



UNIVERSIDAD DISTRITAL
FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS

**EFFECTO DE DIFERENTES NIVELES DE DIVERSIDAD
MICROBIANA DEL SUELO EN LA RELACIÓN SIMBIÓTICA
PLANTA – HONGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR**



DIANA YULIETH PEÑA SIERRA

LUCERO VIVIANA RODRIGUEZ RAMOS

**UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS
FACULTAD DEL MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES
INGENIERÍA FORESTAL
BOGOTÁ D.C.
JULIO DE 2018**



**EFFECTO DE DIFERENTES NIVELES DE DIVERSIDAD
MICROBIANA DEL SUELO EN LA RELACIÓN SIMBIÓTICA
PLANTA – HONGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR**



TRABAJO DE GRADO MODALIDAD INVESTIGACIÓN – INNOVACIÓN
Presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniera Forestal

DIANA YULIETH PEÑA SIERRA
LUCERO VIVIANA RODRIGUEZ RAMOS

Autores

FAVIO LÓPEZ BOTÍA

Director

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS
FACULTAD DEL MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES
INGENIERÍA FORESTAL
BOGOTÁ D.C.
JULIO DE 2018

**EFFECTO DE DIFERENTES NIVELES DE DIVERSIDAD MICROBIANA DEL SUELO EN LA
RELACIÓN SIMBIÓTICA PLANTA – HONGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR**

TRABAJO DE GRADO MODALIDAD INVESTIGACIÓN – INNOVACIÓN

Presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniera Forestal

APROBADO

NOTA DE ACEPTACIÓN

FIRMANTES

FAVIO LÓPEZ BOTÍA

DIRECTOR

LUIS FERNANDO ORTIZ

EVALUADOR

BOGOTÁ AGOSTO DE 2018

DEDICATORIA

Dedico a mis padres Pastor Rodríguez y Yolanda Ramos por enseñarme el valor de la persistencia en la vida y el amor a los sueños, y a mi hermanita Angela Rodriguez por ser el regalo más hermoso que me dió el Universo. A mis maestros y guías que me recordaron el propósito de mi existencia.

Lucero V. Rodriguez Ramos

Dedico eternamente a Dios por su guianza, a mis padres Fermín y Delma por ser ese apoyo incondicional en cada momento de mi vida, y por inculcarme con amor todos los principios que me han permitido llegar hasta aquí. A mis hermanos Yimmy y Samuel por alegrar mi vida. A los maestros que con su dedicación y paciencia apoyaron mi proceso de formación personal y profesional.

Diana Yulieth Peña Sierra

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a nuestra Alma Máter, la Universidad Distrital Francisco José de Caldas y a todos nuestros profesores y compañeros que nos acompañaron en este gran camino de formación integral, especialmente al Profesor Favio López por su gran apoyo y colaboración para la culminación de esta etapa de nuestras vidas.

Agradecemos al departamento de Ciencias del Suelo de la Escuela Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” de la Universidad de São Paulo, y a todas las personas que desde allí hicieron posible el desarrollo de este proyecto y fueron fundamentales en nuestro proceso de formación. Especialmente a Bruna Arruda por su amistad, colaboración, tiempo, trabajo, dedicación y enseñanzas, al profesor Fernando Dini Andreoti, a nuestros queridos técnicos del laboratorio de Microbiología del Suelo, Denise, Sonia y Fernandinho por todo su trabajo y contribución para la realización de esta investigación. Y a todas las personas que nos apoyaron y acompañaron en nuestro proceso de estadía en Brasil.

A todos aquellos que no fueron mencionados, pero que participaron directa e indirectamente en nuestra formación profesional y personal.

MUCHAS GRACIAS!

CONTENIDO

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | RESUMEN..... | 1 |
| 2 | INTRODUCCIÓN..... | 2 |
| 3 | JUSTIFICACIÓN..... | 4 |
| 4 | OBJETIVOS..... | 5 |
| 4.1 | Objetivo General..... | 5 |
| 4.2 | Objetivos Específicos..... | 5 |
| 5 | MARCO DE REFERENCIA..... | 6 |
| 5.1 | Comunidad microbiana del suelo..... | 6 |
| 5.2 | Hongos micorrízicos arbusculares..... | 8 |
| 5.2.1 | Establecimiento de la asociación micorrízica..... | 9 |
| 5.2.2 | Tipos de Hongos Micorrízicos..... | 11 |
| 5.3 | Planta hospedera..... | 12 |
| 5.4 | Fósforo en el suelo..... | 13 |
| 5.5 | Métodos de cuantificación de la colonización micorrízica arbuscular..... | 13 |
| 6 | ESTADO DEL ARTE..... | 15 |
| 7 | METODOLOGÍA..... | 18 |
| 7.1 | Localización..... | 18 |
| 7.2 | Selección de plantas modelo..... | 18 |
| 7.2.1 | Sustrato..... | 18 |
| 7.2.2 | Especies vegetales..... | 18 |
| 7.2.3 | Inóculo de HMA..... | 19 |
| 7.2.4 | Siembra..... | 20 |
| 7.2.5 | Colecta de Raíces..... | 21 |
| 7.2.6 | Cuantificación de colonización micorrízica..... | 21 |
| 7.3 | Colonización micorrízica de plantas en diferentes niveles de diversidad microbiana en el suelo.. | 22 |
| 7.3.1 | Método de extinción de diversidad por diluciones sucesivas..... | 22 |
| 7.3.2 | Método de extinción de diversidad por tratamiento térmico..... | 23 |
| 7.4 | Características químicas y granulométricas del suelo..... | 24 |
| 7.5 | Análisis Estadístico..... | 24 |
| 8 | RESULTADOS Y ANÁLISIS..... | 25 |
| 8.1 | Selección de dos plantas modelo para la cuantificación de las tasas de colonización micorrízica. | 25 |
| 8.2 | Aplicación de diferentes niveles de diversidad microbiana en el suelo..... | 29 |
| 9 | CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 37 |
| 10 | BIBLIOGRAFÍA..... | 38 |
| 11 | ANEXOS..... | 47 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Pasos en el establecimiento de la relación micorrizica. Fuente: Parniske, 2008..... | 10 |
| Figura 2. Semillas utilizadas durante el ensayo. De izquierda a derecha: Maiz (<i>Zea mays</i>), Brizantha (<i>Brachiaria brizantha</i>), Crotalaria (<i>Crotalaria juncea</i>), Soya (<i>Glycine max</i>), Trigo (<i>Triticum aestivum</i>), y Sorgo (<i>Sorghum bicolor</i>)..... | 19 |
| Figura 3. Inóculo de Hongos Micorrízicos Arbusculares seleccionados de acuerdo con cada una de las especies trabajadas: <i>Rhizophagus clarus</i> , <i>Scutellospora heterogama</i> y <i>Acaulospora colombiana</i> | 19 |
| Figura 4. Procedimiento de siembra realizado durante el ensayo. | 20 |
| Figura 5. Ensayo con diez días de crecimiento posteriores a la germinación. | 20 |
| Figura 6. Proceso de colecta de raíces para la cuantificación de tasas de colonización de HMA. | 21 |
| Figura 7. Contadores y caja petri con fragmentos de raíz evaluadas en el proceso de cuantificación del porcentaje de colonización del Hongo Micorrízico Arbuscular..... | 21 |
| Figura 8. Suelo natural autoclavado y dispuesto en tubetes para el desarrollo del ensayo con diferentes niveles de diversidad microbiana..... | 22 |
| Figura 9. Método de obtención de diferentes niveles de diversidad microbiana a partir de diluciones sucesivas de suelo natural. | 23 |
| Figura 10. Método de obtención de diferentes niveles de diversidad microbiana a partir de la aplicación de tratamiento térmico..... | 23 |
| Figura 11. Seguimiento del crecimiento de las especies vegetales durante la primera fase del experimento | 25 |
| Figura 12. Diferencia en la cantidad de raíz obtenida para las especies: <i>Crotalaria juncea</i> , Soya (<i>Glycine max</i>) y <i>Brizantha (Brachiaria brizantha)</i> | 26 |
| Figura 13. Estructuras microscópicas de hongo micorrízico arbuscular observadas al culminar el ensayo | 26 |
| Figura 14. Porcentaje de colonización micorrízica en la especie vegetal <i>Brachiaria brizantha</i> con diferentes niveles de diversidad microbiana en el suelo, utilizando el método de extinción de diversidad por diluciones sucesivas. SN: Suelo Natural. SE: Suelo esterilizado. A: Sin Hongo micorrízico arbuscular B: <i>Acaulospora colombiana</i> . C: <i>Rhizophagus clarus</i> . D: <i>Dentiscutata heterogama</i> | 30 |
| Figura 15. Porcentaje de colonización micorrízica en la especie vegetal <i>Brachiaria brizantha</i> con diferentes niveles de diversidad microbiana en el suelo, utilizando el método de extinción de diversidad por tratamiento térmico. SN: Suelo Natural. SE: Suelo esterilizado. A: Sin Hongo micorrízico arbuscular B: <i>Acaulospora colombiana</i> . C: <i>Rhizophagus clarus</i> . D: <i>Dentiscutata heterogama</i> | 31 |

Figura 16. Porcentaje de colonización micorrízica en la especie vegetal *Crotalaria juncea* con diferentes niveles de diversidad microbiana en el suelo, utilizando el método de extinción de diversidad por diluciones sucesivas. SN: Suelo Natural. SE: Suelo esterilizado. A: Sin Hongo micorrízico arbuscular B: *Acaulospora colombiana*. C: *Rhizophagus clarus*. D: *Dentiscutata heterogama*..... 33

Figura 17. Porcentaje de colonización micorrízica en la especie vegetal *Crotalaria juncea* con diferentes niveles de diversidad microbiana en el suelo, utilizando el método de extinción por tratamiento térmico. SN: Suelo Natural. SE: Suelo esterilizado. A: Sin Hongo micorrízico arbuscular B: *Acaulospora colombiana*. C: *Rhizophagus clarus*. D: *Dentiscutata heterogama*..... 35

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Diferencias citológicas y moleculares entre las células de los tres dominios de los seres vivos. Fuente: Adaptado de Adrian, 2017..... | 7 |
| Tabla 2. Análisis químico y granulométrico de una muestra de suelo colectado entre los 0 y 20 cm de profundidad..... | 18 |
| Tabla 3. Análisis químico y granulométrico de una muestra de suelo colectado en una profundidad de entre 0-20 cm obtenido antes de establecer los experimentos en la casa de vegetación. Piracicaba – SP. | 24 |
| Tabla 4. Promedio de colonización micorrizica (%) en suelo natural de seis especies vegetales evaluadas en ausencia de inoculación con hongo micorrízico arbuscular (HMA), y presencia de inoculación por parte de tres especies fúngicas..... | 27 |

1 RESUMEN

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son simbioses obligados que estimulan el desarrollo vegetal a partir de la colonización de tejidos radiculares en más del 80% de las plantas. Son muchos los beneficios de dicha relación, como aumentar la superficie de absorción de la raíz, facilitar la captación del fósforo insoluble, aumentar la resistencia a patógenos, entre otros; consolidándolos como organismos de alta importancia para el desarrollo de las plantas. Así como los HMA, otros microorganismos que componen la alta diversidad microbiana del suelo, como las bacterias, mantienen una compleja red de interacciones que pueden afectar la colonización micorrízica (CM) y establecer una relación sinérgica con los HMA; no obstante, existen vacíos teóricos respecto a dicha dinámica. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de diferentes niveles de diversidad microbiana en el suelo, en la relación simbiótica planta – HMA. Inicialmente se realizó un experimento de CM para seleccionar dos plantas modelo a partir de seis especies vegetales diferentes: Maíz (*Zea mays*), Brizantha (*Brachiaria brizantha*), Crotalaria (*Crotalaria juncea*), Soya (*Glycine max*), Trigo (*Triticum aestivum*), y Sorgo (*Sorghum bicolor*) inoculadas con tres especies de HMA: *Rhizophagus clarus*; *Dentiscutata heterogama* y *Acalouspora colombiana*. Posteriormente, las dos especies vegetales con mayores tasas de CM fueron inoculadas con las tres especies de HMA en diferentes niveles de diversidad microbiana, obtenidas a partir de: *i*) diluciones sucesivas (10^{-1} 10^{-3} o 10^{-6}); y *ii*) tratamiento térmico (50, 80 o 100°C), evaluando nuevamente la tasa de CM. Finalmente, se realizó la evaluación y correlación de tasas de CM de las plantas en función de los diferentes niveles de diversidad microbiana, para determinar su efecto en la relación micorrízica. Se observó una influencia indirecta de la comunidad microbiana sobre la CM, dada la restricción en la disponibilidad de nutrientes del suelo, como nitrógeno, dificultando la micorrización. La simbiosis de *Crotalaria juncea* con bacterias *Rhizobium*, aumentó la micorrización por la interacción tripartita Planta-HMA-Comunidad Microbiana, diferente de *Brachiaria brizantha* donde la CM varió por la disminución de la comunidad microbiana. Finalmente *A. colombiana* y *D. heterogama*, son posiblemente más resistentes a condiciones restrictivas del suelo logrando la micorrización, a diferencia de lo sucedido con *R. clarus* cuyas tasas de colonización variaron en función de las alteraciones de diversidad microbiana del suelo. Se concluye que La CM está influenciada, no solo por la diversidad microbiana sino también por características intrínsecas tanto de la planta hospedera como de la especie de HMA.

2 INTRODUCCIÓN

Los microorganismos son seres primitivos que participan activamente en diversos procesos dentro de los ecosistemas, lo que los cataloga como elementos claves para el correcto funcionamiento de los sistemas biológicos, así como para el mantenimiento de la vida en el planeta (Montaño *et al.*, 2010). Son característicamente muy abundantes y su capacidad y eficiencia metabólica les facilita establecerse en cualquier medio ya sea suelo, agua o aire (Paul, 2014). Uno de los hábitat ideales para el desarrollo de los microorganismos es el suelo y específicamente esa zona denominada por Hiltner en 1904 como rizósfera en donde la influencia de la raíz es directa (Garrido, 2009), dicha zona suele presentar la mayor concentración de microorganismos, dos a tres veces mayor que en otras zonas (Pedraza *et al.*, 2010), debido a que la actividad bioquímica de las raíces produce exudados ricos en compuestos carbonados los cuales sirven de alimento para la microbiota del suelo (Martínez *et al.*, 2000).

La alta diversidad de microorganismos que se encuentran en la rizósfera dan lugar a una compleja dinámica que sucede en el suelo entre los diferentes tipos de microorganismos sino también con macroorganismos como las plantas; en ese sentido, la relación puede ser saprófita cuando la microbiota se alimenta de residuos de raíces, parásita cuando le causa enfermedades a las plantas o simbiótica cuando se le proporciona a la planta beneficios a cambio de alimento (Bermeo, 2011; Vargas y Villazante, 2014). Consecuentemente, existen tres tipos de microorganismos que establecen simbiosis con las raíces de las plantas: bacterias promotoras del crecimiento vegetal, hongos formadores de micorrizas arbusculares y bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico (Barea *et al.*, 2005a; González & Fuentes, 2017)

Roling (2007) menciona que en un gramo de suelo existen millones de bacterias con la capacidad metabólica para transformar elementos que hacen parte de los nutrientes necesarios para todos los seres vivos, resaltando con ello la importancia de su presencia en el suelo. Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, mejor conocidas como PGPB por sus siglas en inglés, generan efectos benéficos directos sobre un gran número de especies vegetales, incluyendo la fijación biológica de nitrógeno atmosférico, solubilización de fósforo inorgánico, mineralización de fósforo orgánico, producción de inductores de crecimiento vegetal como las auxinas, entre otros (Onofre *et al.*, 2009; Sgroy *et al.*, 2009). Las bacterias fijadoras de nitrógeno producen enzimas que permiten tomar de la atmósfera este elemento en su forma gaseosa y con los azúcares que obtienen de la planta fijarlo dentro de la biomasa bacteriana; este proceso es muy importante puesto que para que el suelo desarrolle fertilidad debe aumentar sus niveles de nitrógeno y es claro que la fijación biológica resulta ser un método altamente eficiente (Sánchez, 2010). Dentro de este tipo de bacterias se encuentran aquellas que establecen relaciones asociativas como *Azotobacter* y *Azospirillum* o simbióticas como el *Rhizobium* las cuales forman los denominados nódulos nitrificantes en las raíces de las plantas (Perez, 2017).

Por otra parte, los HMA se encuentran en un alto porcentaje de ecosistemas en muchas partes del mundo, principalmente en los trópicos; son el tipo de micorriza más común y forman relaciones simbióticas con una gran variedad de plantas (Smith & Read, 2010). Se ha registrado la presencia de estos organismos en aproximadamente el 80% de la especies vegetales así como en el 92% de las familias de plantas (Blackwell, 2011). Según Guerrero *et al.* (1996) la micorriza puede definirse como una sobresaliente adaptación de las raíces de especies vegetales para abarcar extensiones del suelo mucho más amplias, y es entonces un factor fundamental en la estructura del suelo. El estudio de los HMA fue obstaculizado durante mucho tiempo por la imposibilidad de aislar cultivos puros que pudieran ser analizados; fue solo hasta la década de los cincuenta en la que se inició con la investigación de este tipo de hongos (Sánchez, 2007); por ende es posible afirmar que es un área relativamente reciente en la que aún se tiene muchos vacíos teóricos; no obstante, su estudio se ha intensificado y esta relación simbiótica en la actualidad resulta de gran interés e importancia debido a los beneficios que trae consigo a las plantas hospederas (Téllez *et al.*, 2012).

De acuerdo con lo mencionado por Reyes (2011), la simbiosis micorrízica no incluye tan solo el crecimiento de la planta, sino que resulta ser un modulador de la dinámica de las demás comunidades microbianas presentes en la rizósfera, debido a que genera en la planta hospedera una serie de modificaciones fisiológicas, que en última instancia llevan a la producción de exudados que afectan a las comunidades microbianas y estas a su vez, influyen la actividad del HMA. Se ha comprobado que el HMA desarrolla interacciones específicas con organismos solubilizadores de fósforo, simbiontes fijadores de nitrógeno, organismos productores de hormonas de crecimiento, entre otros. Estudios reportan que la bacteria *Pseudomonas fluorescens* considerada la más frecuente de la micorrizósfera, sirve de ayuda para la colonización micorrízica, así mismo en la zona de influencia de las hifas de HMA se ha registrado la presencia de las bacterias *Arthrobacter* y *Bacillus*, que aumentan los porcentajes de colonización del hongo. Finalmente, una relación en la que se ha encontrado mayor reciprocidad es la establecida con *Rhizobium*, ya que el hongo proporciona el fósforo que necesitan estas bacterias para la nodulación mientras que el *Rhizobium* contribuye con el establecimiento de la relación micorrízica (Reyes, 2011).

A pesar de que se ha adelantado una serie de estudios que buscan explicar la dinámica de la comunidad microbiana y cómo estas afectan, por ejemplo, la simbiosis micorrízica, dichas interrelaciones aún son poco conocidas. En función de lo anterior se realizó la presente investigación con el fin de evaluar el efecto que tiene en la relación simbiótica planta - hongo micorrízico arbuscular, la aplicación de diferentes niveles de diversidad microbiana en el suelo, empleando dos métodos de extinción de diversidad de microorganismos aplicados a plantas modelo de rápido crecimiento.

3 JUSTIFICACIÓN

Se conoce que la comunidad microbiana de los suelos se altera, de acuerdo al uso y manejo de que se da a los mismos, sin embargo, en el momento de formular las estrategias para su uso o conservación, no se tiene en cuenta la gran cantidad de factores que influyen en las dinámicas que se manifiestan en la microbiota del suelo. Producto de ello, es el desconocimiento respecto a las interacciones microbiológicas que se dan en el sistema radicular de las especies vegetales y sobre los mecanismos generados por parte de microorganismos benéficos, que permiten el desarrollo óptimo de las plantas, como es el caso de los HMA y de los demás microorganismos que hacen parte de la comunidad microbiana del suelo.

La relación de los HMA con grupos de organismos menos estudiados o con la comunidad total del suelo ha sido pobremente abordada, en parte por las limitaciones de estudiar microorganismos no cultivables o de difícil recuperación en el laboratorio. En los últimos años el estudio de microorganismos del suelo se viene abordando a partir del uso de metodologías de cultivo independiente, en especial para suelos poco estudiados como los de la Amazonia (Borneman & Triplett, 1997). Además de ello, la mayor parte de estudios relacionados con la interacción entre los HMA y otros microorganismos del suelo, se han llevado a cabo aislando tan solo una o dos especies de la comunidad microbiana, por lo que poco se conoce respecto a los efectos que la dinámica de la comunidad completa, causa sobre la simbiosis micorrízica.

A pesar de ello, se conoce que tanto HMA y algunas bacterias del suelo, pueden llegar a interactuar de forma sinérgica en la rizósfera de las plantas (Antursson et al., 2006), donde dichas interacciones son influenciadas fuertemente por el sistema de manejo del suelo y las especies vegetales presentes en la zona; por lo que se deduce, que la diversidad del suelo, puede influir en la colonización micorrízica que se genera en la planta hospedera, y aún más, que las interacciones entre plantas y HMA serían un modulador de la comunidad microbiana del suelo.

El conocimiento de estas interacciones puede consecuentemente contribuir en el mejoramiento de la colonización de la planta hospedera, lo que provoca una optimización en el aprovechamiento de los nutrientes y de los recursos hídricos, mejorando la calidad del suelo y su relación con los componentes biológicos. Razón por la cual, la presente investigación se orienta con el fin de evaluar el efecto producido por la relación simbiótica entre planta y hongo micorrízico arbuscular, bajo la aplicación de diferentes niveles de diversidad microbiana en el suelo, por dos métodos de extinción de diversidad de microorganismos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar el efecto que tiene en la relación simbiótica planta - hongo micorrízico arbuscular, la aplicación de diferentes niveles de diversidad microbiana en el suelo.

4.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la tasa de colonización micorrízica en diferentes especies vegetales de rápido crecimiento.
- Verificar las alteraciones en la composición de la comunidad microbiana del suelo por medio de dos métodos de extinción.
- Determinar si la alteración de la comunidad microbiana por dos métodos de extinción afecta la colonización micorrízica.

5 MARCO DE REFERENCIA

5.1 Comunidad microbiana del suelo

Los microorganismos que se encuentran presentes en el suelo representan una gran fuente de diversidad, donde regularmente se interrelacionan organismos pertenecientes a los tres dominios del árbol filogenético (Bacteria, Archaeae y Eukarya), los cuales son de vital importancia para la comprensión del surgimiento de la vida y de la evolución como proceso continuo en las dinámicas naturales (Pace *et al.*, 2012); donde las bacterias son las que tienen una mayor representatividad en la naturaleza por sus grandes poblaciones, confiriéndole la categoría de mayor diversidad tanto en número de especies, como en el comportamiento y por ende en las interrelaciones que genera. De hecho, la abundancia de microorganismos estimada en el suelo puede alcanzar 10⁹ células por gramo, comprendiendo una diversidad que se estima en rangos de miles a millones de taxones (Torsvik *et al.*, 2002; Gans *et al.*, 2005); sin embargo es necesario precisar que según Hiltner (1904) citado por Antoun & Prévost (2005), la mayor actividad biológica de la comunidad microbiana se observa en zonas que se encuentran bajo la influencia de las raíces, es decir en la rizósfera, debido principalmente por la alta disponibilidad de nutrientes que allí se encuentra, lo que por ende aumenta la biomasa microbiana en dicha región (Andreote *et al.*, 2014).

De igual forma estudios como los realizados por Chaparro *et al.* (2014) mencionan que existen otros factores que contribuyen a la estructuración de comunidades microbianas, como lo son las alteraciones en las condiciones ambientales, las prácticas de manejo adaptadas para un cultivo o los estadios de desarrollo de una planta, como lo demuestra Houlden *et al.* (2008) en su estudio acerca de la influencia que tiene la comunidad microbiana tanto en estructura como en actividad, en la etapa de desarrollo de la planta para cultivos de arveja, trigo y remolacha. Otro caso que reafirma dicha premisa es el estudio de Chaparro *et al.* (2013) donde se le atribuye a los cambios en la exudación de las plantas una diferenciación de la diversidad microbiana, puesto que en la fase de plántula se libera mayor contenido de azúcar, diferente de lo que ocurre en su fase posterior, cuando emite mayor cantidad de aminoácidos y compuestos fenólicos.

Como se mencionaba anteriormente, los factores ambientales y bióticos actúan de forma determinante en la estructuración de comunidades microbianas, por lo que dichos microorganismos en el suelo se consolidan como elementos indispensables para la salud de los ecosistemas, puesto que conducen ciclos geoquímicos importantes (Falkowski, 2001) y ayudan a apoyar el crecimiento saludable de las plantas (Ortíz-Castro *et al.*, 2009). La gran mayoría de efectos benéficos reflejados en especies vegetales, son atribuidos a la diversidad microbiana del suelo, donde los mismos actúan de forma conjunta en procesos importantes como la descomposición de material orgánico, inmovilización y disponibilidad de nutrientes a las plantas (papel que cumplen las bacterias fijadoras de nitrógeno, bacterias solubilizadoras de fosfato mineral y HMA) (Barea *et al.*, 1997), además de la mineralización de compuestos orgánicos y

transformaciones inorgánicas (como lo son la amonificación, nitrificación, desnitrificación y oxidación del azufre) (Minerdi *et al.*, 2001), igualmente en la producción de fitohormonas que ayudan en el crecimiento vegetal, como al mismo tiempo pueden cumplir funciones de inhibición en el desarrollo de patógenos (Kholkhar *et al.*, 2011).

Tabla 1. Diferencias citológicas y moleculares entre las células de los tres dominios de los seres vivos.

Fuente: Adaptado de Adrian, 2017.

| | EUKARYA | ARCHAEAE | BACTERIA |
|--------------------------------|---|--|---|
| Membrana Celular | Presente | Ausente | Ausente |
| Endomembranas | Presente | Ausente | Ausente |
| Cromosoma/s | Muchos, lineales | Uno, circular (puede haber plásmidos) | Uno, circular (puede haber plásmidos) |
| ADN asociado a histonas | Si | Si | No |
| Pared Celular | En algunos casos, compuesta de hidratos de carbono (celulosa o quitina) | Si, de composición variables (nunca de peptidoglucano) | Si, de peptidoglucano |
| Lípidos de membrana | Bicapa. Glicerol unido a ácidos grasos mediante uniones éster | Monocapa. Glicerol unido a isoprenoides ramificados por enlaces éter | Bicapa. Glicerol unido a ácidos grasos mediante uniones éster |
| Lípidos de membrana | Bicapa. Glicerol unido a ácidos grasos mediante uniones éster | Monocapa. Glicerol unido a isoprenoides ramificados por enlaces éter | Bicapa. Glicerol unido a ácidos grasos mediante uniones éster |
| Ribosomas | 80 S | 70 S | 70 S |
| ARN Polimerasa | Varias, relativamente complejas | Un tipo, relativamente compleja | Un tipo, relativamente simple |
| Traducción | Comienza con metionina | Comienza con metionina | Comienza con formilmetionina |
| Reproducción sexual | Si (meiosis y fecundación) | No se conoce | No |

A pesar de la gran importancia que constituye la comunidad microbiana del suelo, aún existe una considerable falta de comprensión de los mecanismos de interacción y metabolismo que existen entre los miembros de dicha comunidad y su ecosistema, no solo por las técnicas usadas que se basan en información parcial obtenida de estudios realizados sobre microorganismos que se han cultivado a partir del suelo a pequeña escala; sino también por la metodología empleada que evalúa los componentes aislados, como es el caso en el estudio de la microbiota del suelo con bacterias y HMA, como se refleja en la investigación realizada por Andrade *et al.* (1998); por lo que se requiere generar estudios integrales con criterios establecidos para entender las interacciones que se llevan a cabo en el suelo por los microorganismos que allí habitan.

Para profundizar en la comprensión de los diferentes organismos presentes en la comunidad microbiana del suelo es necesario establecer la filogenia de los mismos, de acuerdo con el reciente cambio en la clasificación de los seres vivos en los tres dominios establecidos por Woese *et al.* (1990) a partir de la taxonomía filogenética dada por las secuencias de ARNr de la subunidad pequeña (16/18 S, procarionte y eucarionte, respectivamente) donde se contrasta a las especies bajo un mismo parámetro que todas poseen, estandarizando así la complejidad que conlleva la clasificación de la diversidad de especies presentes en el planeta. En la tabla 1 se puntualizan las características más relevantes de los tres dominios.

5.2 Hongos micorrízicos arbusculares

Los HMA, son organismos de tipo biotróficos obligados, creciendo en la naturaleza únicamente como simbiosis y dependiendo exclusivamente de su hospedero para que complete su ciclo de vida (Valerio, 2016), razón por la cual, tiene como función aumentar la superficie de absorción de la raíz, a través de un sistema de hifas extrarradicales, donde la base de la relación simbiótica sea el flujo constante de nutrientes, con elementos como fósforo, nitrógeno y aminoácidos transmitidos por los HMA y a su vez intercambiados por carbón suministrado desde la planta hospedera, el cual será utilizado por el hongo para la síntesis de sus lípidos y membranas (Parniske, 2008).

Según Bonfante & Desiró (2015), tanto el establecimiento como el desarrollo y funcionamiento de la simbiosis entre plantas y HMA, se consolida como un proceso coordinado, ya sea por mecanismos fisiológicos, bioquímicos y de regulación génica. Razón por la cual, el grado de interdependencia entre ambos simbiosis es máximo, de tal forma que las plantas precisan ser micorrizadas para alcanzar un desarrollo óptimo, aún más, cuando éstas se encuentran en situaciones extremas para garantizar su supervivencia; por otra parte, para el HMA es vital la relación con su planta hospedera, con un grado de dependencia máxima, como lo mencionan Bago & Becard (2002); donde se ha encontrado que tanto planta como HMA han co-evolucionado desde hace 400 millones de años, según registros fósiles y estudios filogenéticos (Redecker *et al.*, 2000), permitiendo comprender la estrecha asociación que tienen ambos organismos.

Para comprender la relación simbiótica entre hongo y planta, es necesario describir el proceso de desarrollo del HMA, el cual coloniza la raíz sin causar ningún tipo de daño, desarrollando una red de micelio externo a la raíz, que tiene la capacidad de conectar a la planta con el medio en el que se encuentra, siendo así, más eficaz que la raíz para extraer agua y nutrientes del suelo; por ende, en la mayoría de las ocasiones, el desarrollo simbiótico estimula cambios en la fisiología de la planta, haciéndola más resistente a diferentes situaciones de estrés ambiental (Smith & Read, 2010).

5.2.1 Establecimiento de la asociación micorrízica

Según Bonfante & Desiró (2015), el establecimiento de la simbiosis planta-HMA se da en dos etapas diferentes que se desarrollan en el suelo y en el interior de la planta. De ésta forma, el proceso de colonización de las raíces empieza con la germinación de las esporas de los HMA en el suelo, donde el micelio aún asimbionte, rastrea el suelo hasta encontrar exudados de las raíces, que anteriormente han liberado unas moléculas conocidas como estrigolactonas, las cuales se encargan que inducir la germinación de las esporas y la ramificación de las hifas, además de aumentar la actividad fisiológica de las esporas e hifas fúngicas. De igual forma los HMA liberan otro tipo de moléculas a base de quitina, generalmente son lipo-quito-oligosacáridos y penta-quito-oligosacáridos, los cuales se denominan Factores MYC, donde su función es activar la simbiosis en las plantas mediante 'vías de señalización de genes' conocidos como SYM genes, encargados de estimular el desarrollo de raíces laterales, acumulación de almidón y adicionalmente induce oscilaciones de calcio en las células epidérmicas de la raíz (rizodermis).

Luego, los HMA forma tipos especiales de apresorios denominados hifopodios (hifas de anclaje), dados por el contacto entre la hifa y la rizodermis, el cual por medio de la señalización de SYM genes, permite la agregación del citoplasma en las células de la rizodermis donde se generó la zona de contacto y consecuentemente con las células corticales subyacentes. Como consecuencia de la estimulación química y mecánica secuencial, las células vegetales producen un aparato de pre-penetración (PPA, por sus siglas en inglés de pre-penetration apparatus), por lo que durante este paso las hifas del micelio intraradical son separadas físicamente del citoplasma de la planta hospedera por medio de la invaginación de su membrana plasmática, permitiendo así, conservar la integridad de la célula huésped. Posteriormente, una hifa fúngica que se extiende desde el hifopodio logra ingresar al PPA, guiando al hongo a través de las células de la raíz hacia la corteza. En ésta fase, dicho hongo sale de la célula de la planta para ingresar al apoplasto, donde se ramifica y crece de forma lateral a lo largo del eje de la raíz; por lo que, cuando se hallan en las células internas, las hifas se ramifican en varias ocasiones hasta llegar a diferenciarse en arbusculos, los cuales presentan una vida media muy breve (aproximadamente de 7-10 días), caracterizados por ser la estructura principal, en donde se genera el intercambio de nutrientes, en cuanto el micelio extra-radical se encuentra en el suelo generalmente fuera de la zona de

agotamiento de nutrientes que rodea las raíces, proliferando en la búsqueda de zonas de suministro de los mismos.

Adicionalmente, es importante resaltar el papel que conlleva la formación de las vesículas (Sánchez, 2009), las cuales son estructuras que se establecen generalmente en los extremos de las hifas y llegan a formarse a lo largo del parénquima cortical colonizado, ya sea de forma intracelular y/o intercelular, por lo que son considerados órganos de reserva especialmente de lípidos, ya que generalmente aparecen más tarde que los arbusculos. A pesar de ello algunas especies de los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora* no llegan a formar vesículas dentro de la raíz, sin embargo, en el micelio externo pueden producir células auxiliares. En la figura 1 se muestra el establecimiento de la relación micorrizica.

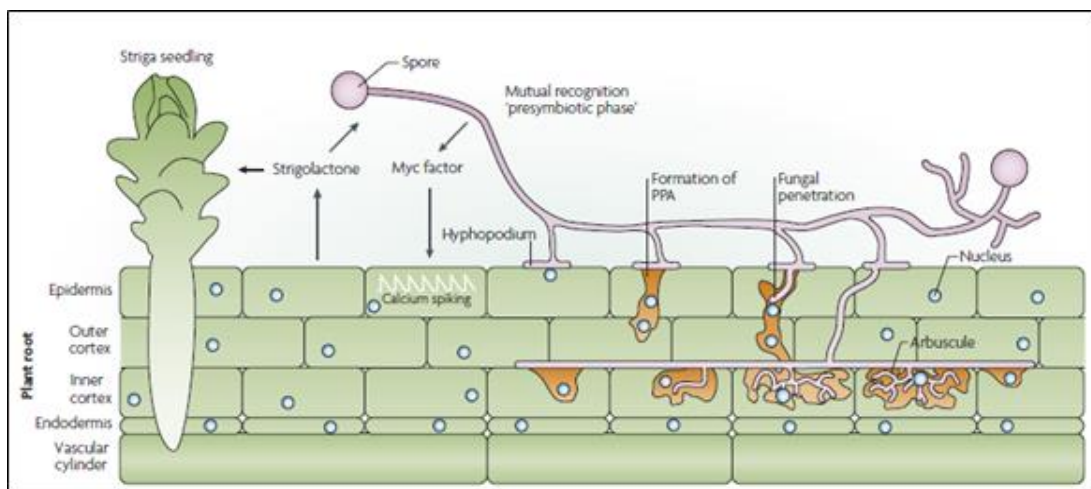


Figura 1. Pasos en el establecimiento de la relación micorrizica. Fuente: Parniske, 2008.

Como se mencionaba anteriormente, la importancia de los HMA radica en que las hifas del hongo pueden crecer de forma externa desde la raíz vegetal hacia el suelo a través del micelio externo, para así, explorar áreas que normalmente son inaccesibles para las raíces, alcanzando de ésta forma una superficie de absorción de nutrientes 100 a 1000 veces mayor, consiguiendo con ello un aumento en la capacidad para captar nutrientes como fósforo, zinc, cobre y amonio (característicos por su difícil absorción, pero fácil fijación), además de agua; sin embargo, es necesario precisar que éstas propiedades de los HMA se dan tiempo después de establecida la asociación simbiótica adecuadamente (Barea *et al.*, 2005), razón por la cual en varios estudios se ha demostrado la correlación que se genera entre la formación de agregados estables en el suelo y el aumento de la concentración de hifas extrarradicales (Tisdall *et al.*, 1997), corroborando de esta manera la gran importancia que los HMA tiene sobre la conservación de los suelos por medio del mantenimiento de sus agregados, en concordancia con el papel que tienen en el establecimiento, nutrición y desarrollo de las plantas (Azcón-Aguilar & Barea, 1992).

5.2.2 Tipos de Hongos Micorrízicos

De acuerdo con Smith & Read (2010), existen cinco tipos de HMA que se encuentran agrupados en tres modalidades tróficas, los cuales se han descrito con base en criterios morfológicos y fisiológicos, y se agrupan en endomicorrizas, ectomicorrizas y ectendomicorrizas.

a) Ectomicorrizas: se considera como los hongos presentes en plantas con especial connotación para el área forestal, puesto que se encuentra en las familias Fagácea, Betulácea, Pinácea, entre otras; que logra alcanzar el 3% de especies vegetales micorrizables. Su principal característica radica en el desarrollo de sus hifas, puesto que se limitan a los espacios intercelulares del córtex, por lo que no penetra las células vegetales de la raíz generando así, una estructura conocida como la red de Hartig, además de producir rizomorfos (Smith & Read, 2008). Posteriormente la raíz se rodea por un denso entramado de hifas que constituyen el manto, lo que permite que la exploración del suelo sea a través del manto, de micelios y de rizomorfos. Los hongos que forman este tipo de micorrizas pertenecen al *phylum* Basidiomycota, aunque también algunos están clasificados en el Ascomycota, que tendrían fitobiontes distribuidos geográficamente en zonas templadas y por ende su aparición sería muy baja en los trópicos. La absorción de nutrientes se da principalmente para elementos como Nitrógeno y Fósforo, permitiendo mayor tolerancia a estrés ya sea por enfermedades o escasez de agua y aumento de temperatura, y toxicidad de metales pesados.

b) Endomicorrizas: se considera como los hongos micorrízicos más propagados en la naturaleza con una mayor incidencia en los trópicos, de acuerdo a especies y comunidad de plantas que los forman, donde su principal característica es la penetración de las hifas intra e interradales en el interior de la epidermis de la raíz y/o de las células corticales de la misma, generando la formación de vesículas pequeñas, arbuscúlos y esporas, sin producir ninguna alteración morfológica que sea visible microscópicamente; además de ello, estas hifas no forman un manto, por lo que no cubren las raíces, limitándose a la exploración del suelo solo con las hifas y micelio, trayendo consigo beneficios a la planta hospedera en la absorción de varios nutrientes como Nitrógeno, Fósforo, Zinc y Cobre; además de permitir una mayor tolerancia a varias condiciones adversas y a su vez, generando una mayor productividad neta para el fitobionte, donde el intercambio de metabolitos se daría a través de ovillos hifales, haustorios y arbuscúlos. Éste grupo se conforma de tres diferentes subgrupos descritos así:

- *Ericoides:* formados por las especies vegetales de la familia de las Ericáceas, en el que los hongos pueden pertenecer a los *phylum* Ascomycota o Basidiomycota. Este subgrupo se caracteriza porque los hongos presentan una gran versatilidad para el uso de fuentes de Nitrógeno y Fósforo, ya sea de origen orgánico o inorgánico, razón por la cual ésta propiedad fúngica le confiere la capacidad a las plantas de

crecer y desarrollarse en suelos con un elevado contenido de materia orgánica (Pearson & Read, 1975; St-John *et al.*, 1985).

- *Orquidioides*: perteneciente a las especies de la familia *Orquidiaceae* con hongos formados por el *phylum* Basidiomycota, la cual se diferencia por la formación de los ovillos de hifas luego de penetrar las células de la raíz, es decir que son generados luego de producirse invaginación de la membrana plasmática para instalarse dentro de las células hospederas; de igual forma producen agregados poco organizados de hifas que luego liberan los nutrientes cuando se degeneran (Smith, 1966).
- *Arbusculares*: caracterizado porque constituye el tipo de simbiosis más representado en la naturaleza, lo que le permite estar presente en gran cantidad de especies vegetales desde Briofitas, Pteridofitas, hasta Gimnospermas y principalmente Angiospermas; donde su mayor atributo de tipo morfológico son los arbusculos que genera por la repetida ramificación dicotómica de sus hifas, que le confiere una especial actividad entorno a la adquisición de nutrientes poco móviles, de forma principal con los iones de fosfato (Sánchez, 2009).

c) Ectendomicorrizas: se caracteriza de forma principal por presentar atributos de los dos tipos de micorriza descritos anteriormente, razón por la cual llegan a ser las menos representadas en la naturaleza; de acuerdo con ello, presenta un manto poco desarrollado y la red de Hartig (característica de las Ectomicorrizas), y también se genera una penetración de las hifas en las células de la corteza, lo que forma los ovillos o enrollamientos (propiedad de las endomicorrizas) (Yu *et al.*, 2001; Gutiérrez *et al.*, 2003); sin embargo su exploración a nivel del suelo solo se realiza a través del manto y micelios. Su relación entorno a los fitobiontes se refleja en la colonización para especies de géneros *Pinus*, *Larix*, *Picea*, *Arbutus*, *Monotropa* y *Arctostaphylos*, lo que le atribuye un alto grado de especificidad, que de igual forma se expresa en la distribución geográfica donde predomina las regiones tropicales y subtropicales. De esta forma los efectos benéficos que trae para la planta hospedera se manifiesta en la absorción de Nitrógeno y fósforo por el intercambio de carbono, a través las hifas intracelulares y la red de Hartig. Los hongos pertenecen principalmente al *phylum* Basidiomycota (Sánchez, 2009).

5.3 Planta hospedera

Los HMA pueden colonizar una amplia gama de especies de plantas de forma diferenciada, variando la densidad de hifas o el número de esporas (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2002). Adicionalmente, puede haber variaciones de colonización dentro de una misma planta, dependiendo del estado fenológico en que ella se encuentra (Wang *et al.*, 2016). De igual manera, las variaciones en las tasas de colonización micorrízica entre especies vegetales también son dependientes de las condiciones ambientales. En situaciones de abastecimiento de Fósforo vía

fertilizante fue observado que las plantas con metabolismo C4 redujeron escasamente la colonización sin que ocurriera alteración en la abundancia de hifas de los HMA, a diferencia de lo que sucede con las plantas con metabolismo C3, ya que en la presencia de Fósforo suprimieron la colonización y la abundancia de hifas (Grman, 2012).

5.4 Fósforo en el suelo

Cuando la concentración de fósforo en el suelo es baja, la interacción entre las plantas y los HMA se desarrolla plenamente, mientras que en situaciones de alta disponibilidad de dicho elemento, su desarrollo es restringido. De forma general, se puede proponer que la planta invierta parte de su carbono en la interacción con HMA cuando ésta tiene necesidad de la interacción para la obtención de fósforo, y que ésta inversión se reduzca en la medida en que la planta se hace autónoma en la obtención de este nutriente. Los mecanismos por los cuales el fósforo regula el desarrollo de la simbiosis entre HMA y las raíces de plantas terrestres son aún desconocidos. (Kiriachek *et al.*, 2009). Se ha declarado que la presencia de fósforo puede afectar el balance de glicósidos y de fitohormonas y/o la expresión de genes de defensa vegetal (Pozo *et al.*, 2015). Como fue observado en el estudio desarrollado por Wang *et al.* (2016), que a pesar de reducir la tasa de colonización micorrízica, la fertilización fosfatada no afectó la diversidad o estructura de la comunidad de HMA en maíz, y se observó que hubo un aumento en la diversidad de la comunidad de HMA en pastos sometidos a fertilización fosfatada (Xiang *et al.*, 2016). Además de ello, la disponibilidad variable de P en el suelo interfiere directamente en la composición y actividad de la comunidad microbiana (Ragot *et al.*, 2015). De ésta forma, los HMA, la comunidad microbiana de la rizósfera y consecuentemente el establecimiento de la colonización micorrízica de las plantas, pueden ser fuertemente influenciadas por la fertilización fosfatada.

5.5 Métodos de cuantificación de la colonización micorrízica arbuscular

La cuantificación de las tasas de colonización micorrízica es hecha tradicionalmente por la observación y contabilización de presencia y ausencia de estructuras de HMA en fragmentos de raíces. Para eso, las muestras de raíces son colectadas y conservadas en solución de alcohol al 70% de concentración y posteriormente son preparadas y cuantificadas. Estas raíces son lavadas con agua, para retirar el exceso de alcohol, y luego decoloradas con solución de KOH al 10% de concentración y en seguida, teñidas con tinta azul (Giovannetti y Mosse, 1980). Posteriormente, las raíces son dispersas en placas de Petri con fondo cuadriculado y observadas, con ayuda del microscopio estereoscópico, para la contabilización de la presencia relativa de estructuras típicas de HMA con base en la frecuencia de observación siguiendo la metodología de Grid (Vierheilig *et al.*, 1998). Dados los datos de conteo, se pueden obtener: *i)* el número más probable (NMP) de propágulos infecciosos; *ii)* unidades de infección (UI); *iii)* porcentaje media de infección (PMI).

Sin embargo, en los últimos años, debido al avance de las técnicas moleculares cuantitativas, como la reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (qPCR), es posible obtener la

cuantificación del número de genes objetivo o los genes funcionales por gramo de muestra, producidas en cada ciclo de PCR, siendo la aplicación de esta técnica dependiente de la especificidad y de la optimización de uso de los primers (Krüger *et al.*, 2009), donde obtuvieron éxito al diseñar primero el *phyllum* Glomeromycota, indicando que el qPCR se muestra como una técnica promisoría para cuantificación de las tasas de colonización micorrízica de las plantas. A pesar de ello, los primers específicos para especies o géneros particulares de HMA no están aún disponibles.

6 ESTADO DEL ARTE

La simbiosis micorrízica que se da entre plantas y HMA, sucede también en presencia de un gran número de microorganismos que se encuentran en la rizósfera y que hacen parte de una compleja dinámica de la que aún se conoce poco; a fin de comprender dicha dinámica, se ha adelantado un gran número de investigaciones que denotan como algunos de estos microorganismos interactúan de manera específica para influenciar la relación micorrízica y sus efectos sobre el crecimiento de las plantas, por lo que bien se puede afirmar que son complementarios de la actividad micorrízica (Garbaye, 1994). Como ejemplo de lo anterior está lo mencionado por Kothamasi *et al.* (2006), quienes determinaron que hay un grupo de bacterias solubilizadoras de fosfato, dentro de las cuales están las *Pseudomonas aeruginosa* que facilitan al HMA obtener este nutriente mineralizado, el cual, eventualmente llegará a la planta hospedera. Igualmente, Hildebrandt *et al.* (2006), encontraron que cepas de *Paenibacillus*, producen metabolitos aún no identificados que pueden mejorar significativamente el crecimiento del micelio extrarradicular de HMA. Otros estudios por su parte, denotan que la microbiota del suelo, no solo interactúa con el HMA, sino que puede afectar directamente a las especies vegetales para que sean ellas las que estimulen la simbiosis, como en el caso de *Rhizobium sp.* y *Bradyrhizobium sp.* las cuales producen compuestos que generan la secreción de flavonoides en plantas de la familia leguminosa, lo que en última instancia incentiva a aumentar la colonización de raíces de las plantas por HMA (Xie *et al.*, 1995; Cohn *et al.*, 1998)

En trabajos previos como el realizado por Ferreira (2016), se observó que los HMA y la diversidad de la comunidad microbiana presentes en la rizósfera tienen una fuerte interacción y que, en algunas situaciones, la modificación de esa diversidad de la comunidad microbiana influencia positiva o negativamente la colonización micorrízica de las plantas. En el caso de influencia positiva, ha de mencionarse lo realizado por Mayo *et al.* (1996) quienes demostraron que las bacterias *Pseudomonas sp.* y *Corynebacterium sp.* estimulan la germinación de esporas de la especie de HMA, *Glomus versiforme*, así mismo, se ha encontrado que la interacción entre bacterias y HMA suele potenciar los efectos benéficos que tiene la simbiosis micorrízica sobre la planta hospedera, como la resistencia a patógenos (Mamani, 2009; Orrico *et al.*, 2013; Ramírez *et al.*, 2013). Por el contrario, y aunque pocos son los casos, se ha registrado efectos negativos de dicha interacción, como lo mencionan Walley & Germida (1997) quienes encontraron que la bacteria *Pseudomonas putida* inhibe la germinación de esporas de *Glomus clarum* y por ende limita u obstaculiza la colonización.

La alteración de la diversidad de la comunidad microbiana del suelo, consecuentemente modifica la composición de la misma, interfiriendo en el sistema de interacción entre plantas y HMA, esta alteración afecta directamente organismos que presentan menor abundancia, y a los que se les ha denominado “biosfera rara”, dado que son un número tan pequeño de individuos que podrían desaparecer con facilidad, pero que a pesar de ello se mantienen en la rizósfera (Pedrós-Alió,

2012). No obstante los avances en las técnicas de secuenciamiento, las cuales podrían revelar la naturaleza de estos organismos raros, su caracterización e importancia permanece aún oculta (Huse *et al.*, 2010); sin embargo, estudios muestran que algunos de sus miembros, aun cuando están presentes en baja abundancia, pueden colonizar el ambiente o el hospedero (Lynch e Neufeld, 2015). Además se afirma que en un ambiente que sufrió disturbios, aquellas especies microbianas de menor abundancia, las cuales son insensibles a la perturbación sufrida, pueden encontrar nuevos nichos disponibles después de la perturbación, y con ello, presentar un aumento en su abundancia relativa (Voort *et al.*, 2016).

Dada la enorme expansión en el estudio de microorganismos del suelo, y específicamente en aquellos que favorecen el desarrollo de las plantas, se han establecido algunos grupos característicos de bacterias, como las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) propuestas por Bashan y Holguín en 1998 cuya actividad puede ser directa, cuando proporciona a la planta compuestos sintetizados tales como nitrógeno, hierro o fósforo; o indirecta cuando sirve de protección contra otros microorganismos patógenos. (Carreón *et al.*, 2010). Estudios demuestran que este grupo de bacterias tiene un fuerte impacto estimulante sobre el crecimiento de los HMA (Linderman, 1997) generando una mayor susceptibilidad de la raíz a la colonización micorrízica, mejora del proceso de reconocimiento entre el hongo y la raíz, e inclusive estimulando el desarrollo radicular de la planta (Antursson & Jansson, 2006). La colonización de las bacterias al HMA se da en la superficie extra radical de la hifa, por lo menos en algunos taxa de los hongos, y en otros casos suele vivir en el citoplasma como endobacterias (Carreón *et al.*, 2010). La colonización micorrízica por otro lado, también afecta a la comunidad microbiana, se ha demostrado que le ofrece un suministro de energía rico en compuestos carbonados, genera cambios de pH en la micorrizósfera, e induce la exudación de compuestos inhibidores o estimulantes para otros hongos (Morgan *et al.*, 2005). De igual manera algunos autores afirman que existen especies bacterianas que responden a la presencia de ciertos HMA por los exudados que estos generan (Antursson & Jansson, 2006) y terminan actuando de forma coordinada en la interfase suelo-raíz (Arora *et al.*, 2010)

Si bien se ha mencionado que varias bacterias del grupo de las PGPB interactúan con los HMA ayudando en la simbiosis no necesariamente todas cumplen ese papel, por lo que Antursson & Jansson (2003) afirman que de dichas bacterias existen algunas específicas que sirven de ayuda a los HMA, y a las que ha denominado bacterias de ayuda a la micorriza- MHB por sus siglas en inglés (mycorrhizal helper bacteria), de las cuales se ha comprobado su importancia en la mejora de la relación benéfica entre HMA y plantas, algunas hipótesis hablan de que estas MHB facilitan la colonización. Cabe mencionar que las MHB no solo se han registrado para endomicorrizas, sino también para otros tipos de micorrizas, por lo que no depende del tipo de simbiosis micorrízica, ni de la taxonomía de las cepas de los MBH, siendo reportadas muchas cepas bacterianas como promotoras de ésta simbiosis (Frey-Klett *et al.*, 2007), inclusive se habla de que hay MHB

específicas también para hongos patógenos, u otras que dificultan la formación de micorrizas por algunos hongos pero que inhiben el establecimiento de simbiosis por parte de otros (Garbaye & Duponnis, 1992).

Para el caso de las endomicorrizas, Mosse (1962) fue el primero en mencionar la presencia de una MHB y cómo sus cultivos estimularon la germinación de esporas de la especie *Glomus mossaceae*, de la misma manera, se determinó que *Paenibacillus sp.* en plantas de sorgo inoculadas con las misma especie de HMA aumentó la tasa de colonización (Budi *et al.*, 1999) al igual que en plantas de trébol (Artursson, 2005). Dicho efecto también fue registrado con *Pseudomonas sp.* en cultivos de tomate (Barea *et al.*, 1998; Gamalero *et al.*, 2004), *Brevacillus sp* en plantas de trébol (Vivas *et al.*, 2003), *Rhizobium meliloti* en alfalfa (Azcon *et al.*, 1991) y para especies de mayor porte como la morera (*Morus alba*) y la papaya (*Carica papaya*) se determinó que *Bacillus coagulans* era el promotor de ese aumento en la colonización de *Glomus mossaceae* (Mamatha *et al.*, 2002). El efecto de aumento en los niveles de colonización se da también en otras especies de HMA como *Glomus intraradices* y *Glomus fistulosum*; en las dos especies las MHB que intervienen son *Pseudomonas putida* y *Bacillus subtilis* que se han registrado en cultivos agrícolas de maíz, papa y cebolla (Toro *et al.*, 1997; Vósatka & Gryndler, 1999), así mismo, se encontró que en la rizósfera de individuos de Acacia, las *Pseudomonas monteillii* intervienen en la simbiosis micorrízica con *Glomus intraradices* (Duponnois & Plenchette, 2003).

7 METODOLOGÍA

7.1 Localización

El presente trabajo fue desarrollado en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología del suelo perteneciente al departamento de ciencias del suelo, adscrito a la Escuela Superior de Agricultura “Luis de Queiroz” de la Universidad de São Paulo, en la ciudad de Piracicaba-SP, Brasil. De acuerdo con la clasificación de Koppen (1900) esta región corresponde a un clima mesotérmico de invierno seco (Cwa) con una precipitación media anual de aproximadamente 1300 mm y con temperatura media anual de 21,5 °C. Para el desarrollo de esta investigación se ejecutaron dos fases, la primera de ellas consistió en seleccionar dos plantas modelo con altas tasas de colonización en condiciones favorables de diversidad del suelo, y para la segunda fase se establecieron tratamientos de soluciones con diferentes niveles de diversidad microbiana. Cada uno de los procedimientos llevados a cabo son explicados a continuación.

7.2 Selección de plantas modelo

7.2.1 Sustrato

El sustrato utilizado fue suelo colectado en área de pastos a una profundidad de entre 0 y 20 cm y cuyas características se presentan en la tabla 2. Se ubica dentro de la clasificación de suelos brasilera como un *Latosolo Vermelho distrófico* de textura média (Embrapa, 2006) el cual corresponde a suelos de tipo oxisol. Para el ensayo de selección de plantas modelo, fue utilizado el suelo con la diversidad biológica natural, con el fin de establecer las dos plantas que presentaran las mayores tasas de colonización bajo dichas condiciones. Para verificar la presencia natural de colonización por parte de los HMA en el área de colecta del suelo, se realizó el procedimiento de tinción a las raíces obtenidas de plantas de *Brizantha* allí presentes, corroborando la presencia natural de colonización.

Tabla 2. Análisis químico y granulométrico de una muestra de suelo colectado entre los 0 y 20 cm de profundidad

| pH | P | H+Al | K | Ca | Mg | SB | CTC | V | MO | Arcilla | Limo | Arena |
|-------------------|---------------------|-----------------------------------|------|----|----|------|------|-------------|-------------------------------|---------|------|-------|
| CaCl ₂ | mg dm ⁻³ | -----mmolc dm ⁻³ ----- | | | | | | -----%----- | -----g kg ⁻¹ ----- | | | |
| 5,4 | <3 | 15 | <0,9 | 11 | 7 | 18,7 | 33,7 | 55 | 2,2 | 176 | 82 | 742 |

7.2.2 Especies vegetales

Para la selección de las plantas modelo se realizó la siembra de seis especies de rápido crecimiento: i) Trigo (*Triticum aestivum*), ii) Soya (*Glycine max*), iii) Crotalaria (*Crotalaria juncea*), iv) Maiz (*Zea mays*), v) Sorgo (*Sorghum bicolor*) y vi) *Brizantha* (*Brachiaria brizantha*). Las

semillas fueron obtenidas en el departamento de producción vegetal de la ESALQ y antes de la siembra fueron desinfectadas en solución de hipoclorito de sodio al 25% (Figura 2).



Figura 2. Semillas utilizadas durante el ensayo. De izquierda a derecha: Maiz (*Zea mays*), Brizantha (*Brachiaria brizantha*), Crotalaria (*Crotalaria juncea*), Soya (*Glycine max*), Trigo (*Triticum aestivum*), y Sorgo (*Sorghum bicolor*).

7.2.3 Inóculo de HMA

Para el desarrollo de la presente investigación se emplearon tres especies de HMA las cuales fueron: *Rhizophagus clarus* (Glomeracea) anteriormente denominada *Glomus clarum*; *Dentiscutata heterogama* (Gigasporacea) anteriormente denominada *Scutellospora heterogama* y *Acalouspora colombiana* (Acalousporacea). Las esporas de dichas especies fueron obtenidas de las colecciones existentes en el laboratorio de microbiología del suelo de la ESALQ y del departamento de ciencias naturales de la universidad Regional de Blumenau (FURB). La identificación taxonómica de las especies estuvo basada en la información que se encuentra consignada en la página especializada del INVAM. Para la preparación del inóculo, las esporas fueron seleccionadas en grupos de 10 de acuerdo a su especie y dispuestas en tubos falcon completando un volumen de 50 ml de agua destilada (Figura 3).



Figura 3. Inóculo de Hongos Micorrízicos Arbusculares seleccionados de acuerdo con cada una de las especies trabajadas: *Rhizophagus clarus*, *Scutellospora heterogama* y *Acalouspora colombiana*

7.2.4 Siembra

La siembra fue realizada en tubetes de 5 cm de diámetro interno y 9 cm de altura, los cuales previamente fueron desinfectados con solución de ácido clorhídrico al 10% y luego enjuagados con agua a fin de eliminar restos de fósforo que pudiesen tener, finalmente la totalidad de los tubetes fue autoclavada por 20 minutos a 1 atm y 121°C de temperatura. Dentro de cada tubete se dispusieron 300 g de suelo (figura 4) a los cuales se les aplicó 50 ml del inóculo de esporas de HMA, posterior a ello se realizó el correspondiente proceso de siembra. El diseño experimental de la siembra fue en bloques al azar.



Figura 4. Procedimiento de siembra realizado durante el ensayo.

Una vez realizada la siembra, se efectuaron visitas diarias para establecer momentos de germinación y a partir de dicho momento se hicieron dos colectas con diferencia de 10 días, es decir, la primera colecta sucedió 10 días después de la germinación y la segunda 20 días después. Estos tiempos de colecta se establecieron luego de ejecutar una prueba piloto realizada previamente con 7, 14 y 21 días de crecimiento posteriores a la germinación, donde se observó que no presentaban diferencias en la tasa de colonización con 7 días de intervalo para la colecta, a partir de ello se decidió aumentar dicho intervalo a 10 días.



Figura 5. Ensayo con diez días de crecimiento posteriores a la germinación.

7.2.5 Colecta de Raíces

Para la colecta de raíces se extrajo la totalidad del pan de tierra del tubete como se observa en la figura 6, con el fin de obtener la mayor cantidad de raíces posible por cada planta, posterior a ello se retiró con cuidado el suelo y se realizó un lavado inicial con agua, una vez extraída la mayor cantidad de suelo fue retirada la parte aérea de la planta y dispuesta la raíz en vasos de precipitado con agua donde se retiraron pequeñas partículas de suelo que quedaron adheridas a la raíz. Finalmente, las raíces completamente limpias fueron almacenadas en tubos falcon con alcohol al 70% para evitar el daño a estructuras de los HMA hasta el procesamiento de análisis de colonización.



Figura 6. Proceso de colecta de raíces para la cuantificación de tasas de colonización de HMA

7.2.6 Cuantificación de colonización micorrízica

La cuantificación de las tasas de colonización micorrízica se realizó siguiendo el método establecido por Giovannetti y Mosse (1980) determinando por observación el porcentaje de colonización de estructuras de HMA en los fragmentos de raíz evaluadas (Figura 7). Dichos fragmentos corresponden a las muestras de raíces colectadas a lo largo del ensayo, las cuales fueron conservadas en alcohol al 70% para evitar dañar algunas estructuras específicas de los HMA como son los arbusculos.



Figura 7. Contadores y caja petri con fragmentos de raíz evaluadas en el proceso de cuantificación del porcentaje de colonización del Hongo Micorrízico Arbuscular

7.3 Colonización micorrízica de plantas en diferentes niveles de diversidad microbiana en el suelo

Este experimento se desarrolló igualmente en la casa de vegetación ubicada en las instalaciones de la Escuela superior de Agricultura “Luis de Queiroz”. Se estableció un diseño experimental en bloques al azar con cuatro repeticiones, en un esquema factorial 8 x 4 x 2, utilizando ocho niveles de diversidad diferentes, obtenidos por dos métodos, incluyendo la comunidad microbiana natural (CMN) del suelo y el suelo esterilizado, tres especies de HMA y un tratamiento sin HMA, y dos especies vegetales. Para obtener el tratamiento con ausencia total de comunidad microbiana, el suelo natural fue autoclavado por dos horas a 1 atm de presión y con temperatura de 121 °C y se dejó en reposo durante 21 días previos a la siembra (Figura 8).



Figura 8. Suelo natural autoclavado y dispuesto en tubetes para el desarrollo del ensayo con diferentes niveles de diversidad microbiana

7.3.1 Método de extinción de diversidad por diluciones sucesivas

Este método consistió en tomar el suelo natural recién colectado el cual contenía la CMN y someterlo a diluciones sucesivas utilizando tres concentraciones: 10^{-1} , 10^{-3} o 10^{-6} de comunidad, obteniendo finalmente tres comunidades microbianas diluidas (CMD) (Van Elsas *et al.*, 2012). La inoculación de las tres CMD (10^{-1} , 10^{-3} o 10^{-6}) fue realizada, en proporción 1:100 en solución de agua autoclavada (Figura 9), siete días después de haber autoclavado el suelo, según las mismas condiciones mencionadas para el primer ensayo (1 atm y 121 °C por dos horas) (Ferreira, 2016) y se dejó en reposo por 15 días mas, antes de realizar la siembra a fin de promover la multiplicación celular de las comunidades diferenciadas, e igualar la abundancia microbiana en cada uno de los tratamientos.

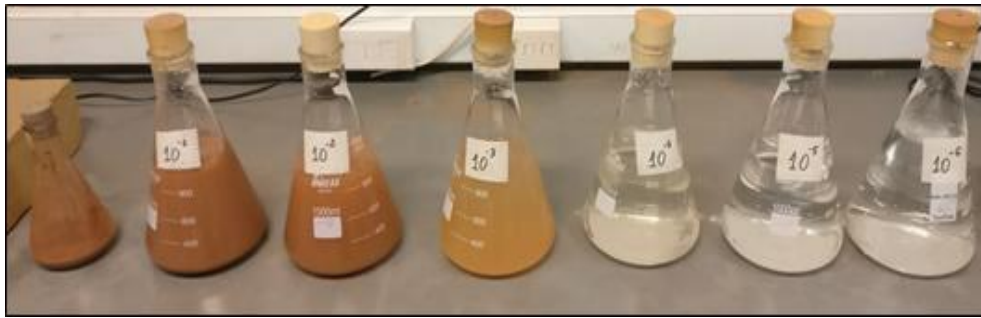


Figura 9. Método de obtención de diferentes niveles de diversidad microbiana a partir de diluciones sucesivas de suelo natural.

7.3.2 Método de extinción de diversidad por tratamiento térmico

Por otra parte, el segundo método de obtención de niveles de diversidad microbiana fue a partir de la aplicación del tratamiento térmico (CMT), el cual consistió en colocar una fina capa de suelo natural en los compartimentos de una estufa y someterlo a tres temperaturas: 50, 80 y 100 °C por una hora. Con ello se obtuvo tres tratamientos (Figura 10). El suelo fue bien esparcido a fin de garantizar que el efecto de la temperatura fuese regular. Una vez fuera de la estufa, dicho suelo se dejó en reposo por 15 días previos a la siembra.



Figura 10. Método de obtención de diferentes niveles de diversidad microbiana a partir de la aplicación de tratamiento térmico.

De acuerdo con lo anterior, este experimento tiene como tratamientos los siguientes niveles de diversidad: *i*) suelo esterilizado; *ii*) CMD (10^{-1}); *iii*) CMD (10^{-3}); *iv*) CMD (10^{-6}); *v*) CMT (50°C); *vi*) CMT (80°C); *vii*) CMT (100°C); *viii*) suelo natural.

En cada nivel de diversidad fueron inoculadas tres especies de HMA, configurando el segundo factor del diseño del ensayo, las cuales fueron: *i*) *Rhizophagus clarus* (Glomeracea); *ii*) *Scutellospora heterogama* (Gigasporacea) e *iii*) *Acalouspora colombiana* (Acalousporacea).

Finalmente, de acuerdo con los resultados del primer ensayo, se seleccionaron las dos especies vegetales con mayores porcentajes de colonización, estas fueron *Brachiaria brizantha* y *Crotalaria juncea*. Al momento de establecer el ensayo se inocularon 10 esporas previamente separadas

conforme al proceso descrito para el ensayo anterior, y se prosiguió a realizar la siembra. Las raíces fueron colectadas 20 días después de haberse corroborado la emergencia de la planta.

7.4 Características químicas y granulométricas del suelo

A continuación, se detallan los análisis químicos realizados al suelo que fue sometido a los diferentes métodos de obtención de niveles de diversidad microbiana

Tabla 3. Análisis químico y granulométrico de una muestra de suelo colectado en una profundidad de entre 0-20 cm obtenido antes de establecer los experimentos en la casa de vegetación. Piracicaba – SP.

| Muestra | pH | MO | P | S | K | Ca | Mg | Al | H+Al | B | Cu | Fe | Mn | Zn |
|---------|-------------------|--------------------|---------------------|----|------|------------------------|----|----|------|-------|-----|----|--------------------|-----|
| | CaCl ₂ | g dm ⁻³ | mg dm ⁻³ | | | mmol. dm ⁻³ | | | | | | | g kg ⁻¹ | |
| SN* | 5,4 | 22 | <3 | 18 | <0,9 | 11 | 7 | <2 | 15 | <0,15 | 2,8 | 41 | 3,0 | 2,5 |
| SA | 4,8 | 25 | 4 | 11 | <0,9 | 19 | 8 | <2 | 15 | 0,19 | 2,1 | 53 | 16,0 | 2,2 |
| S50 | 5,0 | 22 | 4 | 8 | <0,9 | 19 | 7 | <2 | 15 | <0.15 | 2,9 | 42 | 2,9 | 2,8 |
| S80 | 5,0 | 23 | 6 | <6 | <0,9 | 19 | 9 | <2 | 15 | <0.15 | 3,0 | 40 | 3,0 | 2,5 |
| S100 | 5,0 | 24 | 6 | <6 | <0,9 | 26 | 8 | <2 | 13 | <0.15 | 3,3 | 48 | 3,3 | 2,9 |

*SN: suelo natural; SA: suelo autoclavado; S50: suelo sometido a temperatura de 50°C; S80: suelo sometido a temperatura de 80°C; S100: suelo sometido a temperatura de 100°C.

7.5 Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los datos se llevo a cabo empleando el paquete estadístico SPSS a través del cual se realizó un análisis descriptivo inicial y posteriormente un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con nivel de significancia del 95%, aplicado en ambas fases del estudio. La prueba post-hoc aplicada fue el test HSD de Tukey de comparaciones múltiples a fin de determinar los grupos de variables con diferencias significativas. Durante la segunda fase fue necesario, además de las pruebas previamente descritas, incluir representaciones gráficas de los resultados como histogramas y diagramas tipo box-plot. Finalmente, se llevo a cabo un análisis de regresión lineal para obtener la relación entre algunas de las variables evaluadas.

8 RESULTADOS Y ANÁLISIS

8.1 Selección de dos plantas modelo para la cuantificación de las tasas de colonización micorrízica

Luego de la siembra y posterior emergencia de las plántulas se hizo un seguimiento periódico de su crecimiento, llevando a cabo todas las prácticas culturales necesarias para garantizar el adecuado desarrollo de las mismas a fin de obtener el material para continuar con el proceso de investigación (Figura 11). Pese a que se realizó la estandarización del número de semillas empleadas en el momento de la siembra, la cantidad de biomasa de raíz producida fue diferente (Figura 12), en función de las características inherentes de cada una de las especies. Los individuos de *Crotalaria*, Soya y Maíz, fueron los que presentaron mayor producción de biomasa de raíz mientras que los de *Brizantha* presentaron la menor cantidad. A pesar de ello, esta diferencia no afectó a la cuantificación de la colonización micorrízica, ya que esta evaluación se realiza en función del porcentaje de presencia de colonización en un número similar de segmentos de raíces, seleccionados al azar y todas las especies produjeron suficiente cantidad de raíz para llevar a cabo la cuantificación de la colonización micorrízica.



Figura 11. Seguimiento del crecimiento de las especies vegetales durante la primera fase del experimento

El tratamiento adicional con suelo autoclavado mostró que incluso en los tratamientos en los cuales se inoculó HMA, la mayoría de especies no germinaron en ausencia de diversidad natural del suelo, no obstante, en especies como *Crotalaria* y *Brizantha* si se registraron datos de germinación. La disminución en los porcentajes de germinación puede deberse a que la reducción, y en este caso nula presencia de microorganismos en el suelo, afectan ciclos biogeoquímicos como el del carbono o nitrógeno influenciando la fertilidad del suelo, su estructura y con ello la liberación de nutrientes, dejando de encontrarse disponibles para que la planta pueda continuar con sus procesos fisiológicos, lo que finalmente afecta severamente el establecimiento de plántulas, su crecimiento y posterior sobrevivencia (Bashan *et al.*, 2015).

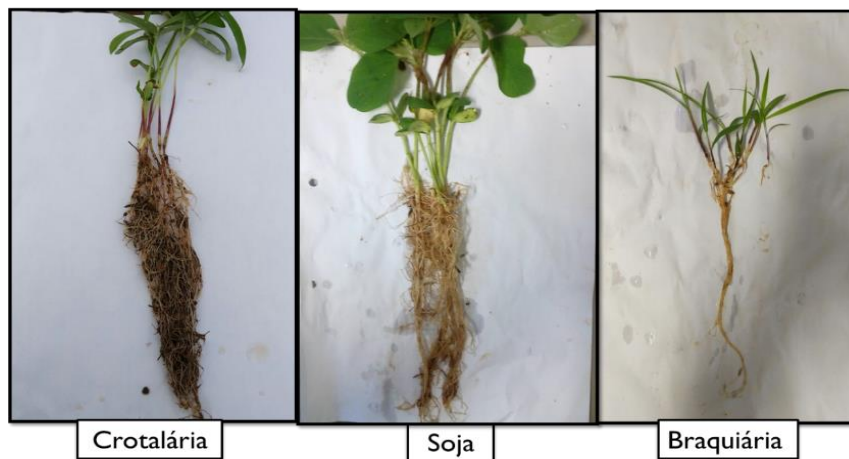


Figura 12. Diferencia en la cantidad de raíz obtenida para las especies: Crotalaria (*Crotalaria juncea*), Soja (*Glycine max*) y Brizantha (*Brachiaria brizantha*).

Debido al corto periodo de evaluación (20 días), las tasas de colonización son bajas (Tabla 4), aunque es posible observar que hay presencia de estructuras fúngicas colonizando las raíces (Anexo 1) y que son fácilmente distinguibles, principalmente las vesículas (Figura 13); lo anterior indica que la colonización micorrízica puede ser detectada 20 días después de ocurrida la emergencia, y que está acorde a lo mencionado por Mustafa *et al.* (2010) quienes afirman que una vez inoculado el HMA en el suelo, la relación simbiótica inicia hacia el tercer día, sin embargo solo hasta los 21 días es cuando se encuentra afianzada, siendo entonces el momento en que se logra detectar. Dado que en la primer fase de la investigación, se evaluó la colonización micorrízica en los días 7, 14 y 21 después de la emergencia, donde se encontró que en el periodo de 14 y 21 días había una mejor respuesta de la colonización, se decidió repetir los periodos de evaluación del %CM con un intervalo de 10 y 20 días, en el que se valida el tiempo adecuado para la observación y evaluación de las tasas de colonización.

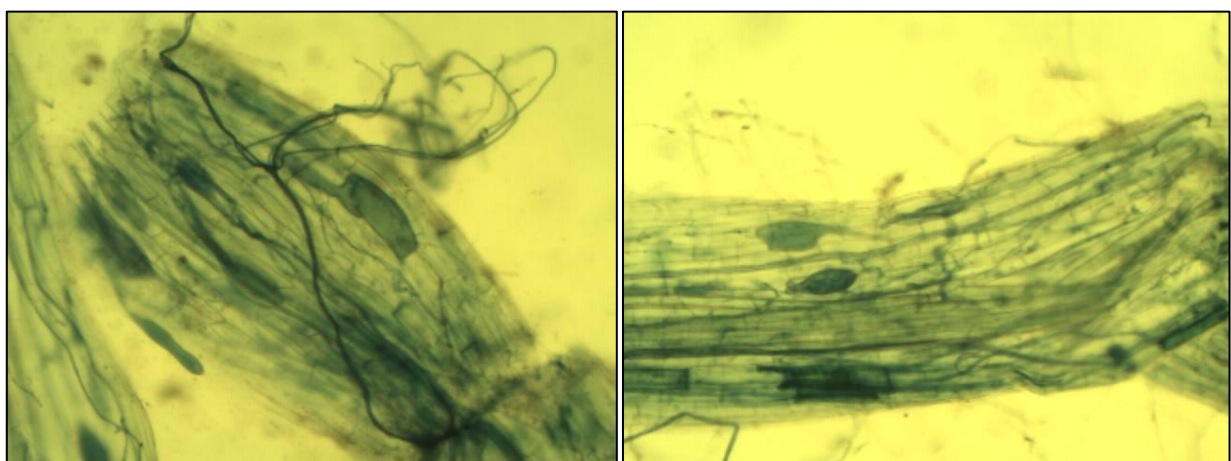


Figura 13. Estructuras microscópicas de hongo micorrízico arbuscular observadas al culminar el ensayo

Tabla 4. Promedio de colonización micorrizica (%) en suelo natural de seis especies vegetales evaluadas en ausencia de inoculación con hongo micorrízico arbuscular (HMA), y presencia de inoculación por parte de tres especies fúngicas.

| Planta | Sin inoculo de HMA | <i>Acaulospora colombiana</i> | <i>Rhizophagus clarus</i> | <i>Dentiscutata heterogama</i> | Promedio |
|-----------------|--------------------|-------------------------------|---------------------------|--------------------------------|-----------|
| Trigo | 1 Cc | 18 Aa | 4 Bb | 1 Cbc | 6 |
| Soja | 0 Bc | 5 Ac | 0 Bd | 0 Bc | 1 |
| Crotalaria | 5 Aab | 2 Ac | 5 Abc | 2 Abc | 4 |
| Maiz | 0 Abc | 2 Ac | 1 Acd | 2 Abc | 1 |
| Brizantha | 6 Ca | 9 BCb | 12 ABa | 14 Aa | 10 |
| Sorgo | 1 Cc | 12 Ab | 7 Bb | 5 BCb | 6 |
| Promedio | 2 | 8 | 5 | 4 | |

Letras mayúsculas diferentes dentro de la misma línea muestran diferencia significativa para colonización micorrízica entre las diferentes especies de HMA por el test t (LSD) ($p < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes dentro de la misma columna muestran diferencia significativa para colonización micorrízica entre especies vegetales por el test t (LSD) ($p < 0,05$).

En la tabla 4, se observan los promedios entorno a la colonización micorrízica por especie vegetal, siendo así en su orden descendente Brizantha (10), Trigo (6), Sorgo (6), Crotalaria (4), Soya (1) y Maíz (1), y por tratamiento de inoculación, el cual obtuvo también promedios de acuerdo a la evaluación de la tasa de colonización, en su orden *A. colombiana*, *R. clarus*, *D. heterogama* y Sin la aplicación de HMA. A partir de éstos valores, se tiene que las tasas de colonización son muy altas para el caso de la Soja (Siqueira & Franco, 1988); y altas para el caso del Trigo, el Sorgo (Siqueira & Franco, 1988) y el Maíz (Plenchette *et al.*, 1983); para el caso de Brizantha según Siqueira & Franco (1988) la media encontrada para el %CM es alta, contradiciendo lo mencionado años más tarde Carneiro *et al.* (1996) quienes lo categorizando como bajo.

A pesar de ello, la especie Brizantha fue la que presentó la mayor tasa de colonización independientemente de la especie de HMA que haya sido inoculada, seguida del Sorgo y el Trigo con promedios iguales en torno al porcentaje de colonización micorrízica, como se evidencia en la Tabla 4, en contraste con las especies de Soja y Maíz que fueron las que presentaron las menores tasas de colonización. Por otra parte, de los HMA inoculados, la especie *Acaulospora colombiana* fue la que presentó mayor promedio de colonización y al comparar las tasas de colonización de cada especie vegetal con otros HMA se observa que el Trigo fue la especie que presentó mayor tasa de colonización, seguida de Sorgo y Braquiaria. Esto puede indicar que el hongo no estaba presente en el ambiente natural del suelo original del área de pastoreo, y que su inoculación fue más influenciada por la planta hospedera, como se refleja en el caso del Trigo. Sin embargo, es preciso observar que dicho HMA fue el más representativo entorno al %CM entre las otras especies fúngicas, por lo que se deduce que la comunidad microbiana pudo influir directamente en la colonización de la misma, como lo plantea Garbaye & Bowen (1991) donde determinaron que las bacterias asociadas con raíces micorrizadas y HMA, promueven

selectivamente el establecimiento de la simbiosis, según la especie de HMA; como en el caso del estudio realizado por Sala *et al.* (2007), donde la inoculación del HMA del género *Acaulospora* aumentó la colonización por bacterias diazotróficas en las raíces del trigo.

De acuerdo a la evaluación de la tasa de colonización micorrízica, fue posible observar que hubo efecto de interacción entre las diferentes especies de HMA y las especies vegetales, puesto que en cada uno ocurre una variación en la colonización y hay una especificidad entre los HMA - planta (Tabla 4).

Cuando no se realizó la inoculación de HMA, las especies fúngicas presentes en el suelo natural fueron capaces de colonizar la especie *Brizantha* de manera más eficiente, en contraste con la relación obtenida con las otras especies vegetales. Esta dinámica de alta colonización y comportamiento de los HMA se debe principalmente al origen del suelo utilizado para la investigación, debido a que provenía de un área de pastoreo cultivada con *Brizantha*, lo que demuestra que los hongos allí presentes tuvieron preferencia en la colonización de dicha especie. No obstante, cuando fue inoculado el HMA, la colonización varió en función de la especie, tanto de los HMA como de las seis especies vegetales. Altas tasas de colonización micorrízica también se observaron en la *Braquiaria* cuando *Rhizophagus clarus* y *Dentiscutata heterogama* fueron inoculados. Esto puede indicar que estos hongos ya estaban presentes en el ambiente natural del suelo, y la inoculación de esporas favoreció su colonización.

Para el caso de *Crotalaria*, donde se presenta un comportamiento similar a la especie *Brizantha*, debido al significativo valor de %CM en el tratamiento de suelo natural sin inoculación de HMA, se deduce que la colonización fue influenciada por la planta hospedera, como lo menciona Sieverding (1991), la efectividad en la colonización de los HMA se relaciona con la planta hospedera, las características edáficas, la densidad de propágulos infectivos y la efectividad del ecotipo de HMA usado; representado en la colonización que la especie *Crotalaria* tuvo en suelo natural.

En concordancia con lo analizado anteriormente, se encuentra la importancia que tendrían las dos especies vegetales de acuerdo al comportamiento en la colonización micorrízica en el suelo natural con la diversidad microbiana presente en el mismo, razón por la cual, son seleccionadas para la siguiente fase de la investigación. De igual manera, es relevante resaltar el papel que cumple la ruta metabólica de las especies *Brachiaria brizantha* y *Crotalaria juncea* con la colonización micorrízica evaluada, las cuales pertenecen a las vías metabólicas C_4 y C_3 respectivamente (Peter *et al.*, 2011). Puesto que, la diferencia en el porcentaje de micorrización para plantas con mecanismos fotosintéticos distintos se basa en sus diferentes sistemas radicales, relacionados con la estrategia de la planta para conseguir agua y nutrientes; donde se ha observado una mayor micorrización en especies C_4 en relación a las C_3 (Hetrick *et al.*, 1988), que se ratifica en el %CM de *B. brizantha* y *C. juncea* de la presente investigación; por lo tanto, se observa una fuerte relación entre el grado de asociación de los HMA y la vía metabólica del

huésped, en el que los hospedadores C3 se consideran facultativamente micotróficos y los C4 estrictamente micotróficos (Hetrick *et al.*, 1990).

Por otro lado, cuando *Acaulospora colombiana* fue inoculada, el Trigo fue la que presentó la mayor tasa de colonización, seguida de Sorgo, y Brizantha. Esto puede indicar que este hongo no estaba presente en el ambiente natural del suelo original de Brizantha, y que su inoculación fue más influenciada por la planta hospedera, en el caso del Trigo.

8.2 Aplicación de diferentes niveles de diversidad microbiana en el suelo

La figura 14 resume los resultados obtenidos para las tasas de colonización en la especie vegetal *Brachiaria brizantha* inoculada con tres especies de HMA (*Acaulospora colombiana*, *Rhizophagus clarus* y *Dentiscutata heterogama*), después de haber aplicado el método de extinción de diversidad mediante diluciones sucesivas. Allí se observa que la tasa de colonización obtenida con cualquiera de las especies de HMA inoculado, e inclusive sin la inoculación del hongo fue significativamente superior en suelo natural en comparación con los demás niveles de diversidad. Resultado esperado, dado que se ha comprobado que la comunidad microbiana sirve de estimulante para la relación micorrízica y el aumento de la colonización en raíces en diferentes especies vegetales, y corrobora lo que algunos autores mencionan como la interacción tripartita planta-hongo-comunidad microbiana (Mirabal & Ortega, 2008).

El análisis estadístico determinó que hay diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las tasas de colonización obtenidas en suelo natural en comparación con cualquiera de los demás niveles de diversidad, incluyendo el suelo totalmente esterilizado, resaltando con ello la posibilidad de que la presencia de la comunidad microbiana total en el suelo, permite una dinámica que hace más efectivo el establecimiento de la relación micorrízica y cuya implicación se detalla más adelante.

El tratamiento en el que no se inoculó ningún HMA (A) presenta el mismo comportamiento que las demás especies inoculadas (B, C y D), donde se obtienen altos valores de CM en suelo natural en comparación con los demás niveles de diversidad, no obstante, su comportamiento es proporcionalmente menor, es decir, a pesar de que en el suelo natural sin inóculo de HMA (A) se obtuvo el mayor porcentaje de colonización, en comparación con los tratamientos en los que se inoculó HMA (B, C y D) dicho porcentaje fue menor, esto posiblemente indica que las cepas nativas de hongos micorrízicos del suelo, tardan más tiempo en establecer la simbiosis y colonizar a la planta hospedera a causa, quizá, de la competencia que hay por la presencia de varias especies de HMA o por algún grado de especificidad de las especies de HMA para con la Brizantha (Eom *et al.*, 2000).

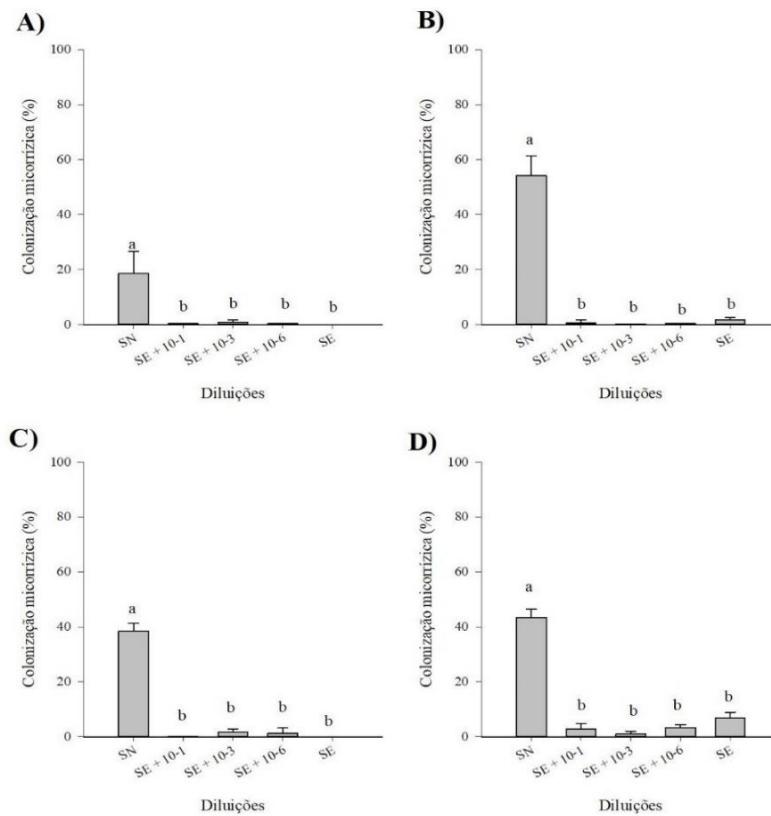


Figura 14. Porcentaje de colonización micorrizica en la especie vegetal *Brachiaria brizantha* con diferentes niveles de diversidad microbiana en el suelo, utilizando el método de extinción de diversidad por diluciones sucesivas. SN: Suelo Natural. SE: Suelo esterilizado. A: Sin Hongo micorrizico arbuscular B: *Acaulospora colombiana*. C: *Rhizophagus clarus*. D: *Dentiscutata heterogama*.

Por otro lado, los porcentajes de colonización de los tratamientos con suelo esterilizado sumado con diferentes niveles de diversidad (10^{-1} , 10^{-3} y 10^{-6}) son considerablemente bajos, siendo que en ninguno de los casos alcanzan el 5% de colonización. La primera conclusión de dicho resultado es que, por lo menos para la especie vegetal *Brizantha*, la presencia de la comunidad microbiana si altera el proceso de colonización micorrizica aunque quizá, de manera indirecta. Una posible explicación para estos resultados, es que con la alteración de la comunidad microbiana puede darse lugar a la falta de disponibilidad de nutrientes necesarios para el establecimiento de la relación simbiótica, dado que, algunos autores mencionan que para el desarrollo inicial de la simbiosis es necesaria la presencia de nitrógeno, y que incluso posterior a la colonización inicial, el HMA suele tomar del suelo este elemento y reservarlo para su propio desarrollo, incorporandolo a través de sus hifas en parches de materia orgánica donde hay material en descomposición (Hodge, 2017), y como es bien sabido, es la comunidad microbiana la que se encarga de realizar dicha descomposición y posterior liberación de nutrientes en el suelo (Bashan *et al.*, 2015). En coherencia con lo anterior la ausencia o disminución de la comunidad microbiana afectará la disponibilidad de nutrientes y con ello el establecimiento de la simbiosis micorrizica. En adición a

lo anterior, se debe considerar también que el contenido de materia orgánica en general, para suelos de tipo oxisol, que es el tipo de suelo empleado en el ensayo, es bajo (López-gutiérrez *et al.*, 2001) y que junto con el proceso de esterilización al que se sometió el suelo, afectan también la disponibilidad de nutrientes en el suelo.

En el suelo esterilizado se observa que no hubo colonización, ni para el caso de los individuos inoculados con *R. clarus*, ni en aquellos a los que no se les incluyó HMA durante la siembra; sin embargo, el suelo esterilizado que fue inoculado con *D. heterogama* obtuvo el segundo valor más alto de colonización, al igual que lo sucedido con el tratamiento en el que se inoculó *A. colombiana*, lo que puede significar que estas dos especies de HMA logran establecer la relación micorrízica independientemente de las condiciones ambientales circundantes (Werner *et al.*, 2014) indicando que son, posiblemente, especies de mayor resistencia a la falta de nutrientes en el suelo y a condiciones más restrictivas de su hábitat. Corroborando lo anterior, se tiene que los valores más representativos de colonización con diferentes niveles de diversidad, se dieron en el tratamiento donde se inoculó *D. heterogama*, así como que el mayor porcentaje de colonización en general se obtuvo en suelo natural con *A. colombiana*.

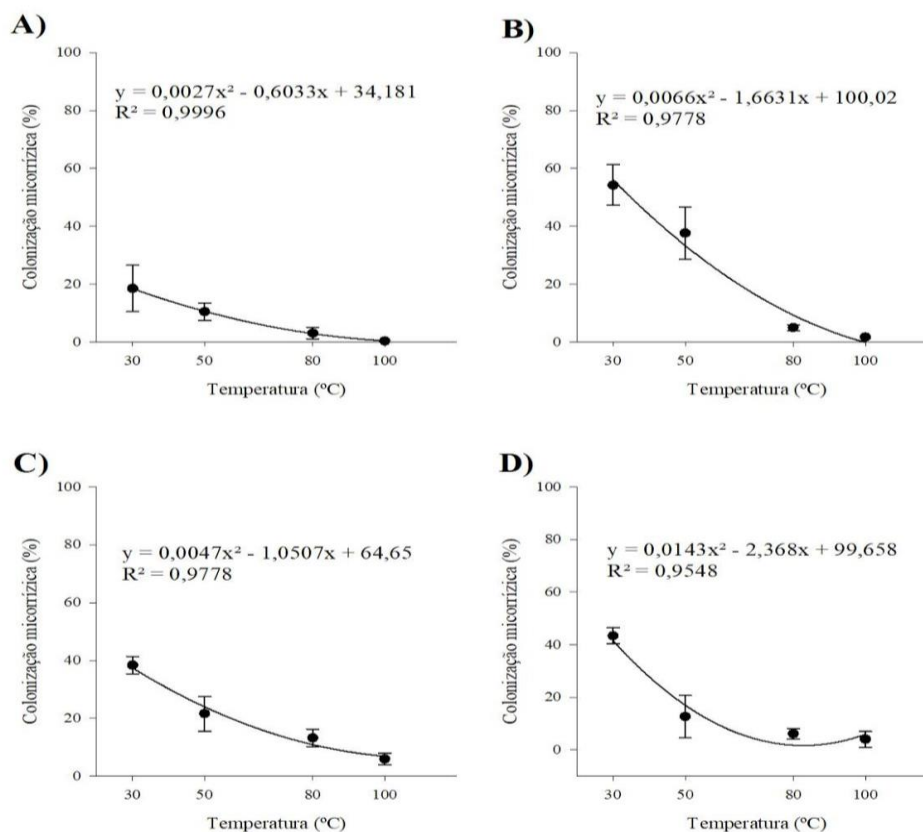


Figura 15. Porcentaje de colonización micorrízica en la especie vegetal *Brachiaria brizantha* con diferentes niveles de diversidad microbiana en el suelo, utilizando el método de extinción de diversidad por tratamiento térmico. SN: Suelo Natural. SE: Suelo esterilizado. A: Sin Hongo micorrízico arbuscular B: *Acaulospora colombiana*. C: *Rhizophagus clarus*. D: *Dentiscutata heterogama*.

Los resultados de la aplicación del método de extinción de diversidad por tratamiento térmico en individuos de la especie *Brachiaria brizantha* inoculados con las tres especies de HMA previamente mencionadas, se encuentran resumidos en la figura 15, donde se observa que hay una relación inversa entre la temperatura y la tasa de colonización; en función de ello, para cada una de las especies de HMA inoculadas y para el testigo (Sin HMA) se realizaron los respectivos modelos de regresión los cuales arrojaron un alto valor de ajuste R^2 de entre el 95 y 99%. En la especie *A. colombiana* fue en la que se obtuvieron los mayores porcentajes de colonización en las temperaturas de 30 y 50 °C, sin embargo, en 80 y 100 °C este valor sufrió una abrupta disminución, este comportamiento puede deberse a que a estas últimas dos temperaturas se dio un aumento en el contenido de fósforo en el suelo, con ello, la necesidad de la simbiosis micorrízica disminuye porque el elemento ya se encuentra disponible para la planta y no hace falta acudir al HMA para obtenerlo; se ha comprobado que existe una relación inversamente proporcional entre el contenido de fósforo en el suelo y la presencia de HMA y que este es un factor que influye la micorrización (Corredor *et al.*, 2003; Vance *et al.*, 2003). Por otra parte, la tasa de colonización para cualquier temperatura en los individuos en los que no se inoculó HMA, no superó el 40% y obtuvo comparativamente con las demás especies de HMA inoculadas los porcentajes más bajos. Estos resultados son coherentes con lo encontrado con el método de diluciones sucesivas ya que para ambos métodos los tratamientos con mayor diversidad de la comunidad microbiana arrojan mayores tasas de colonización.

Por otra parte, en la figura 16 se resumen los resultados obtenidos para las tasas de colonización en la segunda especie vegetal seleccionada bajo el primer experimento, que corresponde a *Crotalaria juncea*, igualmente inoculada con tres especies de HMA (*Acaulospora colombiana*, *Rhizophagus clarus* y *Dentiscutata heterogama*), y posteriormente tratada bajo el método de extinción de diversidad mediante diluciones sucesivas. Allí se observa que la tasa de colonización obtenida para *A. colombiana* y *D. heterogama* es mayor comparada con *Rhizophagus clarus* y el tratamiento sin inoculación de HMA, y que a menor diversidad, su colonización no se ve afectada como se detalló con la especie vegetal anteriormente descrita; esto se debe principalmente a la influencia que tiene la planta hospedera y a los mecanismos intrínsecos de la familia taxonómica a la que pertenece (Fabaceae), la cual se caracteriza por la relación con Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR por sus siglas en inglés) (Sridevi *et al.*, 2007), quienes promueven el crecimiento de las plantas mediante la producción de fitohormonas, la solubilización de fosfatos insolubles y el control biológico de las enfermedades de las plantas hospederas o la mejora del estado nutricional de las mismas (Deshwal *et al.*, 2003). Se ha encontrado que existe una asociación simbiótica tripartita entre la planta hospedera de las leguminosas, los nódulos que inducen rizobios y los HMA, como lo menciona Xie *et al.* (1995) en su estudio acerca de los factores de la nodulación de *Rhizobium* en la estimulación de la colonización micorrízica de la soja, donde observó que los factores Nod aumentaron el grado de colonización micorrízica, por medio de los flavonoides vegetales que median dicha estimulación.

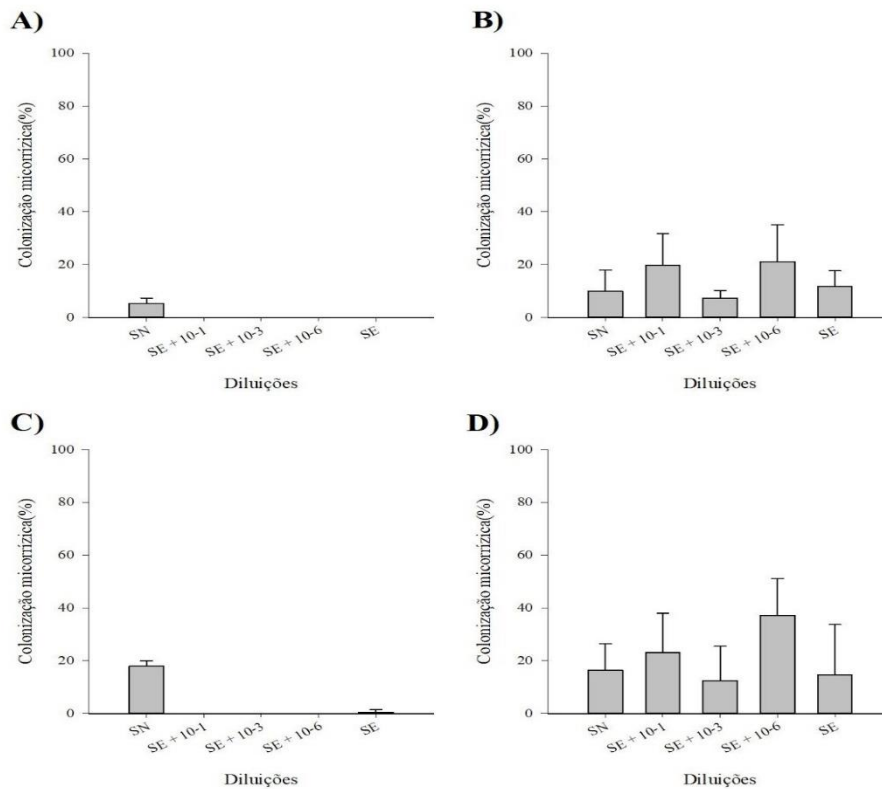


Figura 16. Porcentaje de colonización micorrízica en la especie vegetal *Crotalaria juncea* con diferentes niveles de diversidad microbiana en el suelo, utilizando el método de extinción de diversidad por diluciones sucesivas. SN: Suelo Natural. SE: Suelo esterilizado. A: Sin Hongo micorrízico arbuscular B: *Acaulospora colombiana*. C: *Rhizophagus clarus*. D: *Dentiscutata heterogama*.

Anteriormente se ha conocido sobre la estimulación de la formación de micorrizas por flavonoides y fungicidas, así como por otros microorganismos (Nair et al., 1991, Singh et al., 1991, Siqueira et al., 1991, von Alten et al., 1993). Dicha estimulación indica que la colonización micorrízica en *Crotalaria* se vio influenciada por la nodulación de *Rhizobium* y además, por la planta hospedera, bajo el fenómeno de autorregulación, el cual consiste en un control que ejercen las especies vegetales para equilibrar su estado nutricional, de tal manera que si la planta carece o se satura de un elemento como el fósforo, la misma tendrá la capacidad de estimular o inhibir la colonización de microorganismos simbiotes (Catford et al., 2003); por lo que en éste caso, la planta estimuló el desarrollo micorrízico bajo las interacciones entre HMA y *Rhizobium*.

Para *A. colombiana* se encuentra que las tasas de colonización se encuentran en un rango de %CM que oscila entre el 5% y el 20%, donde se presentan niveles similares de %CM para las diluciones al 10⁻¹ y 10⁻⁶, mientras que para *D. heterogama* el rango de colonización micorrízica varía entre el 15% y el 38%, con su máximo valor para la dilución al 10⁻⁶, considerado como el mayor porcentaje de colonización en general. A pesar de ello, es importante resaltar que el

comportamiento de la relación entre diversidad microbiana y *R. clarus* es similar a la presentada por Brizantha, puesto que disminuye radicalmente la tasa de colonización a menor diversidad, como sucede de igual forma, con el tratamiento sin inoculación, donde la colonización es baja en el suelo natural y nula en los diferentes niveles de las diluciones; por lo que en éste caso se concluye que la especie fúngica en su interacción con el medio y la planta hospedera, sufre alteraciones en la colonización debido a la ausencia de nutrientes en el suelo; de igual forma, es necesario precisar que posiblemente los mecanismos de autorregulación de la planta no favorecieron a ésta especie de HMA, para lo cual se sugiere que se adelanten estudios que permitan esclarecer la forma en que la autorregulación de las especies vegetales interfieren específicamente con especies fúngicas.

Para el tratamiento de suelo esterilizado, se puntualiza que la colonización micorrízica es representativamente alta para las tres especies inoculadas, a pesar de que se reporta una menor colonización para *R. clarus* en comparación con las otras dos especies de hongo; esto nos demuestra que en ausencia total de diversidad microbiana, las especies *D. heterogama* y *A. colombiana* establecen sus relaciones simbióticas independientemente de las condiciones ambientales del medio, tal como se reportó para la especie vegetal *B. brizantha* y que en el caso de *R. clarus*, la ausencia de comunidad microbiana altera su colonización. Adicionalmente, es necesario resaltar que para *B. brizantha* y *C. juncea* los valores más representativos de colonización con diferentes niveles de diversidad, se dieron en el tratamiento donde se inoculó *D. heterogama*, mientras que los más bajos fueron donde no se inoculó HMA; razón por la cual, se concluye que las características intrínsecas de las especies fúngicas, generan respuestas diferentes ante la diversidad microbiana en asociación con la planta hospedera (Chagnon *et al.*, 2013), y que de igual forma, la planta hospedera con sus propios mecanismos, genera una relación simbiótica específica, como el estudio demostrado por Kiers *et al.* (2011), donde la planta hospedera establece la simbiosis de forma eficiente acorde a sus necesidades, es decir que las plantas eligen el simbiote y los mecanismos para realizar el gasto energético en esta interacción (Fellbaum *et al.*, 2014).

En la figura 17 se pueden apreciar los resultados de la aplicación del método de extinción de diversidad por tratamiento térmico en individuos de la especie *Crotalaria juncea* inoculados con las tres especies de HMA anteriormente mencionadas, en la cual se detalla el comportamiento que existe entre la temperatura y la tasa de colonización micorrízica, donde se encuentran datos muy variables y por ende no existe una relación directamente proporcional entorno a menor %CM bajo mayores temperaturas, tal como se puntualizó en la especie vegetal *B. Brizantha*; en función de ello, para cada una de los tratamientos tanto para los tres HMA inoculados, como sin la inoculación del mismo, se presentan valores débiles a moderados de correlación de los respectivos modelos de regresión, y tan solo un valor de ajuste R^2 que alcanza el 99% correspondiente a *D. heterogama*, presentando un comportamiento diferenciado a los otros tres

tratamientos, respecto a la relación de la tasa de colonización que disminuye discretamente en función del aumento de temperatura.

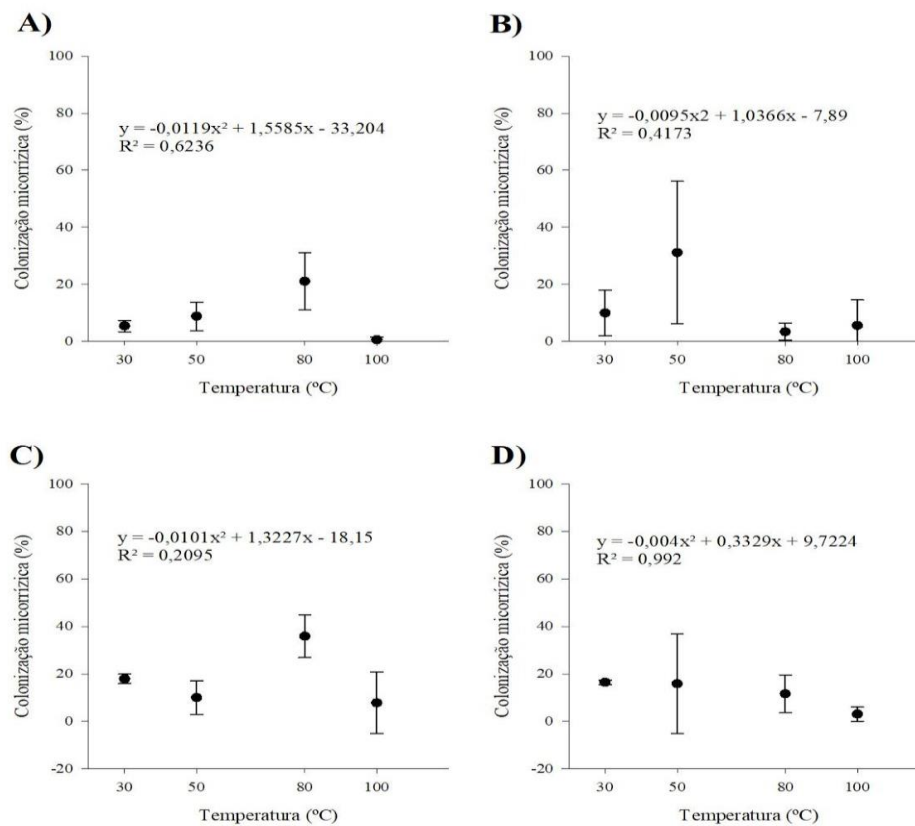


Figura 17. Porcentaje de colonización micorrízica en la especie vegetal *Crotalaria juncea* con diferentes niveles de diversidad microbiana en el suelo, utilizando el métodos de extinción por tratamiento térmico. SN: Suelo Natural. SE: Suelo esterilizado. A: Sin Hongo micorrízico arbuscular B: *Acaulospora colombiana*. C: *Rhizophagus clarus*. D: *Dentiscutata heterogama*.

En la especie fúngica *A. colombiana* se presenta una variación abrupta en 50°C donde se presenta uno de los valores más altos de colonización micorrízica comparado con el %CM general, situación diferente reflejada en el suelo natural, el cual muestra las menores tasas de colonización que no sobrepasa el 20%. Para *R. clarus* se obtiene el mayor valor de colonización presentada a 80°C y con un porcentaje de 38%, aún cuando presenta el menor valor de ajuste R^2 correspondiente a 21%. En este sentido, es preciso resaltar que la tasa de colonización para los individuos en los cuatro tratamientos no superó el 40%, donde la menor tasa se da a los 100°C respecto a las demás temperaturas analizadas, excepto para *A. colombiana* la cual es ligeramente superior al %CM dado a 80°C; lo que demuestra que efectivamente el tratamiento con menor diversidad bajo el método de extinción por temperatura arroja menores valores de la tasa de colonización micorrízica. De igual forma, se observa el patrón general de los cuatro tratamientos de HMA, donde hay una elevada colonización micorrízica en el rango de temperatura de 50°C y

80°C, lo que produce un aumento en la comunidad microbiana del suelo, puesto que el desarrollo de microorganismos de los grupos Bacteria y Archaeae se genera en temperaturas de 45°C-110° (Suárez et al., 2004), por lo tanto se infiere que a mayor comunidad microbiana, la colonización micorrízica aumentará, como se observó para la especie vegetal *B. brizantha*.

9 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados presentados a lo largo de esta investigación indican que la influencia de la comunidad microbiana en la colonización micorrízica puede darse de manera indirecta, debido a que la disminución en la abundancia de los microorganismos limita su capacidad de liberar nutrientes al suelo, y es dicha falta de nutrientes la que puede estar obstaculizando el establecimiento de la relación simbiótica, considerando que esta relación se encuentra mediada por la presencia de nitrógeno en el suelo. Sin embargo, se observó que hay comportamientos diferenciados de colonización de acuerdo a la planta hospedera evaluada, es decir, que la simbiosis micorrízica y consecuente colonización, se ve influenciada no solo por el rol que cumple la comunidad microbiana en el suelo, sino también por las características fisiológicas propias de la planta hospedera, dado que la capacidad de una especie vegetal para desarrollar simbiosis con otros microorganismos como el *Rhizobium* y formar estructuras como los nódulos nitrificantes, en el caso de *Crotalaria juncea*, aumenta la posibilidad del HMA para colonizar y formar la denominada interacción tripartita Planta-HMA-Comunidad Microbiana, siendo diferente al comportamiento que se observó en *Brachiaria brizantha* la cual no desarrolla dichos nódulos. Así mismo, se pudo constatar que las tasas de colonización se ven afectadas por las características intrínsecas de las especies de HMA y que éstas desarrollan cierto grado de especificidad para establecer la relación simbiótica; además de ello, se observó que *A. Colombiana* y *D. heterogama*, son presuntamente más resistentes a las condiciones restrictivas del suelo y logran establecer la simbiosis independiente de las alteraciones ambientales circundantes, diferente a lo sucedido con *R. clarus* cuyas tasas de colonización variaron considerablemente en función de las alteraciones hechas a la diversidad microbiana del suelo.

En síntesis, se observa que la relación tripartita Planta-HMA-Comunidad Microbiana consta de una dinámica que difícilmente puede generalizarse, dado que cada especie de HMA, planta e incluso de la comunidad microbiana, se comporta de diferente manera de acuerdo a sus características específicas, por esta razón, se hace necesario profundizar en mayor proporción en la caracterización de los organismos envueltos en esta relación, así como en los mecanismos que emplean para interactuar entre ellos. Así mismo, se recomienda realizar la evaluación de la CM por técnicas moleculares cuantitativas como qPCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real), que puedan determinar con mayor exactitud las tasas de CM. Del mismo modo, se recomienda realizar estudios enfocados a las propiedades intrínsecas de las especies de HMA, en la cual se puedan determinar las diferentes interacciones específicas que se genera con su planta hospedera, especialmente con aquellas que se caracterizan por su relación con las PGPR; de igual forma se sugiere realizar investigaciones que aclaren cuáles tipos de bacterias están asociados a los géneros de HMA, estableciendo su relación y comportamiento como MHB.

10 BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Adrian, P. (2017). Carl Woese y los dominios de la vida. *Revista Boletín Biológica* N° 37 (11): 27-33.
- ✓ Andrade, G.; Linderman, R. & Bethlenfalvay, G. (1998). Bacterial associations with the mycorrhizosphere and hyphosphere of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant and Soil*, Dordrecht. 202: 79–87
- ✓ Andreote, F; Gumiere, T. & Durrer, A. (2014). Exploring interactions of plant microbiomes. *Scientia Agricola*, Piracicaba. v. 71 (6): 528-539
- ✓ Antoun, H. & Prévost, D. (2005). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. En: SIDDIQUI, Z.A. (Ed.). *PGPR: biocontrol and biofertilization*. Dordrecht: Springer. p. 1-38.
- ✓ Arora, N.; Khare, E. & Maheshwari, D. (2010) *Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Constraints in Bioformulation, Commercialization, and Future Strategies*. In: Maheshwari D. (eds) *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. Microbiology Monographs, vol 18. Springer, Berlin, Heidelberg
- ✓ Artursson, V. (2005). Bacterial–fungal interactions highlighted using microbiomics: potential application for plant growth enhancement. Tesis Doctoral. University of Uppsala, Uppsala, Sweden.
- ✓ Artursson, V., & Jansson, J. (2003). Use of bromodeoxyuridine immunocapture to identify active bacteria associated with arbuscular mycorrhizal hyphae. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(10): 6208-6215.
- ✓ Artursson, V.; Finlay, R. & Jansson J. (2006). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology*, 8(1): 1-10.
- ✓ Azcón-Aguilar, C. & Barea, J. M. (1992). Interactions Between mycorrhizal fungi and other rhizosphere microorganisms. En: *Mycorrhizal functioning* (ed. M. F. Allen). Chapman and Hall, London, UK. p. 163-198.
- ✓ Bago, B. & Becard, G. (2002). Bases of the obligate biotrophy or arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhizal Technol Agr Genes Bioproducts*. p. 33 – 48.
- ✓ Barea, J.; Azcón-Aguilar, C. & Azcón, R. (1997). Interactions between mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms within the context of sustainable soil-plant systems. En: GANGE, A.C.; BROWN, V.K. (Ed.). *Multitrophic interactions in terrestrial systems*. Oxford: Blackwell Science. p. 65–77.
- ✓ Barea, J.; Andrade, G.; Bianciotto, V.; Dowling, D.; Lohrke, S.; Bonfante. P.; O’Gara, F. & Azcón-Aguilar, C. (1998). Impact on arbuscular mycorrhiza formation of *Pseudomonas* strains used as inoculants for biocontrol of soil-borne fungal plant pathogens. *Applied Environmental Microbiology*. 64: 2304–2307.

- ✓ Barea, J.; Azcón, R. & Azcón-Aguilar, C. (2005a). Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. en: Buscot F, Varma A (eds.). *microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. Springer-Verlag, Berlin. p. 195-212.
- ✓ Barea, J.; Pozo, M.; Azcón, R. & Azcón-Aguilar, C. (2005) Microbial co-operation in the rhizosphere. *J Exp Bot.* 56 (417): 1761-1778.
- ✓ Carreón, Y.; Sarabia, M.; Martínez, M. & Madrigal, R. (2010). Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, 12 (1): 65-71.
- ✓ Catford, J.; Staehelin, C.; Lerat, S.; Piché, Y. & Vierheilig, H. (2003). Suppression of arbuscular mycorrhizal colonization and nodulation in split-root systems of alfalfa after pre-inoculation and treatment with Nod factors. *J Exp Bot.* 54 (386):1481-7.
- ✓ Jara, A. (2011). Screening de hongos de suelo ante microorganismos fitopatógenos (Bachelor's thesis).
- ✓ Bonfante, P. & Desiró, A. (2015). Arbuscular mycorrhizas: the lives of beneficial fungi and their plants hosts. Lugtenberg B. (eds) *Principles of Plant-Microbe Interactions*. Springer, Cham.
- ✓ Borneman, J. & Triplett, E. (1997) Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl Environ Microbiol.* 63 (7): 2647-53.
- ✓ Cohn, J.; Bradley, D. & Stacey, G. (1998) Legume nodule organogenesis. *Trends Plant Sci* 3: 105–110
- ✓ Budi, S.; van Tuinen, D.; Martinotti, G. & Gianinazzi, S. (1999). Isolation from the Sorghum bicolor mycorrhizosphere of a bacterium compatible with arbuscular mycorrhiza development and antagonistic towards soilborne fungal pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 5148–5150.
- ✓ Carneiro, M.; Siqueira, J.; Davide, A.; Gomes, L.; Curi, N. & Vale, F. (1996). Fungo micorrízico e superfosfato no crescimento de espécies arbóreas tropicais. *Scientia Forestalis, Piracicaba*, 50: 21-36.
- ✓ Chagnon, P.; Bradley, R.; Maherali, H. & Klironomos, J. (2013). A trait-based framework to understand life history of mycorrhizal fungi. *Trends Plant Science, London*. 18: 476-491
- ✓ Chaparro, J., Badril, D. Bakker, M., Sugiyama, A., Manter, D. & Vivanco, J. (2013). Root exudation of phytochemicals in Arabidopsis follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. *PLoS One, San Francisco*. 8 (2): 55731.

- ✓ Chaparro, J. Badri, D. & Vivanco, J. (2014). Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *ISME Journal*, New York. 8: 790-803.
- ✓ Corredor, G., Otálvaro, D. y Álvarez, C. (2003). Metodologías empleadas para el estudio de micorrizas arbusculares. Programa Nacional de Recursos Biofísicos, CORPOICA, Santa Fe de Bogotá. 45p.
- ✓ Deshwal, V., Dubey, R & Maheshwari, D. (2003). Isolation of plant-growth promoting strains of *Bradyrhizobium* (*Arachis* sp.) with biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut. *Curr. Sci.*, 84: 443-448.
- ✓ Duponnois, R. & Plenchette, C. (2003). A mycorrhiza helper bacterium enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of Australian *Acacia* species. *Mycorrhiza* 13: 85–91.
- ✓ Eom, A.; Hartnett, D. & Wilson, G. (2000). Host plant species effects on arbuscular mycorrhizal fungal communities in tallgrass prairie. *Oecologia*, 122 (3): 435-444.
- ✓ Falkowski, P. (2001). Biogeochemical cycles. *Encyclopedia Biodivers.* 1: 437–453.
- ✓ Fellbaum, C.; Mensah, J.; Cloos, A.; Strahan, G.; Pfeffer, P.; Kiers, T. & Bucking, H. (2014). Fungal nutrient allocation in common mycorrhizal networks is regulated by the carbon source strength of individual host plants. *New Phytologist*, Hoboken. 203: 646–656
- ✓ Ferreira, D. (2016). *Interações entre fungos micorrízicos arbusculares e a microbiota de solos* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- ✓ Frey-Klett, P.; Garbaye, J. & Tarkka, M. (2007). The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New phytologist*. 176 (1): 22-36.
- ✓ Gamalero, E.; Trotta, A.; Massa, N.; Copetta, A.; Martinotti, M. & Berta, G. (2004). Impact of two fluorescent pseudomonads and an arbuscular mycorrhizal fungus on tomato plant growth, root architecture and P acquisition. *Mycorrhiza* 14: 185–192.
- ✓ Gans, J.; Wolinsky, M. & Dunbar, J. (2005). Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*. 309:1387–1390.
- ✓ Garbaye, J. (1994). Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 128: 197–210.
- ✓ Garbaye, J. & Bowen, G. (1991). Biological interactions in the mycorrhizosphere. *Experientia*. 47: 370-375.
- ✓ Garbaye, J. & Duponnois R. (1992). Specificity and function of mycorrhization helper bacteria (MHB) associated with the *Pseudotsuga menziesii*–*Laccaria laccata* symbiosis. *Symbiosis* 14: 335–344.
- ✓ Garrido, B. (2009). Movilidad, biodisponibilidad y degradación inducida de isómeros de hexaclorociclohexano (HCH) en suelos contaminados. Univ Santiago de Compostela.
- ✓ Giovannetti, M. & Mosse, B. (1980). An Evaluation of Techniques for Measuring Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Infection in Roots. *New Phytologist*. 84: 489-500.

- ✓ González, F. & Fuentes, M. (2017). Mechanism of action of five plant growth promoters microorganism. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 34 (1): 17-31.
- ✓ Grman, E. (2012). Plant species differ in their ability to reduce allocation to non-beneficial arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology*, Ecological Society of America. 93 (4): 711-718.
- ✓ Gutiérrez, A.; Morte, A. & Honrubia, M. (2003) Morphological characterization of the mycorrhiza formed by *Helianthemum almeriense* Pau with *Terfezia clavaryi* Chatin and *Picoa lefebvrei* (Pat.) Maire. *Mycorrhiza* 13 (6): 299-307.
- ✓ Hetrick, B.; Kitt, D. & Wilson, G. (1988). Mycorrhizal dependence and growth habit of warm-season and cool-season tallgrass prairie plants. *Canadian Journal of Botany*, 66: 1376-1380.
- ✓ Hetrick, B.; Wilson, W.; Todd, T. (1990). Differential responses of C3 and C4 grasses to mycorrhizal symbiosis, phosphorus fertilization, and soil microorganisms. *Canadian Journal of Botany*, 68: 461-467.
- ✓ Hildebrandt, U.; Ouziad, F.; Marner, F. & Bothe, H. (2006) The bacterium *Paenibacillus validus* stimulates growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* up to the formation of fertile spores. *FEMS Microbiol Lett.* 254: 258–267
- ✓ Houlden, A.; Timms-Wilson, T.; Day, M. & Bailey, M. (2008). Influence of plant developmental stage on microbial community structure and activity in the rhizosphere of three field crops. *FEMS Microbiology Ecology*, Amsterdam. 65:193–201.
- ✓ Huse, S.; Welch, D.; Morrison, H. & Sogin, M. (2010). Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environmental microbiology*. 12 (7): 1889-1898.
- ✓ Kholkhar, I.; Haider, M.; Mukhtar, I. & Mushtaq, S. (2011). Evaluation of antagonistic activity of soil bacteria against plant pathogens fungi. *Pakistan Journal of Phytopathology*, Faisalabad. 23:166-169.
- ✓ Kiers, E.; Duhamel, M.; Beesetty, Y.; Mensah, J.; Frankien, O. & Verbruggen, E. (2011). Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science*, Washington. 333: 880–882
- ✓ Kiriachek, S.; Azevedo, L.; Peres, L. & Lambais, M. (2009). Regulação do desenvolvimento das micorrizas arbusculares. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 33: 1-16
- ✓ Kothamasi, D.; Kothamasi, S.; Bhattacharyya, A.; Kuhad, R. & Babu, C. (2006) Arbuscular mycorrhizae and phosphate solubilising bacteria of the rhizosphere of the mangrove ecosystem of Great Nicobar island, India. *Biol Fert Soils*. 42: 358–361
- ✓ Krüger, M.; Stockinger, H.; Krüger, C. & Schüßler, A. (2009). DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. 183 (1): 212-23.
- ✓ Linderman, R. (1997). Vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi. In Carroll GC, Tudzynski P (eds), *The Mycota*. Berlin, Germany: Springer-Verlag. p. 117–128.

- ✓ Lynch, M. & Neufeld, J. (2015). Ecology and exploration of the rare biosphere. *Nature Reviews Microbiology*. 13 (4): 217.
- ✓ Onofre, J.; Hernández, I.; Girard, L. & Caballero, J. (2009). ACC (1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in Burkholderia species, and its growth-promoting effect on tomato plants. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (20): 6581-6590.
- ✓ Mamani, E. (2009). Efecto de la co inoculación con *Azotobacter chroococcum* y *Glomus fasciculatum* en el rendimiento de dos especies de ají (*capsicum baccatum*, *capsicum chinense*) en condiciones del valle de Ite.
- ✓ Mamatha, G.; Bagyaraj, D. & Jaganath, S. (2002). Inoculation of field-established mulberry and papaya with arbuscular mycorrhizal fungi and a mycorrhiza helper bacterium. *Mycorrhiza* 12: 313–316.
- ✓ Martínez, I.; Periago, M. & Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos latinoamericanos de nutrición*. 50 (1): 5-18.
- ✓ Mayo, K.; Davis, R. & Motta, J. (1986). Stimulation of germination of spores of *Glomus versiforme* by spore-associated bacteria. *Mycologia*. 78: 426–431.
- ✓ Minerdi, D.; Fani, R.; Gallo, R.; Boarino, A. & Bonfante, P. (2001). Nitrogen fixation genes in an endosymbiotic Burkholderia strain. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington. 67: 725–732.
- ✓ Mirabal, L. & Ortega, E. (2008). Comunidad microbiana asociada a los Hongos Micorrizógenos Arbusculares. *Cultivos Tropicales*. 29 (4): 13-20.
- ✓ Montaña, N.; Sandoval, A.; Camargo, R. y Sánchez. (2010). Los microorganismos: Pequeños Gigantes. Disponible en: www.elementos.buap.mx/num77/pdf/15.pdf
- ✓ Morgan, J.; Bending, G. & White, P. (2005). Biological costs and benefits to plant–microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. 56: 1729-1739
- ✓ Mosse, B. (1962). The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. *Journal of General Microbiology*. 27: 509–520.
- ✓ Mustafa, A.; Othman, R.; Zinal-Abidin, M. & Ganesan, V. (2010). Growth response of sweet corn (*Zea mays*) to *Glomus mosseae* inoculation over different plant ages. *Asian J. Plant Sci*. 9 (6): 337-343
- ✓ Nair, M.; Safir, G. & Siqueira, J. (1991) Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza-stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. *Appl Environ Microbiol* 57: 434-439
- ✓ Orrico, D.; Ulloa, S. & Medina, M. (2013). Efecto de los hongos micorrícicos arbusculares y *Pseudomonas fluorescens* en el control de *Meloidogyne* spp. en plantas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*). *Comité editorial*. 15 (1): 1-10.
- ✓ Ortíz, R.; Contreras, H.; Macías, L. & López, J. (2009). The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal Behav*. 4: 701–712.

- ✓ Pace, N.; Sapp, J. & Goldenfeld, N. (2012). Phylogeny and beyond: Scientific, historical, and conceptual significance of the first tree of life. *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America*, Washington. 4: 1011-1018.
- ✓ Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*. 6 (10): 763–775
- ✓ Pearson, V. & Read, D. (1975) Physiology of mycorrhizal endophyte of *Calluna vulgaris*. *Trans Brit Mycol Soc*. 64: 1-7.
- ✓ Paul, E. (2014). *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. Academic press.
- ✓ Pedraza, R. O., Teixeira, K. R., Scavino, A. F., de Salamone, I. G., Baca, B. E., Azcón, R., & Bonilla, R. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 11 (2): 155-164.
- ✓ Pedrós-Alió, C. (2012). The rare bacterial biosphere. *Annual review of marine science*. 4: 449-466.
- ✓ Pérez, J. (2017). Caracterización y efecto de *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* asociadas a *Ipomoea batatas* del Caribe colombiano. Córdoba, Colombia
- ✓ Peter, M.; Franco, L.H.; Schmidt, A.; Hincapié, B. 2011. Especies forrajeras Multipropósito: Opciones para productores del trópico americano. CIAT. p. 212
- ✓ Plenchette, C.; Fortin, J. & 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 Soil*. 70: 199-209.
- ✓ Pozo, M.; López, J.; Azcón, C. & García, J. (2015). Phytohormones as integrators of environmental signals in the regulation of mycorrhizal symbioses. *New Phytol*. (205): 1431–1436.
- ✓ Ragot, S.; Kertesz, M. & Bünemann, E. (2015). Diversity of the *phoD* alkaline phosphatase gene in soil. *Appl. Environ. Microbiol*. 81: 7281–7289
- ✓ Ramírez, F.; Ulloa, M. & Medina, M.E. (2013). Efecto de la inoculación combinada de hongos micorrízicos arbusculares y *pseudomonas putida* en plantas de tomate de árbol (*solanum betaceum*) infectadas con *meloidogyne* spp. *Comité editorial*. 15 (1): 75-86.
- ✓ Redecker, D.; Morton, J. & Bruns, T. (2000). Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 14 (2): 276-284.
- ✓ Reyes, I. (2011). La micorriza arbuscular (MA) centro de la rizósfera: comunidad microbiológica dinámica del suelo. *Revista Contactos*. 81: 17-23.
- ✓ Roling, W. 2007. Do microbial numbers count? Quantifying the regulation of biogeochemical fluxes by population size and cellular activity. *Fems microbiology and ecology*. 62: 202-210.
- ✓ Sala, V.; Freitas, S. & Silveira, A. (2007). Interação entre fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas em trigo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42 (11): 1593-1600.

- ✓ Sánchez, I. (2009). Análisis de la estructura y diversidad de las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares asociados a plantas de especial interés ecológico en ambientes mediterráneos. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- ✓ Sánchez, N. (2010). Selección de cepas nativas de bacterias diazotróficas simbióticas, asociadas a *Leucaena leucocephala*, en el valle del Cesar y la Guajira. Bogotá, Colombia.
- ✓ Sgroy, V.; Cassán, F.; Masciarelli, O.; Del Papa, M.; Lagares, A. & Luna, V. (2009). Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Applied microbiology and Biotechnology*. 85: 371-381.
- ✓ Sieverding, E. (1991). Vesicular arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Technical cooperation. CTZ, Eschborn, Germany. 371 p.
- ✓ Singh, C.; Kapoor, A. & Wange, S. (1991) The enhancement of root colonisation of legumes by vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi through the inoculation of the legume seed with commercial yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Plant Soil*. 131:129-133
- ✓ Siqueira, J. & Franco, A. (1988). *Biotechnologia do solo: fundamentos e perspectivas*. Brasília: MEC/ABEAS; Lavras: ESAL/Faepe, p. 125-178.
- ✓ Siqueira, J.; Safir, G. & Nair, M. (1991) Stimulation of vesicular arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. *New Phytol*. 118: 87-93
- ✓ Smith, S. (1966) Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition. *New Phytol*. 65 (4): 488.
- ✓ Smith, S. & Read, D.(2010) *Mycorrhizal symbiosis*. 3ra edición. New york: Elsevier, Academic Press.
- ✓ Sridevi, M.; Mallaiah, K. & Yadav, N.. (2007). Phosphate Solubilization by *Rhizobium* Isolates from *Crotalaria* Species. *Journal of Plant Sciences*. 2 (6): 635-639.
- ✓ Stjohn, B., Smith, S., Nicholas, D. & Smith, F. (1985) Enzymes of ammonium assimilation in the mycorrhizal fungus *Pezizella-ericae* Read. *New Phytol* 100(4), 579-584.
- ✓ Suarez, C.; Ramirez, F.; Monroy, O.; Alazard, D. & Fernandez, L. (2004). La vida a altas temperaturas: adaptación de los microorganismos y aplicación industrial de sus enzimas. *Ciencia*, 55 (1): 56-65.
- ✓ Tisdall, J.; Smith, S. & Rengasamy, P. (1997) Aggregation of soil by fungal hyphae. *Australian Journal of Soil Research*. 35 (1): 55-60.
- ✓ Toro, M.; Azcón, R. & Barea, J. (1997). Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (P 32) and nutrient cycling. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 4408–4412
- ✓ Torsvik, V.; Ovreas, L. & Thingstad, T. (2002). Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*. 296: 1064–1066

- ✓ Valerio, S. (2016). Respuesta Morfofisiológica y expresión de genes Pht1 de cuatro cultivares de *Zea mays* L. inoculados con Hongos Micorrízicos Arbusculares bajo dos concentraciones de fósforo inorgánico. Tesis Magister. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
- ✓ Vance, P., Uhde-Stone, C. and Allan, L. (2003). Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist*, 157(3): 423–447.
- ✓ Vandenkoornhuyse, P.; Husband, R.; Daniell, T.; Watson I.; Duck, J.; Fitter, A.; Young, J. (2002). Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. Department of Biology, University of York. *Molecular Ecology*. 11 (8): 1555-1564.
- ✓ Vargas, T. & Villazante, L. (2014). Clasificación de los Microorganismos. *Revista de Actualización Clínica Investiga*. 44: 2309.
- ✓ Vierheilig, H.; Coughlan, A.; Wyss, U. & Piche, Y. (1998) Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 5004–5007.
- ✓ Vivas, A.; Marulanda, A.; Ruiz-Lozano, J.; Barea, J. & Azcón R. (2003). Influence of a *Bacillus* sp. on physiological activities of two arbuscular mycorrhizal fungi and on plant responses to PEG-induced drought stress. *Mycorrhiza*. 13: 249–256.
- ✓ von Alten, H.; Lindemann, A. & Schonbeck, F. (1993) Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza by fungicides or rhizosphere bacteria. *Mycorrhiza*. 2: 167-173.
- ✓ Vósatka, M. & Gryndler M. (1999). Treatment with culture fractions from *Pseudomonas putida* modifies the development of *Glomus fistulosum* mycorrhiza and the response of potato and maize plants to inoculation. *Applied Soil Ecology*. 11: 245–251.
- ✓ Walley, F. & Germida, J. (1997). Response of spring wheat (*Triticum aestivum*) to interactions between *Pseudomonas* species and *Glomus clarum* NT4. *Biology and Fertility of Soils*. 24: 365–371.
- ✓ Wang, F.; Liu, X.; Shi, Z.; Tong, R.; Adams, C. & Shi, X. (2015) Arbuscular mycorrhizae alleviate negative effects of zinc oxide nanoparticle and zinc accumulation in maize plants- A soil microcosm experiment/ *Chemosphere* –Elsevier. 147: 88-97
- ✓ Werner, G.; Strassmann, J.; Ivens, A.; Engelmoer, D.; Verbruggen, E.; Queller, D.; Noe, R.; Johnson, N.; Hammerstein, & Kiers, E. (2014). Evolution of microbial markets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111 (4): 1237-1244.
- ✓ Woese, C.; Kandler, O.; Wheelis, M. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87 (12): 4576–4579.

- ✓ Xiang, X.; Gibbons, S.; He, J.; Wang, C.; He, D.; Li, Q.; Ni, Y. & Chu, H. (2016) Rapid response of arbuscular mycorrhizal fungal communities to short-term fertilization in an alpine grassland on the Qinghai-Tibet Plateau. 4: 2226
- ✓ Xie, Z.; Staehelin, C.; Vierheilig, H.; Wiemken, A.; Jabbouri, S.; Broughton, W.; Vogel-Lange, R. & Boller, T. (1995). Rhizobial Nodulation Factors Stimulate Mycorrhizal Colonization of Nodulating and Nonnodulating Soybeans. *Plant Physiology*. 108 (4): 1519-1525.
- ✓ Yu, T.; Egger, K. & Peterson, R. (2001) Ectendomycorrhizal associations - characteristics and functions. *Mycorrhiza*. 11(4): 167-177.

11 ANEXOS

Anexo 1. Estructuras fúngicas encontradas en raíces colectadas 20 días después de la emergencia de la planta

