Coughlan, A. P., y Piché, Y. (2002). Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. *Canadian Journal of Botany*, 80, 1-20.
- Frank, B. (1885). Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 3, 128–145.
- Frioni, L. (2006). Microbiología, básica, ambiental y agrícola, Lillian Frioni. 291-308.
- Gallaud, I. (1905). Études sur les mycorrhizes endotrophes. *Revue Générale de Botanique*, 17, 5–48.
- García, M. H. (2009). Las micorrizas: una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años. In *Anales del jardín botánico de Madrid*, 66(1), 133-144. Real Jardín Botánico.
- Genre, A., Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P., y Barker, D. (2005). Arbuscular Mycorrhizal Fungi Elicit a Novel Intracellular Apparatus in *Medicago truncatula* Root Epidermal Cells before Infection. *Plant Cell*, 17(12), 3489-3499.
- Gerdemann, J. W., y Trappe, J. M. (1974). The Endogonaceae in the Pacific Northwest. *Mycologia Memoirs*, 5, 1–76.
- Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V., y Dexheimer, J. (1979). Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. III. Ultrastructural localization of acid and alkaline phosphatase in onion roots infected by *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.). *New Phytologist*, 82, 127-132.
- Gianinazzi-Pearson, V., van Tuinen, D., Dumas-Gaudot, E., y Dulieu, H. (2001). Exploring the genome of Glomalean fungi. En: Hock, B. (Ed.) *The Mycota IX. Fungal Associations* (3-17). Berlin. Springer-Verlag.
- Giovanetti, M., Sbrana, C., Avio, L., y Strani, P. (2004). Patterns of below-ground plant interconnections established by means of arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytologist*, 164, 175-181.
- Goto, B. T., Silva, G. A., Assis, D., Silva, D. K., Souza, R. G., Ferreira, A. C., y Oehl, F. (2012). *Intraornatosporaceae* (*Gigasporales*), a new family with two new genera and two new species. *Mycotaxon*, 119(1), 117–132.

- Harley, J. L., y Smith, S. E. (1983). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press Inc.
- Hijri, M., y Sanders, I. R. (2004). The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is haploid and has a small genome size in the lower limit of eukaryotes. *Fungal Genetics and Biology*, 41, 253-261.
- Hijri, M., y Sanders, I. R. (2005). Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei. *Nature*, 433, 160-163.
- Hijiri, M., Niculita, H., y Sanders, I. R. (2007). Molecular characterization of chromosome termini of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (*Glomeromycota*). *Fungal Genetics and Biology*, 44, 1380-1386.
- Johnson N. C., Graham J. H., y Smith F. A. (1997). Functioning of mycorrhizal association along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist*, 135, 575-585.
- Krüger, M., Krüger, C., Walker, C., Stockinger, H., y Schüßler, A. (2012). Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytologist*, 193, 970-984.
- Janfranco, L., y Young, J. P. W. (2012). Genetic and genomic glimpses of the elusive arbuscular mycorrhizal fungi. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(4), 454-461.
- Luginbuehl, L. H., y Oldroyd, G. E. D. (2017). Understanding the arbuscule at the heart of Endomycorrhizal symbioses in plant. *Current Biology*, doi: 10.1016/j.cub.2017.06.042.
- Martínez, J. G., y de Aguilar Cormenzana, J. M. (2004). Las micorrizas, nuestras aliadas ocultas. *Fertilidad de la tierra: revista de agricultura ecológica*, 17, 9-13.
- Morton, J. B. (1988). Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: classification, nomenclature, and identification. *Mycotaxon*, 32, 267–324.
- Morton, J. B., y Benny, G. L. (1990). Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Zygomycetes*): a new order, *Glomales*, two new suborders, *Glomineae* and *Gigasporineae*, and two new families, *Acaulosporaceae* and *Gigasporaceae*, with an emendation of *Glomaceae*. *Mycotaxon*, 37, 471–491
- Morton, J. B., y Redecker, D. (2001). Two new families of *Glomales*, *Archaeosporaceae* and *Paraglomaceae*, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia*, 93(1), 181-195.
- Mosse, B. (1953). Fructifications associated with mycorrhizal strawberry roots. *Nature*, 171(4361), 974–974.
- Mosse, B., y Bowen, G. D. (1968). A key to the recognition of some Endogone spore types. *Transaction British Mycology Society*, 51, 469–483.
- Munsell, A. H. (1905). A color notation. G.H. Ellis Company.
- Oehl, F., y Sieverding, E. (2004). *Pacispora*, a new vesicular arbuscular mycorrhizal fungal genus in the *Glomeromycetes*. *Journal of Applied Botany and Angewandte Botanik*, 72, 72–82.
- Oehl, F., Silva, G. A. D., Goto, B. T., Costa Maia, L., y Sieverding, E. (2011a). *Glomeromycota*: two new classes and a new order. *Mycotaxon*, 116, 365–379
- Oehl, F., Silva, G. A. D., Goto, B. T., y Sieverding, E. (2011b). *Glomeromycota*: three new genera and glomoid species reorganized. *Mycotaxon*, 116(1), 75–120.

- Oehl, F., Silva, G. A. D., Sánchez-Castro, I., Goto, B. T., Maia, L. C., Vieira, H. E. E., y Palenzuela, J. (2011c). Revision of Glomeromycetes with entrophosporoid and glomoid spore formation with three new genera. *Mycotaxon*, 117(1), 297–316.
- Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 763.
- Phillips, J. M., y Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55(1), 158–160
- Read, D. J. (1991). Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia*, 47, 376–391.
- Redecker, D., Kodner, R., y Graham, L. E. (2000a). Glomalean fungi from the Ordovician. *Science*, 289(5486), 1920–1921.
- Redecker, D., Morton, J. B., y Bruns, T. D. (2000b). Molecular phylogeny of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus sinuosum* and *Sclerocystis coremioides*. *Mycologia*, 92, 282–285.
- Redecker, D., Schüßler, A., Stockinger, H., Stürmer, S., Morton, J., y Walker, C. (2013). An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). *Mycorrhiza*, 23(7): 515–531.
- Schüßler, A., Schwarzott, D., y Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, 105, 1413–1421.
- Schüßler, A., y Walker, C. (2010). The *Glomeromycota*: a species list with new families and new genera. The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University.
- Sieverding, E., y Oehl, F. (2006). Revision of *Entrophospora* and description of *Kuklospora* and *Intraspora*, two new genera in the arbuscular mycorrhizal *Glomeromycetes*. *Journal of Applied Botanical Food Quality*, 80(1), 69–81.
- Silvani, V. A., Fernández Bidondo, L., Bompadre, M. J., Colombo, R. P., Pérgola, M., Bompadre, A. Fracchia, S., y Godeas, A. M. (2014). Growth dynamics of geographically different arbuscular mycorrhizal fungal isolates belonging to the ‘*Rhizophagus* clade’ under monoxenic conditions. *Mycologia*, 106(5), 963–975.
- Simard S. W., y Durall D. M. (2004). Mycorrhizal networks: a review of their extent, function, and importance. *Canadian Journal of Botany*, 82, 1140–1165.
- Simon, L., Bousquet, J., Levesque, R. C., y Lalonde, M. (1993). Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature*, 363, 67–69.
- Smith, F.A., y Smith, S.E. (1997). Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*, 137, 373–388.
- Smith, S.E., y Read, D. J. (1997). *Mycorrhizal Symbiosis*. 1ra edición. New York. Academic Press.
- Smith, S. E., y Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. 3ra edición. New York. Academic Press.
- Spain, J. L., Sieverding, E., y Schenck, N. C. (1989). *Gigaspora ramisporophora*: A new species with novel sporophores from Brazil. *Mycotaxon*, 18, 443–455.

- Spatafora, J. W., Chang, Y., Benny, G. L., Lazarus, K., Smith, M. E., Berbee, M. L., Bonito, G., Corradi, N., Grigoriev, I., Gryganskyi, A., y James, T. Y. (2016). A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108, 1028–1046.
- Strulle-Derrien, C., Selosse, M. A., Kenrick, P., y Martin, F. M. (2018). The origin and evolution of mycorrhizal symbioses: from palaeomycology to phylogenomics. *New Phytologist*, 220(4), 1012–1030.
- Tedersoo, L., Sánchez-Ramírez, S., Kõljalg, U., Bahram, M., Döring, M., Schigel, D., May, T., Ryberg, M., y Abarenkov, K. (2018). High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. *Fungal Diversity*, 90, 135–159.
- Thaxter, R. (1922). A revision of the Endogonaceae. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences*, 57, 291–351.
- Tulasne, L. R., y Tulasne, C. (1844). Fungi Nonnulli hypogaei, novi v. minus cogniti. *Giornale Botanico Italiano*, 2(7-8), 55–63.
- Tulasne, L. R., y Tulasne, C. (1851). Fungi Hypogaei: Histoire et Monographie des Champignons Hypogés: 1–222, Klincksieck, Paris.
- Turina, M., Ghignone, S., Astolfi, N., Silvestri, A., Bonfante, P., y Lanfranco, L. (2018). The virome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* reveals the first report of DNA fragments corresponding to replicating non-retroviral RNA viruses in fungi. *Environmental Microbiology*, 20(6), 2012–2025.
- Vierheilig, H., Schweiger, P., y Brundrett, M. (2005). An overview of methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in roots. *Physiologia Plantarum*, 125, 393–404.
- Walker, C. (1983). Taxonomic concepts in the *Endogonaceae*; spore wall characteristics in species descriptions. *Mycotaxon*, 18, 443–455.
- Walker, C. H., y Sanders, F. E. (1986). Taxonomic concepts in the *Endogonaceae*. III. The separation of *Scutellospora* gen. nov. from *Gigaspora* Gerd. & Trappe. *Mycotaxon*, 27, 169–182.
- Walker, C., Vestberg, M., Demircik, F., Stockinger, H., Saito, M., Sawaki, H., y Schüßler, A. (2007). Molecular phylogeny and new taxa in the *Archaeosporales* (*Glomeromycota*): *Ambispora fennica* gen. sp. nov., *Ambisporaceae* fam. nov. and emendation of *Archaeospora* and *Archaeosporaceae*. *Mycological Research*, 111(2), 137–153.
- Wang, B., y Qiu, Y. L. (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, 16(5), 299–363.
- Wellman, C. H., Osterloff, P. L., y Mohiuddin, U. (2003). Fragments of the earliest land plants. *Nature*, 425, 282–285.

CAPÍTULO 2

¿Cómo se establece la simbiosis?

Marcela Ruscitti y Mario Saparrat

En este capítulo se explicará cómo se realiza la simbiosis micorrícica, desde la germinación de las esporas, la función del micelio presimbótico y la conexión que se establece entre la planta y el hongo mediante los exudados radicales. Se profundizará también en el proceso de colonización, la formación del apresorio, el desarrollo de los arbusculos y el crecimiento intraradical y extraradical (formación del micelio externo).

Comunicación entre las plantas y los hongos micorrícicos arbusculares

La interacción de las plantas con los hongos micorrícicos arbusculares depende de señales bioquímicas específicas, en todas las fases del desarrollo de la simbiosis, que permiten el reconocimiento, la colonización y el intercambio de nutrientes (Kogel, 2008). La simbiosis entre la planta y el hongo requiere de un reconocimiento y una armonización de procesos en el espacio y en el tiempo que son complejos, los cuales conducen al establecimiento de esta relación simbiótica (Harrison, 2005; Requena et al., 2007).

El ciclo de vida de los hongos micorrícicos arbusculares está conformado por varios pasos, algunos de los cuales dependen de la presencia de una planta hospedante, como el reconocimiento, la señalización y comunicación entre el hongo y la planta y el proceso completo de colonización; mientras que la germinación de las esporas y el crecimiento inicial de las hifas no necesariamente dependen de la presencia de la planta (Giovannetti et al., 1993).

Las plantas aún no micorrizadas envían las primeras señales al hongo, especialmente si están creciendo en un ambiente deficiente en fósforo (P) (Ramírez Gómez y Rodríguez Villate, 2010). En esta fase presimbótica o asimbiótica se presentan señales bioquímicas relacionadas con compuestos volátiles que forman parte de los exudados de las raíces. Uno de ellos es el CO₂ (Bécard y Piché, 1989). Estudios fisiológicos han mostrado que, aunque la espora tiene capacidad de almacenar esqueletos carbonados en forma de lípidos y azúcares, el CO₂ es una de las fuentes de carbono necesario para el crecimiento de la hifa (Bago et al., 2000).

Durante la fase presimbiótica, muchos factores como un determinado entorno rizosférico, el contenido de flavonoides, la presencia de microorganismos del suelo, pueden inducir la germinación de las esporas y promover el crecimiento de las hifas sin la presencia de la planta hospedante (Gianinazzi-Pearson et al., 1996; Graham et al., 1982). Los exudados de la raíz pueden aumentar la longitud y el grado de ramificación de las hifas y juegan un papel importante en las interacciones planta-microorganismo en la rizósfera (Karin Hage-Ahmed et al., 2013).

Cuando una espora de un hongo micorrícico germina, la hifa germinal se ramifica en todas las direcciones para incrementar la probabilidad de éxito para encontrar raíces (**Figura 2.1**). Sin embargo, en ausencia del hospedante, la viabilidad de esta estructura fúngica resultante se limita a un periodo de 20 a 30 días. Después de este lapso, varias modificaciones morfológicas como la retracción del citoplasma de los ápices, la producción de septos adventicios y el desarrollo de ramas laterales son evidencias asociadas a la posterior reversión al estado esporístico de latencia (Bonfante y Perotto, 1995).

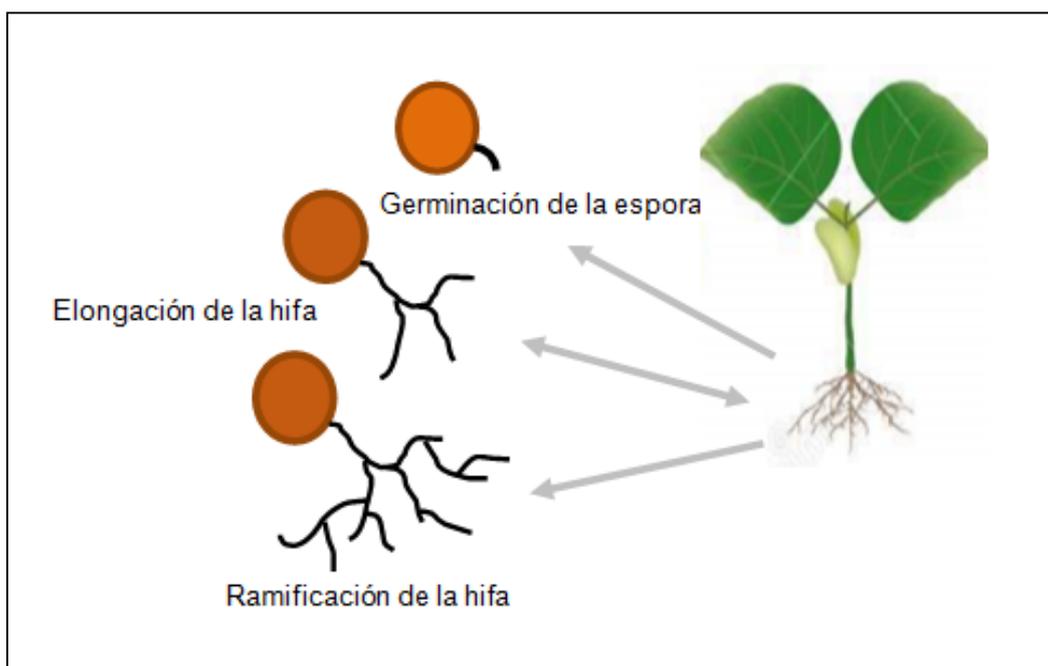


Figura 2.1: Representación esquemática del proceso de germinación de las esporas, elongación y ramificación de las hifas, las flechas representan las interacciones entre la planta y el hongo en cada etapa.

La percepción de las señales correctas, provenientes de las raíces de la planta, promueven la morfogénesis diferencial que consiste en una ramificación profusa de hifas y su proliferación. En ausencia de tales señales, no ocurre ninguna morfogénesis ni formación del apresorio, estructura a través de la cual penetrará el hongo a la raíz. Los exudados de las raíces contienen diferentes tipos de compuestos, incluidos unos con acción hormonal que favorecen la germinación de esporas, el crecimiento y ramificación de la hifa germinativa y la localización de las raíces del hospedero (Akiyama et al., 2005; Hause et al., 2007; Requena

et al., 2007). Se ha demostrado que los flavonoides como naringenina, apigenina, quercitina y las isoflavonas estimulan el crecimiento de hifas *in vitro*. También se sugiere que estos compuestos promueven la interacción entre células durante las primeras fases de la simbiosis (Sharma y Johri, 2002).

Según Elias y Safir (1987) la estimulación de los exudados sobre la elongación hifal es mayor en plantas deficientes en fósforo (P). En resultados obtenidos por ellos, se presentaron grandes diferencias en cuanto al crecimiento hifal en plantas con ausencia de este elemento. Estos autores sugieren que la acción estimulante sobre el crecimiento hifal se debe a la calidad de los exudados de las plantas más que a la cantidad liberada, debido a que en este tiempo la longitud del sistema radical y la cantidad de exudados tanto de plantas deficientes y no deficientes en P fue similar.

Cuando las plantas interactúan con los microorganismos del suelo, se inicia una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos que no ocurren en su totalidad cuando un hongo MA coloniza la planta. Esto soporta la hipótesis de que el hongo emite señales que reconoce la planta para que ésta no inicie una reacción de defensa (Gadkar et al., 2001). Por otro lado, según Ramírez Gómez y Rodríguez Villate (2010) la existencia de plantas no hospedadas (micofóbicas) es una de las evidencias de que los hongos MA pueden generar respuestas de defensa en las plantas y el uso de mutantes Myc (carentes de la habilidad para sintetizar factores de micorrización) ha permitido observar la acumulación de calosa, producción de proteína PR1 y fenoles en la planta como respuesta a los hongos micorrícicos.

En estadios tempranos, una vez que la planta percibe el elicitador (molécula o compuesto que induce la activación de los mecanismos de respuesta) del hongo, se presentan señales de transducción y activación de genes de defensa (García-Garrido y Ocampo, 2002). La pregunta de cómo se establece la interacción entre simbiosis sin disparar eventos de rechazo, ha generado diversos estudios al respecto. Akiyama et al. (2005) identificaron y caracterizaron los compuestos químicos en los exudados de la raíz que inducen cambios morfogénéticos en la hifa germinal. Estos cambios son cruciales al convertir los tubos germinales con potencial de crecimiento limitado, en micelio presimbótico que tiene la capacidad de iniciar la colonización de las raíces. Los cambios incluyen una alteración rápida en la expresión de genes y un aumento en la actividad mitocondrial (Lohse et al., 2005). Los compuestos activos son estrigolactonas (ES) y son efectivas a concentraciones extremadamente bajas. Las estrigolactonas han sido aisladas de raíces de un gran número de plantas, a pesar de los bajos niveles en que se encuentran y de la inestabilidad del compuesto, encontrándose mayor concentración en plantas capaces de establecer simbiosis y en concentraciones bajas de fósforo inorgánico (Akiyama y Hayashi, 2006). La primera respuesta de los hongos MA a las ES es la inducción de una intensa actividad mitocondrial y el incremento en la respiración, antes de iniciar una fuerte ramificación de hifas. Las ES también parecen actuar como atraerentes químicos, con efectos quimiotróficos a distancias cercanas a 910 μm (Akiyama y Hayashi, 2006). Según la bibliografía, ellas estimulan el metabolismo y la ramificación de las hifas de los hongos MA, modificando el patrón de crecimiento micelial, lo que incrementa el

éxito de la interacción con las plantas (**Figura 2.2**). Las ES tienen también un rol hormonal en la inhibición de la ramificación de los tallos (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008). Este efecto directo sobre el crecimiento de las plantas es considerado la principal función de esta clase de moléculas, que en realidad son producidas por muchos taxones de plantas (Akiyama et al., 2005; Akiyama et al., 2010), incluyendo unos no asociados con micorrizas. La liberación de las ES desde las raíces y su rápida hidrólisis representan una forma eficaz de señalización en la rizósfera (Parniske, 2008; Akiyama et al., 2010). Las semillas de varias malezas también son estimuladas por estas moléculas durante el proceso de germinación (Matusova et al., 2005). Estas múltiples funciones recuerdan los efectos pleiotrópicos de las auxinas por lo que se consideran a las estrigolactonas como hormonas vegetales (Bonfante y Genre, 2010).

Los flavonoides son importantes en la fase inicial, pero las estrigolactonas han mostrado ser señales de fundamental importancia en el desarrollo de la simbiosis (Akiyama et al., 2005), ya que el estímulo de esta hormona en el hongo es necesario para la producción de los factores “Myc” y la activación de la expresión de genes ENDO11 para el establecimiento de la simbiosis (Ramírez Gómez y Rodríguez, 2012).

Con respecto al papel de las hormonas en el proceso de micorrización, Hause et al. (2007) presentan un resumen sobre sus efectos particulares. Las citocininas y las auxinas tienen un efecto positivo en el crecimiento del hongo. Las giberelinas presentan respuestas variables sobre el hongo simbiote. El ácido jasmónico muestra respuestas positivas cuando se encuentra en bajas concentraciones y negativas cuando las concentraciones son altas. El etileno presenta respuestas negativas. El ácido salicílico no afecta la micorrización.

En resumen, las raíces de las plantas liberan metabolitos que anuncian su presencia a los hongos y facilitan su contacto físico. Al mismo tiempo, los mismos metabolitos de la planta comunican la posición de las raíces a microorganismos menos deseables. Las ES y la cutina, por ejemplo, juegan roles equivalentes en la interacción con plantas parásitas u oomicetes patógenos, respectivamente (Wang et al., 2012). Sin embargo, cuando las plantas atraviesan una deficiencia de nutrientes liberan grandes cantidades de ES, que inducen la colonización por hongos MA y luego la síntesis y la secreción de estos metabolitos se reducen (Yoneyama et al., 2007; Lopez-Raez et al., 2011). Además, las ES ejercen un efecto inhibitorio sobre algunos microorganismos fitopatógenos del suelo (Dor et al., 2011). Todas estas observaciones sugieren que la secreción diferencial de metabolitos combinada con los diversos impactos sobre los diferentes organismos puede modular la dinámica del ecosistema del suelo hacia la comunicación preferencial y la asociación con estos hongos benéficos.



Figura 2.2: Ramificación de una hifa próxima a la raíz de una posible planta hospedante, previo a la penetración en la misma.

Señalización de la MA compartida con otros sistemas simbióticos

Las interacciones entre las plantas y los hongos MA, y en particular el reconocimiento del hongo por parte de la planta huésped están caracterizados por una vía de señalización, en parte compartida con la simbiosis leguminosa - rizobio (Parniske, 2008).

Para que ocurran los cambios indispensables a nivel celular durante la colonización se requiere de la activación de genes mediante una cascada de señales; este proceso es similar al que ocurre en la simbiosis leguminosa-rizobio, por lo que se le ha llamado vía común Sym (Catoira et al., 2000; Parniske, 2000). Esta similitud se observa a nivel molecular, citológico y genético (Gianinazzi-Pearson y Dénarié, 1997; Parniske, 2000). Se ha encontrado que los factores Nod requeridos en la simbiosis leguminosa-rizobio también son requeridos en la asociación planta-MA (Oldroyd y Downie, 2006). En *Medicago truncatula* se han encontrado tres genes (Catoira et al., 2000) y en *Lotus japonicum*, siete genes, involucrados en esta vía Sym y presentes en las dos simbiosis (Kistner et al., 2005). Algunos de estos genes están relacionados con la nodulación por bacterias y otros han sido relacionados solamente a los hongos MA.

Oldroyd y Downie (2006) proponen un modelo para la vía de señalización Sym, con la participación de receptores de quinasas específicos para rizobios (NFR1 y NFR5) asociados a la percepción de los factores Nod (en MA deben existir receptores similares para factores Myc, pero aún no se han identificado) y receptores DMI2/SYMRK que participan en las dos simbiosis. Una vez que se produce el reconocimiento de los factores Nod (y posiblemente Myc) se genera una cascada de fosforilación en la membrana plasmática, posiblemente ligada a los cambios que sufre el calcio a nivel nuclear, con la participación de mensajeros secundarios (Ramírez Gómez y Rodríguez Villate, 2010). Para la percepción de los factores Nod en la membrana plasmática se requiere la inducción de oscilaciones de Ca en el núcleo y la participación de una nucleoporina (NUP133) que permite la entrada del mensajero secundario al núcleo, para activar los canales de Ca en el interior y en el exterior de la membrana nuclear. Las bombas de Ca^{2+} requieren ATP para su movilización en contra del gradiente de concentración y para mantener un nivel adecuado del elemento almacenado. Esto genera la activación de proteínas quinasas, dependiente de Ca y calmodulina (CCaMK), localizadas en el núcleo (**Figura 2.3**). Genes que se activan en la etapa de la simbiosis temprana como el gen que codifica a DMI3, codifican para la CCaMK, posiblemente para activar la respuesta de la planta (Oldroyd y Downie, 2006).

El hipotético factor Myc es percibido por la planta hospedante por un factor Myc receptor aún no identificado que sería responsable de desencadenar una rápida elevación de la concentración de calcio citosólica, respuesta similar a la registrada durante la nodulación. La proximidad de hifas ramificadas sería una señal que induce la oscilación de la concentración de Ca^{2+} (Bonfante y Genre, 2010).

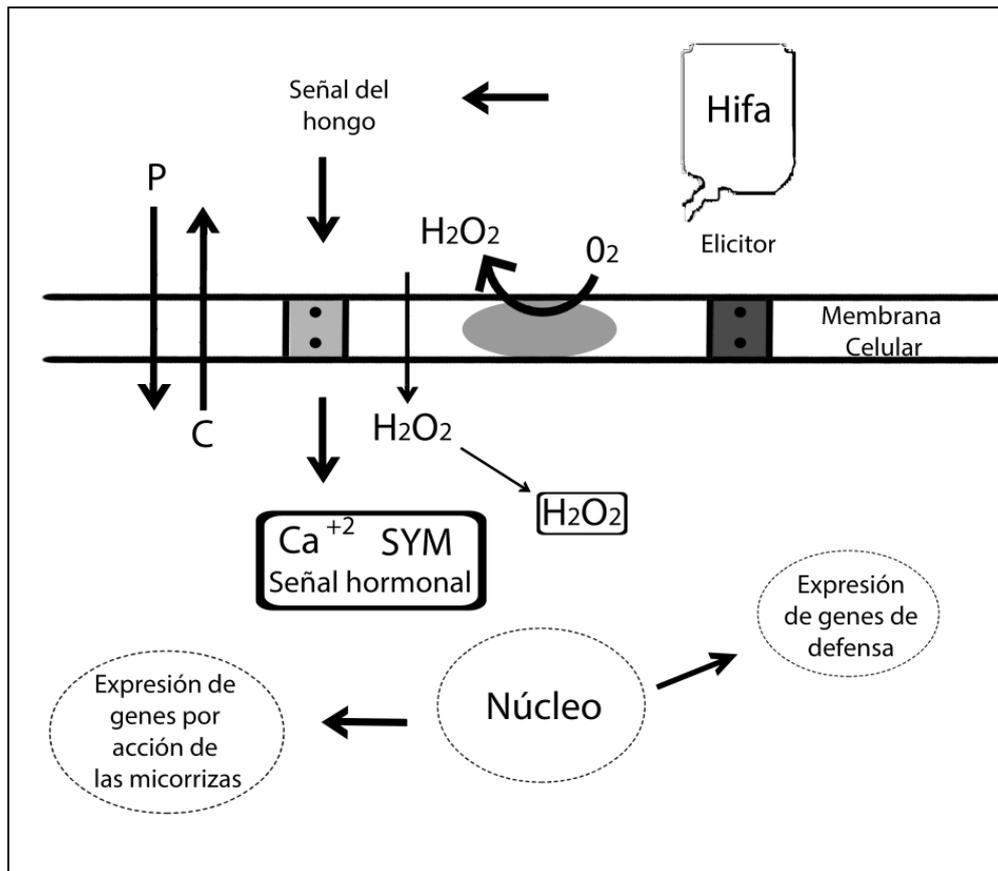


Figura 2.3.: Modelo esquemático de señalización en la simbiosis por hongos MA.

Señales de reconocimiento en la fase simbiótica

La fase presimbiótica o asimbiótica de esta interacción culmina cuando se produce el encuentro físico entre ambos simbios, es decir, cuando el ápice de la hifa “toca” la superficie de una raíz. La activación de la expresión de ciertos genes en el hospedero, producida por los hongos MA, permite a la planta localizar las células en las cuales las hifas del hongo hacen contacto para la formación del apresorio (hifopodio) (Kosuta et al., 2003). El hongo selecciona cuidadosamente el lugar en el cual va a comenzar a colonizar. Las hifas pueden recorrer algunos centímetros a lo largo de la superficie de la raíz, en forma recta o ligeramente curva, luego de forma impredecible las hifas se hinchan, se aplanan sobre la pared celular de algunas células epidérmicas y comienzan a ramificarse repetidamente para desarrollar el apresorio.

La vía simbiótica depende de la expresión del gen ENOD 11 (un gen que codifica una proteína de secreción) que se lleva a cabo en la zona del apresorio. La expresión de otros genes también se modifica, muchos de los cuales regulan procesos durante la fase presimbiótica (Weidmann et al., 2004). Otros genes comienzan a activarse durante la formación del apresorio, incluyendo aquellos involucrados en la remodelación de la pared celular y en las respuestas de defensa, en el momento en que las células epidérmicas reorganizan su citoplasma para producir una estructura específica que es indispensable para el éxito de la penetración de la hifa: el aparato de prepenetración (APP) que es una estructura subcelular por donde la hifa fúngica posteriormente va a ingresar a la célula (Genre et al., 2005). Genre et al. (2005) demostraron también cómo las células de la epidermis de la raíz forman una estructura intracelular especial antes de que ocurra la penetración. Para ello, usaron clones de raíz de *Medicago truncatula* que expresan a la proteína verde fluorescente (GFP) en el citoesqueleto y retículo endoplásmico. Mediante la utilización del microscopio confocal pudieron seguir las respuestas de las células de la epidermis por la formación del apresorio del hongo y la penetración de la hifa en células vivas (**Figura 2.4**). Observaron también que el núcleo de la célula de la epidermis se mueve permitiendo la formación del APP que se forma dentro de una columna citoplásmica. La fluorescencia mostró un arreglo de alta densidad y un haz de microfilamentos paralelo a la columna. Este efecto se asoció con una región de cisternas densas del retículo endoplásmico. Una vez que el APP se forma; la entrada del hongo y el crecimiento de la hifa a través de la célula siguen precisamente el camino definido por el citoesqueleto y las estructuras del retículo endoplásmico. La penetración de la hifa va acompañada por la producción localizada de enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular y por una presión hidrostática ejercida por el ápice de la hifa (Bonfante y Perotto, 1995). Cuando se completa la formación del APP, el hongo comienza nuevamente a crecer y al mismo tiempo se produce una invaginación de la membrana plasmática que genera un espacio periplásmico, que marca la aparición de la interfase simbiótica. Este estrecho compartimento le permite al hongo crecer en el interior del lumen de la célula vegetal sin romper la integridad del protoplasto vegetal (Bonfante, 2001).

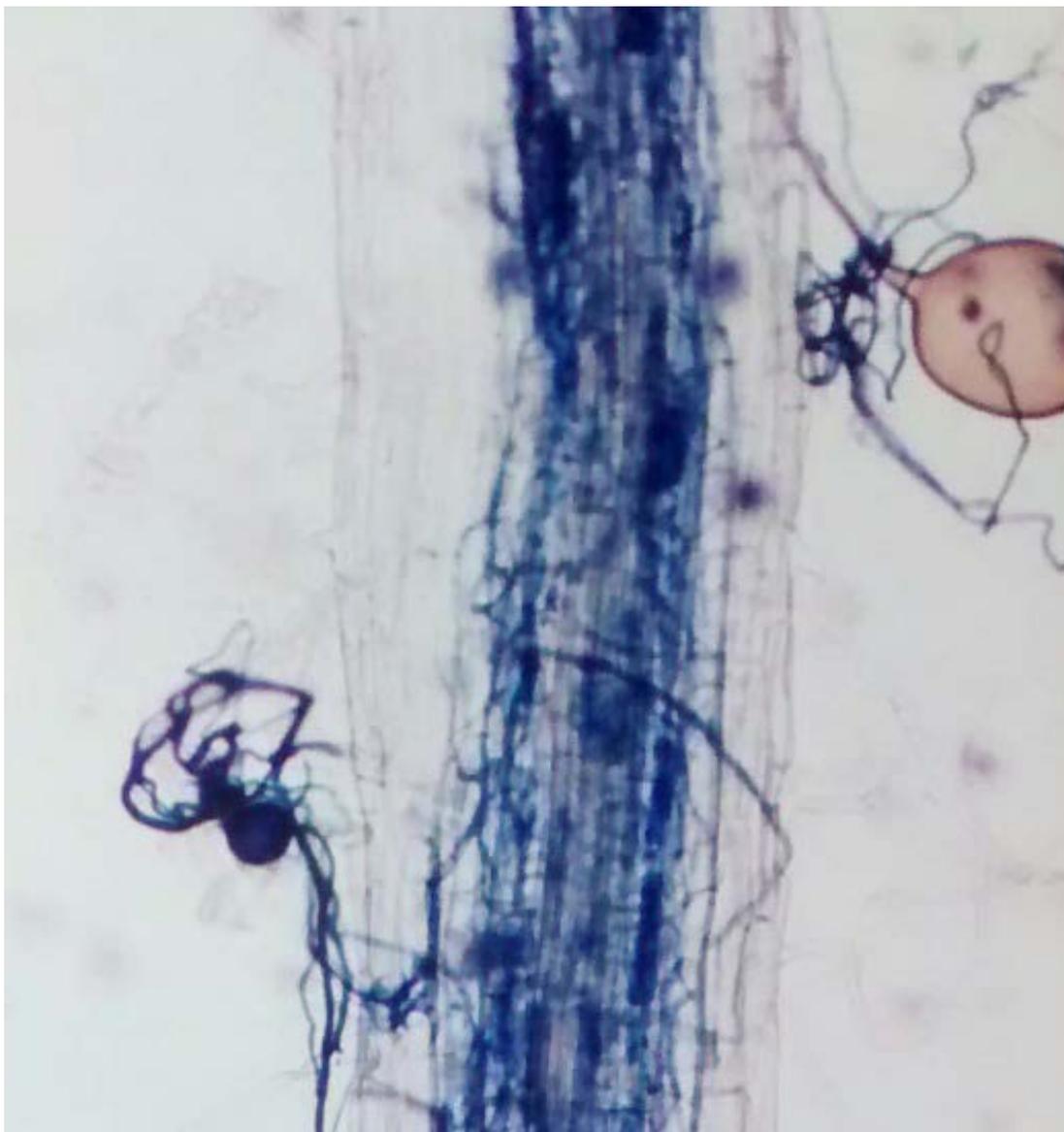


Figura 2.4: Germinación de la espora en las inmediaciones de la raíz, ramificación y formación del apresorio.

Formación de estructuras características del hongo formador de MA durante la colonización

Internamente, la colonización de las raíces involucra la formación de hifas intercelulares, algunos enrulamientos y arbuscúlos. Los arbuscúlos que resultan de la ramificación de las hifas proveen un incremento considerable en el área de contacto entre el hongo y las células corticales (Saito, 2000). Se ha sugerido que el desarrollo de los arbuscúlos en estas células puede ser regulado por un gradiente de carbono debido a la proximidad con el sistema vascular (Blee y Anderson, 1998). Aun cuando la colonización de las células corticales es esencial para la diferenciación del arbuscúlo, no se conocen las señales que disparan las ramifi-

caciones dicotómicas de la hifa para formarlo. La diferenciación del arbusculo está acompañada de varios cambios fisiológicos en la célula de la planta, cuyas vacuolas se fragmentan aumentando el volumen de citoplasma y el número de organelas (Bonfante y Perotto, 1995). Las células que contienen arbusculos muestran un núcleo hipertrofiado, mayor número de mitocondrias y niveles ligeros de actividad transcripcional (Fester et al., 2001). En estas células, los núcleos migran desde la periferia hacia el centro, con un incremento en el tamaño y condensación de la cromatina.

Los arbusculos son estructuras efímeras con una vida de 4 a 7 días (**Figura 2.5 a**). Al final de su ciclo, en las más finas ramificaciones del arbusculo, las paredes del hongo comienzan a colapsar y el citoplasma se retrae. Esta fase de senescencia se extiende desde la hifa troncal hasta el arbusculo en su totalidad. Durante la senescencia y colapso del arbusculo se observa una síntesis localizada de especies reactivas de oxígeno. Durante este proceso, la membrana periarbuscular se reorganiza una vez más para adaptarse a los nuevos cambios, el hongo eventualmente desaparece de la célula y ésta recupera su organización previa con una gran vacuola central y queda en condiciones de ser colonizada nuevamente (Bonfante, 1984).

De hecho la colonización por hongos MA no es un evento lineal ni sincronizado, como los hongos intentan repetidamente colonizar las células corticales, arbusculos de diferentes edades coexisten en células vecinas de modo que estructuras tempranas y jóvenes apresorios pueden desarrollarse en raíces ya colonizadas (**Figura 2.5 b**).

Como se mencionó anteriormente, los arbusculos son los principales sitios de intercambio de nutrientes entre la planta hospedadora y el hongo (Gianinazzi et al., 1979). El carbono de la planta es transportado al hongo a través de dos membranas en la interfase simbiótica. Este carbono primero es liberado en el espacio periarbuscular, probablemente en la forma de sacarosa, después se fracciona en hexosas y es tomado por el hongo MA a través del transporte por la membrana del hongo. En el citoplasma del hongo, las hexosas son convertidas en gránulos de glucógeno y gotas de triglicéridos, que sirven como unidades disponibles para el transporte a larga distancia a través de la red de hifas. Los nutrientes adquiridos por el hongo desde el suelo, atraviesan la membrana plasmática, son transportados a las hifas intraradicales incluyendo los arbusculos, y finalmente atraviesan la membrana periarbuscular para alcanzar el citoplasma de la planta. La absorción y el transporte de P a través de las hifas del hongo MA se realiza por transportadores de fosfato del hongo que están presentes en las hifas extraradicales, posteriormente, es transportado hacia la raíz y las hifas intraradicales, en forma de gránulos de polifosfato (Camarena-Gutiérrez, 2012), este tema será desarrollado específicamente en el Capítulo 3.

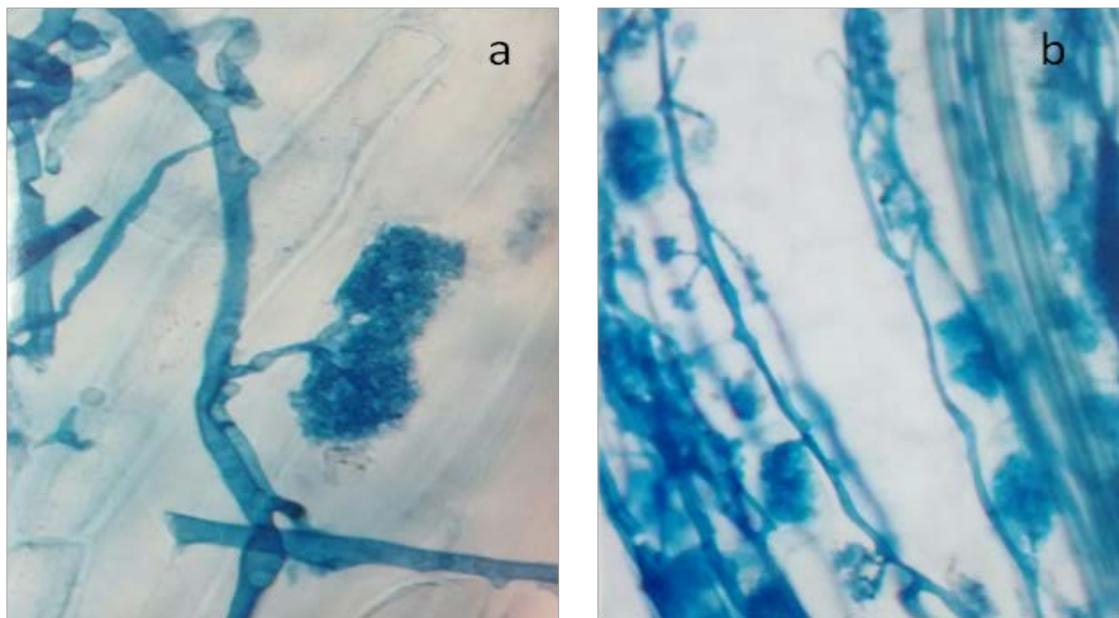


Figura 2.5: Foto de arbusculo (a) y arbusculos en distintas etapas de su formación (b), en raíces de pimienta (*Capsicum annuum* L.).

¿Cómo continúa la colonización?

La colonización ocurre de manera continua en dos sentidos, hacia el interior y exterior de la raíz (**Figura 2.6**). Dentro de la raíz, como ya se mencionó, una vez que ingresa la hifa forma en determinadas células corticales el arbusculo, estructura micorrícica que garantiza el intercambio de sustancias esenciales entre la planta y el hongo. Paralelamente, se pueden originar estructuras fúngicas de almacenamiento que contienen en su interior lípidos (entre otros compuestos) como material de reserva y reciben su nombre de acuerdo al género que los origine. En algunas especies, se llaman vesículas y se forman debido al hinchamiento de la hifa, generalmente terminal y en otros casos, son llamadas células auxiliares y se forman en el exterior de la raíz, como ya se explicó en el capítulo anterior. En ambos casos, su formación está condicionada a la estabilización de la simbiosis micorrícica (Schenck y Smith, 1982). En estudios realizados en condiciones controladas por Barea et al. (1991) se ha puesto de manifiesto que por cada metro de raíz colonizada se producen entre 7 y 250 m de hifas externas del hongo, lo que depende de la especie fúngica implicada en la simbiosis y de sus condiciones de crecimiento. De igual manera, el micelio extrarradical ha mostrado ser capaz de captar eficazmente todos los nutrientes (George et al., 1995); en especial el fósforo (Jakobsen, 1995); nitrógeno (Johansen et al., 1993 y Tobar et al., 1994) y algunos micronutrientes esenciales para la planta (George et al., 1995). El estudio de la morfología y arquitectura de las hifas externas se dificulta en ocasiones por las partículas del suelo y por la presencia de micelio de otros hongos presentes en la rizósfera. El desarrollo de sistemas de

cultivo *in vitro* de los hongos MA, en simbiosis con una raíz hospedante, ha contribuido al estudio de la fisiología y la arquitectura del micelio extrarradical. El empleo de cultivos duales entre el hongo MA, *Glomus intraradices* y raíces de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) no transformadas permitió a Bago et al. (1998) describir en detalle el desarrollo de la fase externa de esta micorriza arbuscular. Una vez que la asociación se ha establecido con éxito y, al parecer, previamente a la formación de los primeros arbuscúlos, el hongo incrementa su actividad y comienza a extenderse profundamente en el entorno, desarrollo que está dirigido por las llamadas hifas exploradoras, las que posteriormente dan lugar a estructuras ramificadas de absorción (ERA) similares a los arbuscúlos intrarradicales (Bago et al., 2000). La producción de estas estructuras ramificadas incrementa aún más el volumen explorado por las hifas, lo que le permite a la planta la captación de sustancias nutritivas y agua del entorno. Además, diferentes estudios han señalado la importancia del micelio extrarradical en la estabilidad y mejora de las características físicas, químicas y biológicas de los suelos. Por otra parte, mientras las hifas intrarradicales sintetizan normalmente lípidos de reserva a partir de la glucosa que obtienen de la raíz (metabolismo lipogénico), el micelio extrarradical (hifas extrarradicales) por su parte utiliza la vía “lipolítica” pues al parecer su combustible metabólico proviene solo del transporte de productos carbonados sintetizados por el micelio interno (glucógeno o trehalosa) (Bago et al; 2000).

El desarrollo de estos sistemas de cultivo *in vitro* de los hongos MA permitieron no solo el estudio del micelio extrarradical, sino que fue un avance sustancial en la producción de inóculo de hongos MA a escala industrial, como se verá más adelante.

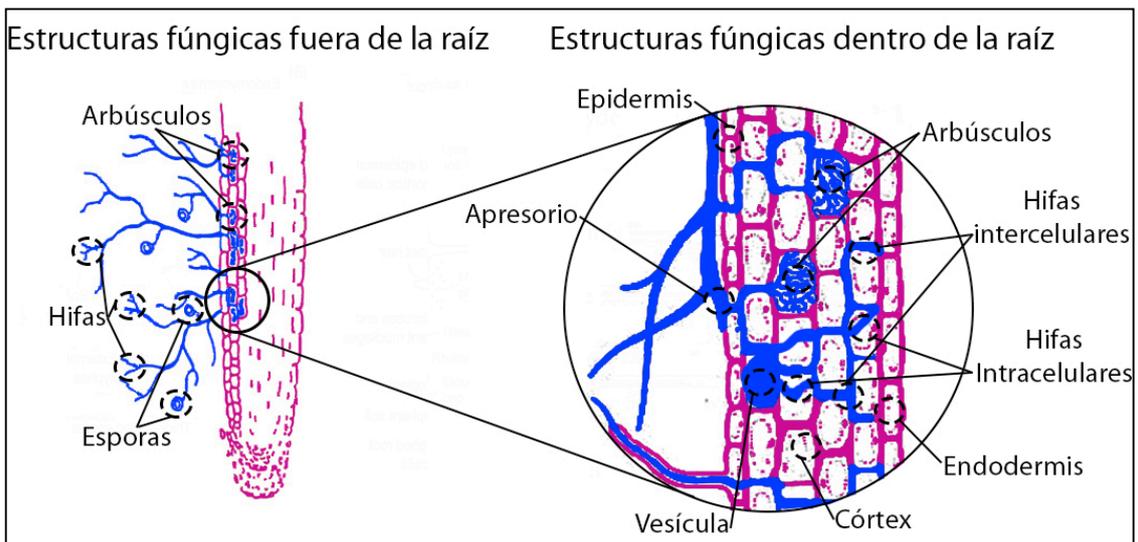


Figura 2.6: Representación esquemática del desarrollo del micelio dentro y fuera de la raíz de la planta hospedante.

¿Después de la colonización de los hongos formadores de MA, se producen respuestas de defensa?

En las interacciones planta-patógeno, las plantas responden a la invasión de los hongos mediante diversos mecanismos, algunos de los cuales están bien estudiados. Dentro de las respuestas de defensa, las interacciones incompatibles ocurren cuando la planta reconoce los compuestos elicitores producidos durante la colonización. Entre las respuestas bioquímicas y fisiológicas que la planta desencadena, se pueden mencionar la producción de metabolitos antifúngicos, fitoalexinas, deposición de lignina; que tienen como función limitar el ataque del hongo. Aunque se sabe de la existencia de elicitores involucrados en estadios tempranos de la formación de la simbiosis, las respuestas de defensa de la planta ante la presencia del hongo son menos agresivas que las observadas en las interacciones planta-patógeno (Salzer y Boller, 2000) y a menudo son completamente suprimidas (David et al., 1998).

En contraste a lo que ocurre en la interacción con patógenos, la asociación micorrícica es excepcionalmente compatible, si bien al comienzo de la infección se generan algunas respuestas de defensa no parecen alcanzar niveles tales que impidan la colonización fúngica. Además la expresión de genes de defensa está localizada concretamente en las células del parénquima cortical con presencia de arbusculos (Gianinazzi-Pearson, 1996).

Algunas de las preguntas más frecuentes para biólogos, ecólogos y agrónomos, es ¿cómo los hongos MA logran sobrepasar el sistema de defensa de la planta?, ¿qué mecanismos utiliza la planta para discriminar entre interacciones benéficas y patogénicas con microorganismos?, y finalmente, ¿cómo podemos utilizar las interacciones benéficas planta-microorganismo, en programas de protección vegetal y control biológico en sistemas agrícolas? (Ramírez Gómez y Rodríguez, 2012).

Si la planta reconoce al hongo como un organismo mutualista o si el hongo suprime las respuestas de defensa de la planta es una cuestión que aún sigue en análisis (Gadkar et al., 2001).

Referencias

- Akiyama, K., Ogasawara, S., y Hayashi, H. (2010). Structural requirements of strigolactones for hyphal branching in AM fungi. *Plant and Cell Physiology*, 51, 1104 – 1117.
- Akiyama, K., Matsuzaki, K., y Hayashi, H. (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 435, 824 – 827.
- Akiyama, K., y Hayashi, H. (2006). Strigolactones: Chemical Signals for Fungal Symbionts and Parasitic Weeds in Plant Roots. *Annals of Botany*: doi:10.1093/aob/mcl063, available online at www.aob.oxfordjournals.org
- Akiyama, K., Matsuzaki, K., y Hayashi, H. (2005). Plant Sesquiterpenes Induce Hyphal Branching in Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Nature*, 435, 824-827.

- Bago, B., Azcón - Aguilar, C., Goulet, A., y Piché, Y. (1998). Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular fungi. *New Phytology*, 139, 375 - 388.
- Bago, B., Azcón - Aguilar, C., Shachar – Hill, Y., y Pfeffer, P. (2000). El micelio externo de la micorriza arbuscular como puente simbiótico entre la raíz y su entorno. En: *Ecología, Fisiología y Biotecnología de la Micorriza Arbuscular*. Eds.: A. Alarcón y R. Ferrera – Cerrato, 78 - 92. IRENAT. Colegio de Postgraduados. Montecillos. Mundi Prensa. México.
- Bago, B., Pfeffer, P., y Shachar-Hill, Y. (2000). Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Journal of Plant Physiology*, 124, 949-957.
- Barea, J. M., Azcón-Aguilar, C., Ocampo, J. A., y Azcón, R. (1991). Morfología, anatomía y citología de las micorrizas vesículo-arbusculares. *Fijación y movilización de nutrientes II. Fijación de nitrógeno y micorrizas*, 150-173. Madrid.
- Bécard, G., y Piché, Y. (1989). Fungal Growth Stimulation by CO₂ and Root Exudates in Vesicular-arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 2320–2325.
- Blee, K. A., y Anderson, A. J. (1998). Regulation of arbuscule formation by carbon in the plant. *Plant Journal*, 16, 523–530. doi: 10.1046/j.1365-3113x.1998.00315.x
- Bonfante, P. (1984). Anatomy and morphology of VA Mycorrhizae. In *V. A. Mycorrhiza*, (eds Powell, C. L., Bagyaraj, D. J.), 5 – 33 (CRC Press, Boca Raton, Florida).
- Bonfante, P., y Perotto, S. (1995). Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi infecting host plants. *New Phytologist*, 130, 3–21
- Bonfante, P. (2019). At the interface between mycorrhizal fungi and plants: the structural organization of cell wall, plasma membrane and cytoskeleton. In *Mycota, IX Fungal Associations* (Hock, B. ed), 45 – 91 (Springer-Verlag).
- Bonfante, P., y Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature communications*, 1, 48.
- Bonfante, P., y Peroto, S. (1995). Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytologist*, 130, 3–21. Obtenido de <http://www.jstor.org/stable/2558536>
- Camarena-Gutiérrez, G. (2012). Interacción planta-hongos micorrízicos arbusculares. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, 18(3), 409-421.
- Catoira, R., Galera, C., Billy, F., Penmetsa, R. V., Journet, E., Maillet, F., Rosenberg, C., Cook, D., Gough, C., y Denarie, J. (2000). Four Genes of *Medicago truncatula* Controlling Components of a Nod Factor Transduction Pathway. *Plant Cell*, 12, 1647-65.
- David, R., Itzhaki, H., Ginzberg, I., Gafni, Y., y Kapulnik, Y. (1998). Suppression of tobacco basic chitinase gene expression in response to colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11, 489–497
- Dor, E., Joel, D. M., Kapulnik, Y., Koltai, H., y Hershenhorn, J. (2011). The synthetic strigolactone GR24 influences the growth pattern of phytopathogenic fungi. *Planta*, 234, 419-427.
- Elias, K. S. (1987). Gene. Hyphal elongation of *Glomus fasciculatus* in response to root exudates. *Applied Environmental Microbiology*, 53(8), 1928-1933.

- Fester, T., Strack, D., y Hause, B. (2001). Reorganization of tobacco root plastids during arbuscule development. *Planta*, 213, 864–868. doi: 10.1007/s004250100561
- Gadkar, V., David-Schwartz, R., Kunik, T., y Kapulnik, Y. (2001). Arbuscular mycorrhizal fungal colonization. Factors involved in host recognition. *Plant physiology*, 127(4), 1493-1499.
- Genre, A., Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P., y Barker, D. (2005). Arbuscular Mycorrhizal Fungi Elicit a Novel Intracellular Apparatus in *M. truncatula* Root Epidermal Cells before Infection. *Plant Cell*, 17, 3489-3499.
- George, E., Marschner, H., y Jakobsen, I. (1995). Role of arbuscular mycorrhizal fungi in uptake of phosphorus and nitrogen from soil. *Critical Reviews in Biotechnology*, 15, 257 - 270.
- Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V., y Dexheimer, J. (1979). Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. III. Ultrastructural localization of acid and alkaline phosphatase in onion roots infected by *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.). *New Phytologist*, 82, 127-132.
- Gianinazzi-Pearson, V. (1996). Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the root of the symbiosis. *Plant Cell*, 8, 1871–1883.
- Gianinazzi-Pearson, V., y Dénarié, J. (1997). Red Carpet Genetic Programmes for Root Endosymbiosis. *Trends in Plant Science*, 2, 371–372.
- Giovannetti, M., Sbrana, C., Avio, L., Citeresi, A. S., y Logi, C. (1993). Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages. *New Phytology*, 125, 587–593.
- Gomez-Roldan, V., Fermas, S., Brewer, P. B., Puech-Pagès, V., Dun, E. A., Pillot, J. P., y Bouwmeester, H. (2008). Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*, 455(7210), 189.
- Graham, J. H. (1982). Effect of citrus root exudates on germination of chlamydospores of the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus epigaeum*. *Mycologia*, 74, 831-835.
- Harrison, M.J. (2005). Signaling in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Annual Review of Microbiology*, 59, 19-42.
- Hause, B., Mrosk, C., Isayenkov, S., y Dieter, S. (2007). Jasmonates in Arbuscular Mycorrhizal Interactions. *Phytochemistry*, 68, 101-110.
- Jakobsen, I. (1995). Transport of phosphorus and carbon in VA micorrizas. En: *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology*. Eds.: Varma, A. y B. Hock, 297 – 323. Springer - Verlag, Berlin.
- Karin, H., Anna, M., Andreas, V., Franz, H., y Siegrid, S. (2013). Alterations in Root Exudation of Intercropped Tomato Mediated by the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus mosseae* and the Soilborne Pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *Lycopersici*. *Journal of Phytopathology*, 161, 763–773.
- Kistner, C., Winzer, T., Pitzschke, A., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., y Webb, K. J. (2005). Seven *Lotus japonicus* Genes Required for Transcriptional Reprogramming of the Root During Fungal and Bacterial Symbiosis. *Plant Cell*, 17, 2217.

- Kogel, K. H. (2008). Compatible Host–microbe Interactions: Mechanistic Studies Enabling Future Agronomical Solutions. *Journal of Plant Physiology*, 165, 1-8.
- Kosuta, S.; Chabaud, M.; Lougnon, G.; Gough, C.; Dénarié, J.; Barker, D., y Bécard, G. (2003). A Diffusible Factor from Arbuscular Mycorrhizal Fungi Induces Symbiosis-Specific MtENOD11 Expression in Roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 131, 952-962.
- Lohse, S., Schliemann, W., Ammer, C., Kopka, J., Strack, D., y Fester, T. (2005). Organization and metabolism of plastids and mitochondria in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 139(1), 329-340.
- Lopez-Raez, J. A., Charnikhova, T., Fernandez, I., Bouwmeester, H., y Pozo M. J. (2011). Arbuscular mycorrhizal symbiosis decreases strigolactone production in tomato. *Journal of Plant Physiology*, 168, 294-297.
- Matusova, R., Rani, K., Verstappen, F. W. A., Franssen, M. C. R., Beale, M. H., y Bouwmeester, H. J. (2005). The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobancha* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiology*, 139, 920 – 934.
- Oldroyd, G., y Downie, J. A. (2006). Nuclear Calcium Changes at the Core of Symbiosis Signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 351–357.
- Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbiosis. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 763 – 775.
- Parniske, M. (2000). Intracellular Accommodation of Microbes by Plants: A Common Developmental Program for Symbiosis and Disease? *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 320–328.
- Ramírez, G., y Rodríguez, V. (2010). Recognition signalling between arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and plants. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuarias*, 11(1), 53-60.
- Ramírez Gómez, M., y Rodríguez, A. (2012). Plant defense mechanisms and responses in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: a review. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 271-284.
- Requena, N., Serrano, E., Oco'n, A., y Breuninger, M. (2007). Plant Signals and Fungal Perception During Arbuscular Mycorrhizae Establishment. *Phytochemistry*, 68, 33-40.
- Saito, M. (2000). Symbiotic exchange of nutrients in arbuscular mycorrhizas: transport and transfer of phosphorus. In Y Kapulnik, DD Douds, eds, *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 85–106
- Salzer, P., y Boller, T. (2000). Elicitor induced reactions in mycorrhizae and their suppression. In GK Podila, DD Douds, eds, *Current Advances in Mycorrhizae Research*. APS Press, St. Paul, MN, 1–10.
- Schenck, N. C., y Smith, G. S. (1982). Additional new and unreported species of mycorrhizal fungi (Endogonaceae) from Florida. *Mycologia*, 74, 77 - 92.
- Sharma, A. K., y Johri, B. N. (2002). Arbuscular mycorrhizae: interactions in plants, rhizosphere, and soils (No. Sirsi) i9781578082063).
- Tobar, R., Azcón, R., y Barea, J. M. (1994). Improved nitrogen uptake and transport from ¹⁵N-labelled nitrate by external hyphae of arbuscular mycorrhiza under water - stressed conditions. *New Phytology*, 126, 119 - 122.

- Umehara, M., Hanada, A., Yoshida, S., Akiyama, K., Arite, T., Takeda-Kamiya, N., y Kyojuka, J. (2008). Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature*, 455(7210), 195.
- Wang, E., Schornack, S., Marsh, J.F., Gobbato, E., Schwessinger, B., Eastmond, P., Schultze, M., Kamoun, S., y Oldroyd, G. E. (2012). A common signaling process that promotes mycorrhizal and oomycete colonization of plants. *Current Biology*, 22, 2242-2246.
- Weidmann, S., Sanchez, L., Descombin, J., Chatagnier, O., Gianinazzi, S., y Gianinazzi-Pearson, V. (2004). Fungal elicitation of signal transduction-related plant genes precedes mycorrhiza establishment and requires the *dmi3* gene in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(12), 1385-1393.
- Yoneyama, K., Yoneyama, K., Takeuchi, Y., y Sekimoto, H. (2007). Phosphorus deficiency in red clover promotes exudation of orobanchol, the signal for mycorrhizal symbionts and germination stimulant for root parasites. *Planta*, 225, 1031-1038.

CAPÍTULO 3

Hongos rizosféricos y el movimiento del fósforo en el suelo

*Mario Saparrat, Valeria Bernardo, Marcela Ruscitti,
Lorena Elíades y Pedro Balatti*

En este apartado se analizará el rol de los hongos rizosféricos en el movimiento del fósforo en el suelo y su disponibilidad, con especial énfasis en los hongos formadores de micorrizas arbusculares y ectomicorrizas, los hongos endófitos negros y otros saprótrofos asociados.

¿Qué es la rizósfera?

La rizósfera es la porción de suelo que rodea a las raíces de las plantas en donde ocurren un sinnúmero de relaciones complejas entre la planta, los microorganismos del suelo y el suelo como sistema (Sylvia et al., 2005). Ésta suele también definirse como el volumen de suelo que rodea y está en contacto con las raíces y en el que se producen diversos fenómenos de interacción química, física, bioquímica y biológica entre los componentes bióticos y abióticos del suelo. No obstante, la caracterización de esta zona del suelo depende del enfoque de análisis: desde un punto de vista físico, la rizósfera es la zona de mayor densidad y agregación del suelo; considerando a la planta (la visión hacia la planta), es la zona de absorción de agua e intercambio de iones; analizando la microbiota del suelo, es la zona del suelo en donde se da una intensa actividad microbiológica e interacción microbiana y por eso es el sitio en donde se puede inducir el biocontrol de fitopatógenos.

Si bien la microbiota asociada a la rizósfera tiene una constitución compleja que incluye bacterias, hongos, virus, actinomicetes y otros, los hongos cumplen varios roles claves y son los que contribuyen con la mayor proporción a la biomasa microbiana total del suelo. Los hongos rizosféricos, que se asocian a diferentes plantas de importancia económica, tienen un potencial biotecnológico, ya que son el insumo necesario para el desarrollo de biofertilizantes, reemplazando o complementando en muchos casos a los inoculantes bacterianos, en respuesta a que suelen ser más eficientes en la colonización del suelo y/o la rizósfera.

Existe un amplio rango de especies de hongos de la rizósfera que promueven el crecimiento y el desarrollo de las plantas, así como su sanidad, pudiendo pertenecer a los siguientes grandes grupos funcionales:

- saprótrofos que pueden pertenecer a los *Phyla* Ascomycota y Mucoromycota; éstos degradan la materia orgánica, participan en la formación de humus y liberan o dinamizan nutrientes claves para el crecimiento de las plantas. Además, estos organismos sintetizan diferentes metabolitos como sideróforos u otros compuestos que actúan en la movilización del P y/o en la detoxificación de compuestos xenobióticos y otros de acción fitotóxica, así como también en otros mecanismos que promueven el crecimiento vegetal.
- antagonistas de fitopatógenos incluyendo a otros hongos (micoparasitismo) como los del género *Trichoderma* que suelen utilizarse como agentes de biocontrol,
- patógenos de animales como los hongos entomopatógenos y nematófagos, y
- simbiontes de las plantas representados por los hongos formadores de micorrizas (micorrizas arbusculares, MA; micorrizas ericoides, orquidioides y ectomicorrizas, ECM) y los endófitos mutualistas (endófitos septados negros).

Estos hongos rizosféricos involucran diferentes mecanismos directos que aumentan la disponibilidad de los nutrientes y el agua a las raíces y/o incrementan el crecimiento vegetal o en forma indirecta mejoran su sanidad, reduciendo a través de interacciones antagónicas la incidencia de fitopatógenos (**Figura 3.1**), características claves en el desarrollo de estrategias sustentables para la producción vegetal.

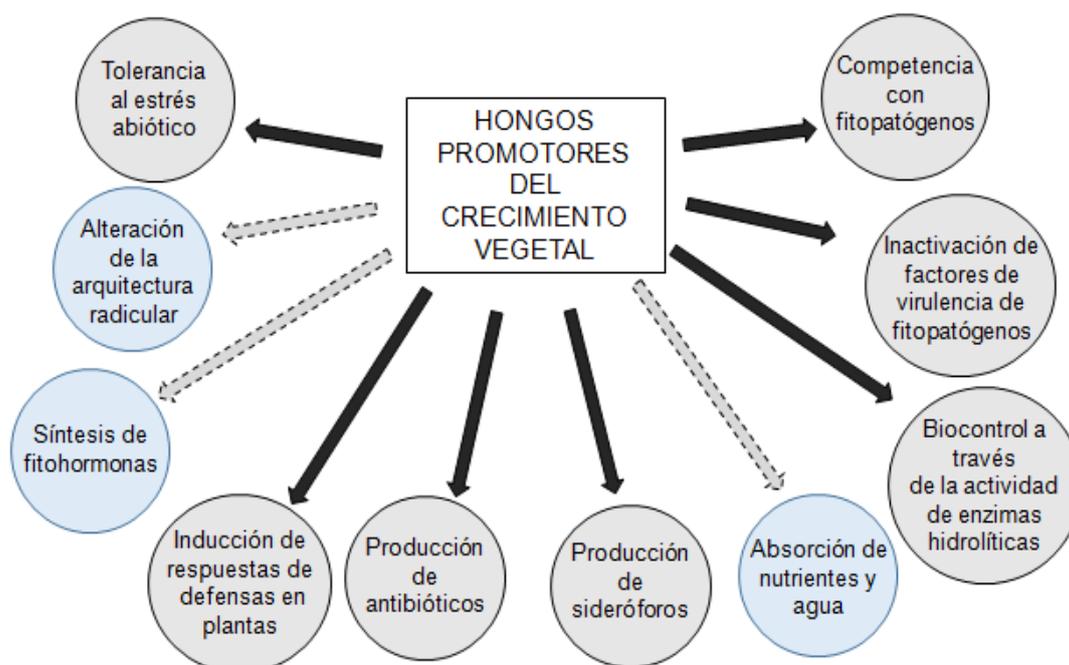


Figura 3.1: Mecanismos fúngicos directos (flechas grises) e indirectos (flechas negras) involucrados en la promoción del crecimiento vegetal.

Fósforo en el suelo y su relación con la planta y los microorganismos

El fósforo (P) es un nutriente esencial para las plantas, animales y microorganismos en la forma de iones fosfatos PO_4^{3-} y HPO_4^{2-} . Forma parte de moléculas claves como el ADN, ARN, moléculas que transfieren energía como ATP, ADP, AMP, NAD(P)H y de los lípidos de las membranas celulares. El P puede ser encontrado en el agua, el suelo, la corteza terrestre y los sedimentos, en contraste con el N, el C y el S no está disponible en estado gaseoso.

Los animales obtienen P a través de los alimentos que consumen. Aunque el P es considerado como un nutriente que puede limitar la productividad primaria en los océanos en la escala geológica, el ortofosfato inorgánico (Pi) es la única forma de P que se puede transportar a través de la membrana plasmática de las plantas y de los hongos. Por lo tanto el P representa un nutriente que limita el crecimiento vegetal, ya que solo el 0,1 % del P total del suelo está disponible para las plantas. Considerando el requerimiento de las plantas el P ocupa el segundo lugar luego del N, sin embargo su disponibilidad para los organismos en general es baja debido a su poca solubilidad, baja movilidad y capacidad para fijarse en el suelo. No obstante, el suelo contiene formas orgánicas e inorgánicas de P. El P inorgánico (mineral) está presente como fosfatos solubles como el Pi o puede encontrarse precipitado. Éste último puede estar como formas cristalinas como las apatitas aunque también como fosfatos amorfos de calcio, potasio, hierro y aluminio y otros fosfatos, como los polifosfatos inorgánicos, los cuales difieren mucho en su solubilidad en agua y reactividad.

Como ya se dijo el P también está formando parte de compuestos orgánicos, principalmente en la forma de mono-ésteres de fosfato, diésteres de fosfatos y fosfatos de inositol. Mientras que los monoésteres de fosfato comprenden hasta el 50 % del total del pool de P orgánico del suelo, los fosfodiésteres son más susceptibles a la descomposición y en general forman sólo una pequeña fracción de este grupo. No obstante, los fosfatos de inositol son los más refractarios en el suelo, estando unidos tanto a materia orgánica como inorgánica. Todos estos compuestos orgánicos fosforados deben ser mineralizados por enzimas microbianas, entre las que se incluyen aquellas provistas por muchos hongos que contribuyen a aumentar la disponibilidad del Pi en la solución del suelo. Mientras que las células de la rizodermis de las plantas absorben el Pi en forma directa de la solución del suelo, otra importante vía de absorción de P es la indirecta, que es la que se produce a través de los hongos formadores de micorrizas que absorben con mayor eficiencia que las plantas el Pi de la misma solución del suelo. Esto es debido a que los hongos exploran un mayor volumen de suelo y traslocan el Pi desde el micelio extrarradicular al intrarradicular, y así se libera en las células corticales de la raíz. Estos procesos de absorción por parte de la planta y de los hongos micorrícicos están mediados por transportadores de Pi que son proteínas con varios dominios transmembrana que incorporan Pi a las células en contra de un gradiente de potencial electroquímico. Esta incorporación de Pi al protoplasto es dependiente de la actividad de ATPasas y se lleva a cabo involucrando un simporte con protones o sodio. Se han identificado dos tipos de transportadores de Pi, uno de alta y otro de baja afinidad. La mayor

absorción de P por las plantas micorrizadas responde a diferentes características de los hongos simbioses tales como la capacidad para acceder a los poros del suelo de menores dimensiones (5–30 μm) que las raíces (> 50–100 μm), ampliando el volumen de suelo explorado, y minimizando la probabilidad de agotamiento de P alrededor de las hifas como consecuencia al menor tamaño y costo de carbono por unidad de superficie de las hifas comparado a las raíces.

Todo lo anterior no hace más que reflejar que los microorganismos están íntimamente involucrados en el ciclo de P en el suelo. Ellos participan tanto en la solubilización de P inorgánico como en la mineralización del P orgánico así como en la inmovilización del P disponible, cumpliendo un rol clave en la movilidad del P en el suelo en respuesta a los bajos niveles de ortofosfato en la solución edáfica. La concentración de P en la solución del suelo en términos generales no excede a 0,1 a 1 μg por gramo, representando menos del 1 % del P total. Esto está condicionado por su solubilidad, lo cual también es el resultado de la asociación de iones, los efectos del pH y la cantidad de P adsorbido sobre las superficies de las arcillas del suelo. Por ejemplo, el P soluble precipita rápidamente como fosfato de hierro y aluminio en suelos ácidos o como fosfato de calcio en suelos alcalinos o es adsorbido a óxidos de hierro y aluminio o arcillas. Por lo tanto, la disponibilidad óptima de P_i soluble se obtiene a un pH del suelo próximo a 6,5, condición en la que la precipitación con aluminio y calcio es mínima. Puesto que el P suplementado al suelo como una sal soluble (por ejemplo en la forma de un fertilizante fosforado) se fija al particulado del suelo (precipitación) y tiene una escasa reextractabilidad, el nivel del P soluble disponible para la planta no aumenta sustancialmente, es decir que el P está disponible en baja cantidad en la solución edáfica. Asimismo, la porción del P del suelo que es extractable en soluciones ácidas diluidas o de bicarbonato, designada como P disponible para los organismos, incluye tanto formas inorgánicas como orgánicas, constituyendo estas últimas hasta el 30-50 % del P total en la mayoría de los suelos.

Siguiendo a Paul (2007), se pueden identificar 4 procesos en el ciclo del P donde los microorganismos participan:

Mineralización

El P que se encuentra formando parte de los compuestos orgánicos no está directamente disponible a los organismos. Para ello, el P orgánico debe ser antes mineralizado a P_i , a través de la acción de las fosfatasas, que incluyen fitasas y nucleasas, que son enzimas sintetizadas y liberadas al suelo por diferentes microorganismos (**Figura 3.2**). A diferencia de las otras formas orgánicas del suelo, los fosfatos de inositol requieren solubilización antes de su hidrólisis en respuesta a estar asociados al material sólido del suelo.

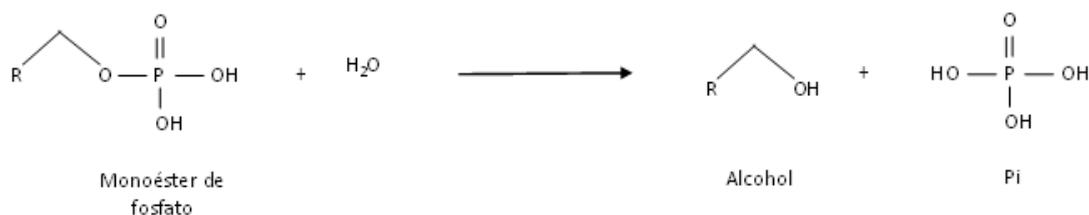


Figura 3.2. Reacción general catalizada por una enzima fosfatasa.

Las hidrolasas involucradas en la mineralización del P orgánico son sintetizadas por bacterias y hongos. Entre estos últimos se destacan representantes saprótrofos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Cunninghamella* y endófitos septados negros. Una vez que el P es mineralizado, éste puede ser absorbido por las plantas, inmovilizado en la biomasa microbiana, precipitar formando complejos inorgánicos, o ser adsorbido a superficies minerales.

Inmovilización

Los microorganismos del suelo pueden fijar o inmovilizar el P en su biomasa, ya sea promoviendo la formación de precipitados inorgánicos (gránulos de polifosfatos) o asimilando el mismo a compuestos orgánicos que están representados por diferentes constituyentes celulares (ácidos nucleicos, ATP, NAD(P)H y diferentes fosfolípidos entre otros).

Procesos redox

Aunque la contribución cuantitativa de las reacciones redox del ciclo biogeoquímico del P no es considerada relevante en comparación con los otros procesos involucrados, diferentes bacterias y hongos del suelo oxidan compuestos fosforados reducidos (como fosfitos e hipofosfitos) a Pi bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas.

Solubilización

La baja solubilidad del P en los suelos determina que éste sea uno de los principales nutrientes que limitan el crecimiento de las plantas. Esto conduce a realizar aplicaciones de formas solubles de P y aun así, solo una fracción del P adicionado estará disponible ya que forma rápidamente complejos insolubles.

Se han identificado muchos microorganismos con la capacidad de solubilizar P que convierten las formas insolubles como los fosfatos de roca, en formas solubles a través de procesos de acidificación, quelación y reacciones de intercambio. No obstante, todavía no está claro cuáles son los principales mecanismos involucrados, siendo a la vez variable según el organismo solubilizador. Los ácidos orgánicos pueden actuar como agentes quelantes por su capacidad para formar complejos con calcio, hierro o aluminio, liberando el Pi a la solución. También la asimilación de amoníaco fue propuesta como un mecanismo responsable de la solubilización del P. Entre los microorganismos solubilizadores, los hongos de suelo han demostrado, en los estudios realizados hasta el momento, que tienen un potencial superior a las bacterias, ya que desencadenan eventos de solubilización de mayor intensidad que los cultivos bacterianos.

Algunos grupos de hongos de suelo como movilizadores de fósforo, mecanismos y su relación con la promoción del crecimiento vegetal

Hongos formadores de micorrizas arbusculares

El intercambio de nutrientes es una característica central de las micorrizas arbusculares (MA), donde los hongos simbioses, en su carácter de obligados, obtienen carbono (C) de su planta huésped mientras que la asisten con la adquisición de varios nutrientes del suelo en condiciones limitantes, siendo el Pi uno de los principales aportes. En este sentido, es considerado que la función predominante de los hongos formadores de micorrizas arbusculares se atribuye al aumento de la absorción de P de la planta huésped como consecuencia de su mecanismo de captación de P de alta afinidad, siendo un alto nivel de P en el suelo un inhibidor de la simbiosis. Sin embargo, estudios recientes realizados sobre la interacción entre *Petunia hybrida* y *Rhizophagus irregularis* revelaron que la limitación en nitrógeno (en la forma de nitrato) en el suelo contrarresta el efecto supresor de la MA por altos contenidos de P, sugiriendo que las plantas promueven la simbiosis siempre que estén limitadas por algunos de estos dos nutrientes (Nouri et al., 2014). Además, existen complejos mecanismos de retroalimentación nutricional que permiten a las plantas controlar la colonización de la raíz por hongos MA en función de los requerimientos de nutrientes y su suministro. En este sentido, el Pi y el nitrato han sido identificados como los principales determinantes nutricionales de la interacción, ejerciendo una regulación negativa sobre la micorrización, mientras que el sulfato y los cationes Mg^{2+} , Ca^{2+} y Fe^{3+} no tienen efecto.

En la simbiosis micorrícica, el hongo envía Pi a la raíz a través de hifas especializadas llamadas arbusculos. Aunque se desconocen muchos aspectos de los mecanismos moleculares de la transferencia de Pi en la simbiosis así como su regulación en respuesta al estado nutricional de la planta, existen reportes que indican que las plantas poseen proteínas de transporte de Pi,

como el denominado MtPT4, que solo se expresan en la simbiosis MA, y que sugieren que el transporte de Pi no solo es un beneficio para la planta sino que también es un requisito para la simbiosis MA. En este sentido, el MtPT4 es esencial para el transporte simbiótico de Pi y el desarrollo de esta simbiosis (Javot et al., 2007).

Estudios con radiomarcadores y microscopia confocal demostraron que las hifas extrarradiculares de los hongos MA adquieren Pi de la solución edáfica a través de transportadores localizados en la membrana plasmática, siendo luego acumulados en el protoplasto y derivando en la síntesis de polifosfatos en vacuolas ácidas que se translocan a las hifas intrarradiculares. Específicamente en los arbusculos, es donde los polifosfatos son hidrolizados a Pi por fosfatasas y exopolifosfatasas, después de lo cual el Pi se libera al espacio periarbuscular donde la planta lo absorbe a través de transportadores de Pi expresados específicamente durante la simbiosis en células corticales que tienen arbusculos y que están ubicados en la membrana vegetal periarbuscular (**Figura 3.3**). También en estudios recientes se ha detectado la existencia de transportadores de Pi en la membrana de los hongos MA, como GigmPT de *Gigaspora margarita*, que actúan tanto como un transportador de Pi de alta afinidad y como sensor (receptor) de Pi vinculado con la activación de la vía de señalización de Pi, siendo la expresión de estas proteínas, sensibles a Pi (solo funcional en su ausencia), y que son requeridas para el establecimiento de la simbiosis MA (Xie et al., 2016).

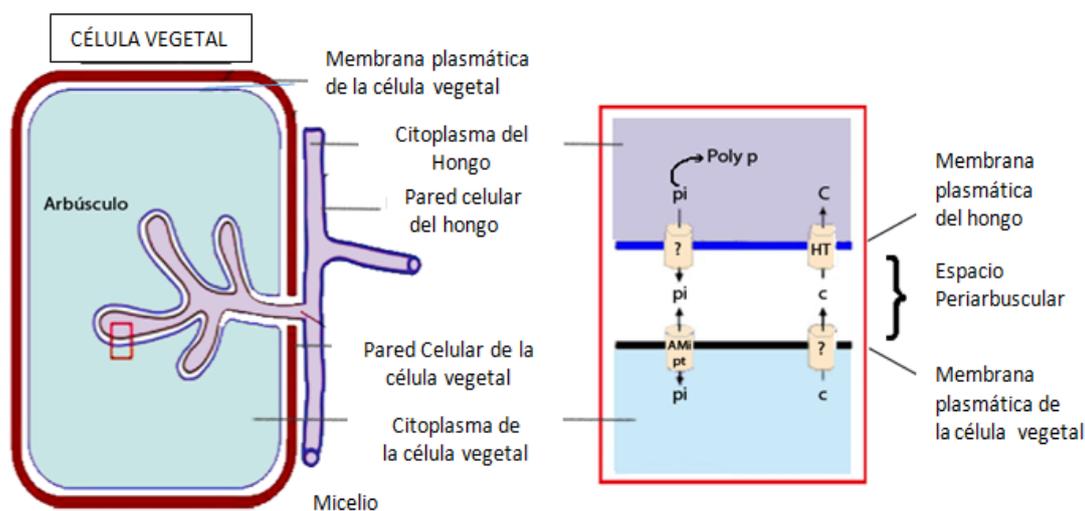


Figura 3.3. Translocación de P y C en la interfaz hongo micorrícico arbuscular (MA) - planta. El Pi es captado por transportadores especializados ubicados en la membrana plasmática del hongo en el micelio extrarradicular. El Pi en el interior del arbusculo derivado a partir de la hidrólisis del polifosfato (Poli P) se importa desde la interfaz simbiótica (espacio periarbuscular) a las células vegetales a través de los transportadores de Pi inducibles por hongos MA (TPiMA). En forma contraria, transportadores de hexosa (HT) importan carbono de la planta al hongo.

Con respecto a la habilidad extracelular de los hongos MA para la mineralización del P orgánico del suelo, no parece ser importante la actividad fosfatasa asociada a las paredes celulares de su micelio extrarradicular (Joner y Johansen, 2000).

Hongos ectomicorrícicos

Los hongos formadores de ectomicorrizas (HFECM o ECM) son los simbiosntes fúngicos más importantes de las plantas que conforman los bosques templados y boreales. Los hongos ECM son fisiológicamente heterogéneos entre y dentro de las especies fúngicas. Ellos presentan diferencias en el grado de colonización, la velocidad de crecimiento micelial, las estrategias de nutrición, el volumen de exploración del suelo asociado a la raíz simbiote y la solubilización y captación de P en respuesta a las diferencias en la longitud y/o área superficial del micelio extrarradicular de los diferentes hongos. Hay datos que revelan que *Pisolithus tinctorius* (Basidiomycota) se extiende tres veces más en longitud micelial (y por lo tanto con mayor superficie de absorción) que *Cenococcum geophilum* (Ascomycota), lo que se relaciona directamente con la mayor cantidad de P absorbido por las plántulas de *Pinus taeda* inoculadas con *P. tinctorius* cuando las mismas se comparan con aquellas colonizadas por *C. geophilum* (Cairney, 2011).

La concentración y la disponibilidad de P son bajas en la mayoría de los suelos forestales, particularmente en aquellos de áreas subtropicales y tropicales, debido a la intensa meteorización y lavado (lixiviación) de los suelos. La **Figura 3.4** muestra una representación esquemática de los procesos claves y los mecanismos implicados en la adquisición, translocación y transferencia del P a la planta en una asociación ectomicorrícica.

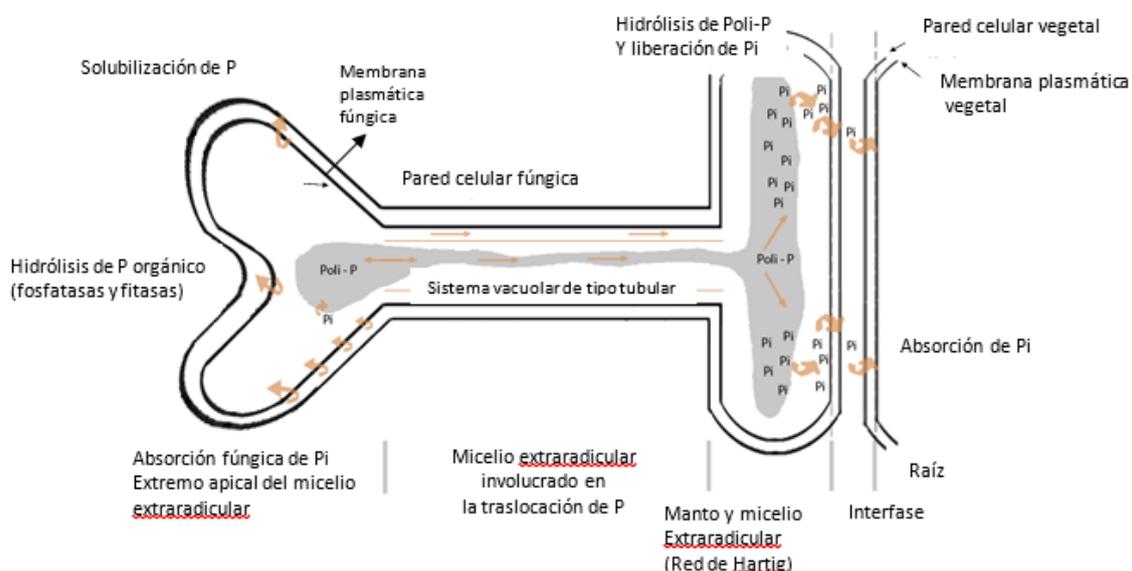


Figura 3.4. Representación esquemática de los procesos claves y mecanismos implicados en la adquisición, translocación y transferencia del fósforo a la planta en una asociación ectomicorrícica.

La absorción de Pi por parte de las hifas de ECM es a través de transportadores de alta afinidad de Pi que suelen estar disponibles principalmente en el frente de exploración del micelio extrarradicular, cuyos genes muestran variaciones en expresión según las condiciones ambientales. Algunos son inducidos bajo condiciones de limitación de P y otros son funcionales cuando

el Pi está disponible en alta concentración. Por otro lado, la movilización de P puede ser asistida por la exudación de ácidos orgánicos (solubilización de Pi) y la actividad de fosfatasas (hidrólisis de P orgánico). Los hongos formadores de ectomicorrizas producen fosfomonoesterasas ácidas extracelulares que suelen asociarse a la pared celular y también fosfodiesterasas así como también fitasas. Estas últimas también están asociadas a la superficie de los hongos, como las fosfomonoesterasas, cuya expresión o síntesis suele ser reprimida cuando hay disponibilidad de Pi, pero no son inducidas por la presencia de hexafosfato de inositol. Las evidencias indican que la distribución de la actividad fosfomonoesterasa en la superficie hifal es heterogénea, siendo la síntesis de estas enzimas ácidas reprimida cuando hay Pi. Si bien la inducción de fosfomonoesterasas no requiere la presencia de P orgánico, se ha observado que su síntesis aumenta en presencia de hojarasca, actividad que además es modulada por otros factores como la temperatura, las precipitaciones y la estacionalidad, el nivel de metales tóxicos, la disponibilidad de nitrógeno, el encalado y el tipo de suelo. Además se han detectado actividades de fosfomonoesterasas alcalinas en varios hongos formadores de ectomicorrizas, que también son inducidas por la baja disponibilidad de P en el medio.

Aunque se ha encontrado que los hongos ectomicorrícicos movilizan el P desde la materia orgánica, gran parte del P de los suelos forestales permanece secuestrado en la necromasa vegetal. No obstante, se ha demostrado que *Paxillus involutus* tiene la capacidad de remover el P a partir de polen y nematodos del suelo en descomposición, lo que contribuye a aumentar la disponibilidad de P a las plántulas de *Betula pendula*.

Se han descrito varios mecanismos en los hongos ECM que solubilizan el Pi, incluyendo la excreción de protones y de aniones de ácidos orgánicos como oxalato, cuya eficiencia depende de la sal que contiene el Pi disponible en el suelo. Cuando las sales contienen calcio los agentes solubilizadores son los protones y cuando las sales son de aluminio o hierro los aniones orgánicos son los que quelan el Al^{+3} y el Fe^{+3} disponibles en los fosfatos insolubles, lo que resulta en la liberación de estos fosfatos en forma soluble (Zhang et al., 2014).

El transporte de Pi a la vacuola de los hongos ectomicorrícicos en el micelio extrarradicular y la síntesis de polifosfato (Poli P) mantiene la concentración de Pi baja en el citoplasma de estas hifas, de tal manera que los transportadores de alta afinidad de Pi se expresen y así se favorece la absorción de Pi desde la solución del suelo junto con la liberación de fosfatasas.

Aunque la translocación a la planta probablemente se produce a través de un sistema vacuolar de tipo tubular, no se puede descartar que ocurra algún movimiento apoplástico en las hifas. En las hifas intrarradiculares (red de Hartig), la hidrólisis de Poli P por la acción de las polifosfatasas libera Pi. Una alta concentración de Pi en la vacuola conduce el flujo pasivo de Pi al citoplasma, donde se genera una alta concentración de Pi en relación con el apoplasto de la interfase hongo-raíz, que conduce el flujo de salida a través de la membrana del hongo.

La absorción eficiente del Pi por medio de transportadores de alta afinidad, ubicados en la membrana plasmática de células de la planta, adyacentes a la red de Hartig, y la posterior translocación y metabolismo dentro de la planta, mantiene baja la concentración de Pi en el apoplasto de la interfase hongo - células corticales de la raíz. El movimiento de P en el micelio de hongos

ectomicorrícicos en el suelo y la transferencia de P a la planta parece estar condicionado por la demanda de P de la planta. Por otro lado, la eficiencia de las ECM para movilizar el P del suelo depende de la especie fúngica, la concentración y disponibilidad de P.

Los cambios en la composición de la comunidad de hongos formadores de ectomicorrizas y su diversidad condicionan la eficiencia de captación de P y con ello el crecimiento de las plantas y así la biomasa arbórea. Se observó que la eficiencia de la planta para absorber P está mediada por la simbiosis y aumenta en la medida que la disponibilidad de P es menor, aunque disminuye con el estrés hídrico.

La reducción en la disponibilidad de agua del suelo y el aumento de la temperatura que se asocian al cambio climático se consideran que tienen un efecto negativo sobre la absorción de P debido a que estas condiciones provocan una disminución de la movilidad y la difusión de P en el suelo y del crecimiento y actividad de las ECM. Esta reducción en el crecimiento y biomasa de los hongos se ha relacionado también con la absorción de P en condiciones donde su disponibilidad está limitando la nutrición de las plantas.

La diversidad de hongos ECM es un factor clave para el funcionamiento de las raíces de diferentes especies arbóreas. Recientemente, se detectó en *Fagus sylvatica* L. que la eficiencia de absorción de P está inversamente relacionada a la riqueza y diversidad de especies de hongos ECM, lo que adicionalmente es función de la disponibilidad de P en el suelo. Sin embargo, aunque la falta de P en el suelo conduce a que la planta active respuestas fisiológicas a fin de mejorar la eficiencia de absorción y uso del P (entre las que se pueden mencionar, el aumento en la relación raíz: tallo y la proliferación de la raíz, alteraciones en la arquitectura radicular con una mayor ramificación, y un incremento en la cantidad de transportadores de Pi de alta afinidad así como en la secreción de fosfatasas, además de un ciclo interno del nutriente), la comunidad de ECM no se observó alterada (Köhler et al., 2018).

Hongos saprótrofos del suelo y endófitos septados negros

Diferentes hongos saprótrofos del suelo juegan un papel importante en el ciclo del P y en la disponibilidad de P para las plantas, lo que está basado en su capacidad para solubilizar diferentes formas de P inorgánico y mineralizar P orgánico. Estudios realizados en *Talaromyces flavus*, *T. helicus*, *T. diversus* y *Penicillium purpurogenum* revelaron que su capacidad de solubilización de P es superior cuando las fuentes de P son sales de hierro y de calcio, en comparación a lo observado con sales de aluminio y roca fosfórica (Della Mónica et al., 2017). Por otro lado, los procesos de solubilización y mineralización de P de estos hongos están interrelacionados y ocurren simultáneamente. El tipo de forma química fosforada y el pH del sistema modulan los procesos de mineralización y solubilización de P desencadenados por diferentes hongos de suelo, si bien la eficiencia del proceso es una característica de cada aislamiento fúngico. En estos hongos, la actividad de las fosfatasas ácidas es mayor que la de las fosfatasas alcalinas, siendo a la vez independiente del pH de reacción. Se han identificado fosfatasas ácidas de *Aspergillus* spp.

con una mayor capacidad de mineralización de P a partir de lecitina y fitato en comparación a enzimas de origen vegetal.

Los endofitos septados negros como *Acephala applanata*, *Phaeomollisia piceae*, *Phialocephala glacialis* y *P. turiciensis*, que son otro tipo de simbioses fúngicos que se encuentran en las raíces de las plantas, también tienen capacidad para solubilizar P inorgánico y mineralizar diferentes formas orgánicas (Della Mónica et al., 2015). Estos hongos sintetizan, en ausencia de la planta huésped y de compuestos orgánicos fosforados, fosfatasa, sugiriendo que el proceso de mineralización de P no es inducido por el sustrato enzimático o el huésped. Estudios utilizando sistemas con plántulas de *Trifolium repens* en perlita-vermiculita revelaron que estos hongos incrementan el nivel de P extractable a nivel de la rizósfera.

Para finalizar podemos decir que el conocimiento de la biología de estos hongos movilizadores de fósforo, que pertenecen a distintos grupos ecofisiológicos, es fundamental para el desarrollo de estrategias sustentables para el aprovechamiento del P inmovilizado en residuos orgánicos y rocas para la producción vegetal en respuesta a ser la base para seleccionar aislamientos específicos como bioinoculantes fúngicos que tengan un rol clave en el ciclo biogeoquímico del P.

Diferentes hongos tienen propiedades multifuncionales para promover el crecimiento de las plantas. Hasta el momento no hay datos concluyentes acerca de los mecanismos y factores que inducen la promoción del crecimiento vegetal en casos específicos utilizando diferentes hongos inoculados. Por lo tanto, son necesarias más investigaciones para desarrollar inoculantes a base de hongos para incrementar la disponibilidad de Pi y promover el crecimiento vegetal, incluso favoreciendo la calidad de vida del hombre y su ambiente.

Referencias

- Cairney, J. W. G. (2011). Ectomycorrhizal fungi: the symbiotic route to the root for phosphorus in forest soils. *Plant and Soil*, 344, 51–71.
- Della Mónica, I. F., Godoy, M. S., Godeas, A. M., y Scervino, J. M. (2017). Fungal extracellular phosphatases: their role in P cycling under different pH and P sources availability. *Journal of Applied Microbiology*, 124, 155-165.
- Della Mónica, I., Saparrat, M. C. N., Godeas, A. M., y Scervino, J. M. (2015). The co-existence between DSE and AMF symbionts affects plant P pools through P mineralization and solubilization processes. *Fungal Ecology*, 17, 10-17.
- Javot, H., Penmetsa, R. V., Terzaghi, N., Cook, D. R., y Harrison, M. J. (2007). A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(5), 1720–1725.
- Johri, A. K., Oelmüller, R., Dua, M., Yadav, V., Kumar, M., Tuteja, N., Varma, A., Bonfante, P., Persson, B. L., y Stroud, R. M. (2015). Fungal association and utilization of phosphate by plants: success, limitations, and future prospects. *Frontiers in Microbiology*, 6, 984.

- Joner, E. J. y Johansen, A. (2000). Phosphatase activity of external hyphae of two arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research*, 104(1), 81-86.
- Köhler, J., Yang, N., Pena, R., Raghavan, V., Polle, A., y Meier, I. C. (2018). Ectomycorrhizal fungal diversity increases phosphorus uptake efficiency of European beech. *New Phytologist*, 220(4), 1200-1210.
- Nouri, E., Breuillin-Sessoms, F., Feller, U., y Reinhardt, D. (2014). Phosphorus and nitrogen regulate arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Petunia hybrida*. *PLoS ONE*, 9(3), e90841.
- Paul, E. A. (2007). *Soil microbiology, ecology, and biochemistry*, 3rd ed. Burlington: Academic Press.
- Sylvia, D. M., Hartel, P. G., Fuhrmann, J. J., y Zuberer, D. A. (2005). *Principles and applications of soil microbiology*, 2nd ed. New Jersey: Pearson Prentice Hall.
- Xie, X., Lin, H., Peng, X., Xu, C., Sun, Z., Jiang, K., Huang, A., Wu, X., Tang, N., Salvioli, A., Bonfante, P., y Zhao, B. (2016). Arbuscular mycorrhizal symbiosis requires a phosphate transceptor in the *Gigaspora margarita* fungal symbiont. *Molecular Plant*, 9(12), 1583–1608.
- Zhang, L., Wang, M.-X., Li, H., Yuan, L., Huang, J.-G., y Penfold, C. (2014). Mobilization of inorganic phosphorus from soils by ectomycorrhizal fungi. *Pedosphere*, 24(5), 683–689.

CAPÍTULO 4

Micorrizas arbusculares, aplicaciones en el sector agro-forestal

Valeria Bernardo, Sebastián Garita, Juan Ignacio Ripodas, Matias Gonzalez, Cecilia Arango y Marcela Ruscitti

En este capítulo se estudiará el efecto de la inoculación con hongos formadores de micorrizas arbusculares sobre la nutrición de las plantas y el aumento de la tolerancia al estrés abiótico (hídrico, salino, causado por metales pesados) y biótico (causado por hongos y nematodos fitoparásitos). También se abordará el biocontrol de enfermedades por acción de las micorrizas arbusculares.

Las micorrizas arbusculares y la nutrición vegetal

Desde hace mucho tiempo se sabe que los hongos MA cumplen actividades que benefician la nutrición y la salud de las plantas, tanto en ecosistemas naturales como en cultivos agrícolas. El largo período de vida en común de los hongos micorrícicos y las plantas simbiotes (más de 450 millones de años) condicionó su co-evolución que se manifiesta en el elevado grado de mutualismo y dependencia que los simbiotes muestran entre sí (Barea et al., 2016). Como consecuencia, la mayoría de las plantas son micotróficas por naturaleza, es decir, necesitan estar micorrizadas para adquirir nutrientes del suelo de forma óptima. Esta asociación simbiótica entre el hongo y la planta, actúa como un complemento de la raíz en la toma de nutrientes especialmente en la absorción de P (como se desarrolló en el capítulo anterior) y nitrógeno (N), el aumento de la tolerancia a condiciones de estrés biótico y abiótico, el mejoramiento de la calidad del suelo (Barea et al., 2005) y el aumento en la diversidad y la productividad de las plantas en un ecosistema determinado (Azcón Aguilar y Barea, 1997).

El crecimiento de las plantas es limitado por la deficiencia de nutrientes minerales, volviéndolas más susceptibles a diversos factores de estrés, no obstante, las micorrizas mejoran la absorción de macro y micro elementos. Desde el punto de vista nutricional, el crecimiento de la planta debido al aumento en la absorción de P es el principal beneficio que obtiene del hongo micorrícico arbuscular (HMA), dado por la baja disponibilidad de este elemento en el suelo. Sin embargo, si el P no es un elemento limitante en el suelo, la simbiosis puede llegar a ser reducida o hasta inhibida si se encuentran altos niveles en el suelo (Blanco y Salas, 1997).

Además del aumento en la absorción del P (como ya se explicó), estos hongos, a pesar de ser incapaces de fijar N₂ atmosférico, favorecen la adquisición de nitrógeno a través de efectos indirectos. Así como ocurre con el P, las hifas y raicillas colonizadas son capaces de tomar el nitrógeno del suelo en varias formas y transferirlo a las plantas (Siqueira y Franco, 1988). Las plantas micorrizadas absorben los iones amonio (NH₄⁺) y la enzima glutamina - sintetasa (GS) lo combina con el glutamato para formar glutamina. Incluso se ha señalado también la absorción de nitrógeno bajo la forma de nitrato (Strullu et al., 1991). Si bien los HMA poseen la capacidad de emplear tanto amonio como nitrato, sus efectos tienen mayor repercusión fisiológica en la planta cuando es la absorción de NH₄⁺ que, por el contrario del nitrato, se difunde lentamente en la rizósfera, y por lo tanto es menos accesible a las raicillas de las plantas, además de ser tóxico, por lo cual es rápidamente metabolizado. El potasio (K) y el magnesio (Mg) son comúnmente encontrados en altas concentraciones tanto en las plantas micorrizadas como en las que no lo están. Estos elementos se mueven con mayor facilidad en la solución del suelo que el P y aún no se ha encontrado el mecanismo de transporte directo de estos iones por parte de los hongos MA, además en algunos casos la elevada absorción de estos nutrientes coincide con un efecto indirecto para eliminar deficiencias de P. Está estudiado también que los micronutrientes como zinc (Zn), cobre (Cu), azufre (S), boro (B) y molibdeno (Mo), son tomados y transportados a través de las hifas hacia las plantas. Sin embargo, los iones de hierro (Fe), manganeso (Mn) y cloro (Cl) se pueden encontrar tanto en plantas micorrizadas como en las que no lo están (Bolan et al., 1987). Los elementos sodio (Na), cobalto (Co) y silicio (Si) no son esenciales en el crecimiento de todas las especies de plantas; sin embargo, su aumento en algunas de ellas está relacionado con la absorción por parte de los hongos MA.

Algunos estudios comprobaron que la colonización por hongos MA mejoró la absorción de todos los macro y micronutrientes cuando las plantas se fertilizan con un bajo nivel de P y N (Baslam et al., 2013). Contrariamente, plantas de lechuga inoculadas con hongos formadores de micorrizas arbusculares, con alta disponibilidad de N y P en el suelo, mostraron un contenido reducido de macro y micronutrientes en sus tejidos (Azcón et al., 2003). El pH es un factor que también influye en la absorción de nutrientes. Rohyadi (2008), trabajando con maíz colonizado por *Gigaspora margarita*, en condiciones ácidas, observó un aumento de P y propuso que podría deberse a una mejor exploración del suelo por las hifas fúngicas. El crecimiento en suelos ácidos también dificulta la absorción de otros nutrientes minerales esenciales distintos del P, como K, Ca, Mg, Cu y Zn. Las limitaciones para la absorción de nutrientes en suelos ácidos (pH menor de 5) pueden ser superadas por la extensión del micelio externo del hongo. Contrastando con las observaciones anteriores, ciertos estudios han reportado la falta de beneficios para las plantas micorrizadas en suelos ácidos (Muthukumar et al., 2014). Por ejemplo, plantas de batata colonizadas por *G. margarita* no lograron mejorar la absorción de P, K, Ca y Mg cuando se cultivaron en suelos con un pH que oscilaba entre 4,2 y 5,2 (Yano y Takaki, 2005). Resultados similares se observaron en trigo colonizado por especies de *Funneliformis* sp. y *Rhizophagus* sp. donde no se detectó una mejora en la absorción de N, P, K, Fe, Mn, Zn y Cu (Suri et al., 2011). Por lo tanto, la implementación de la fertilización ecológica donde se utilizan microorganismos

beneficiosos para movilizar y reciclar nutrientes y aprovechar la fertilidad del suelo, es importante y de gran interés como una alternativa sostenible.

Las micorrizas arbusculares aumentan la tolerancia al estrés abiótico

En la naturaleza, las plantas se enfrentan con diversas situaciones de estrés provocadas por factores abióticos y bióticos que perjudican la supervivencia, el crecimiento y los rendimientos de los cultivos. Es por ello que existen numerosos estudios en busca de estrategias para lograr disminuirlo o para mejorar la resistencia o tolerancia de las plantas minimizando las pérdidas de rendimiento de los cultivos. Desde el punto de vista biológico el estrés puede definirse como “el conjunto de respuestas bioquímicas, fisiológicas o morfológicas que definen un estado particular del organismo, diferente al observado bajo un rango de condiciones óptimas”.

¿Qué es el estrés abiótico?

El estrés abiótico se puede definir como un cambio en cualquier factor inerte dentro del medio ambiente lejos de la condición óptima o lejos de la condición a la que la mayoría de los organismos en ese entorno se han adaptado. Entre las causas que provocan el estrés abiótico se encuentran la sequía, las temperaturas y los pH extremos, la salinidad, la deficiencia de nutrientes y la toxicidad por metales pesados y contaminantes ambientales.

Los efectos del estrés abiótico han sido bien documentados en los sistemas agrícolas, debido a que provocan pérdidas importantes en el rendimiento de los cultivos, en algunas ocasiones superiores al 70% (Mantri et al., 2012). Este tipo de estrés provoca alteraciones en las relaciones hídricas, la absorción de nutrientes, la modificación de la apertura estomática, la reducción de la actividad fotosintética y otras modificaciones de la homeostasis osmótica e iónica causando daño a proteínas, pérdida de funcionalidad de las membranas celulares y la alteración en el patrón de expresión de genes, entre otros cambios desencadenados.

Las plantas, con el objetivo de minimizar su impacto negativo, han desarrollado diversas modificaciones a nivel morfológico, fisiológico y bioquímico para poder tolerar condiciones ambientales desfavorables y evitar daños (Taiz y Zeiger, 2006; Ruiz-Lozano et al., 2006).

Actualmente se intenta implementar estrategias sostenibles en la producción agrícola para mejorar la tolerancia a situaciones de estrés, entre las que se encuentra el estudio de las asociaciones de la microbiota del suelo con las raíces de las plantas. Dicho conocimiento puede ser explotado para mejorar el crecimiento de las plantas y la productividad no solo en situaciones de estrés sino también bajo condiciones normales de crecimiento.

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares han sido ampliamente descriptos como favorecedores del crecimiento vegetal al producir cambios físicos, bioquímicos y fisiológicos en las raíces de las plantas que conducen a alcanzar un mejor estado hídrico y nutricional. Es por este motivo que constituyen una estrategia sustentable para aliviar los efectos negativos provocados por este estrés (**Figura 4.1**). Esta afirmación ha sido demostrada en numerosos trabajos de investigación (Abdel Latef, 2011; Hajiboland, 2013; Gill et al., 2016).

Los beneficios que ofrece esta asociación surgen cuando la planta y el hongo constituyen una interacción estable y funcional donde ambos se favorecen en las condiciones de estrés en las que se establece. Como ya se expresó en otros capítulos, los HMA son simbioses obligados, que mejoran el estado nutricional de las plantas contribuyendo a incrementar la resistencia/tolerancia a situaciones de estrés. Además, existen otros mecanismos que otorgan a la planta hospedante tolerancia a diferentes tipos de estrés, como el mejoramiento de las características físicas del suelo y la diversificación de especies vegetales en los ecosistemas (Smith y Read, 2008).

Si bien existe gran cantidad de estudios sobre los efectos de la micorrización en situaciones adversas para las plantas, se desconocen cuáles son los mecanismos precisos por los cuales inducen esta tolerancia, ya que los beneficios que aportan estos hongos dependen del tipo de estrés, la especie vegetal y la especie de hongo micorrízico.



Figura 4.1: Efecto de los hongos formadores de micorrizas arbusculares ante distintos estreses abióticos

Participación de los hongos micorrícicos frente al estrés hídrico

Los estudios realizados en el tema concluyen que es probable que sólo en situaciones de estrés hídrico leve o moderado, la simbiosis micorrícica genere mayores beneficios a la planta huésped. El aumento de la tolerancia a este tipo de estrés es el resultado de múltiples mecanismos, sugiriendo un enfoque holístico para dilucidar esta asociación.

Uno de los principales efectos perjudiciales provocados por el estrés hídrico está relacionado con la restricción en la absorción de agua y como consecuencia la dificultad en la incorporación de nutrientes del suelo. La planta cierra sus estomas disminuyendo la transpiración, alterando el transporte de nutrientes lo que ocasiona daños en procesos bioquímicos y fisiológicos fundamentales (fotosíntesis, respiración, traslocación de fotoasimilados, alteración del metabolismo de reguladores de crecimiento, etc.) que conducen a una disminución en el crecimiento de las plantas. El agotamiento del agua en la zona de la raíz, la elevada tasa de transpiración o la producción excesiva de especies reactivas del oxígeno (ROS, por su acrónimo en inglés) genera un estrés oxidativo en la planta y pueden ser, a la vez, las causas de los efectos adversos del déficit de agua.

Los hongos MA, a través de su micelio externo, facilitan la absorción y transporte de agua y nutrientes hacia la planta huésped, mejorando la eficiencia del uso del agua en condiciones de sequía comparado con plantas no micorrizadas. Dicha respuesta se genera debido al tamaño del micelio extrarradical (2 a 5 μm) que le permite acceder a pequeños poros del suelo que no pueden alcanzar los pelos radiculares y su capacidad para tomar agua de sitios con potenciales hídricos (Ψ) más bajos con relación a la planta (Marulanda et al., 2003; Smith y Read, 2008). De hecho, se ha demostrado una mayor eficiencia en el uso del agua en las plantas micorrizadas durante el déficit hídrico (Borde et al., 2012). Algunos estudios demostraron también que los HMA pueden modificar la conductividad de las membranas celulares de la planta. Es así que se observó la inducción de genes que codifican acuaporinas en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Ruiz-Lozano, 2003). Pero contrariamente, en lechuga (*Lactuca sativa* L.) y soja (*Glycine max* L.) inoculadas con *F. mosseae* y *R. irregularis*, el estrés por déficit hídrico disminuyó la expresión de acuaporinas en comparación con plantas no inoculadas, las que presentaron un potencial hídrico menos negativo y mayor eficiencia en el uso de agua (Porcel et al., 2006).

Algunos autores observaron que plantas de tomate inoculadas con hongos MA en condiciones de déficit hídrico no presentaron diferencias en la eficiencia del uso del agua en comparación con las plantas no micorrizadas (García-Sánchez et al. 2014), lo que indicaría que existen mecanismos diferentes para modificar la conductividad hidráulica y así evitar la pérdida de agua. La sequía también ocasiona deficiencia en la absorción de nutrientes tales como Ca, Fe, K, Mg, P y Zn. La mejora en la conductividad hidráulica de las raíces de las plantas micorrizadas permite una mayor absorción de elementos como el N, P y K y también Ca y Fe (Wu y Zou, 2010).

Las plantas micorrizadas suelen realizar un mejor ajuste osmótico respecto a las no micorrizadas, La acumulación de osmolitos, como azúcares, prolina y glicina betaína, reducen el potencial osmótico en plantas micorrizadas sometidas a estrés hídrico, permitiendo la retención de agua (Abbaspour et al., 2012) como mecanismo principal de tolerancia a la sequía (Ruscitti et

al., 2011; Rapparini y Peñuelas, 2014); sin embargo, otros estudios revelaron que, bajo la escasez de agua, se observó una disminución de la acumulación de prolina, comparado con plantas no micorrizadas (Doubková et al., 2013).

El efecto de los hongos MA sobre la conductancia estomática es variable. El aumento de la conductancia estomática resulta en una mayor difusión de CO₂ al mesófilo de las hojas favoreciendo la fotosíntesis neta. Plantas micorrizadas de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) (Sánchez-Blanco et al., 2004), mandarina (*Citrus tangerine*) (Wu y Xia, 2006) y arroz (*Oriza sativa* L.) (Ruíz-Sánchez et al., 2010) en condiciones de estrés hídrico, incrementaron la conductancia estomática. Sin embargo, el trébol blanco (*Trifolium repens* L.) mostró una disminución de este parámetro y un aumento en la eficiencia del uso del agua en las mismas condiciones (Benabdellah et al., 2011).

Se detectó también un incremento en el contenido de clorofila y carotenoides en las plantas micorrizadas durante el estrés por sequía (Asrar y Elhindi, 2011, Abdelmoneim et al., 2014), parámetro correlacionado también con el incremento en la tasa fotosintética inducida por la micorrización (**Figura 4.2**). Este efecto fue observado en plantas inoculadas con HMA en caléndula (Asrar y Elhindi, 2011), batata (Yooyongwech et al., 2016) y mandarina (Wu y Xia, 2006) bajo déficit hídrico. De esta forma, la simbiosis evita la fotoinhibición y fotodestrucción del aparato fotosintético por ROS, en condiciones de estrés.

La modificación del equilibrio hormonal es otro de los mecanismos que explican la respuesta de las plantas micorrizadas ante un déficit hídrico. Los cambios en los niveles hormonales parecen depender del tipo de HMA y la especie vegetal. Ciertas plantas micorrizadas sometidas a estrés hídrico incrementan la transpiración y absorción de agua por las raíces, lo cual está asociado con bajas concentraciones de ácido abscísico (ABA), aunque en otras especies, como por ejemplo el tomate, se observó que el contenido de ABA aumentó significativamente. En este caso en particular, el ABA participa sosteniendo la micorrización de las plantas jugando un papel fundamental en el desarrollo y funcionalidad de los arbusculos (Herrera-Medina et al., 2007). También se ha reportado que el ABA regula la síntesis de las estrigolactonas. Estas últimas son una nueva clase de hormona vegetal que regula la arquitectura y el desarrollo reproductivo de las plantas, y que posee la capacidad de intermediar en el proceso de la simbiosis micorrízica, donde actúa como una señal molecular en condiciones desfavorables para el crecimiento de las plantas (López-Ráez et al., 2010). El ácido jasmónico parece estar involucrado también en la funcionalidad de los arbusculos junto con el ABA y en la variación del potencial osmótico de la raíz producido por el incremento de hidratos de carbono. En situaciones de déficit hídrico se produce la acumulación de ROS que daña el aparato fotosintético limitando el suministro de NADPH y ATP al ciclo de Calvin. Las plantas micorrizadas sometidas a déficit hídrico disminuyen la actividad antioxidante. Uno de los mecanismos que explica esta respuesta consiste en la mayor capacidad de absorción de agua por las hifas ya que la mejora del estado hídrico de las plantas disminuye la generación de ROS. Es así que se observa menor actividad de enzimas antioxidantes, tales como superóxido dismutasa y peroxidasas en plantas micorrizadas, comparadas

con aquellas no inoculadas. Otro de los mecanismos sugeridos es que la simbiosis induce la producción de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Abbaspour et al., 2012), especialmente en condiciones de déficit hídrico (Amiri et al., 2015).

Tanto la colonización fúngica de las raíces como la del suelo influyen en el estado hídrico de las plantas hospedantes. El efecto benéfico sobre la estructura del suelo, mediante la formación de agregados estables debido a la producción de una glicoproteína denominada glomalina podría favorecer el estado hídrico del suelo.



Figura 4.2: Plantas de pimienta cultivadas en condiciones de estrés hídrico, no inoculada (A) e inoculada con *Funneliformis mosseae* (B)

Participación de los hongos micorrícicos en el estrés salino

La salinidad constituye un serio problema para la agricultura, acentuándose en las regiones áridas y semi-áridas, donde la evaporación es mayor que las precipitaciones, lo que ocasiona importantes pérdidas de rendimiento de las cosechas. Se estima que la superficie total de los suelos afectados en el mundo es de 831 millones de hectáreas que incluyen 397 y 434 millones de hectáreas de suelos salinos y sódicos, respectivamente. El origen del exceso de sales de un suelo puede ocurrir por causas naturales o por acción del hombre. La actividad antrópica ha

incrementado la extensión de áreas salinizadas al aumentar las zonas de regadío, provocando cambios en el balance de agua y sales de los sistemas hidrogeológicos.

El estrés salino disminuye el potencial osmótico del medio en el que se desarrollan las plantas dificultando la absorción de agua, causando una reducción de la turgencia y expansión celular y por lo tanto una disminución del crecimiento. La salinidad también genera desequilibrios nutricionales en las plantas, ya que la acumulación excesiva de iones dominantes en la solución del suelo, como Cl^- o Na^+ , pueden alcanzar niveles citotóxicos para el metabolismo celular, desencadenando un desequilibrio iónico en la planta, como así también interferir en la absorción de nutrientes esenciales como K^+ , Ca^{2+} y NO_3^- (Azcón-Bieto y Talón, 2008) y provocar un estrés oxidativo que daña proteínas y ácidos nucleicos (Ahmad et al., 2016).

Los mecanismos por los cuales los HMA protegen a las plantas de la salinidad no han sido totalmente dilucidados. Se ha determinado que estos hongos logran potenciar los beneficios de aquellos cultivos tolerantes a la salinidad cuando se seleccionan y combinan en forma adecuada. Esto se ha comprobado aislando cepas de HMA en suelo salinos creciendo asociados a plantas tolerantes a la salinidad, lo que constituye una importante herramienta ecológica para la agricultura. La colonización con hongos micorrícicos arbusculares permitió a las plantas hospedantes creciendo bajo condiciones salinas, aumentar la capacidad de absorción de agua a través de su red hifal como así también mejorar el suministro de nutrientes y la capacidad de intercambio gaseoso (Hameed et al., 2014).

Los HMA mejoran los efectos perjudiciales de la salinidad sobre el crecimiento y la nutrición de plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) esto se comprobó al encontrarse concentraciones más bajas de sodio en los tejidos foliares, lo que mitigó el impacto de la salinidad sobre la integridad de las membranas celulares (Beltrano et al., 2013).

La inoculación con HMA también puede reducir el estrés oxidativo al disminuir la peroxidación de lípidos de membrana en plantas expuestas a salinidad (Yang et al., 2014). Esto se evidenció por el bajo nivel de malondialdehído (MDA), un estimador ampliamente utilizado como diagnóstico de la peroxidación, como así también la menor pérdida de electrolitos (Abdel Latef y Chaoxing, 2014). Como ya se mencionó, ciertas plantas micorrizadas realizan ajuste osmótico acumulando osmoprotectores como prolina, glicina-betaína, azúcares y ácidos orgánicos. Mediante la acumulación de prolina y glicina las plantas inoculadas protegen las membranas tilacoidales contra el daño por ROS. La alta acumulación de azúcares solubles se correlacionó con una mejora de la fotosíntesis mediada por la micorrización (Abdel Latef y Chaoxing, 2014). Sin embargo, puede haber efectos negativos de la asociación con micorrizas y la acumulación de azúcar en la planta huésped durante la salinidad (Beltrano et al., 2013). La inoculación con HMA también puede aumentar la asimilación de nitrato evidenciado por la actividad de la enzima nitrato reductasa. Se observó también el aumento en la proporción K^+/Na^+ y $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ respecto de las no micorrizadas (Evelin et al., 2012). Los estudios indican que la mejora en la nutrición fosforada y el mantenimiento de una mayor proporción de $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ son determinantes en la mejora de la integridad de las membranas en las plantas micorrizadas (Evelin et al., 2012;). La salinidad del suelo puede también afectar la capacidad de colonización de los hongos micorrícicos, ya sea por efectos directos sobre la simbiosis, que producen cambios a nivel fisiológico,

o en forma indirecta al modificar aspectos relacionados al suelo como el pH, textura, materia orgánica, características físicas y químicas y los factores bióticos.

Todas estas evidencias destacan los beneficios de la inoculación con HMA en condiciones de salinidad, sin embargo, es importante estudiar la ecología de estos hongos provenientes de suelos salinos con el fin de identificar aislamientos más adaptados a estas condiciones estresantes.

Participación de los hongos micorrícicos en el estrés por metales pesados

La absorción de iones tóxicos por las raíces reduce la productividad de los cultivos y constituye además una amenaza potencial para la salud humana y el ecosistema. La acumulación de metales pesados (MP) en las plantas que se cultivan para el consumo de la población es la principal vía de entrada de los MP en la cadena alimentaria humana (Garg y Singla 2012). El exceso de MP trae diversas consecuencias sobre el crecimiento de las plantas tales como: inhibición de la germinación, disminución del alargamiento de raíces, alteración de la fotosíntesis y de la transpiración, clorosis y senescencia prematura de hojas (Drzewiecka et al., 2012). También se ha informado la inhibición de la actividad de enzimas, como fosfatasa, ATPasa y enzimas antioxidantes. Sin embargo, algunas especies vegetales han desarrollado mecanismos para mitigar los efectos adversos de los MP, usando diferentes estrategias. Ciertas plantas usualmente acumulan concentraciones relativamente bajas de metales en sus tejidos, aunque crezcan en suelos altamente contaminados (Wei et al., 2008), a manera de exclusión para evitar la absorción excesiva y el posterior transporte de los iones metálicos (Drzewiecka et al., 2012). Las raíces de algunas especies secretan compuestos orgánicos que pueden ligar los MP y así reducir su absorción. Otras plantas pueden retener los metales en las paredes celulares, reduciendo así su traslocación a la parte aérea (Konno et al., 2005). Por el contrario, algunas raíces pueden absorber cantidades elevadas de metales y transportarlos a los tallos, siendo los iones metálicos detoxificados por compartimentalización vacuolar o complejados con ligandos orgánicos, como ácidos orgánicos, aminoácidos y péptidos, los cuales reducen la toxicidad (Clemens, 2001). Estos tipos de plantas pueden ser utilizadas en programas de fitorremediación; no obstante se debe comprobar que el nivel de transporte de MP no alcance niveles elevados que interfieran en la cadena alimentaria (Drzewiecka et al., 2012). La actividad fitorremediadora puede potenciarse a través de la asociación de las raíces de las plantas con microorganismos benéficos que habitan el suelo tales como rizobacterias y hongos micorrícicos (Nadeem et al., 2014). Los posibles mecanismos que subyacen a una mejor tolerancia de la planta a los metales como resultado de la inoculación con hongos micorrícicos pueden ser los siguientes: (1) restricción de metales por los compuestos secretados por el hongo, (2) precipitación en gránulos de polifosfato en el suelo, (3) adsorción de metales a quitina en la pared celular, (4) quelación de los metales dentro del hongo, (5) cambios en el pH de la rizósfera, (6) regulación de la expresión génica en condiciones de estrés (Malekzadeh et al., 2011). Se ha determinado que la glomalina, glucoproteína producida por hongos MA, secuestra metales como Cu, Cd y Zn en forma irreversible (González-Chávez et al., 2004). De la misma manera que las hifas absorben los nutrientes y el agua, también pueden

absorber MP y transportarlos desde la raíz hacia el tallo; este proceso se conoce como fitoextracción. La fitoextracción es una tecnología reciente y representa la más eficiente y atractiva estrategia para “limpiar” suelos contaminados (Kramer, 2005). Consiste en transferir los MP del suelo a las raíces o partes aéreas de las plantas con alta capacidad de almacenamiento. En general, estas plantas se caracterizan por la gran producción de biomasa, consecuentemente, la remoción de esas grandes cantidades de biomasa conlleva la remoción de MP con la cosecha, que se puede utilizar para producir energía o almacenarse como materia seca reduciendo así su volumen (Kramer, 2005). Se sabe que los MP ingresan a las células vegetales por medio de transportadores específicos e inespecíficos que se encuentran en las membranas celulares. En la mayoría de los casos, el aumento en la absorción de MP por las plantas micorrizadas está asociado a un aumento en la nutrición fosforada. Los hongos MA poseen transportadores de PO_4^{3-} de alta afinidad, con los cuales las plantas absorben As como AsO_3^- en respuesta a la semejanza de su conformación, es probable que los hongos contribuyan a remover el As de los suelos utilizando estos mecanismos (Ouziad et al., 2005).

En otros casos, el hongo contribuye a la inmovilización de los MP en el suelo, proceso denominado fitoestabilización. Al extraer los MP del suelo, los hongos MA también contribuyen a disminuir el riesgo de toxicidad para otros microorganismos y plantas que crecen en las inmediaciones (Gamalero et al., 2009). La inmovilización de los MP dentro de la rizósfera es el resultado de la precipitación de sustancias en el suelo, su adsorción a las micelas y/o la absorción y acumulación de los metales en las raíces de las plantas o por la acción microbiana. Las especies vegetales tolerantes a MP con extensos sistemas radicales previenen la difusión y además contribuyen a la fitoestabilización (Gaur y Adholeya, 2004). Los hongos MA también contribuyen a la inmovilización de los MP en el suelo, empleando estrategias similares a las de su hospedante, es decir, inmovilizan los MP excretando compuestos como la glomalina, los adsorben a las paredes celulares fúngicas o los ligan a quelantes acumulados dentro del hongo (Gaur y Adholeya, 2004). Por otro lado, la fijación de los MP a la quitina de los hongos reduce su concentración en el suelo. En especies de plantas altamente colonizadas por hongos formadores de micorrizas, se observó que la inmovilización del Pb está correlacionada con un incremento en el número de vesículas. En forma similar a lo que ocurre en las vacuolas de las plantas, las vesículas podrían actuar como grandes depósitos de compuestos tóxicos contribuyendo así con los mecanismos de detoxificación (Alvarado et al., 2011).

El resultado de la colonización micorrícica sobre la detoxificación de los suelos contaminados depende de la combinación planta – hongo – MP y está influenciado por las condiciones del suelo (Orłowska et al., 2005). El uso de HMA en estrategias de fitorremediación de suelos contaminados con MP demanda de una comprensión previa de cómo el hongo y/o la simbiosis responden a estos ambientes. Las esporas y las hifas presimbióticas del hongo, que se desarrollan antes de producirse la simbiosis, son sensibles a los MP; esto se observó por efecto del Cu, Zn, Pb y Cd, lo que resultó en una disminución del porcentaje de colonización micorrícica (Ruscitti et al., 2011). Es de destacar que los hongos procedentes de esporas que provienen de suelos contaminados logran desarrollar cierta resistencia a los MP (Shalaby, 2003). Por otro lado, la combinación de distintos MP lleva a interacciones sinérgicas o antagónicas, que incrementan o disminuyen la toxicidad del metal. Por ejemplo, el

Zn se comporta como antagonista del Pb y/o del Cd, mientras que el Pb y el Cd actúan sinérgicamente (Shalaby, 2003). La promoción mediada por la colonización micorrícica en el crecimiento de las plantas bajo estrés por MP se atribuyó principalmente a la mejora en el contenido de clorofila y a la mayor absorción de nutrientes minerales por el hospedador (**Figura 4.3**), principalmente los de baja movilidad como P (Abdel Latef, 2013; Garg y Singla, 2012). El mayor contenido relativo de agua (CRA) y el contenido de clorofila se reportaron en plantas de arveja colonizadas y expuestas a arsénico, siendo las plantas micorrizadas las que mantuvieron la mayor turgencia y la menor clorosis (Garg y Singla, 2012). La mayor turgencia se relacionó a la acumulación de sacarosa y/o glicina-betaína, así como a un mayor nivel de prolina como consecuencia del ajuste osmótico (Garg y Singla, 2012). Como ocurre en otros casos de plantas sometidas a estrés, las plantas micorrizadas resultan más tolerantes a los MP a través de la activación de los sistemas enzimáticos de defensa antioxidantes (SOD, CAT, POD y APX) (Abdel Latef, 2013; Garg y Singla, 2012).

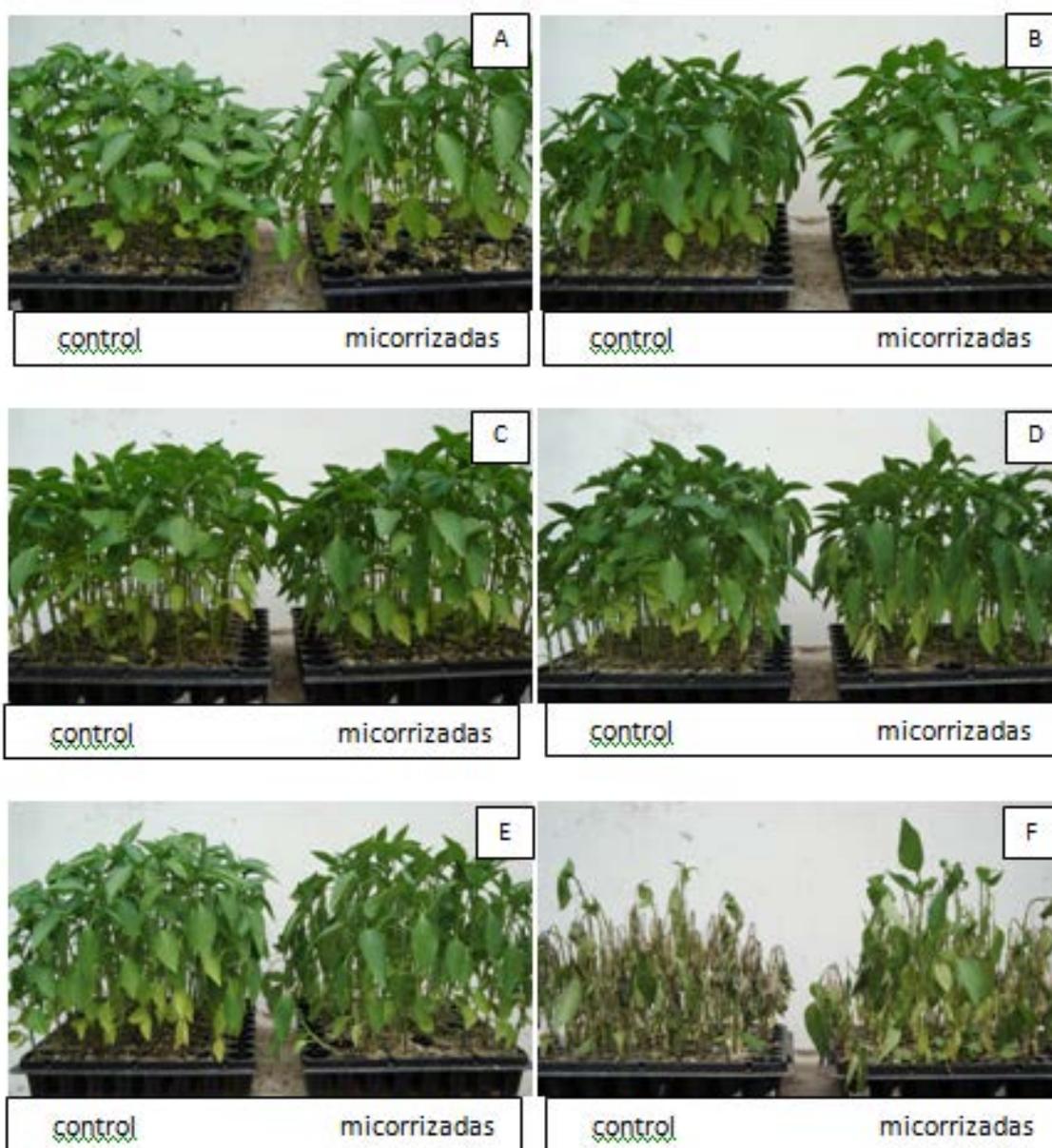


Figura 4.3: Plantas de pimienta cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre; A: 0 mM; B: 0,25 mM; C: 0,5 mM; D: 1 mM; E: 2 mM y F: 4 mM de $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, no inoculadas e inoculadas con *Funneliformis mosseae*.

Participación de los hongos micorrícicos frente al estrés térmico

El cambio climático generado principalmente por la producción de las emisiones de gases con efecto invernadero está provocando el aumento de la temperatura del planeta, junto con el derretimiento de los glaciares, el aumento de las precipitaciones y de la frecuencia de eventos meteorológicos extremos. El aumento de las temperaturas ambientales puede relacionarse con el probable efecto en la producción agrícola. Algunos efectos del estrés por calor en las plantas son los siguientes: (I) retraso de la germinación de las semillas y pérdida de vigor, (II) reducción de la biomasa total, (III) inhibición de crecimiento, (IV) quemado de hojas y frutos, (V) senescencia y abscisión foliar, (VI) reducción de la fotosíntesis y la respiración, (VII) decoloración y daño de la fruta (VIII) disminución del rendimiento (IX) lisis celular, y (X) estrés oxidativo por acumulación de ROS (Jahromi et al., 2008; Miransari, 2010). El desarrollo de la simbiosis micorrícica también es afectado por las altas temperaturas. Los HMA reducen la germinación de sus esporas y el desarrollo de sus hifas cuando la temperatura del ambiente supera los 40 °C, mientras que solo disminuyen la colonización de las raíces con temperaturas de más de 30 °C (Gavito et al., 2005), dependiendo de la duración del estrés y la especie de hongo (Zhu et al., 2012). En general, las plantas micorrizadas crecen mejor a altas temperaturas en comparación con las plantas no micorrizadas (Gavito et al., 2005). Sin embargo, Zhu et al. (2012) no informaron diferencias en la biomasa de plantas de maíz inoculadas con *Glomus etunicatum* a alta temperatura. Algunos estudios demuestran el mejor comportamiento como resultado de una alta tasa de fotosíntesis neta, conductancia estomática y eficiencia del PSII (F_v / F_m) en plantas micorrizadas comparadas con aquellas no inoculadas en situaciones de estrés por altas temperaturas, indicando que la simbiosis con HMA puede proporcionar una alta capacidad de intercambio de gases al disminuir las resistencias estomáticas y al aumentar la asimilación de CO₂ y los flujos de transpiración. El aumento en el contenido de clorofila de las plantas micorrizadas y la estabilización de los lípidos que componen las membranas tilacoidales también mejoran la eficiencia fotosintética bajo estrés calórico (Zhu et al., 2012). Entre otros mecanismos importantes que mejoran el estado de los cultivos bajo este tipo de estrés se menciona el aumento de la conductividad hidráulica de la raíz, favoreciendo el equilibrio osmótico y el control de la deshidratación de los tejidos, incrementando así la eficiencia del uso de agua.

Se ha estudiado también el efecto del estrés por frío en plantas micorrizadas, en las cuales la inoculación con HMA indujo tolerancia al frío, atribuido a una mejora de la fotosíntesis, del estado hídrico de las plantas hospedantes y de la síntesis de azúcares, proteínas solubles y prolina (Chen et al., 2013; Liu et al., 2013). Se observa en general que bajo estrés por bajas temperaturas mejora el transporte de agua en las plantas micorrizadas mediado por la actividad de las aquaporinas (canales proteicos en la membrana especializados en el transporte de agua). La mejora en el estado hídrico de la planta contribuye a mejorar el ajuste osmótico, la absorción de nutrientes, el intercambio de gases y la eficiencia fotoquímica del PSII. También se evidenció una mayor actividad de enzimas antioxidantes en las plantas micorrizadas comparadas con las no micorrizadas, expuestas a estrés por frío.

Las micorrizas arbusculares aumentan la tolerancia al estrés biótico

El suelo es un sistema complejo donde la combinación de material mineral, material orgánico, humedad y oscuridad, hacen de éste, un lugar propicio para el crecimiento y la actividad de diferentes grupos de organismos. No obstante, los suelos que carecen de plantas, presentan bajos niveles de carbono y por lo tanto la actividad microbiana también es reducida. Las raíces sintetizan una gran cantidad de exudados con alto contenido de carbono, que sumado a los tejidos que se desprenden por descamaciones, promueven un incremento significativo de la microbiota del suelo (McCully, 1999).

En la rizósfera pueden encontrarse hongos, bacterias, nematodos, virus y algas. Algunos de estos tienen conocida acción benéfica sobre las plantas; otros tienen una acción negativa, y de otros se desconoce el tipo de interacción con el ambiente y el vegetal. En el caso de aquellos que afectan el crecimiento vegetal, existen aquellos que:

- Provocan daño mecánico, como los nematodos, que perforan células con su estilete para alimentarse y en algunos casos laceran tejidos al ingresar con su cuerpo dentro de las raíces.
- Necrosan los tejidos por la actividad de enzimas.
- Ingresan al tejido sin dañarlo, pero consumen nutrientes de la planta parasitada.
- Provocan alteraciones en el crecimiento, como tumores, metaplasia, epinastia e hiponastia.

El resultado del accionar de estos organismos es en principio una reducción en el crecimiento y en la productividad de los cultivos, y en casos más severos la muerte de la planta. La rizósfera es el área donde ocurren la mayor parte de estas interacciones entre plantas y organismos, de allí la importancia que las micorrizas tienen en la protección vegetal (Hirsch et al., 2003). Como fue comentado anteriormente, las plantas micorrizadas presentan ventajas frente a las plantas no micorrizadas, principalmente por la mayor exploración del sustrato, que aumenta las posibilidades de absorción de agua y nutrientes, especialmente aquellos de escasa movilidad y disponibilidad. Este mejor estado nutricional de las plantas micorrizadas, hace que se encuentren en mejores condiciones para hacer frente al ataque de patógenos y a su vez puedan compensar los daños o las pérdidas provocadas por éstos. Más allá de este efecto *preventivo* y *compensatorio* han sido documentadas otras ventajas que presentan las plantas micorrizadas en situaciones de estrés biótico, que involucran mecanismos tales como la regulación de las vías de señalización, la activación de respuestas de defensa y la modificación de las poblaciones de diferentes grupos de organismos en la rizósfera (Pozo et al., 2010).

El efecto de biocontrol más estudiado es la protección contra hongos patógenos de raíces como *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Verticillium*, *Phytophthora* y *Aphanomyces* (Whipps, 2004) o nemátodos fitoparásitos (Li et al., 2006), en la cual intervienen factores tales como el genotipo

de la planta, el microorganismo involucrado y las condiciones ambientales. Los HMA también afectan significativamente el crecimiento y/o supervivencia de insectos fitófagos. Aunque la simbiosis reduce sistemáticamente los ataques de insectos que se alimentan de raíces, los efectos sobre los insectos de alimentación foliar son más variables. El efecto parece depender del insecto, estilo de vida y grado de especialización. Los HMA reducen la incidencia de los insectos masticadores, mientras que la alimentación con savia o insectos especializados muestra un aumento en el rendimiento en plantas micorrizadas. (Pozo et al., 2010). Sumado a los mecanismos antes mencionados, la aplicación de los HMA para el control de patógenos resulta promisorio, debido a su amplia distribución en los agroecosistemas.

Efecto de los exudados radiculares

Las raíces segregan un amplio espectro de compuestos de bajo peso molecular cuya composición depende de la especie, el estado de desarrollo, las características del suelo, la actividad microbiana, etc. Estos compuestos pueden participar en procesos de señalización entre las plantas y los organismos del entorno (incluidos los microorganismos), como se mencionó en el capítulo 2, actuando como barrera química frente al ataque de bacterias, insectos, hongos y nematodos, y en procesos benéficos como moduladores de las interacciones con microorganismos simbióticos (Cameron et al., 2013). El ataque de las plantas por un agente biológico desencadena una secuencia compleja de eventos bioquímicos y citológicos de reconocimiento, en condiciones ambientales adecuadas, para que se genere la enfermedad. Los HMA comparten mecanismos de interacción con la planta, similares a los que establecen patógenos biotrofos, en los que los exudados radiculares juegan un papel clave (Smith y Read, 2008). La mayor parte de los compuestos químicos que forman parte de los exudados radiculares son metabolitos secundarios, con preponderancia de compuestos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos) como así también ácidos orgánicos, azúcares simples y aminoácidos (Steinkellner et al., 2007; Lioussanne et al., 2008). Se ha comprobado que la composición de los exudados de las raíces micorrizadas difiere cualitativamente y cuantitativamente del de las raíces no micorrizadas. Es así que se observó que a lo largo del ciclo de vida de una planta micorrizada el patrón de flavonoides varía drásticamente. Dependiendo del tipo de compuestos disponibles en dichos exudados su respuesta puede ser tal que estimulen o supriman a distintos microorganismos rizosféricos (Panka et al., 2013). Esas modificaciones en los exudados radiculares, particularmente los ácidos fenólicos, alteran también la comunicación entre hospederos y hospedantes, disminuyendo la tasa de infección o incidencia. Los aminoácidos liberados de las raíces también afectan a los microorganismos que habitan en la rizósfera, ya sea que pueden servir como fuente de nutrientes o suprimir (limitar) su crecimiento (Hao et al., 2011). Los exudados de raíces de plantas colonizadas por HMA provocan la inhibición de la esporulación de hongos patógenos. Varias especies de HMA del género *Glomus* al ser inoculadas en almácigo, son capaces de reducir el ataque combinado de hongos de suelo (*Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora* y *Rhizoctonia*). Además, la resistencia de las plantas micorrizadas se incrementa a través de una mayor expresión de las proteínas relacionadas con la patogénesis como también la

acumulación de fitoalexinas (Ren et al., 2015). Un estudio reveló que la penetración del nematodo *Meloidogyne incognita* se redujo en tomates micorrizados y que los exudados de raíces micorrizadas contribuyeron a este proceso, debido a un efecto negativo sobre el nematodo y su motilidad en el suelo. La modificación de los exudados radiculares también provoca cambios en la población total y en los grupos funcionales de los microorganismos presentes. En muchos casos se favorece el desarrollo de microorganismos antagonistas de patógenos, generando una barrera de bioprotección para la planta (Vos et al., 2012).

Producción de sustancias fúngicas

El micelio extrarradicular de las micorrizas también libera una serie de compuestos que tienen un efecto supresor y/o estimulante en el sustrato circundante. Filión et al. (1999), reportaron la estimulación del crecimiento de *Pseudomonas chlororaphis* y *Trichoderma harzianum* por exudados de los hongos formadores de MA, mientras que la germinación de conidios de *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* se redujo y el crecimiento de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* no se vio afectado. Otra evidencia clara de este mecanismo de acción fue demostrada por St-Arnaud et al. (1997) quienes cultivaron plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus*), familia *Caryophyllaceae* (especie que no forma micorrizas arbusculares), en un sustrato infestado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* y observaron que si las plantas de clavel eran cultivadas junto a plantas de *Tagetes patula* inoculadas y no inoculadas con *Glomus intraradices*, el micelio proveniente de las raíces colonizadas que se extendió en el sustrato tuvo un efecto supresor en *Fusarium*. La sobrevivencia de las plantas en presencia de micorrizas se duplicó, la severidad de los daños fue menor y el número de propágulos del patógeno al final del ciclo del clavel fue menor.

Competición por espacio y fuente carbonada

El crecimiento de los hongos micorrícicos y el de muchos organismos fitopatógenos depende de los fotosintatos provistos por la planta huésped, por lo que existe una competencia por la captación de éstos. Cuando los HMA colonizan las raíces de forma temprana, la mayor demanda de carbono puede inhibir el crecimiento de los patógenos (Larsen y Bødker, 2001). Es por este motivo que se ha sugerido que la competencia por nutrientes, especialmente carbono, es la principal causa del efecto de biocontrol mediado por HMA (Jung et al., 2012). Del mismo modo, existe una competencia por el sitio, ya que al igual que los hongos formadores de micorrizas arbusculares muchos patógenos tienen un crecimiento inter e intracelular en el vegetal (Pozo et al., 2010). Una investigación llevada adelante utilizando inmunomarcadores, demostró que en plantas micorrizadas de tomate que fueron posteriormente inoculadas con *Phytophthora nicotianae*, hubo una reducción del crecimiento de las hifas del patógeno en aquellas porciones de tejido que estaban micorrizadas. Si bien el crecimiento de un

microorganismo no excluyó al otro, se observó que en los sectores de tejido que contenían arbuscúlos la necrosis provocada por el patógeno disminuía significativamente (Cordier et al., 1996). En plantas de tomate y pimiento micorrizadas con *Glomus intraradices* e infectadas con *Nacobbus aberrans*, la colonización micorrícica fue significativamente mayor que en plantas no infectadas, sugiriendo que la colonización temprana de las raíces por los HMA interfiere con la penetración de los nematodos (Marro et al., 2014; Ruscitti, et al., 2019). En plantas de tomate infectadas con *Nacobbus aberrans*, la inoculación con *G. intraradices* mostró un efecto benéfico al reducir el número de agallas en las raíces y disminuir la reproducción del nematodo (Lax et al., 2011; Garita et al., 2019). El mayor volumen radicular de las plantas colonizadas por el hongo *Funneliformis mosseae*, parece compensar el menor crecimiento radicular de plantas infectadas con nematodos endoparásitos migratorios (Elsen et al., 2003). Este efecto es dependiente de la especie de nematodo, el HMA y la planta, ya que el aumento en la ramificación de las raíces podría tener un impacto negativo en la planta hospedadora debido a un aumento en los sitios potenciales de infección.

Inducción de resistencia

El ingreso de los hongos micorrícicos en las raíces puede provocar una respuesta de defensa donde se desencadena una serie de cambios bioquímicos que pueden darse a nivel local o de forma sistémica. La micorrización provoca una reacción en la planta, en la que proteínas vinculadas a la patogénesis son secretadas en los espacios intercelulares, incluyendo un incremento en la síntesis de enzimas hidrolíticas, como quitinasa y β -1,3-glucanasa (El-Khallal, 2007), así como enzimas asociadas con la síntesis de compuestos fenólicos, fitoalexinas y barreras estructurales como la lignificación de las paredes celulares (Guillon et al., 2002). Estudios recientes determinaron que dichas respuestas ocurren más rápidamente en plantas micorrizadas comparadas con las no micorrizadas ante el ataque de patógenos, lo que actuaría a modo de Resistencia Sistémica Inducida, preparando a la planta para enfrentar nuevos ataques (Pozo et al., 2010). La rápida inducción o mayor activación de las respuestas de defensa tras la colonización por un agente biológico externo se denomina “priming” o “potenciación”.

La Resistencia Sistémica Inducida por HMA es importante en el control de patógenos foliares, comedores de hojas y necrótrofos, e involucra el incremento en los niveles de ácido jasmónico (AJ) que actúa como molécula señal. En un trabajo publicado por Klopffholz et al. (2011) se determinó que el hongo *Glomus intraradices* secreta una proteína que parece atenuar el sistema de defensa de la planta y promover el estado biotrófico del hongo ya que éste necesita mantener a su hospedante vivo para su supervivencia. Los organismos biotrófos deben evitar la elicitación masiva de respuestas de defensa, que no solamente pueden matar al patógeno, sino también al hospedante. En las interacciones simbióticas, se ha podido determinar que se presentan fluctuaciones de los niveles de ROS en etapas tempranas del establecimiento de la simbiosis compatible tanto en rizobios como en HMA, acompañado por la emisión de señales moleculares como la producción de flavonoides en leguminosas y estrigolactonas y factores Myc (disparadores o activadores de las

respuestas simbióticas) en plantas micorrizadas en células cercanas a aquellas colonizadas, lo cual sugiere que éste puede ser un mecanismo de control de la colonización (Fester y Hause, 2005). El estrés biótico también provoca un desequilibrio en la producción de ROS. Las ROS, como el radical superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH), ocurren normalmente en el metabolismo celular; sin embargo, bajo condiciones de estrés, su producción puede aumentar provocando la oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Las plantas micorrizadas incrementan la actividad de enzimas antioxidantes como la peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa, para contrarrestar el daño oxidativo (Lambais et al., 2003). Con respecto a la interacción del HMA con *Meloidogyne incognita* (una especie de nematodo fitoparásito), se pudo determinar en las plantas micorrizadas con *Glomus mosseae* e infectadas con el nematodo, una reducción de la infección y una mayor expresión de genes de defensa, sugiriendo que la ruta de síntesis de fenilpropanoides y el metabolismo de las ROS son cruciales en la inducción de la resistencia inducida contra nematodos (**Figura 4.4**) (Vos et al., 2013).

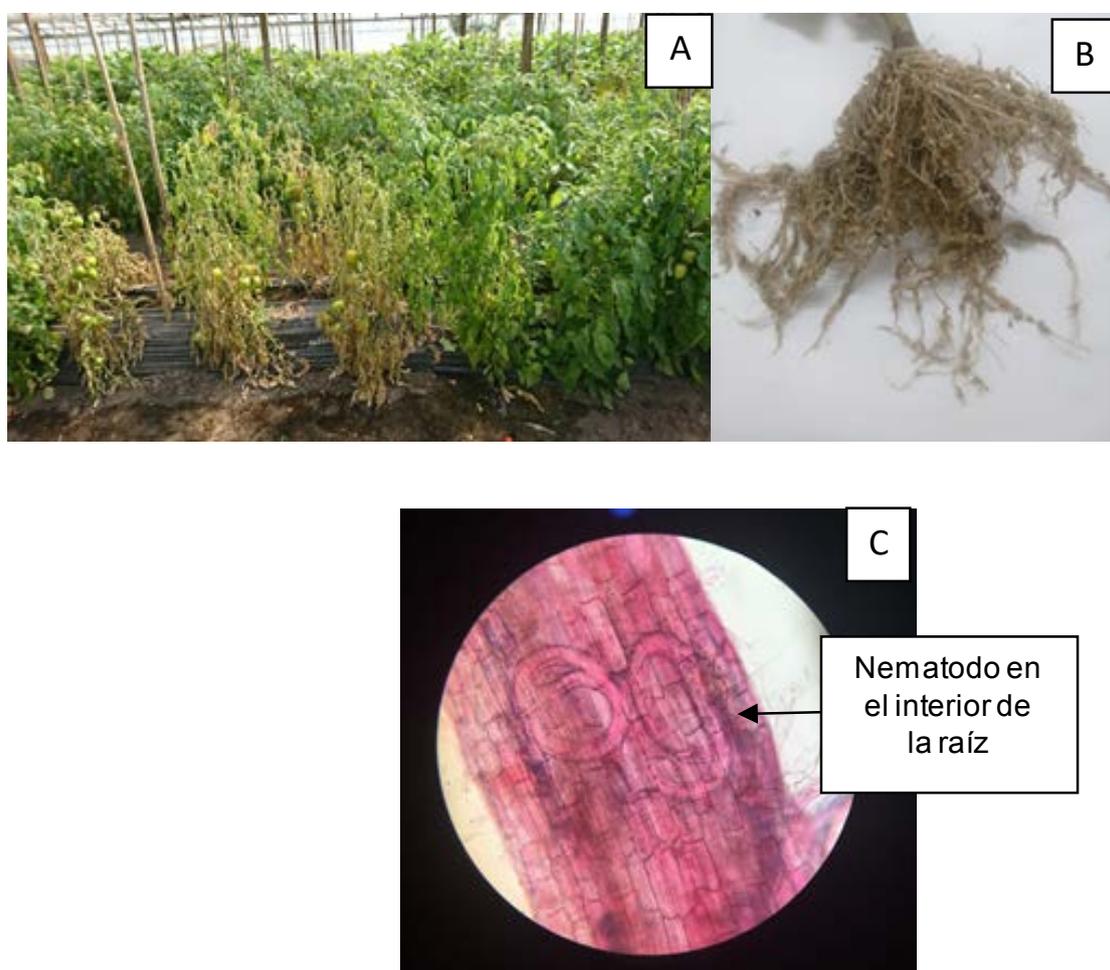


Figura 4.4: Plantas de tomate infectadas con *Nacobbus aberrans* (A). Raíces de tomate con agallas producidas por el nematodo (B). Raíces de tomate inoculadas con *Funneliformis mosseae* e infectadas por el nematodo (C).

Referencias

- Abbaspour, H., Saeid-Sar, S., Afshari, H., y Abdel-Wahhab, M. A. (2012). Tolerance of mycorrhiza infected Pistachio (*Pistacia vera* L.) seedlings to drought stress under glasshouse conditions. *Journal of Plant Physiology*, 169, 704-709.
- Abdel Latef, A. A. (2013). Growth and some physiological activities of pepper (*Capsicum annum* L.) in response to cadmium stress and mycorrhizal symbiosis. *Journal of Agricultural Science Technology*, 15, 1437-1448.
- Abdel Latef., A. A., y Chaoxing, H. (2014). Does the inoculation with *Glomus mosseae* improve salt tolerance in pepper plants? *Journal of Plant Growth Regulation*, 33, 644-653.
- Abdelmoneim, T. S., Moussa, T. A., Almaghrabi, O. A., y Abdelbagi, I. (2014). Investigation the effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the tolerance of maize plant to heavy metals stress. *Life Science Journal*, 11(4), 255-263.
- Ahmad, P., Abdul Latef, A. A., Hashem, A., Abd_Allah, E. F., Gucel, S., y Tran, L. S. P. (2016). Nitric oxide mitigates salt stress by regulating levels of osmolytes and antioxidant enzymes in chickpea. *Frontiers in Plant Science*, 7, 347
- Alvarado, C. J., Dasgupta-Schubert, N., Ambriz, E., Sánchez-Yañez, J. M. y Villegas, J. (2011). Hongos micorrízicos arbusculares y la fitorremediación de plomo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 27(4), 357-364.
- Amiri, R., Nikbakht, A., y Etemadi, N. (2015). Alleviation of drought stress on rose geranium (*Pelargonium graveolens* (L.) Herit.) in terms of antioxidant activity and secondary metabolites by mycorrhizal inoculation. *Scientia Horticulturae*, 197, 373-380.
- Asrar, A. W., y Elhindi, K. M. (2011). Alleviation of drought stress of marigold (*Tagetes erecta*) Plants by using arbuscular mycorrhizal fungi. *Saudi. Journal of Biology Science*, 18, 93-98.
- Augé, R. M., Toler, H. D., Saxton, A. M. (2015). Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis. *Mycorrhiza*, 25, 13-24.
- Azcón-Bieto, J., y Talón, M. (2008). *Fundamentos De Fisiología Vegetal (2ª ED.)* Ed. S.A. MCGRAW-HILL / Interamericana De España.
- Azcón-Aguilar, C., y Barea, J. (1997). Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza*, 6(6), 457-464.
- Azcón, R., Ambrosano, E., y Charest, C. (2003). Nutrient acquisition in mycorrhizal lettuce plants under different phosphorus and nitrogen concentration. *Plant Science*, 165, 1137-1145.
- Barea, J. M., Pozo, M. J., Azcón, R., y Azcón-Aguilar, C. (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56(417), 1761-1778.
- Barea, J. M., Pozo, M. J., y Azcón-Aguilar, C. (2016). Significado y aplicación de las micorrizas en Agricultura. *Agricultura*, 746-751.
- Baslam, M., Esteban, R., García-Plazaola, J.I., y Goicoechea, N. (2013). Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) for inducing the accumulation of major carotenoids, chlorophylls

- and tocopherol in green and red leaf lettuces. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 3119-3128.
- Beltrano, J., Ruscitti, M., Arango, M. C., y Ronco, M. (2013). Effects of arbuscular mycorrhiza inoculation on plant growth, biological and physiological parameters and mineral nutrition in pepper grown under different salinity and p levels. *Journal of Soil Science of Plant Nutrition*, 13, 123-141.
- Benabdellah, K., Abbas, Y., Abourouh, M., Aroca, R., y Azcón, R. (2011). Influence of two bacterial isolates from degraded and non-degraded soils and arbuscular mycorrhizae fungi isolated from semi-arid zone on the growth of *Trifolium repens* under drought conditions: Mechanisms related to bacterial effectiveness. *European Journal of Soil Biology*, 47, 303-309.
- Blanco, F., y Salas, E. (1997). Micorrizas en la agricultura: contexto mundial e investigación realizada en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 21(1), 55-67.
- Bolan, N. S, Robson, A. D., y Barrow, N. J. (1987). Effects of VAM on the availability of iron phosphates to plants. *Plant Soil*, 22, 401-410.
- Borde, M., Dudhane, M., y Jite, P. (2012). Growth, water use efficiency and antioxidant defense responses of mycorrhizal and non-mycorrhizal *Allium sativum* L. under drought stress condition. *Annals of Plant Sciences*, 1(1), 6-11.
- Cameron, D. D., Neal, A. L., van Wees, S. C., y Ton, J. (2013). Mycorrhiza-induced resistance: more than the sum of its parts? *Trends in plant science*, 18, 539-545.
- Cordier, C., Gianinazzi, S., y Gianinazzi-Pearson, V. (1996). Colonisation patterns of root tissues by *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* related to reduced disease in mycorrhizal tomato. *Plant Soil*, 185, 223-232.
- Chen, S., Jin, W., Liu, A., Zhang, S., Liu, D., Wang, F., Lin, X., y He, C. (2013). Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) increase growth and secondary metabolism in cucumber subjected to low temperature stress. *Scientia Horticulturae*, 160, 222-229
- Clemens, S. (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 212, 475-486.
- Doubková, P., Vlasáková, E., y Sudová, R. (2013). Arbuscular mycorrhizal symbiosis alleviates drought stress imposed on *Knautia arvensis* plants in serpentine soil. *Plant Soil*, 370, 149-161.
- Drzewiecka, K., Mleczek, M., Waškiewicz, A., y Goliński, P. (2012) Oxidative stress and phytoremediation. In: Ahmad P, Prasad MNV (eds.) *Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability*. Springer Science+Business Media, LLC, 425-449.
- El-Khallal, S. M. (2007). Induction and modulation of resistance in tomato plants against *Fusarium* wilt disease by bioagent fungi (arbuscular mycorrhiza) and/or hormonal elicitors (jasmonic acid and salicylic acid): 2-changes in the antioxidant enzymes, phenolic compounds and pathogen related-proteins. *Australian Journal of Basic Applied Science*, 1(4), 717-732.
- Elsen, A., Baimey, H., Swennen, R., y De Waele, D. (2003). Relative mycorrhizal dependency and mycorrhiza- nematode interaction in banana cultivars (*Musa* spp.) differing in nematode susceptibility. *Plant Soil*, 256, 303-313.

- Evelin, H., Giri, B., Kapoor, R. (2012) Contribution of *Glomus intraradices* inoculation to nutrient acquisition and mitigation of ionic imbalance in NaCl-stressed *Trigonella foenum-graecum*. *Mycorrhiza*, 22, 203-217.
- Fester, T., y Hause, G. (2005). Accumulation of reactive oxygen species in arbuscular mycorrhizal roots. *Mycorrhiza*, 15, 373-379.
- Gamalero, E., Lingua, G., Berta, G., y Glick, B. R. (2009) Beneficial role of plant growth promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on plant responses to heavy metal stress. *Canadian Journal of Microbiology*, 55, 501-514.
- García-Sánchez, M., Palma, J. M., Ocampo, J. A., García-Romera, I., y Aranda, E. (2014). Arbuscular mycorrhizal fungi alleviate oxidative stress induced by ADOR and enhance antioxidant responses of tomato plants. *Journal of Plant Physiology*, 171, (6), 421-428.
- Garg, N., y Singla, P. (2012). The role of *Glomus mosseae* on key physiological and biochemical parameters of pea plants grown in arsenic contaminated soil. *Scientia Horticulturae*, 143, 92-101.
- Garita, S., Bernardo, V., Guimaraes, M., Arango, C., y Ruscitti, M. (2019). Mycorrhization and grafting improved the growth of tomato and decrease the population of *Nacobbus aberrans*. *Revista Ciência Agronômica* ISSN 1806-6690. En prensa
- Gaur, A. y Adholeya, A. (2004). Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Current Science*, 86, 528–534.
- Gavito, M. E., Rouhier, H., Olsson, P. A., Medina, P. A., Jakobsen, I., Bago, B., y Azcón, A. C. (2005). Temperature constraints on the growth and functioning of root organ cultures with arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 168, 179-188.
- Gill, S. S., Gill, R., Trivedi, D. K., Anjum, N. A., Sharma, K. K., Sharma, K. K., Ansari, M. W., Ansari, A. A., Johri, A. K., Prasad, R., Pereira, E., Varma, A., y Tuteja, N. (2016). *Piriformospora indica*: potential and significance in plant stress tolerance. *Frontiers in Microbiology*, 7, 332.
- González-Chávez, M. C., Carrillo-Gonzalez, R., Wright, S. F., y Nichols, K. A. (2004). The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution*, 130, 317-323.
- Guillon C., St-Arnaud M., Hamel C., y Jabaji-Hare S. (2002). Differential and systemic alteration of defence-related gene transcript levels in mycorrhizal bean plants infected with *Rhizoctonia solani*. *Canadian Journal of Botany*, 80(3), 305-315.
- Hajiboland, R. (2013). Role of arbuscular mycorrhiza in amelioration of salinity. In: Ahmad P, Azooz MM, Prasad MNV (eds) *Salt stress in plants: signalling, omics and adaptations*. Springer, New York, 301-354
- Hameed, A., Egamberdieva, D., Abd_Allah, E. F., Hashem A., Kumar, A., y Ahmad, P. (2014). Salinity stress and arbuscular mycorrhizal symbiosis in plants. In: M. Miransari (Ed.), *Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses*, Volume 1, DOI: 10.1007/978-1-4614-9466-9-7, © Springer Science+Business Media New York, 139-159.

- Hao, L., Thein, M., Brust-Mascher, I., Civelekoglu-Scholey, G., Lu, Y., Acar, S., Prevo, B., Shaham, S., y Scholey, J. M. (2011). Intraflagellar transport delivers tubulin isotypes to sensory cilium middle and distal segments. *Nature Cell Biology*, 13, 790-798.
- Herrera-Medina, M. J., Steinkellner, S., Vierheilig, H., Ocampo, J. A., García-Garrido, J. M. (2007). Abscisic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist*, 175, 554-564.
- Hirsch, A. M., Bauer, W. D., Bird, D. M., Cullimore, J., Tyler, B., y Yoder, J. I. (2003). Molecular signals and receptors: controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. *Ecology*, 84, 858-868.
- Jahromi, F., Aroca, R., Porcel, R., y Ruiz-Lozano, J. M. (2008) Influence of salinity on the in vitro development of *Glomus intraradices* and on the in vivo physiological and molecular responses of mycorrhizal lettuce plants. *Microbial Ecology*, 55, 45-53.
- Jung, S. C., Martínez-Medina, A., López-Ráez, J. A., y Pozo, M. A. (2012). Mycorrhiza induced resistance and priming of plant defenses. *Journal of Chemical Ecology*, 38(6), 651-664
- Kloppholz, S., Kuhn, H., y Requena, N. (2011). A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. *Current Biology*, 21, 1204-1209.
- Konno, H. T., Nakato, S., y Nakashima, K. K. (2005). *Lygodium japonicum* fern accumulates copper in the cell wall pectin. *Journal of Experimental Botany*, 56, 1923-1931.
- Kramer, U. (2005). Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Current Opinion Biotechnology*, 16, 133-141.
- Lambais, M., F. Rãos-Ruiz, W. M., y Andrade, R. (2003). Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 160, 421-428.
- Larsen, J., Bødker, L. (2001). Interactions between pea root-inhabiting fungi examined using signature fatty acids. *New Phytologist*, 149, 487-493
- Lax, P., Becerra, A., Soteras, F., Cabello, M., y Doucet, M. E. (2011). Effect of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans* in tomato plants. *Biology and Fertility of Soils*, 47, 591-597.
- Li, H. Y., Yang, G. D., Shu, H. R., Yang, Y. T., Ye, B. X., Nishida, I., y Zheng, C. C. (2006). Colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* induces a defense response against the rootknot nematode *Meloidogyne incognita* in the grapevine (*Vitis amurensis* Rupr.), which includes transcriptional activation of the class III chitinase gene VCH3. *Plant Cell Physiology*, 47, 154-163.
- Lioussanne, L., Jolicoeur, M., y St-Arnaud, M. (2008). Mycorrhizal colonization with *Glomus intraradices* and development stage of transformed tomato roots significantly modify the chemotactic response of zoospores of the pathogen *Phytophthora nicotianae*. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 2217-2224.
- Liu, Z. L., Li, Y. J., Hou, H. Y., Zhu, X. C., Rai, V., He, X. Y., y Tian, C. J. (2013). Differences in the arbuscular mycorrhizal fungi improved rice resistance to low temperature at two N levels: Aspects of N and C metabolism on the plant side. *Plant Physiology Biochemistry*, 71, 87-95.

- López-Ráez, J. A., Verhage, A., Fenández, I., García, J. M., Azcón-Aguilar, C., Flors, V., y Pozo, M. J. (2010). Hormonal and transcriptional profiles highlight common and differential host responses to arbuscular mycorrhizal fungi and the regulation of the oxylipin pathway. *Journal of Experimental Botany*, 61, 2589-2601.
- Malekzadeh, E., Alikhani, A. H., Savaghebi-Fioozabadi, R. G., y Zarei, M. (2011) Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and an improving growth bacterium on Cd uptake and maize growth in Cd-polluted soils. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 9, 1213-1223.
- Mantri, N., Patade, V., Penna, S., Ford, R., y Pang, E. (2012). Abiotic stress responses in plants: present and future. In *Abiotic stress responses in plants 1-19*. Springer, New York, NY.
- Marro, N., Lax, P., Cabello, M., Doucet, M. E., y Becerra, A. G. (2014). Use of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus intraradices* as Biological Control Agent of the Nematode *Nacobus aberrans* Parasitizing Tomato. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(5), 668-674.
- Marulanda, A., Azcón, R., y Ruiz-Lozano, J. M. (2003). Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* L. plants under drought stress. *Physiologia Plantarum*, 119, 526-533.
- McCully, K., Leiper, C., Sanders, T., y Griffin, E. (1999). The Effects of Peripheral Vascular Disease on Gait. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 54(7), 291-294.
- Miransari, M. (2010). Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to plant growth under different types of soil stress. *Review. Plant Biology*, 12, 563-569.
- Muthukumar, T., Priyadharsini, P., Eswaranpillai, U., Jaison, S., y Pandey, R. (2014). Role of arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of acidity stress on plant growth. In book: *Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses*, 1(3), 43-72. Publisher: Springer, New York, Editors: M. Miransari.
- Nadeem, S. M., Ahmad, M., Zahir, Z. A., Javid, A., y Ashraf, M. (2014). The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Research review paper. Biotechnology Advances*, 32, 429-448.
- Orlowska, E., Ryszka, P., Jurkiewicz, A., y Turnau, K. (2005). Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) strains in colonisation of plants involved in phytostabilisation of zinc wastes. *Geoderma*, 129, 92-98.
- Ouziad, F., Hidebrandt, U., Schmelzer, E., y Bothe, H. (2005). Differential gene expressions in arbuscular mycorrhizal-colonized tomato grown under heavy metal stress. *Journal of Plant Physiology*, 162, 634-649.
- Panka, D., Piesik, D., Jeske, M., y Baturó-Ciesniewska, A. (2013). Production of phenolics and the emission of volatile organic compounds by perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.)/*Neotyphodium lolii* association as a response to infection by *Fusarium poae*. *Journal of Plant Physiology*, 170, 1010-1019.

- Porcel, R., Aroca, R., Azcón, R., y Ruiz-Lozano, J. M. (2006). PIP aquaporin gene expression in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants in relation to drought stress tolerance. *Plant Molecular Biology*, 60, 389-404.
- Pozo, M. J., Jung, S. C., López-Ráez, J. A., y Azcón-Aguilar, C. (2010) Impact of arbuscular mycorrhizal symbiosis on plant response to biotic stress: The role of plant defence mechanisms. In: H. Koltai and Y. Kapulnik (eds.), *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*, 193–207. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Rapparini, F., y Peñuelas, J. (2014). Mycorrhizal fungi to alleviate drought stress on plant growth. In: Miransari M (ed.) *Use of microbes for the alleviation of soil stresses*, Vol. 1, Springer Science+Business Media NY, 21-42.
- Ren, L., Zhang, N., Wu, P., Huo, H., Xu, G., y Wu, G. (2015). Arbuscular mycorrhizal colonization alleviates *Fusarium* wilt in watermelon and modulates the composition of root exudates. *Plant Growth Regulation*, 77, 77-85
- Rohyadi, A. (2008). Growth Responses of External Hyphae of Arbuscular Mycorrhizal Fungi to Acidic Soil Conditions and their Effects on Cowpea Growth. *Microbiology Indonesia*, 2 (1), 22-26.
- Ruiz-Lozano, J. M. (2003). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza*, 13(6), 309-317.
- Ruiz-Lozano, J. M., Porcel, R., y Aroca, R. (2006). Does the enhanced tolerance of arbuscular mycorrhizal plants to water deficit involve modulation of drought-induced plant genes? *New Phytologist*, 171, 693-698.
- Ruíz-Sánchez, M., Aroca, R., Muñoz, Y., Armada, E., Polón, R., y Ruiz-Lozano, J. M. (2010). The arbuscular mycorrhizal symbiosis enhances the photosynthetic efficiency and the antioxidative response of rice plants subjected to drought stress. *Journal of Plant Physiology*, 167, 862-869.
- Ruscitti, M., Arango, M., Ronco, M., y Beltrano, J. (2011). Inoculation with mycorrhizal fungi modifies proline metabolism and increases chromium tolerance in pepper plants (*Capsicum annum* L.). *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 23, 15-25.
- Ruscitti, M., Arango, C., Garita, S., Bernardo, V., y Ripodas, J. (2019). Use of arbuscular mycorrhizae for phytoparasitic nematodes control and growth promotion in pepper plants. II International Symposium Mycorrhizal Symbiosis in South America. March 6th - 8th, San Carlos de Bariloche, Argentina. Abstracts Book p 48.
- Sanchez-Blanco, M. J., Ferrandez, T. M., Morales, A., Morte, A., y Alarcon, J. J. (2004). Variations in water status, gas exchange, and growth in *Rosmarinus officinalis* plants infected with *Glomerus deserticola* under drought conditions. *Journal of Plant Physiology*, 161, 675-682.
- Shalaby, A. M. (2003). Responses of arbuscular mycorrhizal fungal spores isolated from heavy metal-polluted and unpolluted soil to Zn, Cd, Pb and their interactions in vitro. *Pakistan Journal of Biological Science*, 6(16), 1416-1422.
- Siqueira, J. O., y Franco, A. A. (1988). *Biotecnología do solo. Fundamentos e Perspectiva*. MEC-ESAL-FAEPE-ABEAS. Brasília, D. F. 235 p.

- Smith, S., y Read, D. (2008). Colonization of roots and anatomy of arbuscular mycorrhiza. London: Academic Press. *Mycorrhizal Symbiosis*, 42-90.
- St-Arnaud, M., Vimard, B., Fortin, J. A., Hamel, C., y Caron, M. (1997). Inhibition of 1997) *Fusarium oxysporum* f-sp. *dianthi* in the non-VAM species *Dianthus caryophyllus* by co-culture with *Tagetes patula* companion plants colonized by *Glomus intraradices*. *Canadian Journal of Botany*, 75(6), 998-1005.
- Steinkellner, S., Lenzemo, V., Langer, I., Schweiger, P., Khaosaad, T., Toussaint, J. P., y Vierheilig, H. (2007). Flavonoids and strigolactones in root exudates as signals in symbiotic and pathogenic plant-fungus interactions. *Molecules*, 12(7), 1290-306.
- Strullu, D. G. Perrin, R., Plenchette, C., y Garbaye, J. (1991). Les mycorrhizes des arbres et plantes cultivées. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris. 249 p.
- Suri, V. K., Choudhary, A. K., Chander, G., y Verma, T. S. (2011). Influence of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Applied Phosphorus on Root Colonization in Wheat and Plant Nutrient Dynamics in a Phosphorus-Deficient Acid Alfisol of Western Himalayas. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 42(10), 1177-1186.
- Taiz, L., y Zeiger, E. (2006). *Plant Physiology*. 3rd edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA, USA.
- Vos, C., Claerhout, S., Mkandawire, R., Panis, B., De Waele, D., Elsen, A. (2012). Arbuscular mycorrhizal fungi reduced root-knot nematode penetrations through altered root exudation of their host. *Plant Soil*, 354, 335-345.
- Vos, C., Schouteden, N., Tuinen, D., Van Chatagnier, O., Elsen, A., Waele, D. D., de Panis, B., y Gianinazzi-Pearson, V. (2013). Mycorrhiza-induced resistance against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* involves priming of defense gene responses in tomato. *Soil Biology and Biochemistry*, 60, 45-54.
- Wei, L., Luo, Ch., Li, X., y Shen, Z. (2008). Copper accumulation and tolerance in *Chrysanthemum coronarium* L. and *Sorghum sudanense* L. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 55, 238-246.
- Whipps, J. (2004). Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany*, 82, 1198-1227.
- Wu, Q. S., y Xia, R. X. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions. *Journal of Plant Physiology*, 163(4), 417-425.
- Wu, Q. S., y Zou, Y. N. (2010). Beneficial roles of arbuscular mycorrhizas in citrus seedlings at temperature stress. *Scientia Horticulturae*, 125, 289-293.
- Yang, Y., Tang, M., Sulpice, R., Chen, H., Tian, S., y Ban, Y. (2014). Arbuscular mycorrhizal fungi alter fractal dimension characteristics of *Robinia pseudoacacia* L. seedlings through regulating plant growth, leaf water status, photosynthesis, and nutrient concentration under drought stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 3, 612-625.
- Yano, K., y Takaki, M. (2005). Mycorrhizal alleviation of acid soil stress in the sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Soil Biology and Biochemistry*, 1569-1572.

- Yooyongwech, S., Samphumphuang, T., Tisarum, R., Theerawitaya, C., y Cha-um, S. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) improved water deficit tolerance in two different sweet potato genotypes involves osmotic adjustments via soluble sugar and free proline. *Scientia Horticulturae*, 198, 107-117.
- Zhu, X. C., Song, F. B., Liu, S. Q., Liu, T. D., y Zhou, X. (2012). Arbuscular mycorrhizae improves photosynthesis and water status of *Zea mays* L. under drought stress. *Plant Soil Environmental*, 58, 186-191

CAPÍTULO 5

Micorrizas arbusculares y la restauración de ecosistemas degradados

*Matias Gonzalez, Cecilia Arango, Graciela Pastorino
y Marcela Ruscitti*

En este capítulo se abordará la contribución de las micorrizas arbusculares a la restauración de los ecosistemas degradados y la mejora de los suelos agrícolas. También se estudiarán las técnicas de biorremediación y fitorremediación como estrategia para limpiar suelos contaminados y la participación de los hongos micorrícicos en este proceso.

El rol de las micorrizas arbusculares en la restauración de suelos degradados

La vida en nuestro planeta está íntimamente ligada a la dinámica y evolución natural del suelo. Unos pocos centímetros de profundidad, 20-30 cm, son responsables de brindar nutrientes y agua, y garantizar soporte a plantas, microorganismos y animales.

Los suelos alcanzan su madurez cuando logran estabilizar sus propiedades y se encuentran en equilibrio con el medio. Se considera que un suelo (sano) es adecuado para la producción agrícola, cuando posee las condiciones adecuadas para facilitar el enraizamiento, proveer nutrientes para el desarrollo de las plantas, permitir la disponibilidad de oxígeno para las raíces, tener bajos/nulos niveles de toxicidad y salinidad. Por el contrario cuando se altera el equilibrio del suelo, ya sea por el cambio climático y/o por la actividad humana, las transformaciones que se producen en los ambientes suelen conducir al deterioro del suelo.

Se ha observado que este fenómeno denominado **degradación edáfica**, se pone de manifiesto por la pérdida de la cubierta vegetal o por el descenso de la productividad agrícola asociado con cambios importantes en las características físicas, químicas y biológicas del suelo, lo que conduce a la vez a un aumento de la vulnerabilidad ante los agentes erosivos hídricos y/o eólicos. Según la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) la degradación del suelo se define como “un cambio en la salud del suelo resultando en una disminución de la capacidad del ecosistema para producir bienes o prestar servicios para sus beneficiarios”. Este es un tema de gran preocupación y relevancia a nivel mundial que está afectando

extensas áreas del planeta, incluyendo regiones que actualmente no están degradadas, y que se encuentran amenazadas de serlo en el futuro cercano, como los suelos agrícolas de América del Sur y África. En Argentina, se estima que un 36% del territorio está afectado por procesos de erosión hídrica y eólica, lo cual representa unas 100 millones de hectáreas (Gaitán et al., 2017). Un análisis sobre la relación erosión del suelo - productividad sugiere que la erosión es responsable de una pérdida media mundial de 0,3% del rendimiento anual de los cultivos, lo que equivale a la eliminación de 4,5 millones de ha.año⁻¹ de producción de cultivos (FAO, 2016). El deterioro de la salud de los suelos implica, además de una importante pérdida económica por la dificultad para establecer producciones rentables, problemas para proveer alimentos adecuadamente a los habitantes de la región.

Las propiedades del suelo que pueden emplearse para valorar su calidad, deben ser aquellas que sean sensibles al manejo y que se vean afectadas o se correlacionen con las variaciones ambientales, y además puedan ser cuantificadas con precisión. Se han identificado diversos indicadores de la salud del suelo que permiten evaluar indirectamente el grado de funcionalidad del mismo de manera sencilla, ya que muchas veces es difícil medir directamente su capacidad productiva. Estos indicadores se pueden agrupar en tres categorías principales: químicos (disponibilidad de nutrientes), físicos (estructura del suelo) y biológicos (número y clase de organismos que componen la micro-macro fauna edáfica) (Astier Calderón et al., 2002). A su vez se puede considerar al estado del suelo de dos maneras distintas: si se toman en cuenta las propiedades ideales del suelo, como profundidad, fertilidad, suministro adecuado de agua, facilidad de manejo, etc., resulta en una calificación **absoluta**. En tanto que si se tiene en cuenta la aptitud del suelo para un determinado uso, se refiere a una clasificación **relativa**, en donde la tierra podría ser excelente para cierta producción, por ejemplo un suelo ligeramente ácido para un bosque de pinos, pero no para otro tipo de actividad como un cultivo de cereales, el que sería considerado marginal en términos absolutos (FAO, 2016).

Dentro de los procesos de degradación que ocurren, la erosión del suelo, sea hídrica o eólica, es quizás el más agresivo, debido a que provoca la pérdida de la capa superficial, que contiene los nutrientes, lo que conduce a la reducción de la fertilidad y de la capacidad productiva (FAO, 1980). Por ello se considera a la erosión de las tierras como un buen indicador de la degradación del suelo.

Un suelo degradado se puede reconocer por diversos aspectos que lo diferencian de uno sano (Figuerola, 2004):

- Pérdida de la estructura, por ende descenso de la porosidad y del grado de aireación.
- Compactación y encostramiento (endurecimiento) de la capa superficial.
- Disminución de la capacidad de retención de agua, lo que se traduce en una reducción de la cantidad de agua útil para las plantas.
- Reducción de la velocidad de infiltración del agua de lluvia.
- Menor disponibilidad de macronutrientes (principalmente fósforo y nitrógeno asimilable).
- Descenso de las poblaciones de microorganismos del suelo.

Existen diversos factores tanto de origen humano como natural, que afectan los sistemas biológicos que cubren y protegen el suelo. Por ejemplo: la tala indiscriminada de bosques nativos, los incendios forestales, las lluvias copiosas, la sobreexplotación, el desmonte para fines agropecuarios, el monocultivo, entre otros (Hernández Cuevas et al., 2011). Dentro de los aspectos que el hombre puede controlar se encuentra el manejo de la flora nativa y las producciones agroforestales. Por ejemplo, la pérdida de los bosques ocasiona áreas degradadas, en las que la posibilidad de ocurrencia de procesos erosivos graves aumenta a causa de la formación geológica de los suelos.

Dada la importancia de mantener la productividad del suelo, es conveniente invertir en *prevenir* su daño, mediante un conjunto de medidas para conservar los recursos naturales y su medio productivo. Pero aún en los casos en que ya se haya iniciado el deterioro se debe proceder a la *mitigación* de los daños, que consiste en una intervención para reducir la degradación en curso o para disminuir el impacto negativo de la misma. El objetivo principal es detener la degradación continua y comenzar con el mejoramiento de los recursos y sus funciones; los resultados tienden a ser visibles a corto o mediano plazo, de manera que constituyen un buen incentivo para asumir nuevos esfuerzos. Cuando la degradación ya es manifiesta, y el suelo es prácticamente improductivo, se necesita realizar su *rehabilitación*. Para subsanar el problema o minimizar el daño, en esta última etapa, se requieren mayores inversiones y trabajos costosos a largo plazo.

También debemos mencionar que la erosión del suelo no solo produce cambios *in situ*, como es la pérdida de la productividad, sino también *ex situ*, que se refiere al aumento de la productividad en los suelos al pie de las laderas, la sedimentación y eutrofización de los cursos y reservas de agua, con los consiguientes efectos adversos (Pimentel, 2006).

¿Cuáles son las medidas que se pueden tomar para restablecer la salud de un suelo?

En primer lugar se ha observado que la implantación de la cubierta vegetal es fundamental, porque en un suelo con cobertura se disminuye el efecto de la erosión, sea hídrica o eólica, y también se mitigan las variaciones de temperatura. La dificultad para lograr el restablecimiento de la vegetación natural en áreas erosionadas podría deberse a que en la capa superficial del suelo las poblaciones de microorganismos se ven afectadas drásticamente, y éstas son responsables del mantenimiento de la salud de las plantas y de la calidad del suelo (Barea et al., 2011, Bashan et al., 2012). Por ello, dentro de las herramientas destinadas a frenar el avance de la erosión y la desertificación, o para recuperar la estructura y la capacidad biológica del suelo, se encuentra la aplicación de **enmiendas orgánicas**, juntamente con la **reinoculación** de hongos endomicorrícicos.

La importancia de emplear enmiendas orgánicas radica en el hecho que para lograr un suelo de calidad y buena fertilidad, éste debe contener materia orgánica suficiente para mantener activa a la microbiota. Los procesos microbiológicos, mediante diversas reacciones físico químicas,

son clave en los ciclos de los nutrientes (C, N, P, Fe y otros) y además proporcionan sustancias que mejoran la estructura del suelo, lo que se manifiesta en aumentos en la capacidad de retención de agua, infiltración, porosidad y esto condiciona el establecimiento de la cubierta vegetal. El compost, es un buen material para ser empleado como enmienda puesto que contiene materia orgánica estable, elementos nutritivos directamente asimilables por la planta y se puede aplicar al suelo sin riesgo de fitotoxicidad.

Los hongos micorrícicos incorporados a los suelos en proceso de restauración, cumplen una función ecológica, y esto ha llevado a contemplarlos como una herramienta de manejo sostenible del suelo. Se los considera casi como una relación obligada para el crecimiento de poblaciones vegetales, tanto en condiciones naturales como en agrosistemas (Bahle et al., 2018). Ellos contribuyen con el aumento de la productividad de los cultivos, la regeneración de comunidades vegetales degradadas y el mantenimiento del equilibrio del ecosistema (Garzón, 2016).

El micelio de los hongos micorrícicos arbusculares, además del beneficio directo que aporta a las plantas, contribuye significativamente a darle estructura y estabilidad al suelo, mediante la producción de glomalina que participa en la formación de agregados, colaborando en la adhesión de las partículas, lo que asegura el drenaje y la tasa de aireación, reduciendo la compactación y el potencial de erosión, además de mejorar la capacidad de retención del agua y la cantidad disponible para la vegetación y define el grado de disponibilidad de los nutrientes del suelo (**Figura 5.1**) (Garzón, 2016).

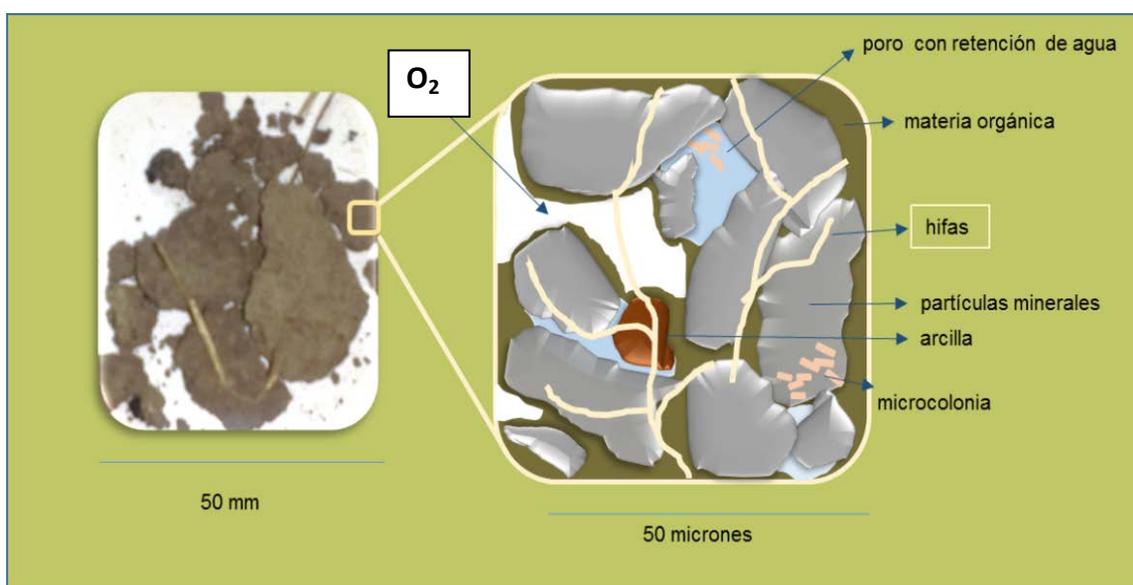


Figura 5.1: Distribución espacial de las partículas del suelo.

Como ya se mencionó, la asociación micorrícica estimula el crecimiento de las plantas al mejorar la disponibilidad de los nutrientes y la absorción de agua, así como al restaurar la estructura y estabilidad del suelo a través de la formación de agregados del suelo (Barea et al., 2011).

La simbiosis micorrícica podría ser una alternativa al uso de la fertilización química, evitando así los factores de riesgo que ocasiona dicha práctica, como el aumento de la salinidad, la fitotoxicidad, los contaminantes orgánicos y los MP que muchas veces limitan la utilización de estos productos químicos en los distintos programas de producción frutícola, hortícola u ornamental.

La aplicación de las enmiendas y la incorporación de hongos formadores de micorrizas arbusculares, tanto para la producción agrícola o para servicios ambientales, tienen mayor relevancia en ecosistemas donde las condiciones edáficas son extremas, como en los suelos pobres, tanto de zonas tropicales como de zonas áridas y semiáridas,

La inoculación temprana de las semillas o las plántulas con hongos formadores de micorrizas favorece un buen desarrollo de las plantas en sus etapas iniciales de crecimiento, lo que les confiere ventajas adaptativas, ya que al ser más vigorosas y tener sistemas radicales bien conformados serán capaces de tolerar mejor las situaciones de estrés como puede ser el trasplante. Diversos autores han reportado que un aumento en la biomasa en los primeros estadios representa mayores probabilidades de establecimiento exitoso en el campo (Hernández Cuevas et al. 2011), una condición crítica para especies destinadas a programas de restauración. Por ello, es crucial contar con viveros de producción de plantas que realicen la inoculación en los primeros estadios como práctica habitual.

En cuanto a la selección de especies para restaurar la cobertura vegetal, se debe tener en cuenta que es necesario recurrir a plantas tolerantes a los ambientes degradados, capaces de prosperar en el suelo erosionado, de manera que se restablezca la sucesión natural en el ecosistema. Como la recuperación de sitios degradados o la mejora de áreas marginales es lenta y onerosa, es interesante poder emplear cultivos que, además de contribuir con una disminución de la degradación edáfica, ocasionen un beneficio económico (Camprubi et al., 2015). Se realizaron investigaciones en diversas regiones, como es el caso de México, sobre suelos deforestados, donde la posibilidad de ocurrencia de procesos erosivos graves aumentaba, debido al origen volcánico de los suelos y el alto contenido de sílice, que al quedar descubiertos se compactan fuertemente y se propicia la aparición de duripanes, que se caracterizan por su gran dureza y porque sus nutrientes son escasos o están en formas químicas poco o no disponibles (Hernández Cuevas et al., 2011). Las prácticas de reforestación y restauración incluyeron ejemplares de árboles de madera dura y blanda (coníferas y latifoliadas) y en los últimos años se recurrió a especies menos convencionales, pero con potencial de adaptación a condiciones edafo-climáticas extremas, entre las que destacan las plantas nativas o autóctonas, las cuales fueron inoculadas con hongos micorrícicos (Hernández Cuevas et al., 2011). Trabajos similares se realizaron en España, donde se emplearon arbustos nativos, como el romero (*Rosmarinus officinalis*), con perspectivas de aprovecharlos económicamente. Al estar inoculadas con hongos formadores de micorrizas, estas plantas actuaban como "islas de recursos", ya que se comportaban como una permanente fuente de inóculo en el sector de implantación, estimulando la revegetación de los suelos degradados (Barea et al., 2011).

Es importante considerar que en programas de revegetación de suelos degradados, se recomienda el empleo tanto de plantas como hongos nativos, que suelen estar más adaptados a las

condiciones edáfico-ambientales de la zona y en consecuencia se obtienen mejores respuestas. También se destaca que en procesos de restauración de suelos, son interesantes los resultados que se obtienen al emplear plantas que brindan ventajas adicionales, como es el enriquecimiento del sustrato con minerales esenciales, como es el caso de las leguminosas que aportan nitrógeno y que favorece el establecimiento y desarrollo de diversas comunidades microbianas, cuya participación es relevante en el ciclo de nutrientes (Barea et al., 2011).

El objetivo final de la mayoría de los proyectos de restauración es establecer una cubierta de vegetación sostenible. La restauración del manto vegetal, es una de las estrategias más eficaces para combatir la degradación del suelo y recuperar agroecosistemas degradados. Por lo anterior, la inoculación con hongos micorrícicos arbusculares es recomendable a fin de aumentar las posibilidades de establecimiento y desarrollo de las plantas, sin olvidar que se debe tener en cuenta que los beneficios de las micorrizas no sólo se restringen al ámbito de la productividad y la optimización fisiológica de la planta, sino que engloban una serie de ventajas ecológicas. Por tal razón, los efectos a nivel edáfico son claves para el mantenimiento de la diversidad vegetal y de los microorganismos del suelo, para la productividad y la restauración de ecosistemas perturbados (Garzón, 2016).

Finalmente, la interacción entre las técnicas recomendadas, incluyendo la aplicación de enmiendas orgánicas y la inoculación micorrícica, ha mostrado un efecto sinérgico en la producción de biomasa aérea y también en la biomasa radicular en relación a plantas que no fueron micorrizadas y que no recibieron la enmienda orgánica (Figuroa, 2004).

Biorremediación y Fitorremediación: técnicas promisorias para remediar el exceso de MP en los suelos

La biorremediación y la fitorremediación surgen como una solución a la problemática del aumento de la contaminación, tanto de contaminantes orgánicos (pesticidas, hidrocarburos, dioxinas, etc.) pero especialmente de los inorgánicos como los MP, que no se degradan naturalmente y se acumulan en altas concentraciones en el agua y el suelo. Puesto que ellos pueden ser trasladados a los alimentos los convierte en un riesgo potencial para la salud humana. Aunque estas tecnologías están ganando cada vez más atención por ser de bajo costo, efectivas y no perturbar o destruir la estructura física, química y biológica del suelo (Midhat et al., 2017), hay pocas experiencias a gran escala ya que implican interrelaciones complejas entre las plantas, los microorganismos y el ambiente (**Figura 5.2**) (Kumar et al., 2017).

La biorremediación es una técnica que implica el uso de microorganismos (hongos, bacterias y/o algas) y sus productos metabólicos para eliminar contaminantes o convertirlos en especies químicas menos tóxicas, minimizando el impacto negativo al ambiente y facilitando los procesos enzimáticos que están involucrados en el proceso, responsables de su actividad en el saneamiento ambiental (Niti et al., 2013).

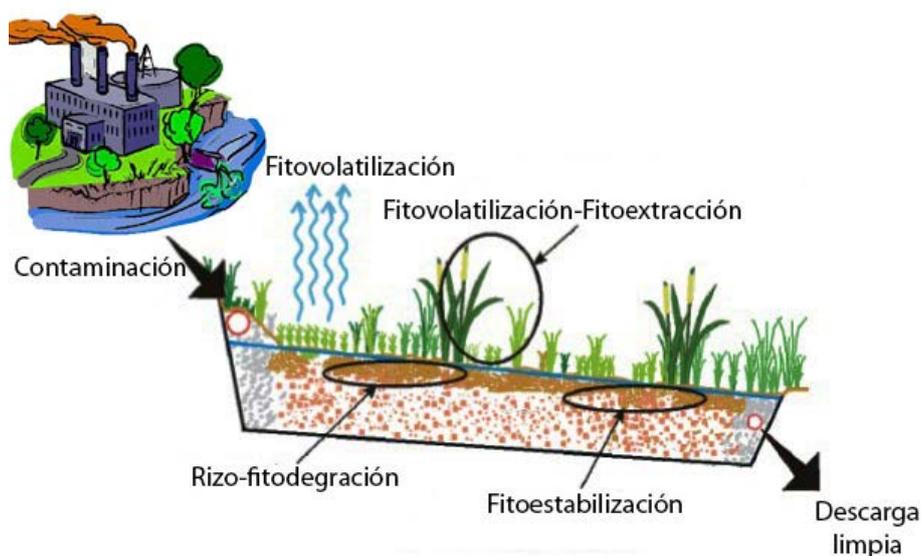


Figura 5.2: Modelo de un sistema de fitorremediación posible de ser aplicado en zonas con contaminación por residuos industriales.

Existen diversos trabajos que demuestran la capacidad de algunas especies de rizobios y hongos micorrícicos arbusculares para entablar relaciones simbióticas con ciertas plantas, mejorando sus capacidades extractivas y degradativas, además de aumentar la tolerancia de las plantas a estas condiciones adversas, como se mencionó anteriormente (Li et al., 2010; González-Chávez et al., 2011; Ren et al., 2019).

Estos microorganismos producen diversos metabolitos como sideróforos, ácidos orgánicos, ácido indol-3-acético (AIA), etc., y se ha sugerido que están involucrados en varios tipos de procesos biogeoquímicos que funcionan en la zona rizosférica de sitios contaminados. Las funciones más importantes incluyen el alargamiento celular, la adquisición de nutrientes, la movilidad o la inmovilización de metales, etc. En general, los microorganismos aumentan la eficacia de la fitorremediación mediante la alteración de la acumulación de MP en los tejidos de las plantas o la estimulación de la producción de biomasa vegetal. Por lo tanto, la fitorremediación de contaminantes puede ser asistida con el uso de microorganismos asociados a las plantas, en los cuales están involucrados varios procesos como la traslocación, solubilización, transformación, precipitación, inmovilización, quelación, volatilización y complejación (Rajkumar et al., 2012).

La fitorremediación, por definición, consiste en utilizar plantas también asociadas a microorganismos como las micorrizas y el empleo de técnicas de manejo agronómicas para restringir, inmovilizar, eliminar, estabilizar y/o degradar compuestos contaminantes (Bader et al., 2019). Existen distintas maneras de fitorremediar según las estrategias con las cuales las plantas regulan o controlan los niveles de contaminación (Chibuike et al., 2014), tales como: **fitoextracción** (acumulación en la biomasa, preferentemente en partes fácilmente cosechables), **fitoestabilización** (acumulación en la biomasa para reducir la biodisponibilidad de los contaminantes, mejorando propiedades físicas y químicas del suelo), **fitoinmovilización** (uso de las raíces para la fijación o inmovilización de los contaminantes en el suelo), **fitovolatilización** (uso de plantas

para eliminar los contaminantes del suelo mediante su volatilización o contaminantes del aire) y **fitodegradación** (uso de plantas y microorganismos asociados para degradar contaminantes orgánicos) (Figura 5.3).

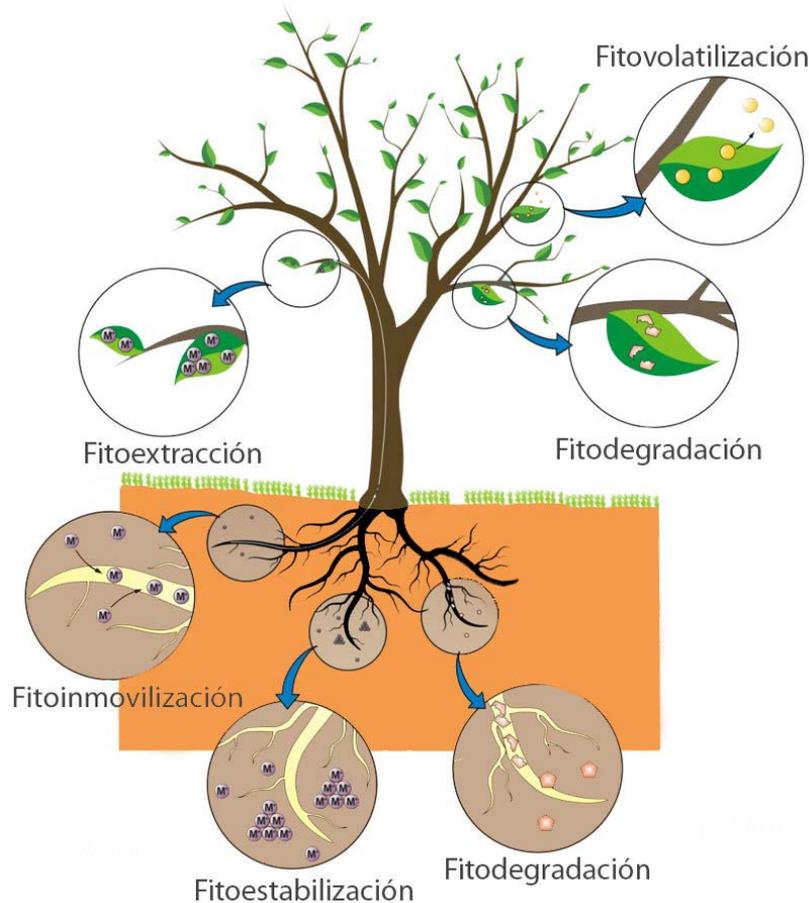


Figura 5.3. Representación esquemática de las diferentes estrategias de fitorremediación.

¿Cuál es la estrategia utilizada por los hongos formadores de micorrizas arbusculares para inmovilizar los MP?

La inmovilización de los MP en el suelo se puede realizar mediante una sucesión de siete procesos diferentes. El primer proceso consiste en reducir la biodisponibilidad de los metales mediante un agente quelante (glomalina) secretado por las micorrizas que precipita el metal pesado por su unión con polifosfatos (Vodnik et al., 2008). El segundo y tercer proceso son la unión del MP precipitado a la pared celular del hongo y su posible pasaje a través de una membrana plasmática (Joner et al., 2000). Sin embargo algunos HMA exhiben la capacidad de absorber metales a través de la alcalinización del sustrato mediante la liberación de OH^- , lo que afecta la estabilidad del metal en el suelo (Budel et al., 2004). Si esta barrera es superada, transportadores específicos e inespecíficos de metales, los transportarán al citosol (cuarto) y serán quelados por

metalotioneínas (proteínas con grupos tiol (-SH) capaces de unirse a metales pesados) producidas por estos hongos (quinto) (Gohre y Paszkowski, 2006). Los procesos sexto y séptimo son la exportación del MP transformado en una forma menos contaminante al suelo nuevamente y/o la retención en vacuolas. Además de esto, pueden transportar los MP a través de hifas a las células de la planta (fitoextracción), o inmovilizar los metales en el suelo o en sus propias estructuras (fitoestabilización).

Así, González-Chávez et al. (2011) informaron que el arseniato (forma altamente tóxica) es absorbido y convertido en arsenito (forma menos tóxica) en el citosol de las micorrizas para luego ser secretado al suelo por una bomba de eflujo de arsenito. Se observó un nivel más bajo de MP en plantas de maíz con inoculación de hongos formadores de micorrizas arbusculares (Kaldorf et al., 1999), no obstante Tonin et al. (2001) informaron que las raíces de trébol inoculadas con micorrizas mostraron una mayor acumulación de MP. Estos procesos de fitoestabilización y fitoextracción dependen principalmente de los hongos micorrícicos y la combinación hongo - planta.

El conocimiento de los mecanismos fisiológicos y moleculares de la fitorremediación comenzó a surgir en años recientes junto con estrategias biológicas y de ingeniería diseñadas para optimizar y mejorar la fitorremediación (Dubchak y Bondar, 2019). Las especies que pueden ser utilizadas para programas de fitorremediación deben contar con características específicas como tolerancia a los elevados niveles de concentración de metales, elevados índices de bioacumulación y traslocación, rápida y gran producción de biomasa, tolerancia al anegamiento y la sequía extrema, adaptación al hábitat, tolerancia a altos tenores salinos y bajos pH y amplia extensión radicular. Pocas especies, alrededor de 500, se han reportado como hiperacumuladoras de metales. Estas se caracterizan por tener factores de traslocación (relación de concentración de metal en parte aérea / raíz) superiores a 1, pero también tienen la capacidad de acumular gran cantidad de metal (más de 10000 ppm) sin sufrir reducciones en su crecimiento (Hemen, 2011; Atangana et al., 2014). La remediación de sitios contaminados con especies apropiadas y económicamente valiosas es una estrategia que busca beneficios mediante la recuperación para la producción agrícola, la obtención de fito-productos tales como aceites esenciales aromáticos (Pandey et al., 2019), biomasa para papel, biocarbón o biodiesel para producción de energía (Du et al., 2019), plantas ornamentales, o productos derivados de la madera. También se exploran otros nichos de mercado interesantes basados en el mismo principio como la fitominería y biominería, la construcción de techos verdes, la arquitectura inteligente basada en la limpieza de contaminantes del aire (Pandey y Souza-Alonso, 2019, Agarwal et al., 2019) y el rejuvenecimiento de agua de ríos que implica la descontaminación de contaminantes orgánicos, inorgánicos y biológicos (Upadhyay et al., 2019). Estas técnicas están demostrando ser un campo crucial para el desarrollo futuro, basado en una tecnología ecológica, para generar ganancias para propietarios de tierras contaminadas con múltiples beneficios adicionales para el medio ambiente, hacia el desarrollo de una sociedad más sostenible.

Las comunidades microbianas desempeñan un papel fundamental en el establecimiento de plantas en zonas contaminadas. Específicamente los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) que, como ya se mencionó, establecen relación con más del 80% de las familias de plantas terrestres (Brundrett, 2004). De hecho, la supervivencia de algunas especies de plantas depende totalmente de la asociación con HMA (Van der Heijden et al., 2008). A pesar de su rápida respuesta al estrés ambiental, estos microorganismos también pueden presentar respuestas adaptativas al estrés metálico (Meier et al., 2012). Se ha demostrado que esporas aisladas de sitios contaminados con metales pesados son más tolerantes a elevadas concentraciones en comparación con el material aislado de suelo no contaminado (Gohre y Paszkowski, 2006).

Según una reciente clasificación de HMA (Sieverding y Oehl, 2006) se suelen encontrar 5 géneros en zonas contaminadas: *Glomus*, *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora*. En coincidencia con esto, muchos autores observaron la dominancia del género *Glomus* en sitios contaminados con metales pesados (Renker et al. 2005; Vallino et al. 2006; Zarei et al. 2010). Los efectos más importantes de la utilidad de la simbiosis con micorrizas en la fitorremediación pueden resumirse en: aumentar la absorción de iones de baja movilidad, mejorar la estructura del suelo lo que lleva a facilitar el enraizamiento y establecimiento de plantas, aumentar la capacidad exploratoria de las raíces siendo esto clave en sitios contaminados donde generalmente hay pocos nutrientes disponibles y favorecer la tolerancia de las plantas al estrés biótico y abiótico (Smith y Read, 2008). En relación a esto los HMA inducen la producción de enzimas antioxidantes como las peroxidasas y las catalasas en las plantas (Ferrol et al., 2016). Las enzimas peroxidasas protegen a la planta contra los radicales libres (estrés oxidativo) formados durante las condiciones de estrés metálico (Latef, 2013).

Es muy común encontrar en zonas contaminadas por MP la presencia de elevadas concentraciones de hidrocarburos, producto de actividades industriales. Con respecto a la contaminación con hidrocarburos, los HMA no adquieren carbono a partir de la degradación de estos compuestos orgánicos sino que dependen de los azúcares y lípidos proporcionados por sus simbiontes vegetales (Bago et al., 2000; Bravo et al., 2017). Por lo tanto, estos hongos no pueden ser utilizados como agentes directos de biorremediación de hidrocarburos, a diferencia de otros hongos o bacterias (Singh, 2006). Sin embargo, se ha observado que desempeñan un papel beneficioso en la protección de las plantas contra los hidrocarburos, por ejemplo, en la disipación de hidrocarburos aromáticos policíclicos de la rizósfera (Joner et al., 2001) o en la reducción de los efectos tóxicos del diesel en el crecimiento de las raíces (Driai et al., 2015) lo que resulta en una mejora en la producción de biomasa, mayor captación de nutrientes y un incremento en la actividad antioxidante (Hernández-Ortega et al., 2012). En estos casos de contaminación la bibliografía suele citar en mayor cantidad los géneros *Rhizophagus* y *Glomus* (Hassan et al., 2014, Ryszka et al., 2019).

Algunas experiencias prácticas

Se han logrado varios avances, con respecto a la biorremediación y fitorremediación, durante los últimos 10 años, principalmente en países desarrollados. Sin embargo, las prácticas de fitorremediación a gran escala son acotadas a pesar de que se han llevado a cabo con éxito varias prácticas y proyectos de campo en distintos lugares del mundo (Pandey y Bajpai 2019). A continuación se citan algunas y sus resultados.

1- Restauración ecológica de áreas degradadas por la extracción minera de carbón

La minería es una actividad extractiva que hace un uso temporal de la superficie terrestre y los métodos de extracción pueden variar según la presencia de carbón y la geología del área. El carbón se extrae principalmente con métodos de minería subterránea y de superficie. Esta última es una operación de bajo costo aunque puede desencadenar importantes problemas ambientales, como la degradación de la tierra, la deforestación y la pérdida de biodiversidad. La mayoría de los recursos de carbón se depositan bajo la cubierta forestal y las cuencas hidrográficas, por lo que la degradación de la tierra y la deforestación parecen inevitables para su extracción. La minería de superficie también genera la creación de vertederos, pozos, cuerpos de agua contaminados y la generación de diferentes usos de la tierra que son comparativamente menos productivos que el uso de la tierra original (Ahirwal y Maiti, 2016). También la escorrentía altamente ácida de estas áreas contamina el agua subterránea lo que tiene un impacto negativo en la salud humana. Se llevaron a cabo estudios sobre una mina de carbón superficial en Dhanbad (India) con el fin de recuperar y restaurar esa zona, prestando atención al establecimiento de una cubierta vegetal nativa. Antes de cortar los árboles y la vegetación del sotobosque para explotar la superficie, se realizó un inventario de todas las especies existentes. La importancia de la utilización de especies nativas reside en el desarrollo de un paisaje que imita los atributos de un ecosistema natural, la posibilidad de un uso posterior de la tierra con fines económicos, la reducción de los impactos de la fragmentación masiva del hábitat, la mejora de los servicios ecosistémicos como el secuestro de carbono y el grado de mejora en estética.

La presencia de MP, especialmente de Fe, Cr, y Zn, en las regiones mineras es bien conocida, y las principales fuentes son las rocas excavadas y las actividades antropogénicas de refinación del carbón. La evaluación de la concentración de MP en el suelo de la mina y su ecosistema circundante reveló una concentración variada de MP en el suelo de la mina recuperada. Los hongos micorrícicos han ganado mucha atención debido a su papel en la interacción biológica entre plantas y microorganismos. La densidad de esporas de HMA y la infección de la raíz de diferentes árboles que crecen en los vertederos recuperados de esta mina, mostró que aquella correspondiente a la rizósfera de *Cassia siamea* fue mayor que la de *Dalbergia sissoo*. La diferencia en la densidad de esporas puede deberse a las características de la planta y las condiciones de la rizósfera. La asociación con hongos formadores de micorrizas arbusculares aumentó la productividad de los vertederos de minas al aumentar la capacidad de tolerancia a la sequía

de las plantas junto con la disponibilidad de P, además de funcionar como una barrera a la traslocación de MP hacia las partes aéreas lo que facilitó su revegetación y constituyendo un caso de estudio para la recuperación de áreas sometidas a minería.

2- Fitorremediación de aguas residuales

La continua urbanización y el crecimiento de las industrias alimentarias han contribuido significativamente a la producción de aguas residuales. Éstas provocan diversos efectos adversos en el ambiente, como la eutrofización y el deterioro de la calidad del agua natural debido a la existencia de elevadas concentraciones de nitrógeno y fósforo (Xin et al. 2010). Cada día, millones de litros de aguas residuales se generan a partir de diversas actividades domésticas e industriales en todo el mundo. Las aguas residuales generadas por las actividades domésticas son principalmente de dos tipos: aguas grises (excluyendo las aguas residuales contaminadas con materia fecal) y aguas negras (incluidas las aguas residuales contaminadas con materia fecal). El porcentaje de aguas grises es el 80% del total de aguas residuales domésticas (Vakil et al. 2014). Hoy en día, el uso de humedales construidos para el tratamiento de aguas residuales es una opción ampliamente reconocida. Esta ecotecnología sostenible comenzó en Europa durante la década de 1960 y se ha replicado en otros continentes. Se basa en procesos de humedales naturales para la eliminación de contaminantes, incluidas las rutas físicas, químicas y biológicas, pero en un entorno controlado en comparación con los ecosistemas naturales (Kadlec y Wallace, 2009). Estos sistemas de ingeniería ecológica implican tres componentes importantes: medios de filtro porosos, microorganismos y vegetación (Mitsch y Gosselink, 2015). Los mecanismos para la transformación de la materia orgánica disponible en el agua y los MP y nutrientes se llevan a cabo mediante biofilms microbianos formados en los medios porosos y en la zona de la rizósfera (Shelef et al., 2013). Con respecto a la vegetación, uno de los roles más característicos que desempeñan es la producción de raíces y rizomas para proporcionar sustratos para los microorganismos adheridos y la oxigenación de áreas adyacentes a la raíz, además de absorber los contaminantes del agua. El tipo de vegetación utilizada son plantas típicas de humedales naturales, como *Cyperus papyrus*, *Phragmites australis*, *Typha* y *Scirpus* spp., que han sido evaluadas por sus efectos positivos en la eficiencia del tratamiento de aguas residuales. Así como también *Eichhornia crassipes*, el camalote.

3- Fitoextracción de Pb y Cd en suelos contaminados usando *Amaranthus hybridus* L. y hongos formadores de micorrizas arbusculares

Las actividades mineras y metalúrgicas practicadas en áreas como la Comarca Lagunera, en México, han contaminado la región con diferentes elementos potencialmente tóxicos como plomo (Pb), cadmio (Cd), arsénico (As) y zinc (Zn). El uso de plantas es una de las estrategias para la remediación de suelos como éstos, contaminados con MP. Sin embargo, son pocos los estudios

sobre remediación con plantas de zonas áridas y su asociación con micorrizas. Se ha demostrado ampliamente que las micorrizas arbusculares mitigan el estrés e incrementan el crecimiento de las plantas en sitios fuertemente contaminados con MP, por lo que son una herramienta biotecnológica potencial para la restauración de ecosistemas degradados (Gaur y Adholeya, 2004; Hildebrandt et al., 2006). Se evaluó la capacidad extractora de Pb y Cd del quelite (*Amaranthus hybridus* L.) al adicionar una mezcla de micorrizas arbusculares (*Entrophospora columbiana*, *Glomus intraradices*, *G. etunicatum*, *G. clarum*) al sustrato contaminado con Pb o Cd. *A. hybridus* mostró capacidad de concentrar en sus tejidos Pb y Cd al crecer en suelos contaminados incluso en ausencia de hongos MA. No obstante, la adición de micorrizas arbusculares en suelos ligeramente básico y de textura franca contaminado mejoró la capacidad fitoextractora de plomo en las plantas, por lo que la adición de micorrizas es una práctica agronómica importante al emplear *A. hybridus* en planes de remediación de suelos contaminados. La combinación de tecnologías como es el caso de la rizoremediación y fitoextracción de MP es una estrategia que puede ser usada como auxiliar en la descontaminación de ligeramente básicos de textura franca contaminados con Pb y Cd. Los metales pueden ser estabilizados en *A. hybridus* y esta especie vegetal se puede cosechar y confinar, evitando que los metales pesados se encuentren expuestos a la acción de factores ambientales como precipitación y viento y se dispersen en áreas en que la población humana sea potencialmente dañada.

Referencias

- Agarwal, P., Sarkar, M., Chakraborty, B., & Banerjee, T. (2019). Phytoremediation of air pollutants: prospects and challenges. In *Phytomanagement of Polluted Sites* (pp. 221-241). Elsevier.
- Ahirwal, J., y Maiti, S. K. (2016). Assessment of soil properties of different land uses generated due to surface coal mining activities in tropical Sal (*Shorea robusta*) forest, India. *Catena* 140, 155-163.
- Astier Calderón, M., Maass Moreno, M., y Etchevers Barra, J. (2002) Derivación de indicadores de calidad de suelos en el contexto de la agricultura sustentable. *Agrociencia*, 36, 605-620.
- Atangana, A., Khasa, D., Chang, S., & Degrande, A. (2014). Phytoremediation in Tropical Agroforestry. In *Tropical Agroforestry* (pp. 343-351). Springer, Dordrecht.
- Bader, N., Alsharif, E., Nassib, M., Alshelmani, N., & Alalem, A. (2019). Phytoremediation potential of *Suaeda vera* for some heavy metals in roadside soil in Benghazi, Libya. *Asian Journal of Green Chemistry*, 3(1. pp. 1-124), 82-90.
- Bago, B., Pfeffer, P. E., y Shachar-Hill, Y. (2000). Carbon Metabolism and Transport in Arbuscular Mycorrhizas. *Plant Physiology*, 124, 949–958. <https://doi.org/10.1104/pp.124.3.949>.
- Barea, J. M., Palenzuela, J., Cornejo, P., Sánchez-Castro, I., Navarro Fernández, C., López García, A., Estrada, B., Azcón, R., Ferrol, N., y Azcón Aguilar, C. (2011). Ecological and functional roles of mycorrhizas in semi-arid ecosystems of Southeast Spain. *Journal of Arid Environments*, 7, 1292–1301.

- Bashan, Y., Salazar, B., Moreno, M., Lopez, B. R., y Linderman R. G. (2012). Restoration of eroded soil in the Sonoran Desert with native leguminous trees using plant growth-promoting microorganisms and limited amounts of compost and water. *Journal of Environmental Management*, 102, 26 – 36.
- Bravo, A., Brands, M., Wewer, V., Dörmann, P., y Harrison, M. J. (2017). Arbuscular mycorrhiza-specific enzymes FatM and RAM2 fine-tune lipid biosynthesis to promote development of arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist*, 214, 1631–1645. <https://doi.org/10.1111/nph.14533>.
- Brundrett, M., 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews*, 79, 473-495.
- Budel, B., Weber, B., Kuhl, M., Pfanzer, H., Sultemeyer, D., y Wessels, D. (2004). Reshaping of sandstone surfaces by cryptoendolithic cyanobacteria: Bioalkalization causes chemical weathering in arid landscapes. *Geobiology*, 2, 261–268.
- Camprubi, A., Zárate, I. A., Adholeya, A., Lovato, P. E., & Calvet, C. (2015). Field performance and essential oil production of mycorrhizal rosemary in restoration low-nutrient soils. *Land degradation & development*, 26(8), 793-799.
- Chibuike, G. U., & Obiora, S. C. (2014). Heavy metal polluted soils: effect on plants and bioremediation methods. *Applied and environmental soil science*, 2014.
- Driai, S., Verdin, A., Laruelle, F. F., Beddiar, A., Lounès-Hadj Sahraoui, A., y Lounès-Hadj Sahraoui, A. (2015). Is the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* able to fulfil its life cycle in the presence of diesel pollution? *International Biodeterioration & Biodegradation*, 105, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.08.012>.
- Du, J., Zhang, L., Liu, T., Xiao, R., Li, R., Guo, D., ... y Zhang, Z. (2019). Thermal conversion of a promising phytoremediation plant (*Symphytum officinale* L.) into biochar: Dynamic of potentially toxic elements and environmental acceptability assessment of the biochar. *Bioresource technology*, 274, 73-82.
- Dubchak S., y Bondar O. (2019). Bioremediation and Phytoremediation: Best Approach for Rehabilitation of Soils for Future Use. In: Gupta D., Voronina A. (eds) *Remediation Measures for Radioactively Contaminated Areas*. Springer, Cham
- FAO, P. (1980). UNESCO, 1980. Metodología provisional para la evaluación de la degradación de los suelos. Roma.
- FAO (2016). Estado Mundial del Recurso Suelo.
- FAO, <http://www.fao.org/soils-portal/soil-degradation-restoration/es/>
- Ferrol, N., Tamayo, E., y Vargas, P. (2016). The heavy metal paradox in arbuscular mycorrhizas: From mechanisms to biotechnological applications. *Journal of Experimental Botany*, 67, 6253–6265
- Figueroa, D. R. (2004). Estrategias para la recuperación de suelos degradados. *Revista de industria, Distribución y Socioeconomía Hortícola*, 175, 36-39. ISSN 1132-2950.
- Gaitan, J. J., Navarro, M. F., Tenti Vuegen, L. M., Pizarro, M. J., & Carfagno, P. (2017). Estimación de la pérdida de suelo por erosión hídrica en la República Argentina. Ediciones INTA.

- Garzón, L. (2016). Importancia de las Micorrizas Arbusculares (MA) para un uso sostenible del suelo en la Amazonia Colombiana. *Revista Luna Azul*, 42, 217–234. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=321744162010>.
- Gaur, A., y Adholeya, A. (2004). Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Current Science*, 86(4), 528-534
- Gohre, V., y Paszkowski, U. (2006). Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta*, 223, 1115–1122.
- González-Chávez, M. C., Ortega-Larrocea, M. P., Carrillo-González, R., López-Meyer, M., Xocostle-Cázares, B., Gomez, S. K., Harrison, M. J., Figueroa-López, A. M., y Maldonado Mendoza, I. E. (2011). Arsenate induces the expression of fungal genes involved in as transport in arbuscular mycorrhiza. *Fungal Biology*, 115, 1197–1209.
- Hassan, S. E. D., Bell, T. H., Stefani, F. O. P., Denis, D., Hijri, M., y St-Arnaud, M. (2014). Contrasting the community structure of arbuscular mycorrhizal fungi from hydrocarbon-contaminated and uncontaminated soils following willow (*Salix* spp. L.) planting. *PLoS One* 9, e102838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102838>.
- Hernández Cuevas, L., Guerra de la Cruz, V., Santiago Martínez, G., y Cuatlal Cuahutencos, P. (2011). Propagation and mycorrhization of native plants with soil restoration potential. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 2, 87-96.
- Hernández-Ortega, H. A., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., Zavaleta-Mancera, H. A., LópezDelgado, H. A., y Mendoza-López, M. R. (2012). Arbuscular mycorrhizal fungi on growth, nutrient status, and total antioxidant activity of *Melilotus albus* during phytoremediation of a diesel-contaminated substrate. *Journal of Environmental Management*, 95, 319–324. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.02.015>.
- Hildebrandt, U., Regvar, M., y Bothe, H. (2007). Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*, 68(1), 139-146.
- Joner, E. J., Briones, R., y Leyval, C. (2000). Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant and Soil*, 226, 227–234.
- Joner, E. J., Johansen, A., Loibner, A. P., de la Cruz, M. A., Szolar, O. H. J., Portal, J. M., y Leyval, C. (2001). Rhizosphere effects on microbial community structure and dissipation and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in spiked soil. *Environmental Science & Technology*, 35, 2773–2777. <https://doi.org/10.1021/es000288s>.
- Kadlec, R., y Wallace, S. (2009). *Treatment Wetlands*, 2nd ed.; Taylor and Francis Group: Boca Raton, FL, USA.
- Kaldorf, M., Kuhn, A. J., Schroder, W. H., Hildebrandt, U., y Bothe, H. (1999). Selective element deposits in maize colonized by a heavy metal tolerance conferring arbuscular mycorrhizal fungus. *Journal of Plant Physiology*, 154, 718–728.
- Kumar, A., Maiti, S. K., Prasad, M. N. V., & Singh, R. S. (2017). Grasses and legumes facilitate phytoremediation of metalliferous soils in the vicinity of an abandoned chromite–asbestos mine. *Journal of soils and sediments*, 17(5), 1358-1368.

- Latef, A. A. A. (2013). Growth and some physiological activities of pepper (*Capsicum annum* L.) in response to cadmium stress and mycorrhizal symbiosis. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15, 1437–1448.
- Li, L. F., Li, T., Zhang, Y., & Zhao, Z. W. (2010). Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and their distribution patterns related to host-plants and habitats in a hot and arid ecosystem, southwest China. *FEMS Microbiology Ecology*, 71(3), 418-427.
- Meier, S., Borie, F., Bolan, N., Cornejo, P. (2012). Phytoremediation of metal-polluted soils by arbuscular mycorrhizal fungi. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 42 (7), 741-775.
- Midhat, L., Ouazzani, N., Esshaimi, M., Ouhammou, A., & Mandi, L. (2017). Assessment of heavy metals accumulation by spontaneous vegetation: Screening for new accumulator plant species grown in Kettara mine-Marrakech, Southern Morocco. *International journal of phytoremediation*, 19(2), 191-198.
- Mitsch, W. J., y Gosselink, J. G. (2015) *Wetlands*, 5th ed.; Wiley: Hoboken, NJ, USA.
- Niti, C., Sunita, S., Kamlesh, K., & Rakesh, K. (2013). Bioremediation: An emerging technology for remediation of pesticides. *Research Journal of Chemistry and Environment* Vol, 17, 4.
- Pandey, J., Verma, R. K., & Singh, S. (2019). Suitability of aromatic plants for phytoremediation of heavy metal contaminated areas: a review. *International journal of phytoremediation*, 21(5), 405-418.
- Pandey, V. C., y Bajpai, O. (2019). Phytoremediation: From Theory Toward Practice. In *Phytomanagement of Polluted Sites*, 1-49.
- Pandey, V. C., & Souza-Alonso, P. (2019). Market Opportunities: in Sustainable Phytoremediation. In *Phytomanagement of Polluted Sites* (pp. 51-82). Elsevier.
- Pimentel, D. (2006). Soil Erosion: A Food and Environmental Threat. *Environment Development and Sustainability*, 8, 119-137.
- Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M. N. V., y Freitas, H. (2012). Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnology Advances*, 30, 1562-1574.
- Ren, C., Liu, W., Zhao, F., Zhong, Z., Deng, J., Han, X., ... y Ren, G. (2019). Soil bacterial and fungal diversity and compositions respond differently to forest development. *Catena*, 181, 104071.
- Renker, C., Blanke, V., y Buscot, F. (2005). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in grassland spontaneously developed on area polluted by a fertilizer plant. *Environmental Pollution*, 135, 255–266.
- Ryszka, P., Zarzyka-Ryszka, M., Anielska, T., Choczyński, M., y Turnau, K. (2019). Arbuscular mycorrhizal fungi from petroleum-impacted sites in the Polish Carpathians. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 138, 50-56.
- Sarma, H. (2011). Metal hyperaccumulation in plants: a review focusing on phytoremediation technology. *Journal of Environmental Science and Technology*, 4(2), 118-138.
- Shelef, O., Gross, A., y Rachmilevitch, S. (2013). Role of plants in a constructed wetland: Current and new perspectives. *Water*, 5, 405–419.

- Sieverding, E., y Oehl, F. (2006). Revision of Entrophospora and description of Kuklospora and Intrasporea, two new genera in the arbuscular mycorrhizal Glomeromycetes. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 80, 69–81.
- Singh, H. (2006). Mycoremediation: Fungal bioremediation. *John Wiley and Sons*, Hoboken, New Jersey.
- Smith, S. E., y Read, D. J. (2008). Mycorrhizal symbiosis. Cambridge, London: Academic
- Tonin, C., Vandenkoornhuysse, P., Joner, E. J., Straczek, J., y Leyval, C. (2001). Assessment of arbuscular mycorrhizal fungi diversity in the rhizosphere of *Viola calaminaria* and effect of these fungi on heavy metal uptake by clover. *Mycorrhiza*, 10, 161–168.
- Upadhyay, A. K., Singh, D. P., Singh, N. K., Pandey, V. C., & Rai, U. N. (2019). Sustainable Phytoremediation Strategies for River Water Rejuvenation. In *Phytomanagement of Polluted Sites* (pp. 301-311). Elsevier.
- Vakil, K. A., Sharma, M. K., Bhatia, A., Kazmi, A. A., y Sarkar, S. (2014). Characterization of greywater in an Indian middle-class household and investigation of physicochemical treatment using electrocoagulation. *Separation and Purification Technology*, 130: 160–166.
- Vallino, M., Massa, N., Lumini, E., Bianciotto, V., Berta, G., y Bonfante, P. (2006). Assessment of arbuscular mycorrhizal fungal diversity in roots of *Solidago gigantea* growing in a polluted soil in northern Italy. *Environmental Microbiology*, 8, 971–983.
- Van der Heijden, M. G. A., Bardgett, R. D., y Van Straalen, N. M. (2008). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 11, 296-310.
- Vodnik, D., Grcman, H., Macek, I., Van, J., Elteren, J. T., y Kovacevic, M. (2008). The contribution of glomalin-related soil protein to Pb and Zn sequestration in polluted soil. *Science of the Total Environment*, 392, 130–136.
- Xin, L., Hong-Ying, H., Ke, G., y Ying-Xue, S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*, 101(14), 5494–5500.
- Zarei, M., Hempel, S., Wubet, T., Schäfer, T., Savaghebi, G., Jouzani, G. S., Nekouei, M. K., y Buscot, F. (2010). Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil chemical properties and heavy metal contamination. *Environmental Pollution*, 158, 2757–2765.

CAPÍTULO 6

Tecnología de la inoculación

Silvana Velazquez, Fabricio Valdés y Camila Abarca

Introducción

Entre los microorganismos benéficos del suelo se encuentran los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA); los cuales se asocian simbióticamente con el 80% de las especies de plantas terrestres, incluyendo varios cultivos agrícolas (Wang y Qiu, 2006). En dichas asociaciones los HMA son simbiosistas obligados que establecen un vínculo clave entre la planta huésped y el suelo proporcionándole nutrientes minerales y agua a cambio de productos fotosintéticos (Smith y Read, 2008). El micelio externo de los hongos arbusculares que emerge del sistema radical puede adquirir nutrientes de zonas del suelo que son inaccesibles para las raíces (Smith et al., 2000). Además, las hifas fúngicas son mucho más delgadas que las raíces y, por lo tanto, pueden penetrar en poros más pequeños (Allen, 2011). El micelio interno de los hongos arbusculares coloniza exclusivamente la corteza radical y forma estructuras altamente ramificadas dentro de las células denominadas arbusculos, que son considerados como el sitio funcional de intercambio de nutrientes (Balestrini et al., 2015). Por lo tanto, los HMA pueden atenuar la limitación en el crecimiento de las plantas causado por un suministro inadecuado de nutrientes (Nouri et al., 2014). Además de un incremento en el suministro nutricional, las interacciones con HMA brindan otros beneficios a las plantas, entre ellos una mejor tolerancia a la sequía y a la salinidad (Augé et al., 2015) así como también mayor resistencia a las enfermedades (Pozo y Azcón-Aguilar, 2007) e incluso modificar las respuestas fitoquímicas a la herbivoría (Bennett et al., 2009).

En la actualidad se considera que, en un ambiente natural, una condición no micorrícica debe verse como anormal para la mayoría de las especies, aunque existe una marcada diversidad entre las comunidades de hongos arbusculares, dependiendo de la diversidad de especies vegetales, del tipo de suelo y estación, o una combinación de estos factores (Smith y Smith, 2012).

El proceso de restablecer la estructura natural de las comunidades de HMA representa una alternativa favorable a las prácticas de fertilización convencionales, con vistas a una agricultura sustentable, un objetivo clave para los productores que enfrentan la recesión mundial y deben tener una mayor conciencia del medio ambiente. La estrategia principal adoptada para lograr este objetivo es la reintroducción directa de los propágulos de HMA (inóculo) en el suelo. Sin embargo, la explotación de estos hongos requiere el conocimiento de cómo los HMA se adaptan

y reaccionan al ser introducidos en un nuevo ecosistema, cómo responden al manejo del suelo y de los eventos que llevan al establecimiento de una simbiosis funcional, incluidos los mecanismos involucrados en la transferencia de nutrientes. Es importante tener en cuenta que para la introducción de inóculo en un suelo degradado/estresado y/o para evitar el fracaso del proceso de revegetación es importante conocer previamente la biota nativa (Oliveira et al., 2005). Algunas especies de HMA han sido citadas por ser más tolerantes al estrés que otras, y generalmente se encuentran en suelos estresados y contaminados (Hildebrandt et al., 2007). Por lo tanto es posible que se obtengan resultados exitosos luego de una selección cuidadosa de las combinaciones favorables de huésped/nicho/hongo.

En el presente capítulo se desarrollarán algunas de las principales técnicas para cuantificar el potencial inóculo de HMA de los suelos, los métodos de propagación, su correcto almacenamiento, las estrategias de inoculación y los principales desafíos relacionados a la producción e implementación de inóculo micorrízico (**Figura 6.1**).



Figura 6.1: Secuencia de etapas desarrolladas en este capítulo.

Determinación del potencial inóculo de HMA del suelo

Es un prerequisite conocer la diversidad y abundancia de las poblaciones nativas de HMA antes de agregar un inoculante formulado en base a estos microorganismos. Los métodos empleados con mayor frecuencia para determinar la cantidad de propágulos de HMA son los siguientes:

I) Determinación de la densidad de esporas: las esporas son estructuras que permiten la supervivencia de los hongos arbusculares. En determinadas circunstancias son los únicos propágulos infectivos del suelo (por ejemplo luego de que un suelo haya permanecido un largo período sin vegetación, o después de una larga estación seca) y por lo tanto el número de esporas/gramo de suelo seco o número de esporas/volumen de suelo revela la cantidad de propágulos fúngicos en el suelo objetivo. Bajo determinadas condiciones el número de esporas puede tener una correlación con el número total de propágulos infectivos del suelo, pero en otras circunstancias esta correlación no puede ser tan evidente a causa de algunas características intrínsecas de los HMA como son su viabilidad o la incapacidad que poseen algunas esporas viables de germinar bajo determinadas condiciones ambientales.

II) Determinación del micelio externo de los HMA: la biomasa de micelio puede ser cuantificada, aunque este procedimiento además de ser laborioso puede conducir a resultados erróneos

debido a la imposibilidad de separar el micelio de HMA de otros hongos saprótrofos o patógenos del suelo. Del mismo modo los métodos colorimétricos para determinar la quitina del suelo conllevan el mismo tipo de error. Una técnica más adecuada es la determinación de la longitud de las hifas (Abbott y Robson, 1984). Para aislar el micelio externo, se tamiza en húmedo una cantidad conocida de suelo, luego se centrifuga y se transfiere a un papel de filtro donde el micelio se tiñe con un colorante afin a la quitina. La longitud se mide bajo un microscopio compuesto usando una modificación del método de línea de intersección (Giovannetti y Mosse, 1980). Se han desarrollado además, métodos de fluorescencia para diferenciar entre hifas de HMA viables de no viables, los cuales son importantes porque sólo las hifas viables sirven como fuente de propágulos (Schubert et al., 1987)

III) Porcentaje de colonización radical: la infección radical es una condición necesaria para el establecimiento y funcionalidad de la simbiosis con HMA. La posibilidad de que un cultivo obtenga un nivel máximo de colonización radical depende de varios componentes como por ejemplo, las especies de plantas, las condiciones del suelo (contenido de nutrientes) y las especies de HMA. Por lo tanto, altos porcentajes de colonización podrían indicar un elevado potencial inóculo del suelo. Sin embargo los porcentajes de colonización constituyen una estimación relativa de la biomasa fúngica interna de la raíz, pero no brindan información acerca de la cantidad de propágulos de un sitio. Una de las técnicas más empleada para determinar los porcentajes de infección radical es la descrita por Giovannetti y Mosse (1980). Del mismo modo el porcentaje de raíz colonizada también puede arrojar resultados erróneos ya que está influenciado por diversos factores como la densidad radical de la especie vegetal, la etapa vegetativa y el estado nutricional de la planta, las condiciones climáticas, el tipo de suelo, etc.

IV) Determinación de la infectividad micorrícica del suelo: el nivel de propágulos se determina mediante un bioensayo basado en el trabajo de Plenchette et al. (1989). Las muestras de suelo proveniente de los sitios objetivos se secan al aire y luego se pasan por un tamiz de 2 mm de malla. Se realizan diluciones mezclando el suelo original en distintas proporciones (por ejemplo, 100, 30, 10 y 3%) con el mismo suelo esterilizado para proveer una escala logarítmica de concentración. Se llenan macetas plásticas con 150 ml de suelo con cada dilución y se realizan 4 repeticiones. Luego se trasplantan plántulas hospedadoras a cada maceta. Las plantas crecen en invernadero con condiciones controladas de luz y temperatura. Las plántulas se colonizarán dependiendo del nivel de inóculo de cada tratamiento de suelo. Cuatro semanas luego del trasplante las plantas son cosechadas y entonces se evalúa la colonización radical. La infectividad micorrícica del suelo se calcula utilizando un análisis de regresión y las pendientes b resultantes son comparadas utilizando la prueba LSD con una significancia del 0,05.

V) Evaluación mediante técnicas moleculares: durante las últimas décadas, se han desarrollado varias técnicas de metagenómica para caracterizar molecularmente comunidades completas de Glomeromycota (Borriello et al., 2012; Davison et al., 2012) o de inóculos de HMA (Berruti et al., 2013). Estas metodologías también permiten monitorear el HMA inoculado dentro de la planta huésped durante el ciclo de cultivo y verificar los niveles de colonización en las plantas inoculadas.

Método de propagación del inóculo de HMA

Como mencionamos anteriormente los HMA son simbioses obligados y no pueden reproducirse en cultivos puros sin la presencia de plantas hospedadoras. Esta característica restrictiva hace que la producción a gran escala de inóculos constituya un complejo desafío.

Los inóculos de micorrizas pueden obtenerse a partir de tres fuentes de propágulos:

I) el suelo rizosférico de una planta que contenga HMA puede usarse como inóculo, ya que normalmente contiene fragmentos de raíces colonizadas, esporas e hifas de hongos arbusculares. Sin embargo, a menos que se disponga de información precisa sobre la abundancia, la diversidad y la infectividad de esta fuente de propágulos, los inóculos de suelo resultan poco confiables porque conllevan el posible riesgo de transferir patógenos y semillas de malezas;

II) las esporas extraídas del suelo pueden usarse para iniciar la producción de un inóculo puro o mixto. Para la producción de este inóculo es necesario que los HMA se cultiven junto a una planta trampa (es decir, una planta que puede ser colonizada masivamente por muchas especies de HMA) en un medio inerte óptimo para la propagación de estos microorganismos. Este es el tipo de inóculo más utilizado para la inoculación de cultivos a gran escala, ya que generalmente contiene un conjunto más concentrado del mismo tipo de propágulos que el que se encuentra en los inóculos del suelo;

III) los fragmentos de raíz infectados que se han separado de un cultivo o de una planta trampa también pueden servir como fuente de inóculo. Este tipo de inóculo no es recomendable debido a que puede introducir microorganismos patógenos al sistema.

El método más extendido para la propagación de HMA es el uso de plantas trampa y, solo escasamente se aplican otros métodos. Los cultivos con planta trampa pueden iniciarse a partir de alguna de las tres fuentes de propágulos antes mencionadas. Para la elaboración de una planta trampa se dispone de un recipiente (aproximadamente de 250 ml), con un sustrato estéril (con diferentes proporciones de perlita:vermiculita; suelo:arena; suelo:perlita:vermiculita, entre otros), al cual se le adicionan los propágulos fúngicos. Se introducen semillas previamente esterilizadas de una planta hospedadora para que se establezca la simbiosis y multiplicar los propágulos infectivos. Las plantas que se emplean deben ser micotróficas, tener un rápido crecimiento vegetativo, las semillas deben estar libres de patógenos y no haber sido tratadas con fungicidas. Frecuentemente se realiza un cultivo consociado de una leguminosa y una gramínea (Brundrett y Abbott, 1995).

Existen algunas otras alternativas al uso de plantas trampa en macetas. Los sistemas de cultivo sin suelo, como la aeroponía y la hidroponía, conducen a la producción de esporas puras y limpias y potencian el crecimiento de la planta huésped (Ijdo et al., 2011).

El cultivo monoxénico de raíz es otro método que permite la propagación exitosa de HMA a gran escala que se puede utilizar directamente como inóculo. El método consiste en cultivar raíces inoculadas (las llamadas raíces pilosas) que han adquirido la capacidad de proliferar sin

ninguna porción epigea, después de la transformación con el plásmido Ri (inductor de raíz) de *Agrobacterium rhizogenes* (Bécard y Fortin, 1988). Un número masivo de esporas, micelio y raíces colonizadas se obtienen en una placa de Petri en solo unos pocos meses (Declerck et al., 1998). Desafortunadamente, el protocolo solo se ha implementado para un número reducido de especies de hongos formadores de micorrizas arbusculares.

Almacenamiento del inóculo de HMA

Al finalizar el cultivo se debe almacenar correctamente el inóculo micorrícico. Se corta la parte aérea de la planta, y el suelo se deja secar durante aproximadamente 3 semanas. Para lograr un mejor secado del suelo infectado es conveniente dejar las macetas sin regar durante 2-3 semanas en invernadero (nunca se debe aplicar calor). Cuando el suelo almacenado es húmedo (incluso con una humedad del 5%), los microorganismos del suelo y del aire (hongos y bacterias) son capaces de hiperparasitar las esporas de los HMA. El suelo con raíces se debe homogeneizar y luego el material se coloca en recipientes de plástico o vidrio y se almacena refrigerado a 8-10 °C.

Un correcto almacenamiento puede mantener vivos los aislamientos de hongos arbusculares durante 5 años. Algunos métodos para la conservación han sido descritos en la literatura (Schenck y Smith, 1982). Sin embargo, la forma más fácil de almacenar el suelo infectado con un alto número de esporas es como se mencionó anteriormente. Los métodos de secado al vacío de esporas no sólo son más complicados sino que además no resultan adecuados para todas las especies de hongos arbusculares (Toro et al., 1985).

Para evitar la pérdida de cultivos de hongos debido al almacenamiento u otros problemas, se recomienda renovarlos cada 2-3 años.

Técnicas de inoculación de HMA

Las técnicas de inoculación con HMA están intrínsecamente relacionadas con los métodos de producción asociados a cada cultivo. En el caso de cultivos que se reproducen mediante semillas (trigo, maíz, sorgo, mijo, cebada, algodón, soja) en los que se busca inocular pequeños lotes y en los cuales no se emplea maquinaria para la siembra, el inóculo de HMA en el suelo se puede aplicar en el surco en el que se coloca la semilla. Sin embargo cuando hay que inocular grandes superficies se deberá aplicar el inoculante mediante el uso de maquinaria, en estos casos se ha probado el uso de carriers, como la arcilla expandida, para obtener un mayor volumen de inoculante. Otra posibilidad consiste en peletear las semillas con inoculante o suministrarlo al sistema mediante el riego.

En el caso de los cultivos que pasan por una etapa en vivero antes de ser trasplantados en el campo, como los hortalizas (tomates, cebollas y pimientos) y la mayoría de los árboles frutales, se pueden emplear otras estrategias para incorporar el inóculo. Las semillas y el suelo que se emplea como sustrato para las macetas se desinfectan y se les aplica un biocida para erradicar o prevenir las plagas, malezas y enfermedades. También es posible optar por sustratos artificiales libres de HMA, como vermiculita, perlita o materiales orgánicos compostados. La inoculación se realiza preinfectando las plantas en almácigos o *in vitro*, o incorporando directamente el inóculo con HMA durante la siembra, mezclado con el sustrato. En el caso que las semillas sean pregerminadas en condiciones controladas, deben trasplantarse a los contenedores y cuando desarrolla la primera hoja, las raíces de las plántulas se pueden sumergir en una suspensión de agua que contiene inóculo de HMA. Se puede, también introducir el inóculo justo en el momento del trasplante cuando se hace el orificio de plantación. Todos estos procedimientos de siembra en viveros se realizan generalmente en forma manual.

Desafíos relacionados con la producción y aplicación de inóculos de HMA

Existe una creciente demanda de los productores de usar inoculantes a base de HMA como biofertilizante. Un adecuado manejo agrícola puede potenciar los efectos positivos de la simbiosis con hongos arbusculares que se establecen naturalmente en el suelo. Hasta el momento la principal estrategia para aumentar los beneficios de la asociación simbiótica es mediante la inoculación con propágulos de HMA.

No obstante la producción de inóculo de HMA puro o mixto a gran escala constituye aún un gran desafío. El principal obstáculo para la producción de un inóculo a base de estos microorganismos radica en el comportamiento simbiótico obligado de los HMA, es decir, su necesidad de tener una planta huésped para completar el crecimiento y finalización de sus ciclos de vida. Esto significa que el paso de propagación debe incluir una fase de cultivo con la planta huésped que suele requerir mucho tiempo y espacio. Otra dificultad para el uso agrícola de los HMA que podemos mencionar es la ausencia de un método rápido para evaluar si una planta está colonizada y cuál es el grado de colonización del hospedador, ya que necesitamos considerar que el proceso de colonización puede llevar de 15 - 60 días para que los hongos arbusculares completen su ciclo de vida. Cabe mencionar además que el procedimiento para obtener una gran cantidad de inóculo necesario para la aplicación a gran escala también es un proceso exigente.

Sin embargo, y considerando todas las dificultades expresadas, la inoculación con HMA resulta más adecuada para los sistemas de producción de plantas que involucran una etapa de trasplante, por ejemplo cultivos hortalizas y forestales, ya que se necesitan cantidades más pequeñas de inóculo. La inoculación extensa a campo abierto, puede por lo tanto resultar técnicamente poco práctica y económicamente prohibitiva. No obstante es importante considerar que una vez que la biodiversidad de HMA se restaura y está bien establecida, y si se implementa un manejo compatible con estos microorganismos, como la implementación de cultivos de cobertura

(Lehman et al., 2012) y prácticas de labranza conservacionista (Såle et al., 2015) la comunidad de HMA persistirá una vez establecida. Si no se llevan a cabo prácticas perjudiciales antes y después del cultivo, la red hifal micorrícica permanecerá inalterada e infecciosa en el futuro.

Como alternativa a la inoculación a gran escala, también es factible un enfoque a pequeña escala, inspirándose en la idea de crear lo que Allen (1987) ha denominado “islas de fertilidad”, en las que la inoculación con HMA podría limitarse a pequeñas porciones de un campo, y esto conduciría gradualmente al establecimiento de una red micelial saludable y con costos reducidos. Esta técnica estaría particularmente orientada a ayudar a la revegetación de una tierra degradada, como se vio en el capítulo anterior, ya que las islas de fertilidad inoculadas probablemente permitan que las especies de plantas nativas recuperen la tierra empobrecida de nutrientes más rápidamente. Por lo tanto, la restauración con HMA solo representa un costo inicial que, si la persistencia de hongos arbusculares se favorece en el suelo, podría perpetuarse con el paso de los años. Como ya se demostró (Barr, 2010), la inoculación con HMA puede ser económicamente rentable, en comparación con la fertilización convencional, proporcionando ahorros sustanciales para los agricultores y para proyectos de recuperación de tierras degradadas.

La tendencia general de las empresas productoras de inoculantes es el desarrollo de un formulado en base a solo una o unas pocas especies de HMA, que pueda ser aplicado en una amplia gama de cultivos y condiciones ambientales. Las especies de HMA que se utilizan se pueden propagar de manera rutinaria y son generalistas, ya que se encuentran en asociación con una gran variedad de plantas hospedadoras en diferentes biomas. Sin embargo los beneficios reales de los inóculos que actualmente se encuentran en el mercado no siempre son positivos. Entre estos problemas surge la necesidad de controlar la composición biológica de un producto, por ejemplo, debido a la presencia de patógenos y la posibilidad de introducir semillas de malezas, pero sobre todo la necesidad de evaluar su pureza en términos de composición de HMA. De hecho, la lista de especies declarada en la etiqueta de un inóculo comercial no siempre corresponde con precisión a su composición real. Los inóculos de HMA se producen principalmente utilizando cultivos en contenedores, ya sea en invernaderos, cámaras de crecimiento o en campos, y, como resultado, no pueden estar libres de microorganismos externos.

A partir de todo lo expuesto en el presente capítulo el empleo de biofertilizantes en base a HMA requiere de un profundo conocimiento de la biología de estos microorganismos, por lo tanto para promover el desarrollo y la mejora del mercado de inoculantes, se deberán fortalecer los vínculos entre la investigación y las empresas e introducir una serie de "mejores prácticas" que podrían adoptarse para resolver problemas relacionados con el funcionamiento de estos inóculos.

Referencias

- Abbott, L.K., Robson, A.D. (1984). The effect of MA on plant growth. In: POWELL, C.L., BAGYARAJ, D.J. VA Mycorrhizas. UNISCIENCE, CRC Press-Florida, p. 113-130.

- Allen, M. F. (1987). Ecology of vesicular-arbuscular mycorrhizae in an arid ecosystem: use of natural processes promoting dispersal and establishment, *Mycorrhizae Decade Practical Applications and Research Priorities 7th NACOM IFAS* (Gainesville, FL), 133–135.
- Allen, M. F. (2011). Linking water and nutrients through the vadose zone: a fungal interface between the soil and plant systems: linking water and nutrients through the vadose zone: a fungal interface between the soil and plant systems. *Journal of Arid Land*, 155–163.
- Augé, R. M., Toler, H. D. y Saxton, A. M. (2015). Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis. *Mycorrhiza*, 25, 13–24.
- Balestrini, R., Lumini, E., Borriello, R., y Bianciotto, V. (2015). Plant-soil biota interactions. En E.A. Paul (Ed), *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*, 311–338. Londres: Academic Press; Elsevier.
- Barr, J. (2010). Restoration of plant communities in The Netherlands through the application of arbuscular mycorrhizal fungi. *Symbiosis*, 52, 87–94.
- Bécard, G., y Fortin, J. A. (1988). Early events of vesicular–arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytology*, 108, 211–218.
- Bennett, A. E., Bever, J. D., y Bowers, M. D. (2009). Arbuscular mycorrhizal fungal species suppress inducible plant responses and alter defensive strategies following herbivory. *Oecologia*, 160, 771–779.
- Berruti, A., Borriello, R., Della Beffa, M. T., Scariot, V., y Bianciotto, V. (2013). Application of nonspecific commercial AMF inocula results in poor mycorrhization in *Camellia japonica* L. *Symbiosis*, 61, 63–76.
- Borriello, R., Lumini, E., Girlanda, M., Bonfante, P., y Bianciotto, V. (2012). Effects of different management practices on arbuscular mycorrhizal fungal diversity in maize fields by a molecular approach. *Biology and Fertility of Soils*, 48, 911–922.
- Brundrett, M. C., y Abbott, L. K. (1995). Mycorrhizal fungus propagules in the Jarrah forest: II. spatial variability in inoculum levels. *New Phytologist*, 131, 461–469.
- Davison, J., Öpik, M., Zobel, M., Vasar, M., Metsis, M., y Moora, M. (2012). Communities of arbuscular mycorrhizal fungi detected in forest soil are spatially heterogeneous but do not vary throughout the growing season. *PLoS ONE* 7, 8.
- Declerck, S., Strullu, D. G., y Plenchette, C. (1998). Monoxenic culture of the intraradical forms of glomus sp. Isolated from a tropical ecosystem: a proposed methodology for germplasm collection. *Mycologia*, 90, 579–585.
- Giovannetti, M. y Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, 84, 489–500.
- Hildebrandt, U., Regvar, M., y Bothe, H. (2007). Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*, 68, 139–146.
- Ijdo, M., Cranenbrouck, S., y Declerck, S. (2011). Methods for large-scale production of AM fungi: past, present, and future. *Mycorrhiza*, 21, 1–16.

- Lehman, R. M., Taheri, W. I., Osborne, S. L., Buyer, J. S., y Douds, D. D. Jr. (2012). Fall cover cropping can increase arbuscular mycorrhizae in soils supporting intensive agricultural production. *Applied Soil Ecology*, 61, 300–304.
- Nouri, E., Breuillin-Sessoms, F., Feller, U., y Reinhardt, D. (2014). Phosphorus and nitrogen regulate arbuscular mycorrhizal symbiosis in petunia hybrida. *PLoS ONE*, 3.
- Oliveira, R. S., Vosátka, M., Dodd, J. C., y Castro, P. M. L. (2005). Studies on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and the efficacy of two native isolates in a highly alkaline anthropogenic sediment. *Mycorrhiza*, 16, 23–31.
- Plenchette, C., Perrin, R., y Duvert, P. (1989). The concept of soil infectivity and a method for its determination as applied to endomycorrhizas. *Canadian Journal of Botany*, 67(1), 112-115.
- Pozo, M. J., y Azcón-Aguilar, C. (2007). Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 393–398.
- Säle, V., Aguilera, P., Laczko, E., Mäder, P., Berner, A., Zihlmann, U., y Oehl, F. (2015). Impact of conservation tillage and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 84, 38-52.
- Schenck, N. C., y Smith, G. S. (1982). Responses of six species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and their effects on soybean at four soil temperatures. *New Phytologist*, 92(2), 193-201.
- Schubert, A., Marzachi, C., Mazzitelli, M., Cravero, M. C., y Bonfante-Fasolo, P. (1987). Development of total and viable extraradical mycelium in the vesicular–arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus clarum* Nicol. & Schenck. *New Phytologist*, 107(1), 183-190.
- Smith, F. A., Jakobsen, I., y Smith, S. E. (2000). Spatial differences in acquisition of soil phosphate between two arbuscular mycorrhizal fungi in symbiosis with *Medicago truncatula*. *The New Phytologist*, 147(2), 357-366.
- Smith, S. E., y Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd edn. Academic, London
- Smith, S. E., y Smith, F. A. (2012). Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. *Mycologia*, 104(1), 1-13.
- Toro, T., Galvez, A. L., y Sieverding, E. (1985). Evaluación de varias formas de almacenamiento de hongos formadores de micorriza vesiculo-arbuscular. En E.Sieverding, M. Sanchez de Prager, y O.N. Bravo (Eds.) *Investigaciones sobre Micorrizas en Colombia*, 224-236. Universidad Nacional de Colombia, Facultas de Ciencias Agropecuarias: Palmira.
- Wang, B., y Qiu, Y. L. (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, 16, 299-363.

CAPÍTULO 7

Técnicas empleadas en el muestreo de hongos micorrícicos arbusculares

Valeria Bernardo, Sebastián Garita, Juan Ignacio Ripodas, Cecilia Arango, Graciela Pastorino y Marcela Ruscitti

En este capítulo se desarrollarán algunas de las técnicas comúnmente empleadas en el muestreo y seguimiento de los hongos micorrícicos arbusculares, como la tinción de las raíces para su observación y cuantificación. Además, se presentarán métodos de extracción de esporas, establecimiento de cultivos trampa para la multiplicación del inóculo, determinación de la viabilidad de las estructuras fúngicas, dependencia micorrícica, detección de micelio externo, extracción de glomalina y número más probable.

Cuantificación de la colonización de raíces con hongos micorrícicos arbusculares. Porcentaje de Micorrización

Para la detección de la presencia de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) en las raíces se emplean técnicas de tinción que facilitan la visualización de la presencia de las distintas estructuras fúngicas, ya sea dentro o fuera de las mismas, ya que la simple observación macroscópica de las raíces no permite detectar su presencia. El empleo de estas técnicas hace posible observar la colonización de plantas hospedantes que ocurre en forma natural, evaluar el establecimiento de HMA inoculados, correlacionándolo con parámetros de crecimiento y desarrollo vegetal, entre otros.

Las metodologías de tinción de raíces para observar la presencia del hongo simbionte y sus estructuras, contemplan los siguientes pasos: lavado, clarificación a través de hidrólisis alcalina, neutralización y tinción con colorantes tales como: negro de clorazol E (Brundrett et al., 1994), azul de Tripán en lactoglicerol (Phillips y Hayman, 1970); fucsina ácida (Kormanik y Mc Graw, 1982), tinta para estilógrafo (Vierheilig et al., 1998).

Procedimiento general para la tinción con azul de Tripán y la cuantificación de la colonización fúngica

El método más ampliamente utilizado es el descrito por Phillips y Hayman (1970). Se recolectan las raíces y se lavan con agua para eliminar el resto de suelo e impurezas. Se seleccionan en forma aleatoria fracciones de raíces no lignificadas y de diámetros menores a 1 mm, para facilitar la penetración de los reactivos. Luego se clarifican con el agregado de KOH al 10% (p/v) calentando a baño María (BM) a 80 °C durante intervalos de tiempo diferentes que dependen del tipo de raíz a analizar. Se continúa lavando las raíces tres veces con agua y se aplica una solución de HCl 0,1N (5 minutos a temperatura ambiente). Finalmente se tiñen con azul de Tripán (5 a 10 minutos a 95 °C). El colorante tiñe de color azul las estructuras del hongo que contienen quitina, principal componente de las paredes celulares de los hongos micorrícicos arbusculares. Luego las raíces se conservan en una solución de lacto-fenol.

La cuantificación de la colonización se realiza en general mediante dos técnicas: “Intersección de cuadrantes” (Sieverding, 1984; Brundrett et al., 1994) o “Intersección de campos en placa”. La elección del método depende de lo que se pretenda investigar. Aquí describiremos el método de Intersección de campos en placa.

Fragmentos de raíces teñidas seleccionados al azar, de aproximadamente 1 cm de longitud, se montan en portaobjetos añadiendo gotas de ácido láctico y se cubren con un cubreobjeto observándose al microscopio óptico. Para la observación de las raíces, estas se dividen en tres campos, los cuales se recorren con el microscopio, realizándose en total 30 observaciones por preparado. Se sugiere realizar 5 preparados por muestra (3 líneas por preparado = 150 intersecciones x 5 preparados = 750 lecturas). De cada muestra se registra la presencia de campos negativos (sin presencia de estructuras fúngicas) y positivos (con presencia de estructuras fúngicas). En los campos positivos se tiene en cuenta el tipo de estructuras (arbúsculos, vesículas, hifas) presentes dentro de la raíz. El porcentaje de micorrización (M%) se calcula como la proporción de campos con raíces infectadas sobre el número total de campos observados, calculando también el porcentaje de arbúsculos (%Ar) y vesículas (%V) mediante el mismo procedimiento (Moorman y Reeves, 1979).

Cuando se requiere obtener un mayor grado de información sobre las estructuras del hongo, se puede emplear la microscopía de contraste de fases, microscopía de fluorescencia, entre otras. También se puede acudir a la microscopía electrónica de barrido (SEM) o de transmisión (TEM), pero los costos de operación son superiores y el procesamiento de las muestras es más laborioso. Mediante estas técnicas se observan arbúsculos, vesículas en tercera dimensión, componentes de la ultraestructura de la simbiosis “*in situ*”, que permiten estudiar y caracterizar en detalle el proceso de intercambio de nutrientes entre los simbioses.

Complementar estas técnicas con estudios bioquímicos y moleculares permite integrar lo morfológico con lo fisiológico. Los estudios de actividades metabólicas a través de la cuantificación de enzimas específicas y el análisis molecular, permiten a su vez, precisar procesos fisiológicos y genes involucrados en cada una de las etapas de la simbiosis y moléculas características

(Brundrett et al., 1994). Para el reconocimiento de la diversidad de los HMA las técnicas moleculares surgen como valiosas herramientas de apoyo.

Extracción de esporas desde el suelo o a partir de inoculantes sólidos. Método de tamizado húmedo, decantación y gradiente de sacarosa

La ubicación taxonómica y la sistemática tradicional de reconocimiento de los HMA a través de los caracteres morfológicos de sus estructuras reproductivas (esporas y esporocarpos) hacen necesario el aislamiento de estas estructuras del suelo. Asimismo, la separación de esporas también es empleada para estimar la población de los HMA en la producción de inoculantes. Numerosos autores han descrito diferentes técnicas con este objetivo (Gerdemann y Nicolson, 1963; Jenkins, 1964, Sutton y Barron, 1972; Saif, 1977, Smith y Skipper, 1979; Mosse y Jones, 1968, Tommerup y Kidby, 1979; Sieverding, 1984, 1991, Walker, 1997; Lara y Flores, 2003). Estos investigadores coinciden en algunas de las etapas del procedimiento entre las que se incluyen: la obtención de una suspensión de una masa o volumen de suelo en un volumen de agua, agitación mecánica, el paso por una serie de tamices para separar las esporas y demás partículas componentes de la materia orgánica del suelo, en base a su tamaño, la generación de un gradiente de densidad, con sacarosa, por centrifugación con el fin de lograr suspender diferencialmente partículas de tamaños (aproximadamente en el rango 450 - 40 μm) y densidades similares a los alcanzados por las esporas de HMA, y extraer las esporas de HMA en el gradiente obtenido de la suspensión.

La técnica que se describe corresponde a la extracción de esporas mediante un tamizado húmedo, seguido de centrifugación en gradiente de sacarosa (Sieverding, 1983; Cabello, 2008) (**Figura 7.1**).

Se pesan 50 -100 g de suelo o inoculante y se diluye en un litro de agua, se agita por 15 minutos y se deja decantar la suspensión resultante. Se repite el procedimiento 2-3 veces y luego de la última decantación se pasa la mezcla de suelo y agua, por tamices de 300 μm , 150 μm y 50 μm . Se continúa lavando con agua corriente hasta que el agua salga limpia. El contenido de los tamices se coloca en tubos de centrifuga de 50 ml con ayuda de una piseta. Con agua y el residuo de los tamices, se llenan hasta la mitad los tubos de centrifuga de 50 ml y se agrega una solución de sacarosa al 60-80% hasta completar el volumen, con una jeringa o pipeta desde el fondo del tubo para formar un gradiente. El material debe quedar suspendido sobre la solución de sacarosa. Luego, se centrifuga durante 5 minutos a 3500 rpm. Con una jeringa a la que se le coloca una manguera plástica flexible de 1/8 de pulgadas de diámetro entre 10-15 cm de longitud, se extrae la fase intermedia de los tubos, principalmente el material contenido en el rango medio del gradiente de la solución de sacarosa, donde se acumulan las esporas. Ese contenido se vuelca en el tamiz de 50 μm y se lava con abundante agua para eliminar toda la sacarosa y así

evitar la ruptura de esporas por presión osmótica. Se transfiere el material a una caja de Petri con cuadrícula de 1 cm dibujada en la parte inferior para su cuantificación bajo lupa estereoscópica. El número total de esporas de HMA se refiere a gramos o ml de suelo o inoculante.

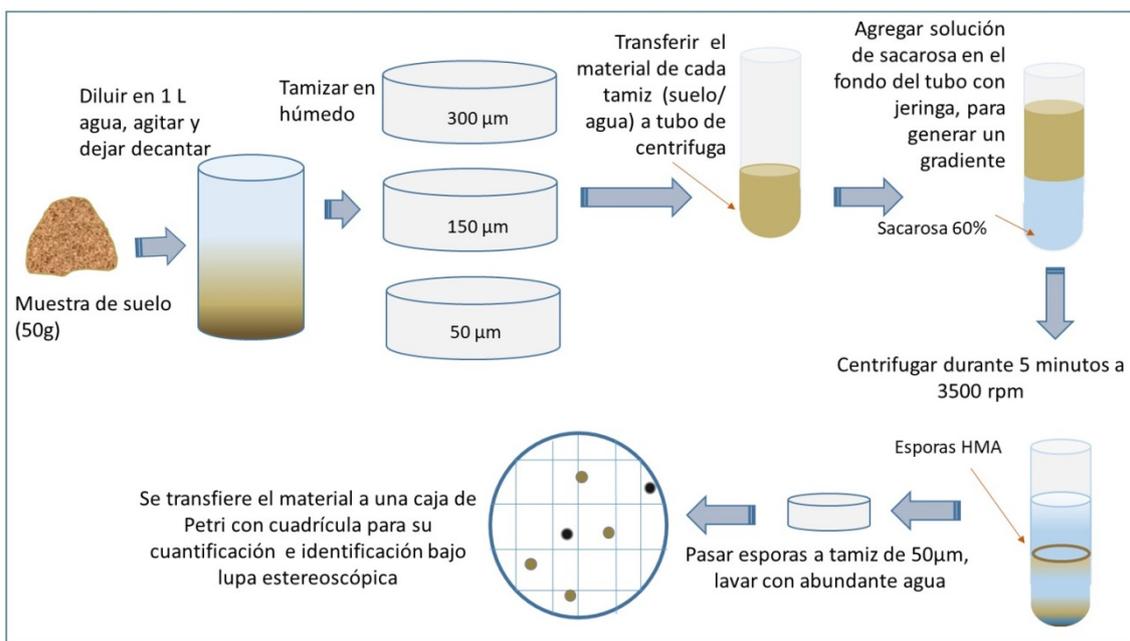


Figura 7.1: Esquema del procedimiento a realizar para la técnica de extracción de esporas, empleada para clasificar sistemáticamente estos hongos y para estimar la población de los HMA del suelo o en inóculos comerciales

Viabilidad de esporas de HMA

Una vez realizada la extracción de esporas y esporocarpos de HMA del suelo, suele ser necesario determinar su viabilidad. Para ello se procede a emplear técnicas que determinan la proporción de esporas que germinan bajo ciertas condiciones ambientales preestablecidas. Aquí describiremos el procedimiento para determinar la viabilidad de las esporas desarrollado por An et al. (1998). Se prepara una solución stock que contenga 0,5 mg MTT [(3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio bromuro] por ml de agua deionizada que se conservará a 4°C en oscuridad hasta su utilización. En un tubo eppendorf se coloca igual volumen de la solución stock y de una suspensión acuosa de esporas de HMA, se mezcla y se incuban a temperatura ambiente por 40 horas. Luego se remueven las esporas y se las observa al microscopio. Las esporas viables se tiñen de rojo brillante. Las esporas no viables no varían de color respecto a su apariencia original. Transcurridas 40 hs de incubación todas las esporas se tornan azules.

Establecimiento de cultivos trampa para la multiplicación de HMA

Para el establecimiento de bancos de HMA nativos o introducidos se utiliza la implementación de cultivos trampa, con varios fines de: a) conservación de este recurso biológico, b) la confirmación de la presencia de algunos HMA esporulados y la activación de otros que no fueron detectados utilizando otras técnicas, c) la producción posterior de inoculantes para el campo a partir de la selección de esporas en cantidades suficientes para lograr cultivos mono-específicos, d) investigaciones en laboratorio, invernaderos y campo. Los resultados de un cultivo trampa dependen de varias condiciones, tales como el potencial de inóculo micorrícico inicial del suelo, la planta trampa utilizada y las condiciones de crecimiento de los cultivos trampas, incluyendo variables como temperatura, luz, sustrato. Para cumplir con este objetivo se requiere: a) un sustrato adecuado, b) disponer de una planta hospedera adecuada, c) una fuente de inóculo de HMA (suelo de campo y raíces) y d) proveer condiciones de suelo (sustrato) y manejo de la planta hospedera que sean óptimas para el establecimiento de la micorrización.

El sustrato para la multiplicación de los HMA podrá estar constituido por suelo y arena en partes iguales, el cual deberá ser esterilizado. Para ello, se pasa por un tamiz de apertura de malla de 2 mm para descartar restos vegetales. Se coloca el sustrato en bolsas resistentes a altas temperaturas y se tinaliza durante una hora a 100 °C, durante tres días consecutivos. Se puede esterilizar el sustrato de suelo+arena en las proporciones correspondientes para facilitar el llenado de las macetas. Otro sustrato que se emplea frecuentemente, está constituido por dos partes de vermiculita mediana, una parte de perlita y una de arena (2:1:1) tinalizados. Se llenan las macetas, previamente lavadas y desinfectadas con este sustrato luego se agrega el inóculo (10-20%) y una pequeña capa de sustrato para tapar la fuente de inóculo. Otros autores (Bagyaraj y Stürmer, 2012) emplean una mezcla homogénea de suelo de campo (inóculo) con arena estéril (50% de suelo de campo y 50% de arena). Se siembran las semillas y se agrega otra capa fina de sustrato. Se utilizan 3-3,5 g de semillas por maceta. Para realizar la desinfección superficial de las semillas, se las colocan en un vaso de precipitado con una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 5 a 10 minutos. Luego se enjuagan tres veces con agua estéril. Para evitar cualquier tipo de contaminación se recomienda desinfectar con alcohol etílico 96% todos los elementos a utilizar. Incluso se aconseja exponer a luz UV al menos 2 horas dichos elementos, luego de la desinfección con alcohol.

La elección de la planta trampa es fundamental ya que será el soporte donde se desarrollarán los HMA. Debe ser una especie que crezca y se adapte a las condiciones locales y diferencie un buen sistema radicular que dará espacio suficiente para el crecimiento y esporulación del hongo. Las gramíneas C4 (sistema radical fasciculado, alta eficiencia fotosintética), los tréboles y los lotus son considerados buenas plantas trampa debido a que son altamente micotróficas.

Se tapan las macetas con film para evitar la evapotranspiración. Una vez que están emergidas las plántulas se quita el film. Las macetas se mantienen a capacidad de campo en cámaras de crecimiento (25±5 °C, fotoperíodo de 16 horas y 350 μmoles.m.s⁻¹) durante 90 días. También se les suele proporcionar nutrientes utilizando solución nutritiva de Hoagland modificada

(Hoagland y Arnon, 1950), de modo de disminuir la cantidad de fósforo. Al cabo de dos meses, se pueden realizar pruebas de establecimiento de los HMA y de control de pureza.

Puede emplearse una sola especie de semillas o varias, según el propósito del estudio. En el caso que el objetivo sea obtener mayor diversidad de HMA, suelen recomendarse una gramínea C4, una leguminosa y una herbácea habitual (por ejemplo: *Lotus perenne*, *Trifolium pratense* y *Plantago lanceolata*). Este consorcio ofrece la ventaja que brinda mayores oportunidades a los HMA para infectar las raíces y así obtener la mayor cantidad posible de especies de HMA.

Determinación de la viabilidad del micelio de HMA. Evaluación de la actividad de la enzima succinato-deshidrogenasa (SDH)

Los métodos de tinción descritos anteriormente determinan la presencia de diferentes propágulos de los HMA en el interior o en el exterior de las raíces colonizadas. Por otro lado, el micelio del hongo participa activamente en la absorción y traslado de fósforo (P) del suelo al tejido radical, esta actividad del micelio puede evidenciarse a través de la actividad de la enzima succinato-deshidrogenasa (enzima ligada al ciclo de Krebs), basada en el porcentaje de micorrización, de acuerdo al procedimiento descrito por Smith y Gianinazzi-Pearson (1990). La tinción del hongo a través de la actividad de la enzima succinato-deshidrogenasa se detecta mediante una coloración, debida a la reducción del colorante nitroblue tetrazolium observable con el microscopio óptico, diferenciando los sitios activos de la enzima en el micelio externo e interno. Esta técnica se utiliza también para evaluar efectos tóxicos sobre estos hongos.

Las raíces lavadas se colocan en una solución denominada incubadora (0,2 M de Tris-HCL, pH 7; 2,5M de succinato de sodio.6H₂O; 5 mM de MgCl₂ y 4 mg/mL de nitroblue tetrazolium) y se incuban a 25°C durante 16 a 18 hs en oscuridad. Transcurrido ese tiempo se aclaran las raíces con una solución de hidrato de cloral al 75% calentando durante 15 minutos. Finalmente se tiñen con una solución de fucsina-ácida al 0,01% en ácido láctico durante 8 minutos a 90 °C. Los fragmentos de raíces teñidos se disponen en portaobjetos de la misma manera que aquellos teñidos con azul de Tripán, y se cuantifica el porcentaje de raíces que presentan actividad observándose las estructuras viables del hongo, coloreadas de azul-violáceo y las muertas de color fucsia.

Algunos autores señalan que esta tinción vital es indicadora de actividad, pero no lo es de la efectividad del micosimbionte sobre los hospederos (Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1995). No obstante, la eficiencia fúngica en la captación y acumulación de fósforo se puede cuantificar mediante otra técnica de tinción que determina la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP), la cual se localiza principalmente en las vacuolas y arbusculos del micelio intraradical, la cual fue descrita por Tisserant et al. (1993). Este procedimiento utiliza ácido alfa naftil fosfato como sustrato. Para ello las raíces lavadas se cortan en fragmentos de aproximadamente 1 cm de longitud y se colocan en una solución también llamada incubadora (Buffer Tris/ácido cítrico pH 9,2; Fast blue RR, α naftil fosfato, MgCl₂, MnCl), luego de la incubación las raíces se clarifican con NaOCl

3% durante 1 a 3 minutos. Se realizan los preparados de raíces para la observación en microscopio (idem SDH), determinando la presencia de la enzima activa cuando un precipitado negro se detecta en los tejidos fúngicos.

Dependencia micorrícica (DM)

La dependencia micorrícica se define como "el grado en el cual una planta requiere de la condición micorrícica para dar su máximo crecimiento o rendimiento a un nivel dado de fertilidad del suelo" (Gerdeman, 1975). Se determina numéricamente como la diferencia entre el peso seco de una planta micorrizada y una no micorrizada, expresada como porcentaje (Plenchette et al., 1983). Este índice permite evaluar la eficiencia de la micorrización en la producción de biomasa, al relacionar el peso seco (PS) total de las plantas micorrizadas y no micorrizadas de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$DM = \frac{\text{PS de las plantas micorrizadas} - \text{PS de las plantas no micorrizadas}}{\text{PS de las plantas micorrizadas}} \times 100$$

La dependencia micorrícica puede variar entre las distintas plantas y se estima que está relacionada con la cantidad de pelos radicales, así es que las plantas más dependientes de los hongos micorrícicos son aquellas de raíces gruesas no ramificadas y con escasos pelos. Así también las plantas que requieren de elevados niveles de fertilización fosfatada, en ausencia de este elemento, son altamente dependientes de la micorrización.

Metodologías para extracción y tinción de micelio externo total

Las redes miceliales que establecen los HMA en la colonización del suelo, están constituidas por el micelio externo (ME) o micelio extrarradical. A través de este micelio, los hongos MA colonizan el suelo y absorben nutrientes que luego utilizarán en su metabolismo y trasladarán a las raíces de las plantas. Dado su tamaño microscópico son capaces de llegar a los microporos y convertirse en puentes de nutrientes y de agua, especialmente cuando el agua está fuertemente retenida en esos espacios. Los microporos constituyen un hábitat para la microbiota asociada que cumple diferentes funciones en la sanidad y la disponibilidad de nutrientes que están asociados a diferentes componentes del suelo como arcillas, limos, arena, materia orgánica y exu-

dados radicales. También los HMA secretan glomalina, jugando un papel importante en la agregación y en la porosidad del suelo mejorando su estructura. El ME también soporta la formación de esporas de los HMA, asegurando los procesos de reproducción y supervivencia.

La extracción y cuantificación de ME se basa en la técnica de filtro de membrana, el método de intersección (gridline) de Miller y Jastrow (1992) y cálculos de Tennant (1975) descritos y adaptados por Torres (2000) y Zárate (2006) (**Figura 7.2**). Se toman muestras de suelo provenientes de la rizósfera de las plantas (15 a 20 g de suelo por muestra, de los primeros 5-10 cm de profundidad), se tamizan con malla de 2 mm, es recomendable guardarlos en refrigerador. De acuerdo con Reyes (2000), el tipo de muestra más aconsejable para hacer la separación del ME es aquella que ha sido refrigerada, ya que se extrae más cantidad que en suelo seco al aire. Antes de iniciar el proceso se debe reservar una muestra para conocer el contenido de humedad del suelo. Para realizar la técnica se procede a pesar 5 g de suelo tamizado y se colocan en un vaso de precipitado de 600 ml, adicionando 250 ml de agua deionizada y 31 ml de hexametáfosfato de sodio al 5% para dispersar el suelo. El vaso de precipitado se cubre con papel aluminio para prevenir evaporación y se deja 12 horas. Luego cada muestra se mezcla con varilla de vidrio, la cual debe ser lavada con 10 ml de agua deionizada, para remover posibles hifas que hayan quedado adheridas. La suspensión del suelo se dispersa con agua y con ayuda de ultrasonido o en un agitador magnético durante 5 minutos. Posteriormente, y en pleno movimiento se van tomando 6 alícuotas en forma fraccionada, de 1 ml cada una, que se disponen en un vaso de precipitado de 600 ml. El agitador magnético se debe lavar y secar después de ser usado en cada muestra. La velocidad de agitación debe ser igual para todas las muestras. A estos 6 ml de alícuota, se le adicionan 250 ml de agua destilada y 31 ml de hexametáfosfato de sodio al 5%, para suspender las hifas de HMA. De esta nueva dilución se toman 4 alícuotas de 5 ml cada una, para un volumen total de 20 ml, que se transfieren a un tamiz de 20 μm . Al igual que en el paso anterior, las alícuotas se toman en plena agitación, cerca al vórtice. El micelio recogido en el tamiz se lleva al equipo de filtración por membrana (al vacío), con ayuda de una piseta. Se emplean filtros de nitrocelulosa o fibra de vidrio de 1,2 μm de poro, para recoger el micelio. Dicho equipo debe estar previamente purgado con agua antes de iniciar el proceso. Se aplica vacío para extraer el agua y solo dejar el micelio sobre el filtro. Luego se tiñe el micelio agregando sobre las membranas una solución de 2 ml de azul de Tripán con la llave de paso cerrada y el vacío suspendido, se dejan en contacto por 10 minutos. Luego de este tiempo, se aplica nuevamente vacío para eliminar el colorante y sin lavar la muestra, se agregan 10 ml de agua acidificada con unas gotas de vinagre, que se dejan durante 20 minutos, para fijar el colorante. Terminado el proceso, se remueven los filtros de nitrocelulosa y se colocan sobre portaobjetos previamente rotulados. Para la cuantificación del micelio externo obtenido de muestras de suelo se usa un microscopio óptico y utilizando una cuadrícula previamente instalada, se cuentan los interceptos entre hifas y líneas impares, tanto horizontales como verticales (líneas 1, 3, 5, 7, 9).

Procedimiento para la cuantificación del micelio externo obtenido de muestras de suelo:

Se usa un microscopio óptico con objetivo de 20X (u otro objetivo que permita obtener buena resolución), un ocular de 10X y una cuadrícula de 10×10 posicionada en uno de los oculares. Para estimar la longitud del ME, cada filtro de nitrocelulosa debe ser abarcado por 70 campos visuales, los cuales pueden ser seleccionados realizando movimientos en zig-zag a través de todo el filtro. En cada campo visual, utilizando la cuadrícula previamente instalada, se cuentan los interceptos entre hifas y líneas impares, tanto horizontales como verticales (líneas 1, 3, 5, 7, 9). Para cuantificar la longitud del ME se utiliza el método de Tennant (1975), considerando las dimensiones de la cuadrícula y los factores involucrados en la ecuación, que para el caso de usar un objetivo de 20X, se muestran a continuación (Torres, 2000):

- Longitud total del eje X o Y de la cuadrícula = 0,06 mm×10 líneas = 0,6 mm × línea.
- Área neta de filtrado (FA) = 210 mm².
- Área del filtro cubierta por los 70 campos leídos (CA) = ((5 × 0,06)² × 70) mm².

(El número 5 corresponde a las líneas impares leídas).

• Según Tennant (1975), la longitud total de las hifas sobre el área del filtro cubierta por los 70 campos leídos es: $H = ((11/14) \times N \times 0,06)$ mm, donde N = número total de interceptos sobre la línea de lectura Y.

- Longitud total de las hifas sobre un filtro HL = ((H/CA) × FA) mm
- Longitud total de las hifas para una muestra TL = (HL/factor de dilución)/1000) m/g de suelo seco.

Aquí se utiliza el valor de contenido de humedad para realizar la corrección del peso seco del suelo. Para detalles sobre el cálculo de factor de dilución de sugiere consultar el artículo original de Tennant, (1975). Cuando se utilizaron las diluciones sugeridas, el factor de dilución calculado fue de 0,0066.

Para evaluar ME viable en la rizósfera, se puede utilizar la técnica de succinato deshidrogenasa (ya explicada), con los reactivos y materiales especificados para la técnica de viabilidad en raíces y algunas diferencias en el uso de equipos. Se toman muestras de suelo provenientes de la rizósfera de las plantas (20 a 25 g de suelo por muestra), en los primeros 5-10 cm de profundidad, se pasan por tamiz de 2 mm procesadas el mismo día del muestreo y se obtienen 3 alícuotas fraccionadas de 1 ml cada una y se incuban en Erlenmeyer con 3,5 ml de solución incubadora (tinción vital) y en oscuridad a 28°C por 12 a 16 horas con agitación suave. Luego de la incubación, en presencia de los reactivos, se vierte el contenido del Erlenmeyer sobre el tamiz de 20 µm, se lava con 500 ml de agua destilada sobre el tamiz y luego se recoge el micelio en el equipo de filtración con ayuda de una piseta. Se agrega hipoclorito al 3% (de 3 a 4 ml) para eliminar el exceso de colorante y se deja allí por 5 minutos. Se elimina el hipoclorito con 500 ml de agua destilada. Para contrastar la tinción del micelio, se aplica fucsina ácida (0,2 g/l) en una proporción de fucsina y agua de 1:10 y se deja teñir en el equipo, durante 20-30 minutos. Finalmente se elimina la fucsina con suficiente agua destilada y luego se montan los filtros de nitrocelulosa sobre portaobjetos, se agrega una gota de PVLG (alcohol polivinilo (Sigma®) 1,66 g + ácido láctico 10 ml + glicerina 1 ml + agua destilada 10 ml) y se ponen cubre-objetos. Las muestras están listas para ser cuantificadas al microscopio.

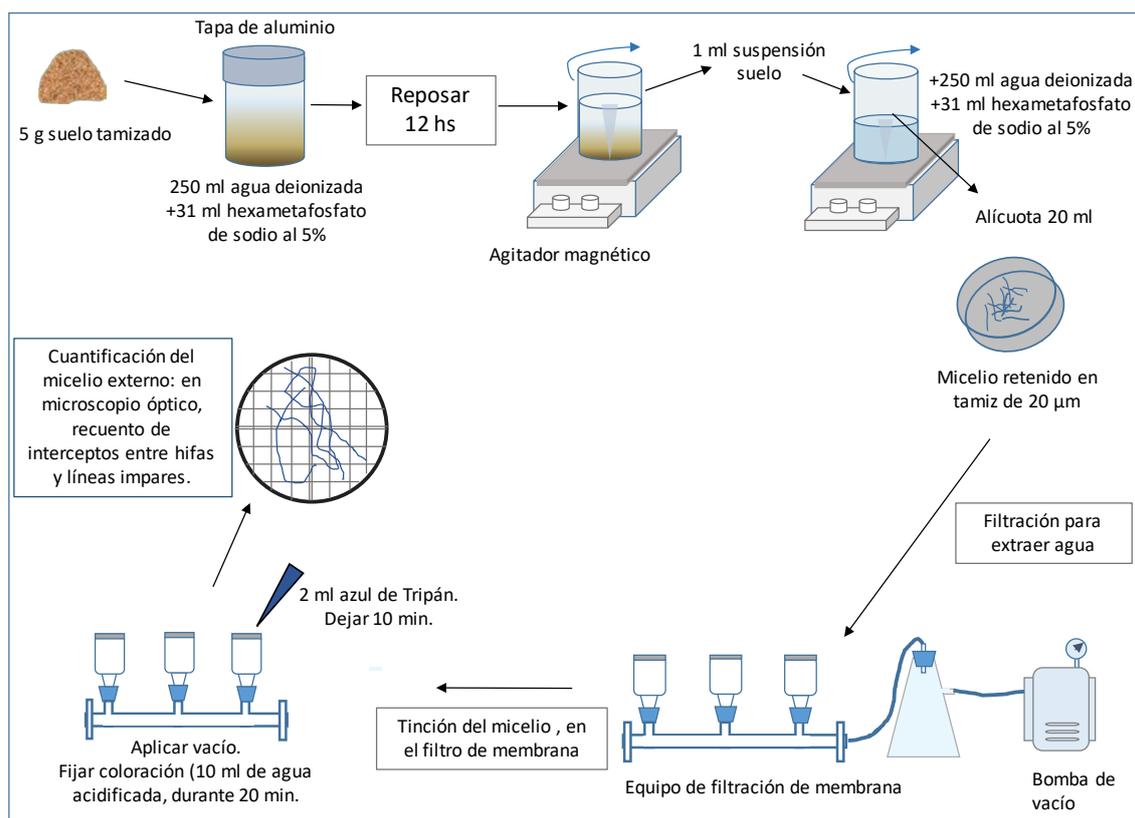


Figura 7.2: Esquema del procedimiento a realizar para extraer, teñir y cuantificar el micelio externo de los hongos MA.

Metodología para la extracción y cuantificación de la glomalina del suelo

La glomalina es una glicoproteína producida por las hifas y esporas de los HMA que es liberada al suelo y en las raíces de las plantas hospedantes. Existen diferentes métodos que permiten extraer y estimar distintas fracciones de glomalina. La glomalina fácilmente extractable (GFE) y la glomalina total (GT) pueden extraerse utilizando distintas concentraciones de citrato de sodio y variando la temperatura del autoclavado.

La cuantificación de proteína se realiza posteriormente por el método de Bradford (1976). El método consta de tres etapas básicas, una de preparación de las muestras de suelo, otra de extracción de la glomalina y otra de lectura de la misma en un espectrofotómetro a 590 ó 595 nm. Las muestras de suelo se toman antes del riego. Tanto para GFE como para GT, se pesa un gramo de suelo tamizado con malla de 2 mm. Se debe conocer el contenido de humedad del suelo para hacer las correcciones y referir el resultado al peso seco del suelo. Según Sieverding (2008), las muestras pueden guardarse en heladera a 4°C, antes de su procesamiento. Para la extracción de GFE se utilizan tubos de vidrio de aproximadamente 30 ml, en los cuales se agrega 1 g de suelo y 8 ml de solución de citrato de sodio, 20 mM y pH 7.0, se agita en vórtex y se lleva a autoclave a 121°C y 1 atmósfera de presión, durante 30 minutos. Una vez fríos los tubos se centrifugan a 5000 rpm durante 15 minutos inmediatamente después de la extracción. Se mide el volumen total del sobrenadante que contiene

la proteína, y se almacena a 4°C. El sobrenadante se puede alicuotar para realizar la lectura de proteína. Para la determinación de GT se usa también el mismo protocolo pero el tiempo de autoclavado es mayor (una hora). No obstante, y a fin de aumentar la extractabilidad, el suelo que queda en el fondo de los tubos de la centrifuga se emplea nuevamente para repetir todo el proceso de extracción (8 ml de citrato, autoclave y centrifuga) hasta que el sobrenadante alcance un color dorado, café o rojizo casi transparente. En cada repetición el sobrenadante se vierte en el mismo frasco y al terminar el proceso de extracción se mide el volumen total recolectado. En general se requieren de 6 a 7 extracciones; sin embargo, esto varía con el tipo de suelo. Luego de cuantificar el volumen total del sobrenadante se separa en tubos eppendorf para su posterior lectura y se guarda en heladera a 4 °C. Para la lectura de la proteína glomalina se utiliza el método de Bradford (1976), sugerido por Wright y Upadhyaya (1998) y adaptado por Castillo et al. (2009). La curva patrón se prepara con albumina bovina (BSA) en PBS a pH 7,4 y para la cuantificación de la glomalina debe prepararse una curva estándar con suero de albumina bovino fracción V (BSA) y Coomassie G250 como colorante.

Técnica del número más probable (NMP)

La técnica del número más probable adaptada por Bagyaraj y Stürmer (2012) es uno de los métodos usados para evaluar el número de propágulos infectivos de HMA y la colonización micorrícica. Se basa en una serie de diluciones decimales de suelo en donde la presencia o ausencia de colonización micorrícica se registra y da como resultado el Número Más Probable (NMP) de propágulos infectivos, basándose en una tabla estadística (**Figura 7.3**).

Una de las desventajas de esta técnica es que se requiere mucho material y tiempo para la preparación del ensayo, pero el número calculado tiene hasta un 95% del nivel de confianza. Por otro lado, el análisis de las raíces de las plantas trampa para comprobar la colonización es una tarea relativamente fácil y rápida. El método es ampliamente utilizado para realizar comparaciones entre tratamientos (diversos suelos o plantas huésped).

Para realizar este método se colocan en una bolsa de plástico 30 g de la muestra de suelo a evaluar y se añaden 270 g del diluyente esterilizado (mezcla de arena y suelo, 1:1). Se homogeneiza la mezcla, para obtener una dilución decimal (10^{-1}). Se retiran 30 g de la dilución anterior y se mezclan con 270 g del diluyente estéril en otra bolsa (dilución 10^{-2}). Se realizan las diluciones necesarias, habitualmente hasta la dilución 10^{-4} . Luego se distribuye cada dilución de suelo en macetas (15 x 2,5 cm), se recomienda hacer cinco replicas por cada dilución. Se siembran las semillas de la planta seleccionada en cada recipiente. Después de emerger, se debe ralea (dejar una sola planta por recipiente) y se mantiene en una cámara de crecimiento durante seis semanas. A la cosecha se debe retirar la planta cuidadosamente, lavar el suelo de las raíces, separarlas y teñirlas con azul de Tripán. Con ayuda de un microscopio estereoscópico se determina la presencia o ausencia de colonización micorrícica en cada réplica. El número de macetas positivas (raíces colonizadas) en diluciones diferentes se utiliza para calcular los valores de NMP. Se pueden emplear las tablas de Cochran (1950).

Para ilustrar la aplicación del procedimiento para el cálculo del NMP, se presenta un caso ejemplo en la **Figura 7.3**: Considerando cinco réplicas (macetas) para cada una de las cuatro diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}), se obtuvo la siguiente secuencia de números de recipientes colonizados (positivos): 5, 5, 3, 2. Esto significa que, para las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} las cinco réplicas fueron positivas para la colonización micorrízica, tres réplicas fueron positivas en la dilución 10^{-3} y dos réplicas fueron positivas en la dilución 10^{-4} .

Para el cálculo del NMP, es necesario seleccionar sólo tres números (*número clave*) e ingresar a la tabla. El primer número del *número clave* es el correspondiente al mayor número de recipientes positivos de la serie menos concentrada ($N_1= 5$). Los otros dos números son los correspondientes a las próximas dos diluciones: $N_2= 3$ y $N_3= 2$. Con el número clave (532) se ingresa a la tabla del NMP. El valor correspondiente es: 1,4. Para obtener el NMP de propágulos infectivos de HMA en la muestra, este valor debe de ser multiplicado por la dilución media (en este caso 10^{-3}). Por lo tanto, en este ejemplo, el suelo tiene $1,4 \times 10^3$ propágulos infectivos. g suelo $^{-1}$.

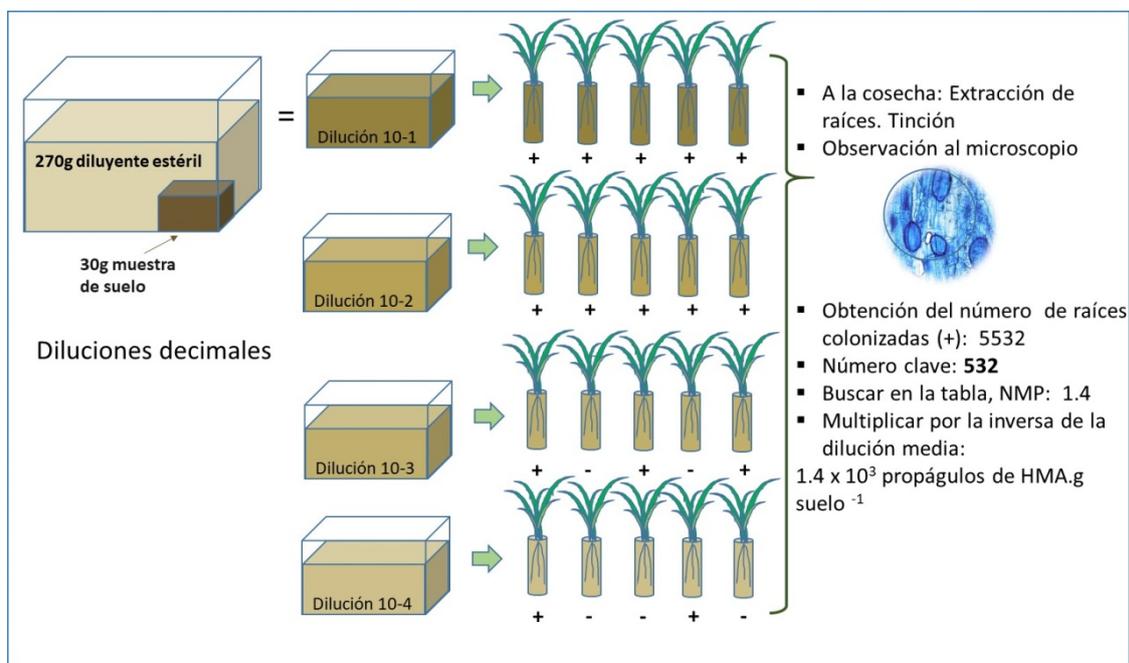


Figura 7.3: Esquema del procedimiento a utilizar en la técnica del NMP para estimar el número de propágulos de HMA en el suelo.

Referencias

An, Z. Q., Guo, B. Z., y Hendrix, J. W. (1998). Viability of soil borne spores of Glomalean mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 1133-1136.

- Bagyaraj, J., y Stürmer, S. (2012). Hongos Micorrizógenos Arbusculares (HMA). En: Moreira, F, Huising, E, Bignell, D. (Eds). *Manual de Biología de Suelos Tropicales*. Instituto Nacional de Ecología. México D.F. México. 217–241.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Brundrett, M., Melville, L., y Peterson, L. (Eds.). (1994). Practical methods in mycorrhiza research [based on a workshop organized in conjunction with the ninth North American Conference on mycorrhizae, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada. *Mycologist Publications*.
- Cabello, M. (2008). Curso de hongos formadores de micorrizas arbusculares. Instituto Spegazzini, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Castillo, Rubio, Borie en INVAM. (2009). on line available. http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/ad_hoc/54450000Glomalin/Bradford%20Total%20Protein%20Assay.pdf
- Cochran, W. G. (1950). Estimation of bacterial densities by means of the "most probable number". *Biometrics*, 6(2), 105-116.
- Gerdemann, J. W., y Nicolson, T. H. (1963). Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological society*, 46(2), 235-244.
- Gerdemann, J. W. (1975). Vesicular-arbuscular mycorrhizae. *The development and function of roots*, 576, 591.
- Gianinazzi-Pearson, V., y Gianinazzi, S. (1995). Proteins and Protein Activities in Endomycorrhizal Symbioses. *Mycorrhiza*, 22, 251-266.
- Hoagland, D.R. y D.I. Arnon. (1950). The water culture method for growing plants without soil. *California Agriculture Experiment Station Circular* 347.
- Jenkins, W. (1964). A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant disease reporter*, 48(9).
- Kormanik, P. P., y McGraw, A. C. (1982). Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots.
- Lara, L. I., y Flores, M. R. (2003). Diversidad y actividad de hongos micorrízicos arbusculares, en agroecosistemas cafetaleros perturbados por la erosión.
- Miller, R. M., y Jastrow J. D. (1992). Extraradical hyphal development of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in a chronosequence of prairie restorations. In *Mycorrhizas in Ecosystems*. Eds. DJ Read, DH Lewis, AH Fiten and IJ Alexander, 171–176. CAB International, Publ., Oxon, UK.
- Moorman, T., y Reeves, F. B. (1979). The role of endomycorrhizae in revegetation practices in the semi-arid west. II. A bioassay to determine the effect of land disturbance on endomycorrhizal populations. *American Journal of Botany*, 66(1), 14-18.
- Mosse, B., y Jones, G. W. (1968). Separation of Endogone spores from organic soil debris by differential sedimentation on gelatin columns. *Transactions of the British Mycological Society*, 51(3-4), 604-608.

- Phillips, J. M., y Hayman, D. S. (1970). Improved procedure of clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55, 159-161.
- Plenchette, C., Fortin, J. A., y Furlan, V. (1983). Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. I. Mycorrhizal dependency under field conditions. *Plant and Soil*, 70, 199-209.
- Reyes, J. T. (2000). Micelio externo de hongos micorrícicos arbusculares y su potencial influencia en la recuperación de suelos degradados de laderas del Cauca, Colombia. Tesis de maestría en suelos. Universidad Nacional de Colombia, Escuela de Post – Grados, Sede Palmira. 88.
- Saif, S. R. (1977). The influence of stage of host development on vesicular-arbuscular mycorrhizae and endogonaceous spore population in field-grown vegetable crops i. summer-grown crops. *New Phytologist*, 79(2), 341-348.
- Sieverding, E. (1983). Manual de métodos para la investigación de la micorriza vesículo-arbuscular en el laboratorio.
- Sieverding, E. (1984). Aspectos básicos de la investigación de la micorriza vesículo arbuscular. *Curso Nacional sobre micorrizas, 1er.*
- Sieverding, E., Friedrichsen, J., y Suden, W. (1991). Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. *Sonderpublikation der GTZ (Germany)*.
- Sieverding, E. (2008). Seminario de micorrizas en el trópico, encuentro de investigadores en micorrizas. Noviembre 12, 13 y 14. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira.
- Smith, S. E., y Gianinazzi-Pearson, V. (1990). Phosphate uptake and arbuscular activity in mycorrhizal *Allium cepa* L.: effects of photon irradiance and phosphate nutrition. *Functional Plant Biology*, 17(2), 177-188.
- Smith, G. W., y Skipper, H. D. (1979). Comparison of Methods to Extract Spores of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi 1. *Soil Science Society of America Journal*, 43(4), 722-725.
- Sutton, J. C., y Barron, G. L. (1972). Population dynamics of *Endogone* spores in soil. *Canadian Journal of Botany*, 50(9), 1909-1914.
- Tennant, D. (1975). A Test of a Modified Line Intersect Method of Estimating Root Length. *Journal of Ecology*, 63(3), 995-1001.
- Tisserant, B., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S., y Gollotte, A. (1993). In planta histochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular mycorrhizal infections. *Mycological Research*, 97(2), 245-250.
- Tommerup, I. C., y Kidby, D. K. (1979). Preservation of spores of vesicular-arbuscular endophytes by L-drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 37(5), 831-835.
- Torres, R. (2000). El papel del micelio externo de hongos que forman micorriza arbuscular asociado a barbechos mejorados en suelos degradados de ladera de Pescador, Cauca. Tesis de maestría en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia, Palmira, 89.
- Vierheilig, H., Coughlan, A. P., Wyss, U. R. S., y Piché, Y. (1998). Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12), 5004-5007.

- Walker, R. (1997). *Métodos de investigación para el profesorado*. Ediciones Morata.
- Wright, S. F., y Upadhyaya, A. (1998). Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein from arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science*, 161(9), 575–586.
- Zarate, L. M. (2006). Dinámica temporal en la formación de micelio externo de hongos micorrizico arbusculares (HMA) y su impacto en la formación de agregados estables al agua. Tesis de maestría en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia, Palmira, 108.

Los autores

Coordinadores

Saparrat, Mario Carlos Nazareno

Dr. en Ciencias Naturales, Lic. en Biología orientación Botánica, Fac. de Cs. Naturales y Museo, Universidad Nacional de la Plata (UNLP). Profesor Titular UNLP en la Cátedra de Botánica Sistemática I (Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP).y Profesor Adjunto UNLP en la Cátedra Microbiología Agrícola (Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP). Docente Investigador UNLP Categoría II. Investigador Independiente CONICET en el Instituto de Fisiología Vegetal INFIVE CONICET-UNLP. Especialista en Docencia Universitaria, UNLP. Vicepresidente de la Asociación Micológica Carlos Spegazzini. Editor Asociado de Darwiniana Nueva Serie. Coordinador de la Comisión Asesora Honoraria de Ciencias Agrícolas, Producción y Salud Animal de la CICPBA.

Mail: masaparrat@fcnym.unlp.edu.ar

Ruscitti, Marcela

Ingeniera Forestal de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCAyF) de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Máster en Gestión y Planificación del Medio Ambiente y los Recursos Naturales de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM), Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas, área Ciencias Biológicas (UNLP). Jefe de trabajos prácticos del curso de Fisiología Vegetal de la FCAyF – UNLP. Profesor Adjunto del curso de Fisiología Vegetal, Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales, Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires (ECANA – UNNOBA). Docente Investigador categoría II del Programa de Incentivos UNLP. Directora de Proyectos de Investigación que estudian la participación de las micorrizas arbusculares asociadas a distintas especies vegetales, en situaciones de estrés biótico y abiótico. Directora de tesis de grado y de posgrado en la temática del uso de bioinsumos (micorrizas arbusculares, hongos nematófagos, trichoderma, bacterias) y biotécnicas (fitorremediación) como alternativa sustentable de producción en situaciones de estrés.

Mail: marcelaruscitti@gmail.com

Arango, María Cecilia

Ingeniera Agrónoma de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCAyF) de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Magister en Protección Vegetal (FCAyF, UNLP). Jefa de trabajos prácticos ordinaria del curso Bioquímica y Fitoquímica de las carreras de Ingeniería Agronómica y Forestal, UNLP. Docente-investigadora del Departamento de Ciencias Exactas de la FCAyF, en el área de Fisiología y Bioquímica Vegetal. Co-Director del proyecto perteneciente al programa de incentivos de la UNLP “Sustentabilidad de sistemas productivos intensivos. Prácticas de bajo impacto ambiental para disminuir el efecto del estrés biótico y abiótico”.

Mail: mcecilia_arango@hotmail.com.ar

Autores

Abarca, Camila

Licenciada en Biología orientación Botánica, FCNyM, UNLP. Ayudante Diplomada en Botánica Sistemática II, FCNyM, UNLP. Becaria Doctoral CONICET.

Mail: camila.abrc@gmail.com

Balatti, Pedro Alberto

Ph.D. Plant Pathology, University of Missouri, Columbia, USA. Ingeniero Agrónomo, Fac. Cs. Agrarias y Forestales, UNLP. Profesor Titular Ordinario en la Fac. de Cs. Agrarias y Forestales, UNLP, en las Cátedras: Microbiología Agrícola y Fitopatología. Docente Investigador UNLP Categoría I. Investigador Principal de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICPBA). Vicepresidente de la CICPBA. Director Interino del Centro de Investigaciones en Fitopatología CIDEFI, UNLP-CICPBA. Miembro titular de la Comisión de Extensión e Investigación de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la UNLP (Periodo 2018-2022).

Mail: pbalatti@gmail.com

Bernardo, Valeria

Ingeniera Agrónoma de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCAyF) de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Becaria doctoral de la Comisión de Investigaciones Científicas (CICBA). Desarrolla su trabajo en el Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE-CONICET-UNLP) y su tema de investigación es sobre el uso de bioinsumos (micorrizas arbusculares, hongos nematófagos, bacterias) como alternativa sustentable de producción en situación de estrés en cultivos hortícolas causado por nematodos fitoparásitos. Participa de proyectos de investigación, actividades de capacitación y extensión y en la formación de recursos humanos.

Mail: valebernardo35@gmail.com

Colombo, Roxana Paula

Licenciada en Cs Biológicas, FCEyN, UBA. Doctora de la Universidad de Buenos Aires en Cs. Biológicas. Investigadora asistente CONICET. Lugar de trabajo en el Laboratorio de Microbiología del Suelo, FCEyN, UBA. Jefa de trabajos prácticos (PRIDIUN) del Dep de Biodiversidad y Biología Experimental, FCEyN, UBA. Ayudante en la materia “Gestión y recuperación de suelos”, Lic en Cs Ambientales, UNDAV. Arbuscular Mycorrhizal Fungal Association in Genetically Modified Drought-Tolerant Corn. (J env qual 2016). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in soil from the Pampa Ondulada, Argentina, assessed by pyrosequencing and traditional techniques. (Can J microbiol 2014). Differential effects of two strains of Rhizophagus intraradices on dry biomass and essential oil yield and composition in *Calamintha nepeta* (Rev argent microbiol 2013). Investigador responsable del PICT (AN-PCyT): Consorcios planta-HMA para biorremediación de suelos.

Mail: roxanacolombo@hotmail.com

Elíades, Lorena Alejandra

Licenciada en Biología orientación Ecología, FCNyM, UNLP. Doctora en Cs. Naturales, FCNyM. Ayudante Diplomada Botánica Sistemática I, FCNyM, UNLP. Docente-Investigadora categoría III, UNLP. Investigadora Adjunta CONICET. Vicedirectora Instituto de Botánica Spegazzini, FCNyM, UNLP, CIC. Alkalophilic and alkali-tolerant soil fungi from *Celtis tala* and *Scutia buxifolia* forests in eastern Buenos Aires province (Argentina) 2011, Preliminary data on growth and enzymatic abilities of soil fungus *Humicolopsis cephalosporioides* at different incubation temperatures 2015, Combinación de hongos movilizadores y solubilizadores de P con rocas fosfóricas y materiales volcánicos (cenizas y pumicitas) para la promoción de crecimiento de plantas de Lechuga (*Lactuca sativa* L.) 2017

Mail: lorenaeliades@yahoo.com

Garita, Sebastián Andrés

Ingeniero Agrónomo de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCAyF) de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Magister en Fitotecnia por la Universidade Federal do Ceará. Docente adscripto en el curso de fisiología vegetal de FCAyF-UNLP y becario doctoral del CONICET. Sus trabajos de investigación se focalizan en el uso de microorganismos como controladores biológicos y atenuantes del estrés biótico en plantas. Participa de proyectos de investigación, actividades de capacitación y extensión y en la formación de recursos humanos.

Mail: sebastiangularita@hotmail.com

Gonzalez, Matias

Ingeniero Agrónomo de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCAyF) de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Ayudante Ad-Honorem del curso de Fisiología Vegetal y del curso de Fruticultura de la FCAyF – UNLP. Becario doctoral de temas estratégicos del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Desarrolla su trabajo en el Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE-CONICET-UNLP) y su tema de investigación es el estudio de especies nativas para su utilización en programas de fitorremediación de suelos contaminados con

metales pesados con fines agrícolas. Participa de proyectos de investigación, actividades de capacitación y extensión y en la formación de recursos humanos.

Mail: magonzalez921994@gmail.com

Pastorino, Graciela Noemí

Ingeniera Agrónoma, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCAyF), UNLP. Magister en Biotecnología, Facultad de Farmacia y Bioquímica (FFyB), UBA. Doctora en Ciencias Naturales, Facultad de Cs Naturales y Museo (FCNyM), UNLP. Ayudante Diplomada de Microbiología Agrícola, FCAyF, UNLP. Docente-investigadora del Departamento de Ciencias Biológicas, FCAyF. Especialista en Docencia Universitaria, UNLP. Área de investigación-extensión: Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal (micorrizas, rizobios, endófitos).

Mail: gnpastorino@gmail.com

Ripodas, Juan Ignacio

Ingeniero Agrónomo de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCAyF) de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Becario Doctoral de UNLP. Desarrolla su trabajo en el Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE-CONICET-UNLP) y su tema de investigación abarca la Fisiología del estrés biótico y abiótico en plantas y el uso de bioinsumos (micorrizas arbusculares) y aceites esenciales de plantas aromáticas como alternativas de bajo impacto ambiental.

Mail: juanripodas7@gmail.com

Silvani, Vanesa Analía

Doctora de la Universidad de Buenos Aires (Cs. Biológicas), UBA. Lic. Ciencias Biológicas, FCEN, UBA. Docente Dpto. Biodiversidad y Biología Experimental, FCEN, UBA. Inv. Adjunta del CONICET. Curadora del Banco de Glomeromycota In Vitro. Arbuscular mycorrhizal fungal diversity in high-altitude hypersaline Andean wetlands studied by 454-sequencing and morphological approaches (2016) Symbiosis. Growth dynamics of geographically different arbuscular mycorrhizal fungal isolates belonging to the '*Rhizophagus* clade' under monoxenic conditions (2014) Mycologia. The thalloid liverwort *Plagiochasma rupestre* supports arbuscular mycorrhiza-like symbiosis *in vitro* (2012) WJ Microbiol Biotechnol. Inv. Responsable PICT (ANCYPT): Micorriza Arbuscular en antigua mina "Paramillos de Uspallata". Biorremediación de suelos. Inv. colaboradora (UBACYT): Inoculación de semillas con consorcios microbianos seleccionados. Biofertilizantes.

Mail: vanesasilvani@gmail.com

Valdés, Fabricio Emanuel

Licenciado en Biología Orientación Botánica, FCNyM, UNLP. Doctorando de Ciencias Naturales. "Caracterización de la estructura y diversidad de las comunidades de Hongos y Briofitas asociados a los distintos ambientes en la Reserva Natural Punta Lara". Instituto Spegazzini, FCNyM, UNLP. Ayudante Colaborador, Introducción a la Botánica, FCNyM, UNLP.

Mail: iam.rondii@gmail.com

Velázquez, María Silvana

Dra. En Ciencias Naturales, FCNyM, UNLP. Ayudante diplomado de Botánica Sistemática I FCNyM, UNLP. Investigadora Adjunta CONICET. **Velázquez S.** & Cabello M. 2011. Occurrence and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trap cultures from El Palmar National Park soils. *European Journal of Soil Biology*. 47: 230-235. **Velázquez S.**, Cabello M. & Barrera M. Composition and structure of arbuscular-mycorrhizal communities in El Palmar National Park, Argentina. *Mycologia*. 105(3): 509-520. 2013. **Velázquez M.S.**, Fabisik J.C., Abarca C.L., Allegrucci N., Cabello M. Colonization dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in *Ilex paraguariensis* crops: Seasonality and influence of management practices. 2018. *Journal of King Saud University – Science*. doi.org/10.1016/j.jksus.2018.03.017

Mail: mariasilvanavelazquez@gmail.com

Micorrizas arbusculares : biología y aplicaciones en el sector agro-forestal / Mario Carlos Nazareno Saparrat... [et al.] ; coordinación general de Mario Carlos Nazareno Saparrat ; Marcela Ruscitti ; María Cecilia Arango. - 1a ed.-
La Plata : EDULP, 2020.
Libro digital, PDF - (Libros de cátedra)

Archivo Digital: descarga
ISBN 978-987-8348-41-4

1. Biología del Suelo. I. Saparrat, Mario Carlos Nazareno, coord. II. Ruscitti, Marcela, coord. III. Arango, María Cecilia, coord.
CDD 578.757

Diseño de tapa: Dirección de Comunicación Visual de la UNLP

Universidad Nacional de La Plata – Editorial de la Universidad de La Plata
48 N.º 551-599 / La Plata B1900AMX / Buenos Aires, Argentina
+54 221 644 7150
edulp.editorial@gmail.com
www.editorial.unlp.edu.ar

Edulp integra la Red de Editoriales Universitarias Nacionales (REUN)

Primera edición, 2020
ISBN 978-987-8348-41-4
© 2020 - Edulp

n
naturales


Edulp
EDITORIAL DE LA UNLP



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA