

PRE-SELECCION DE PLANTAS NATIVAS Y PRODUCCIÓN DE INÓCULOS DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (HMA) DE RELEVANCIA EN LA REHABILITACION DE ÁREAS DEGRADADAS DE LA GRAN SABANA, ESTADO BOLÍVAR, VENEZUELA.

PRE-SELECTION OF WILD PLANT SPECIES AND PRODUCTION OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI (AMF) INOCULA RELEVANT FOR THE REHABILITATION OF DEGRADED AREAS OF LA GRAN SABANA, BOLIVAR STATE, VENEZUELA.

*Gisela Cuenca*¹, *Zita De Andrade*¹, *Milagros Lovera*¹, *Laurie Fajardo*¹, *Erasmus Meneses*¹,
*Milagro Márquez*² y *Rubén Machuca*²

¹Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Centro de Ecología, Apartado 21827, Caracas 1020-A, Venezuela. Fax: 58(0)212 5041088. E-mail: gcuenca@ivic.ve.

²CVG-Autoridad Gran Sabana, Estación Científica de Parupa, La Gran Sabana, estado Bolívar, Venezuela.

RESUMEN

Las micorrizas arbusculares (MA) son una simbiosis importante para la nutrición mineral de las plantas, la protección contra patógenos y la recuperación de áreas degradadas. Aunque los hongos que forman este tipo de micorrizas no pueden crecer en ausencia de una planta hospedadora, actualmente es factible la producción de inóculos de hongos MA (HMA) para plantas que tienen una fase de vivero, almácigo o semillero. En el presente trabajo se realizaron pruebas de germinación de varias especies nativas de La Gran Sabana, apropiadas para la reforestación de áreas degradadas y se describe un método simple para reproducir inóculos de MA. Los inóculos producidos fueron evaluados utilizando varios criterios, tales como el número de esporas producidas, también a través del Número Más Probable de Propágulos infectivos y el efecto en el peso seco de las plantas colonizadas. Se evaluó su eficiencia en condiciones de campo. Se recomienda el uso de *Clusia pusilla* y *Gongylolepis benthamiana* para reforestar áreas degradadas, debido a su elevado porcentaje de germinación y tolerancia a condiciones de alta irradiación. El criterio más apropiado para determinar el poder micorrízico de los inóculos, fue el peso seco de las plantas hospederas, por considerarlo más consistente que la producción de esporas. Dado los efectos beneficiosos de las micorrizas, la producción de inóculos de HMA debería ser una práctica normal en los viveros venezolanos.

Palabras clave: MA, micorrizas arbusculares, especies nativas tropicales, reforestación, recuperación de áreas degradadas, producción de inóculos de HMA, germinación.

ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizas (AM) are important for mineral nutrition of plants, protection against plant pathogens and reclamation of degraded lands. Fungi forming this kind of mycorrhizas are unable to grow in axenic culture. However, they can be applied successfully in cultures that have a nursery or seed-bed stage before transplantation to the field. In this work native plant species useful for reforestation of degraded lands in La Gran Sabana (LGS), Venezuela, were selected. In addition, a simple method for the reproduction of AM inocula is described. The inocula produced were evaluated by the Most Probable Number (MPN) method and by their effect on the growth of *Clusia pusilla* in the field. *C. pusilla* and *Gongylolepis benthamiana* are suitable to use in afforestation due to their high percentage of germination and tolerance to high irradiance. Dry weight of host plants resulted the best criterion for predicting the mycorrhizal inoculum potential of the inocula. Spore number resulted a bad predictor of it. AM inocula production should be a routine practice in Venezuelan nurseries.

Key words: AM, arbuscular micorrizas, indigenous tropical species, afforestation, rehabilitation of degraded areas, AMF inoculum production, germination.

INTRODUCCIÓN

Las micorrizas arbusculares (MA) han sido estudiadas intensamente en los últimos años y sus efectos beneficiosos son actualmente indiscutibles en la nutrición mineral de las plantas, la protección contra estreses abióticos y bióticos (patógenos) y la recuperación de áreas degradadas (Smith y Read 1997, Cuenca *et al.* 1998a). Existen varios tipos de micorrizas pero las más difundidas en la naturaleza son las micorrizas arbusculares que dominan en las zonas tropicales (Brundrett 1991, Janos 1996).

En Venezuela existe una tasa creciente de deforestación que ha sido especialmente intensa al sur del Orinoco, debido a la creciente actividad minera para la extracción de oro y diamantes, la construcción de carreteras, la ampliación de áreas de conuco y el concomitante incremento en la frecuencia de incendios, los cuales afectan incluso a regiones supuestamente protegidas del impacto humano como el Parque Nacional “Canaima” (Huber y Febres 2000, Fölster y Dezzeo 1994).

Tradicionalmente en Venezuela, se han utilizado especies exóticas de rápido crecimiento como los pinos y eucaliptos, para la recuperación de áreas degradadas. Quizá ello se debe al escaso conocimiento que se tiene de la biología de las especies nativas y a las bajas tasas de crecimiento que suelen presentar las especies que crecen en suelos naturalmente ácidos y pobres en nutrientes como los de gran parte del territorio venezolano, al sur del Orinoco.

Hoy en día se sabe que la introducción de especies que forman ectomicorrizas (como los pinos y eucaliptos) en áreas que han estado previamente dominadas por especies que forman micorrizas arbusculares pueden perturbar seriamente el funcionamiento de los ecosistemas, especialmente en lo relacionado con el ciclo del carbono (Chapela *et al.* 2001). Además, estos suelos son tan pobres que no soportan el crecimiento de especies con altas demandas de nutrientes.

Por su parte, la producción de inóculos de MA ofrece muchas dificultades debido a la imposibilidad de cultivar los hongos que forman esta simbiosis (Glomeromycota) en condiciones axénicas, lo cual ha sido imposible hasta el presente debido a la obligatoriedad que presentan dichos hongos a la asociación con una planta hospedera (Azcón-Aguilar *et al.* 1999). A pesar de estas restricciones actualmente es factible la producción de inóculos

de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) para ser aplicados en plantas que tienen una fase de vivero, almácigo o semillero (Siquiera *et al.* 1998, Silva y Siquiera 1991). La aplicación de los inóculos de HMA a gran escala constituye por ahora un reto para la ciencia. Por otra parte, esta simbiosis tiene la ventaja de no presentar una especificidad taxonómica marcada, aunque sí se ha descrito que el número de hospedadores potenciales para una especie de HMA puede ser más restringido en condiciones naturales que en experimentos de invernadero, lo que indicaría la existencia de una cierta “especificidad ecológica” (Mc Gonigle y Fitter 1990).

A la luz de estos hechos, el presente trabajo tiene como objetivos: a) pre-seleccionar especies de plantas nativas de La Gran Sabana (LGS), de elevado porcentaje de germinación, b) describir un método simple para reproducir inóculos de micorrizas arbusculares, utilizables en los viveros de LGS c) probar distintos procedimientos para evaluar el potencial micorrízico de los inóculos de micorrizas arbusculares producidos en vivero y d) una vez seleccionadas las especies nativas, evaluar su desempeño al ser inoculadas con los HMA preseleccionados en un suelo de LGS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preselección de especies de plantas nativas de La Gran Sabana.

Se recolectaron semillas de plantas de diversos ecosistemas de LGS, a lo largo de un año. Simultáneamente se colectaron muestras botánicas para la posterior identificación de las especies.

En los casos en los que las semillas presentaron arilo, éste fue cuidadosamente eliminado antes de realizar la prueba de germinación e igualmente cuando la testa era muy gruesa, se escarificaron con ácido sulfúrico concentrado por 30 minutos. Las semillas fueron embebidas en agua destilada, colocadas en germinadores en el laboratorio de Ecología de Suelos del IVIC (temperatura media entre 20 y 25 °C), y observadas durante un lapso de aproximadamente 3 meses. Al final del período de observación se registró el tiempo transcurrido para la germinación y el % de germinación, en cada caso.

Producción de inóculos de micorrizas arbusculares

En el presente trabajo se prepararon algunos inóculos puros de HMA y algunos inóculos mixtos provenientes de sabanas y arbustales de LGS, que

consideramos serían los más apropiados para utilizarlos en la recuperación de estos ecosistemas, los cuales están siendo sometidos a una intensa degradación.

La metodología utilizada para producir los inóculos de MA adaptados a las condiciones de LGS, consistió en tomar muestras de suelo de la capa superficial (0-20 cm) directamente del campo, secarlo ligeramente al aire, mezclarlo con arena previamente esterilizada en proporción 1:1 y luego colocarlo en "contenedores trampa" con una planta hospedadora altamente micorrízica, durante 4 meses. Al cabo de ese tiempo la planta se dejó secar para favorecer aún más la esporulación (Morton *et al.* 1993). Luego el contenido del contenedor se colocó en bolsas plásticas cerradas, incubándolas por un periodo de 1 a 4 meses para romper la latencia de las esporas a una temperatura entre 20-25°C recomendada para especies tropicales (Morton *et al.* 1993).

A los cuatro meses se seleccionaron los "contenedores trampa" más adecuados para producir los inóculos de HMA basándonos en el número de esporas que presentaban y vitalidad de las mismas. Para aislar las esporas de HMA de cada contenedor trampa se utilizó el método del tamizado húmedo y posterior centrifugación en sacarosa según Sieverding (1991). Bajo el estereomicroscopio se reunieron los grupos de esporas de morfología similar. De cada morfotipo se preparó una lámina permanente utilizando como medio de montaje alcohol polivinílico en lactoglicerina (PVLG) según Koske y Tessier (1983). Con la ayuda de la literatura especializada se procedió a identificar las esporas hasta nivel de género y cuando fue posible hasta nivel de especie utilizando un microscopio provisto de un sistema de contraste de interferencia. Los especímenes de dichas muestras fueron registrados y mantenidos en el herbario de HMA del IVIC, donde están disponibles para consulta.

Las esporas consideradas de la misma especie, se colocaron en grupos de 25 a 100 esporas en envases de 120 cm³ que contenían suelo de LGS esterilizado y mezclado a partes iguales con arena estéril. En cada envase se sembraron una o dos plántulas nativas de LGS, manteniéndolos en condiciones de invernadero durante 4 meses, para luego verificar si el intento de purificación de estos inóculos había tenido éxito o no.

Posteriormente el resto del suelo de cada contenedor trampa se mezcló de nuevo con arena

estéril y se colocó en contenedores más grandes (aprox. 3 kg), con *Vigna luteola* como planta hospedadora, para así multiplicar el contenido original. Ello permitió reiniciar el proceso de purificación en los casos en los que fue necesario o producir los inóculos mixtos que también se requerían para este trabajo.

Las especies de HMA presentes en los inóculos mixtos fueron aisladas y se prepararon láminas permanentes, utilizando los métodos señalados anteriormente.

Reproducción a mayor escala de los inóculos seleccionados (Vivero en LGS).

Para realizar esta actividad se utilizaron contenedores plásticos de 43 cm x 37 cm x 26 cm (aproximadamente 41 litros/contenedor) que se llenaron con: dos partes de suelo orgánico, 1 parte de suelo de la sabana de los alrededores de la Estación Científica de Parupa (ECP) en LGS y arena estéril (1/8). Dicho sustrato se esterilizó con Basamid a la dosis recomendada (60 g/m²). Después de aplicado el fungicida, el suelo se cubrió herméticamente con un plástico durante una semana, y posteriormente se aireó durante 7 días más. Luego se procedió a inocular el suelo con los HMA previamente seleccionados utilizando 300 g de inóculo por contenedor y *V. luteola* como planta hospedadora. Los inóculos se mantuvieron en el vivero de la ECP por un período mínimo de 4 meses.

Evaluación rápida de los inóculos de HMA reproducidos en La Gran Sabana.

Los inóculos producidos en la ECP, fueron evaluados a los 2 y a los 4 meses de iniciada la producción. Para la primera evaluación se extrajeron las esporas presentes (Sieverding 1991) y se contaron sólo las que poseían contenido lipídico (característica indicadora de vitalidad). Para la evaluación realizada a los 4 meses, se tomaron muestras de las raicillas de la planta hospedadora y también se aislaron las esporas de HMA presentes en los contenedores a dos profundidades de la misma (0-10 cm y 11-20 cm) siguiendo la metodología descrita por Sieverding (1991). Las raicillas se tiñeron con azul de tripán (Phillips y Hayman 1970) y el % de colonización se determinó utilizando el método de Giovannetti y Mosse (1980). También se evaluó el peso seco de la parte aérea de las plantas hospedadoras, como una medida adicional indicadora de la efectividad de los inóculos.

Tabla 1. Resultados de la prueba de germinación de algunas especies nativas de La Gran Sabana, estado Bolívar, Venezuela

Nombre científico	Familia	Fecha de colección	Lugar de recolección	Condiciones para la germinación	N° de semillas probadas
<i>Gongylolepis berthamiana</i>	Asteraceae	Mayo, Julio y Enero	Arbustal El Jardín y de Iboribó	Embebidas en agua	88
<i>Cyrilla racemiflora</i>	Cyrtillaceae	Diciembre	Arbustal de Maremán y de Iboribó	Embebidas en agua	70
<i>Clusia schomburgkiana</i>	Clusiaceae	Julio	Luepa	Embebidas en agua	250
<i>Clusia pusilla</i>	Clusiaceae	Julio, Agosto	Arbustal El Jardín	Embebidas en agua	50
<i>Clusia grandiflora</i>	Clusiaceae	Julio	Estación Científica de Parupa	Embebidas en agua	270
<i>Clusia sp.</i>	Clusiaceae	Enero	Quebrada Arapán	Embebidas en agua	100
<i>Vismia sp.</i>	Clusiaceae	Enero	Estación Científica de Parupa	Embebidas en agua	20
<i>Chamaecrista flexuosa</i>	Leguminosae	Octubre	Arbustal de Iboribó	Embebidas en agua	58
<i>Chamaecrista sp.</i>	Leguminosae	Octubre	Arbustal de Iboribó	Embebidas en agua	50
<i>Dimorphandra macrostachya</i>	Leguminosae	Julio	Estación Científica de Parupa	30 min H ₂ SO ₄ y embebidas en agua	30
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Malpighiaceae	Julio, Enero	ECP, arb. El Jardín y del Kamá	30 min H ₂ SO ₄ y embebidas en agua	30
<i>Macaírea parvifolia</i>	Melastomataceae	Enero, Marzo	Arbustal de Iboribó y de Sakaiká	Embebidas en agua	180
<i>Tococa guianensis</i>	Melastomataceae	Enero	Estación Científica de Parupa	Embebidas en agua	100
<i>Pagamea sp.</i>	Rubiaceae	Enero	Arbustal de Iboribó	Embebidas en agua	58
<i>Axonopus sp.</i>	Poaceae	Julio	San Rafael de Kamoirán, Km 196	Embebidas en agua	648
<i>Axonopus anceps</i>	Poaceae	Julio	San Rafael de Kamoirán, Km 196	Embebidas en agua	160
<i>Echinolaena inflexa</i>	Poaceae	Julio	Sabanas via ECP	Embebidas en agua	138
<i>Bonnetia sessilis</i>	Theaceae	Enero, Mayo	Arbustal El Jardín y de Sakaiká	Embebidas en agua	430
<i>Ternstroemia crassifolia</i>	Theaceae	Enero	Arbustal de Iboribó	Alcohol y Embebidas en agua	34

Estimación del número más probable (NMP) de propágulos infectivos de micorrizas arbusculares presente en cada uno de los inóculos.

Simultáneamente con la evaluación rápida de los inóculos pre-seleccionados, se procedió a determinar el Número más Probable de propágulos infectivos presentes en los mismos. Para ello se utilizó la metodología propuesta por Porter (1979). De acuerdo a ello, se procedió a diluir el inóculo de HMA en cada caso con un suelo similar al usado para su preparación, pero esterilizado previamente en el reactor del IVIC (8kGy). Se prepararon diluciones seriadas de 4^0 , 4^{-1} , 4^{-2} , 4^{-3} , 4^{-4} , 4^{-5} , 4^{-6} , 4^{-7} y 4^{-8} del suelo problema y de cada una de las series se hicieron quintuplicados, los cuales se utilizaron para llenar contenedores de 350 cm³ de capacidad, obteniéndose así 45 contenedores para cada inóculo a evaluar. Se utilizó como planta hospedadora *V. luteola* y el bioensayo se mantuvo en el invernadero del IVIC por ocho semanas al final de las cuales se cosecharon todas las plantas.

Los sistemas radicales fueron extraídos con mucho cuidado con el fin de que la pérdida de raicillas fuese mínima. Las raicillas de cada contenedor se tiñeron con azul de tripán siguiendo la metodología de Phillips y Hayman (1970) y posteriormente fueron revisadas bajo el microscopio estereoscópico o el microscopio óptico (cuando había dudas) para evaluar la presencia de algún indicio de colonización micorrízica. Se construyeron tablas donde se cuantificó la presencia o ausencia de MA para cada planta y se calculó el NMP de propágulos de MA presentes en cada inóculo basándose en dichas tablas y siguiendo a Porter (1979).

Evaluación del crecimiento en el campo de plántulas nativas inoculadas con HMA en la fase de vivero.

Una vez que se seleccionó la planta nativa (*C. pusilla*), se colectaron semillas de esta especie, las cuales se pre-germinaron en arena estéril y se mantuvieron allí por dos meses hasta el total despliegue de los cotiledones. A los dos meses las plántulas se sembraron en contenedores de 5 kg de capacidad que contenían suelo proveniente de un bosque cercano a la ECP. Dicho suelo es franco arenoso y posee un pH de 4,7, 6,2% de materia orgánica, 0,20% de nitrógeno total y 3,7 µg g⁻¹ de P intercambiable (método de las membranas de Tiessen y Moir 1993).

Previamente al establecimiento del ensayo estos suelos fueron esterilizados utilizando Basamid, de manera similar a lo descrito para el sustrato utilizado en la preparación de los inóculos.

El ensayo consistió en los siguientes tratamientos:

C: Plantas no micorrizadas

M1: Plantas inoculadas con *Glomus manihotis* en la dosis de 50 g de inóculo/ planta.

M2: Plantas inoculadas con el inóculo Sabana-3 en la dosis de 50 g de inóculo /planta.

M3: Plantas inoculadas con el inóculo Arbustal-9 en la dosis de 70 g de inóculo /planta.

Al tratamiento control (C) se le agregó una mezcla de los tres inóculos utilizados pero previamente esterilizados con radiaciones gamma (8 kGy), con el fin de garantizar su inactividad. A todos los tratamientos se los fertilizó cada 15 días, con N, K y Mg a la dosis de 20, 20 y 10 mg/planta respectivamente. Para preparar las soluciones nutritivas se utilizaron los pesos adecuados de N_0_3NH_4 , KCl y $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Se sembraron 10 repeticiones por tratamiento dando un total de 40 plántulas en todo el ensayo.

Después de sembrar todas las plantas se agregó a cada una de las bolsas un lixiviado de microorganismos del suelo, el cual fue preparado a partir de una dilución del suelo sin esterilizar con agua destilada (1 kg de suelo/litro) que fue filtrado con la ayuda de una bomba de vacío a través de un papel de filtro Whatman n°1. El filtrado fue diluido con agua destilada hasta obtener una solución al 5% y de ella se agregaron 40 ml a cada contenedor con la finalidad de reintroducir los microorganismos (distintos a los HMA) que originalmente estaban presentes en el suelo.

El experimento se mantuvo en el vivero de la ECP por cuatro meses al final de los cuales las plantas se transplantaron a un área degradada libre de propágulos de HMA (ver descripción en Cuenca *et al.* 2002), donde se mantuvieron por once meses más. Al final del experimento se midió la altura de las plantas y se cosechó el vástago de tres plantas de cada tratamiento con el fin de determinar su peso seco. También se tomó una muestra de las raicillas con el fin de determinar la presencia de micorrizas. Para ello las muestras fueron teñidas con azul de tripán (Phillips y Hayman 1970) y se determinó la presencia de micorrizas, vesículas y arbusculos siguiendo el método de Mc Gonigle *et al.* (1990).

MICORRIZAS RELEVANTES EN REHABILITACION DE AREAS DEGRADADAS

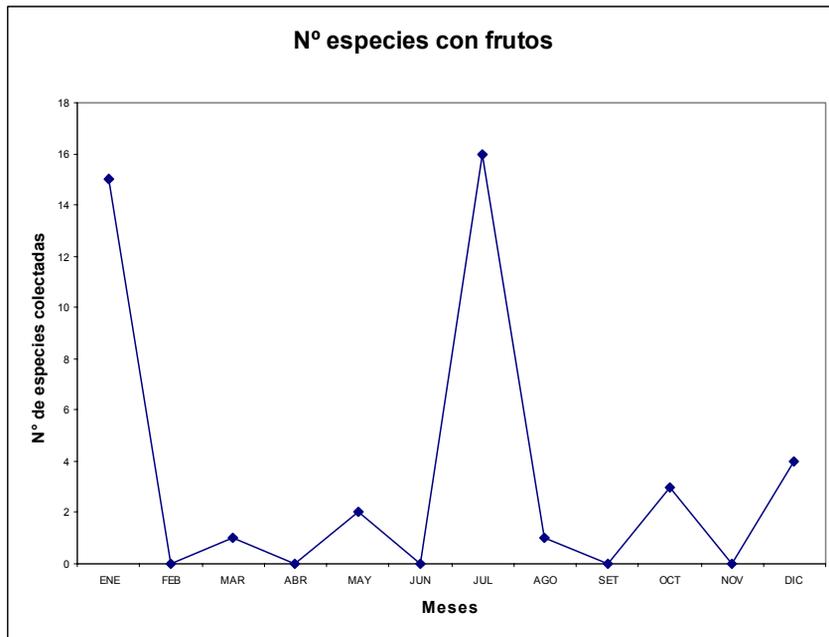


Figura 1. Número de especies de plantas colectadas con frutos maduros en los muestreos realizados a lo largo de 1 año en La Gran Sabana, estado Bolívar, Venezuela.

Tabla 2. Origen de los inóculos de hongos micorrízicos arbusculares reproducidos en la Estación Científica de Parupa, La Gran Sabana, estado Bolívar, Venezuela.

Número del Cultivo	Inóculo	Origen de la Cepa
IVIC-324	Sabana 1	Sabana de <i>Trachypogon plumosus</i> cerca del Aeropuerto de Luepa (5° 46' N 61° 13' W), La Gran Sabana, Edo. Bolívar.
IVIC-261	Sabana 3	Sabana dominada por <i>Axonopus</i> sp. En la ruta hacia Iboribó (5°38' N 61°36' W), La Gran Sabana, Edo. Bolívar.
IVIC-198	Arbustal 198	Arbustal esclerófilo km 198 con muchos individuos de <i>Clusia pusilla</i> (5° 26' N 61° 14' W).
IVIC-9	Arbustal 9	Arbustal esclerófilo a 1 km del salto del Kamá (5° 25' N 61° 13' W), con <i>Clusia pusilla</i> , <i>Bonnetia sessilis</i> , etc. como especies dominantes.
C-21	<i>Acaulospora spinosa</i>	Instituto de Ecología y Sistemática (IES), La Habana, Cuba.
IVIC-44	<i>Acaulospora lacunosa</i>	Bosque en galería cerca de la ECP en La Gran Sabana, (5°40' N 61° 31' W).
IVIC-390	<i>Glomus manihotis</i>	Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.

Tabla 3. Evaluación del número de esporas a los dos y cuatro meses de iniciada la reproducción de los inóculos en la ECP. Porcentaje de colonización micorrizica (%MA) y peso seco de las plantas hospedadoras a los cuatro meses de iniciada la producción.

TIPO DE INÓCULO	N° esporas/100 g de inóculo		% MA	Peso seco de las plantas hospedadoras (g)
	2 meses	4 meses*		
Sabana 1	384	64	75,45	32,1
		103		
Sabana 3	128	6	83,47	32,5
		17		
Arbustal 198	nd	0	10,69	34,2
		30		
Arbustal 9	121	67	25,72	74,0
		6		
<i>Acaulospora lacunosa</i>	171	0	57,16	51,3
		0		
<i>Acaulospora spinosa</i>	1114	199	33,64	51,3
		5		
<i>Glomus manihotis</i>	67	654	79,40	61,5
		1458		

* A los 4 meses, el número de esporas se evaluó a dos profundidades en la cesta de producción: de 0-10 cm y de 11-20 cm de profundidad.

Estadística

Los datos de altura, peso seco y colonización micorrizica de las plantas sometidas a los distintos tratamientos fueron comparados utilizando un análisis de varianza de una vía y el test de Tukey para $p < 0,05$. Previo al análisis estadístico, los datos relativos a la colonización micorrizica, fueron transformados por el arcoseno (Zar 1996).

RESULTADOS

En la Tabla 1 puede verse la lista de las especies nativas de LGS cuyas semillas fueron recolectadas y los resultados de las pruebas de germinación. Las especies del género *Clusia* además de *Tococa guianensis*, *Macairea parvifolia*, *Ternstroemia crassifolia* y *Dimorphandra macrostachya* se destacan por presentar altos niveles de germinación.

Adicionalmente, las semillas de las especies mencionadas presentaron la germinación más rápida dentro de las especies estudiadas (salvo *T. crassifolia*, todas germinaron en una semana o menos). *Gongylolepis benthamiana* mostró valores medios de % de germinación mientras que *Pagamea* sp., *Bonnetia sessilis*, *Cyrilla racemiflora* y las dos especies de *Chamaecrista* presentaron % de germinación muy bajos. *Bonnetia sessilis* resultó ser la especie que tardó más tiempo en germinar (47 días). Finalmente, las semillas que no germinaron después de tres meses de observaciones en nuestras condiciones experimentales fueron las de: *Byrsonima crassifolia*, *Axonopus* sp., *Axonopus anceps*, *Echinolaena inflexa* y *Vismia* sp. En general se observó una tendencia a la mayor presencia de frutos maduros en los meses de enero y julio (Figura 1).

MICORRIZAS RELEVANTES EN REHABILITACION DE AREAS DEGRADADAS

Tabla 4. Breve descripción de las esporas presentes en los inóculos de a) Sabana y b) Arbustal, reproducidos en la ECP. La denominación de los componentes de la pared de las esporas se hizo según Walker (1983). U= componente unitario; E= componente evanescente; L= componente laminado; M=componente membranoso.(.)= componente ornamentado.

Nombre provisional de la especie	Color	Diametro (µm)	Murograma	Observaciones	Figura
<i>a) Inóculo de Sabana</i>					
<i>Scutellospora cf gilmorei</i>	Hialino, suspensor color crema	267 x 254	A(ULM)B(M) C(MMM)	No tiene un escudo de germinación conspicuo. Ancho del suspensor ~49µm.	2 d
<i>Scutellospora</i> 'del escudo amarillo'	Hialino, escudo y suspensor pardo-amarillo	325 x 230, ancho del suspensor 57µm	A(ULM)B(M) C(MMM)	Muy similar a <i>S.cerradensis</i> , pero carece de papilas en el componente U.	2c
<i>Glomus</i> "ornamentado blanco"	Blanco-crema	133 x 130	A(E ₀ LM)	El componente externo evanescente está cubierto de verrugas, componente L~25 µm .	2 a
<i>Glomus</i> 'naranja ornamentado'	Marrón rojizo	105 x 110	A(E ₀ L)	La ornamentación del componente externo es similar al de la anterior. Ancho del componente L 23µm.	-
<i>Glomus</i> 'marrón'	Marrón rojizo	108 x 95	A(LM)	El componente más interno solo se ve cuando la espora está viva.	2 b
<i>b)Inóculo de Arbustal</i>					
<i>Glomus</i> 'naranja ornamentado'	Marrón rojizo	70 x 100	A(E ₀ LM)	El componente externo está ornamentado con verrugas.	2 f
<i>Glomus</i> 'marrón elíptico'	Ámbar-rojizo	68 x 93	A(LM)	Tiende a ser más largo que ancho. Esporóforo con estrechamiento en la unión.	2 e
<i>Glomus</i> "ámbar redondo"	Ámbar con hifa amarilla	90 x 100	A(LM)	Pared laminada (7-13µm) con estrías verticales. Hifa recta persistente.	-
<i>Acaulospora cf scrobiculata</i>	Amarilla	123 x 128	nd	Muy similar a la descripción de esta especie pero el color es amarillo brillante	-
<i>Entrophospora sp nov</i>	Amarilla	58 x 60	A(L)B(M) C(MMM)	Espora muy pequeña, cicatrices en ángulo recto.	2 h
<i>Glomus</i> 'deforme'	Ámbar-rojizo	160 x 85	A(LM)	Esporas de forma muy irregular y componente laminado bastante grueso. Esporóforo rara vez persistente.	2g

De los numerosos intentos de obtener cultivos puros de los HMA de LGS, solo tuvimos éxito en el aislamiento de *Acaulospora lacunosa* proveniente de un bosque en galería cercano a la ECP. Para ampliar la gama de inóculos puros que se reproducirían en la ECP, se incluyeron algunos

de colecciones internacionales con la condición de que las especies seleccionadas hubieran sido descritas para LGS previamente, por lo que se seleccionaron a *Glomus manihotis* y *Acaulospora spinosa* las cuales cumplían con dicha condición (Cuenca *et al.* 1998 b). El origen de estos cultivos

Tabla 5. Número más Probable (NMP) de propágulos de micorrizas arbusculares presentes en los inóculos preseleccionados para realizar los experimentos de campo.

Inóculo	NMP/ 100 g suelo (95% intervalo de confianza)	Número de propágulos agregados a cada planta de <i>C. pusilla</i>
<i>Glomus manihotis</i>	11054 (5173-23623)	5527 (2586-11811)
Inóculo de Sabana	901 (211-963)	450 (211-963)
Inóculo de Arbustal	8289 (3879-17714)	5802 (2715-12400)

de colección y del resto de los inóculos reproducidos en la ECP, se muestra en la Tabla 2.

A los dos meses de iniciada la reproducción de los inóculos, (Tabla 3) se destaca el de *A. spinosa* por su elevado número de esporas en contraste con el de *G. manihotis* que para esa fecha mostró el valor más bajo.

La evaluación de los inóculos a los 4 meses de iniciada su producción en la ECP (Tabla 3), indica que los que produjeron mayor colonización micorrizica (% MA) en las plantas hospedadoras, fueron Sabana-3, *Glomus manihotis* y Sabana-1. Esto no fue acompañado de una elevada producción de esporas salvo para el inóculo de *G. manihotis*, el cual presentó la mayor producción, en contraste con los resultados observados en la evaluación realizada a los 2 meses.

Los inóculos de arbustal mostraron menor poder infectivo (%MA) y concomitantemente baja producción de esporas. En general se produjeron más esporas en la parte inferior del contenedor de

producción que en la zona superior.

Los inóculos Arbustal-9 y *Glomus manihotis* fueron los que más incrementaron el crecimiento, medido como peso seco, de la planta hospedadora. Los inóculos de *Acaulospora spinosa* y *A. lacunosa* no se destacaron ni por producir un alto porcentaje de colonización ni por la producción de un elevado número de esporas, sin embargo, arrojaron valores medios en cuanto a la biomasa de *V. luteola* producida.

Basándonos en los criterios rápidos evaluados en la Tabla 3 se hizo una pre-selección de los inóculos que presentaban un mayor potencial micorrizico. *G. manihotis* fue seleccionado basándonos en su alta producción de esporas y capacidad de colonización micorrizica. Entre los inóculos procedentes de los dos arbustales se seleccionó el del Arbustal-9 por haber provocado un mayor crecimiento en las plantas hospederas a pesar de sus niveles de infección relativamente bajos. Y finalmente, se seleccionó el inóculo

Tabla 6. Altura, peso seco del vástago y presencia de micorrizas en las plántulas de *C. pusilla* después de 15 meses de tratamiento. %MA: Porcentaje de colonización micorrizica, %Arb: Porcentaje de arbusculos y %V: Porcentaje de vesículas. Control: plantas no inoculadas; M1: plantas inoculadas con *Glomus manihotis*; M2 y M3: inoculadas con una mezcla de AMF provenientes de una sabana y un arbustal de LGS, respectivamente.

Tratamiento	Altura(cm)	Peso seco del vástago (g)	% MA	% Arb.	% V
Control	1,51 ± 0,14 a	0,02 ± 0,01 a	5,8 a	0 a	0 a
M1	10,03 ± 1,20 b	3,10 ± 1,54 b	82,0 b	10,6 b	56,3b
M2	10,84 ± 1,17 b	3,97 ± 1,20 b	84,0 b	1,3 b	23,3 a
M3	9,05 ± 0,96 b	3,20 ± 2,47 b	93,3 b	3,6 b	34,6ab

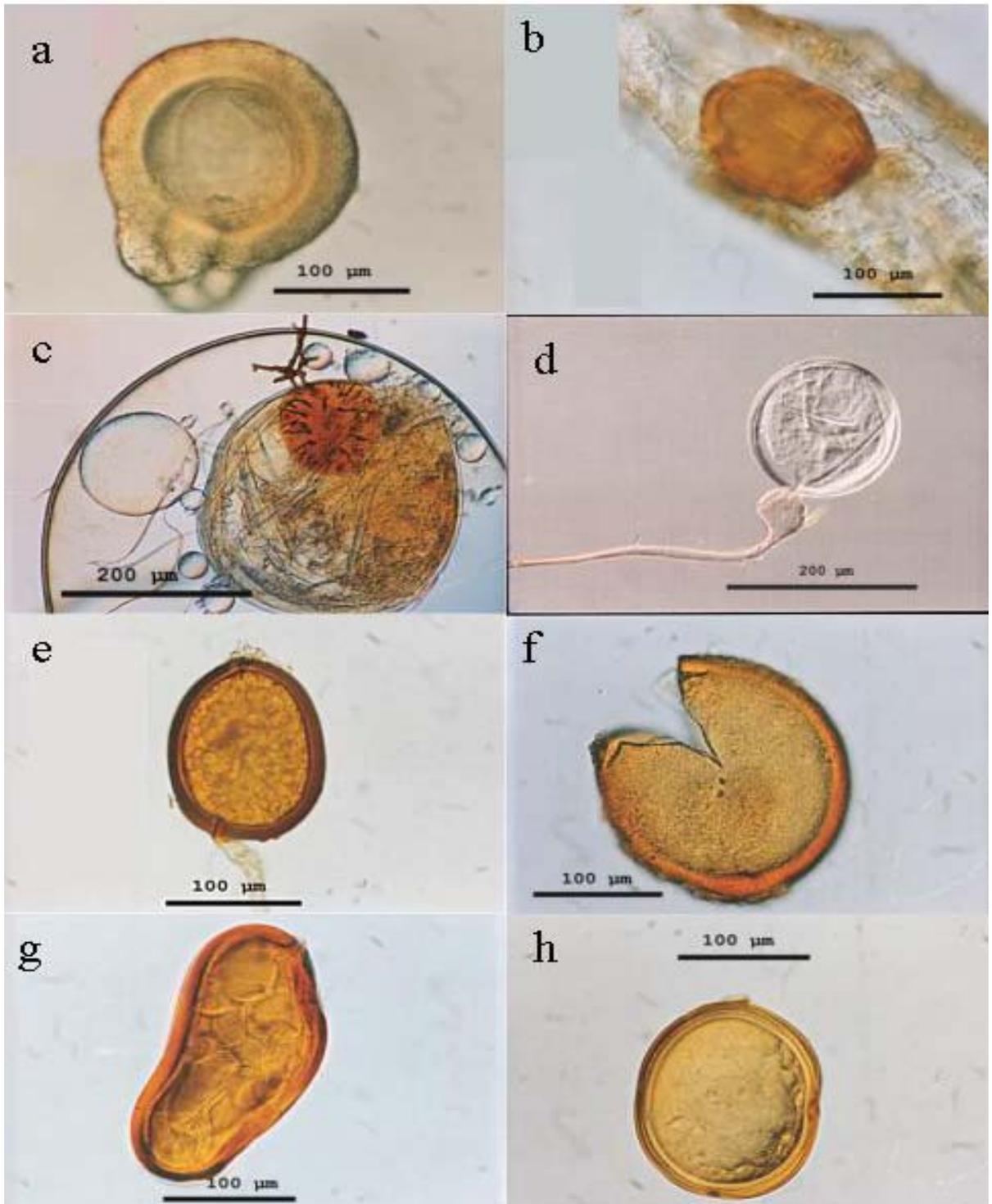


Figura 2. Esporas de hongos micorrízicos arbusculares presentes en los inóculos de sabana (a-d) y de arbustal (e-h). a) *Glomus* “ornamentado blanco”; b) *Glomus* “marrón” dentro de una raíz; c) *Scutellospora* “con escudo amarillo”, muy similar a *S. cerradensis* pero sin las ornamentaciones del componente más externo; d) Espora juvenil de *Scutellospora* cf *gilmorei*. e) *Glomus* “marrón”; f) *Glomus* “naranja ornamentado”; g) *Glomus* “deforme” y h) *Entrophospora* sp. nov.

Sabana-3 debido a su gran capacidad de formar micorrizas, aunque el crecimiento producido en las plantas hospedadoras fue francamente bajo en comparación con el provocado por los otros dos inóculos seleccionados.

En la Tabla 4 y Figura 2 aparece una breve descripción y la ilustración de las especies más abundantes presentes en los inóculos mixtos de sabana y de arbustal seleccionados. Dichas descripciones preliminares se incluyen aquí con el fin de compararlas con otras futuras, una vez que la problemática en torno a la taxonomía de los HMA sea aclarada (Schussler *et al.* 2001).

La determinación del NMP (Tabla 5) demostró que el inóculo de Sabana poseía el menor número de propágulos. En contraste, el inóculo de *G. manihotis* y el de Arbustal tenían niveles de propágulos diez veces mayores. Al agregar diferentes cantidades de inóculo a las plantas del experimento realizado con *C. pusilla* para tratar de compensar las diferencias que se presumía existían, se obtuvieron similares concentraciones de propágulos de *G. manihotis* y de Arbustal, no así del de Sabana, que resultó mucho menos concentrado.

Los resultados del crecimiento, en altura, de *C. pusilla* después de 11 meses en el campo (Tabla 6) muestran un efecto altamente significativo de la inoculación con HMA. Este efecto significativo también se observó en los resultados del peso seco (Tabla 6). No se observaron diferencias significativas entre los tres inóculos probados. Sin embargo el inóculo de *G. manihotis* produjo significativamente más vesículas que los otros.

DISCUSIÓN

Las pruebas de germinación fueron más efectivas con las especies pertenecientes a los arbustales de LGS que con las especies de la sabana. Aunque en este caso no se realizó un estudio riguroso de la germinación, pues las condiciones de luz y temperatura no fueron controladas, se podría pensar que algunas de estas semillas presentan estados de latencia siendo probable que requieran del fuego para germinar (Suárez y Baruch 1994).

Entre las plantas nativas que presentaron resultados positivos pueden recomendarse especialmente a las especies de *Clusia* y a *Gongylolepis benthamiana* por su rápida y abundante germinación. De las especies de *Clusia*

hemos preferido a *C. pusilla* por su crecimiento a plena exposición solar en condiciones naturales y su importancia tanto en arbustales intactos como en los perturbados.

Los resultados indican que enero y julio fueron los meses más apropiados para recolectar semillas maduras. Sin embargo, un estudio mucho más detallado realizado por Ramírez (2000) referido a las sabanas de LGS únicamente, no muestra tal estacionalidad. Las diferencias son atribuibles a que en nuestro caso se colectaron frutos maduros indistintamente de bosque, sabana o arbustal, por lo que la tendencia obtenida es una mezcla de las variaciones anuales de cada uno de esos ecosistemas.

Al comparar los resultados de la evaluación temprana realizada a los inóculos con los datos del NMP, se evidencia que el criterio más útil como índice para determinar rápidamente que inóculos poseían el mayor poder micorrízico, fue el peso seco de las plantas hospedadoras. Por su parte, el número de esporas resultó poco consistente y quedó evidenciado que no todos los hongos producen esporas sincrónicamente a pesar de que la planta hospedadora esté en la misma etapa de crecimiento (Gazey *et al.* 1992). En efecto, *A. spinosa* produjo sus esporas tempranamente durante los primeros meses de reproducción de los inóculos mientras *G. manihotis* las produjo mucho más tarde, indicando diferencias en la "fenología" de estas dos especies de HMA. Debido a ello concluimos, de manera similar a como lo han indicado otros autores (Morton 1993, Walker *et al.* 1982) que el número de esporas no es una medida fiable de potencial micorrízico de los suelos. Debido a la distribución agregada de las esporas, el tipo de muestreo realizado puede subestimar la diversidad y abundancia de los HMA presentes en un suelo (Clapp *et al.* 1995, Walker *et al.* 1982). Otra causa de distorsión es que la capacidad de producir esporas varía entre las distintas especies y por lo tanto utilizar el número de esporas como una medida indicadora de la importancia de determinada especie de HMA en un suelo, es una evaluación sesgada favorablemente hacia las especies que esporulan más abundantemente.

Utilizando como criterio principal la biomasa producida por las plantas hospedadoras se pre-seleccionaron tres de los inóculos producidos en la ECP. Un inóculo de arbustal, debido a que la especie seleccionada para realizar la prueba de campo *C. pusilla*, pertenece a los arbustales de LGS

(Huber 1994). También se pre-seleccionó un inóculo de sabana, porque las áreas degradadas que frecuentemente se encuentran en la zona, son principalmente sabanas (Rosales *et al.* 1997).

El utilizar inóculos mixtos se justifica plenamente, debido a que en condiciones naturales las plantas están expuestas a una mezcla de especies de HMA (van der Heijden *et al.* 1998). Adicionalmente, al utilizar inóculos mixtos, se aumentan las posibilidades de que los hongos más apropiados se hagan dominantes en la eventualidad de que las condiciones del suelo cambien con las diferentes prácticas agrícolas, forestales y en etapas sucesionales (Abbott y Gazey 1994). Sin embargo, como el uso de este tipo de inóculo implica una baja repetibilidad de los resultados, se incluyó también un inóculo puro de *G. manihotis* considerado como uno de los HMA de gran eficiencia en zonas tropicales (Sieverding 1991). *G. manihotis* existe en forma natural en los suelos de LGS, condición importante para nosotros pues al tratarse de un Parque Nacional, no es deseable la introducción de nuevas especies. Sin embargo dada la elevada diversidad genética de los HMA (Bever *et al.* 2001, Gianinazzi-Pearson *et al.* 2001), el cultivo de *G. manihotis* proveniente del CIAT utilizado aquí, puede ser muy diferente de la cepa nativa de LGS. La obtención de cultivos puros de HMA nativos de LGS, ha resultado hasta ahora muy difícil. De los muchos intentos realizados durante este trabajo, sólo se logró la reproducción con éxito de una especie, *A. lacunosa*. La dificultad de reproducir los HMA en cultivos puros es una experiencia frecuentemente reseñada en la literatura (Clapp *et al.* 1995, Walker *et al.* 1982) y que puede atribuirse a la dificultad de reproducir en un invernadero, las condiciones ecológicas exactas en las que viven las especies de HMA que se pretende propagar. De hecho, el sistema de cultivos en maceta considerado como obligatorio para los taxónomos de HMA antes de cualquier intento de clasificación o descripción de una especie nueva (Morton 1993), tienen un sesgo hacia las especies de HMA tolerantes a los ambientes de invernadero y macetas, las cuales no necesariamente son las más relevantes desde el punto de vista ecológico.

Por otra parte, entre las especies aisladas de las sabanas y arbustales, se encontraron varias especies de HMA nuevas para la ciencia. Ejemplos de ello son los dos *Glomus* ornamentados presentes en el inóculo de sabana así como la *Scutellospora*

con el escudo de germinación amarillo, que aunque es muy similar a *S. cerradensis* carece de un componente externo papilado, típico de esta especie (Spain y De Miranda 1996) con lo cual hemos concluido que se trata de una especie no descrita. Otra especie muy interesante es la pequeña *Entrophospora* amarilla que sin lugar a dudas es también no descrita.

El experimento con *C. pusilla* en condiciones de campo, mostró claramente el efecto beneficioso de las micorrizas. Por otra parte, la ausencia de diferencias entre los efectos producidos por los distintos inóculos, indica que el hecho de que el inóculo de sabana estuviese 10 veces más diluido, no fue limitante en el experimento y que por lo tanto, los tres inóculos se encontraban en concentraciones saturantes. Adicionalmente, no se evidenció especificidad entre el tipo de inóculo y la planta hospedadora.

Finalmente, los resultados de este trabajo permiten sugerir la biomasa de las plantas hospederas producida, como un criterio útil para predecir el potencial micorrízico de un determinado inóculo. Este parámetro es mucho más confiable que el número de esporas o el % de colonización contrastando fuertemente con el NMP el cual requiere de un mínimo de 6 a 8 semanas de crecimiento, siendo además sumamente laborioso.

En suma, la reproducción de inóculos de MA para ser aplicados en condiciones de vivero, almácigos o semilleros es una técnica relativamente sencilla y económica, cuya utilización debería ser una práctica normal en los viveros venezolanos. Es necesario que la comunidad de profesionales asociados a la agricultura y al manejo forestal, se convenzan de que la “revolución verde” con su uso ilimitado de insumos ya no es apropiada y debe dar paso a las prácticas de ahorro de fertilizantes utilizando los recursos biológicos propios de nuestros suelos. Por último, el uso de especies de plantas nativas en la recuperación de áreas degradadas, es sumamente importante y factible, ya que no solo se estaría garantizando el éxito de éstas, sino también el mantenimiento de la biodiversidad y equilibrio de los ecosistemas naturales.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo brindado por el CONICIT, quien ha aportado el financiamiento para llevar a cabo el presente proyecto (S1-97000498). A los ilustres botánicos Otto Huber y Gabriel Picón

quienes realizaron la identificación de todas las muestras botánicas. A la Autoridad Gran Sabana y especialmente a todo el personal de la Estación Científica de Parupa, sin cuyo apoyo hubiera sido imposible realizar este trabajo. En particular al Ing. Gabriel Picón por su apoyo durante todas las etapas de la realización de esta investigación. A los señores Ramón Capote, Luis Mujica, Marcelo Silva y Francisco Pérez Yumira por su valiosa ayuda en los trabajos de campo. Asimismo, agradecemos al Dr. Ricardo Herrera-Peraza, del Instituto de Ecología y Sistemática de La Habana, Cuba, por sus útiles comentarios relativos a los experimentos realizados en este proyecto y la donación de los inóculos de HMA.

LITERATURA CITADA

- ABBOTT, L.K. y C. GAZEY 1994. An ecological view of the formation of VA micorrizas. *Plant and Soil* 159(1):69-78.
- AZCÓN-AGUILAR, C., B. BAGO y J.M. BAREA. 1999. Saprophytic growth of arbuscular mycorrhizal fungi. Pp 391-408, *in* A. Varma, B. Hock (eds.): *Mycorrhiza*, 2nd Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- BEVER, J.D., P.A. SCHULTZ, A. PRINGLE y J.B. MORTON. 2001. Arbuscular mycorrhizal fungi: more diverse than meets the eye, and the ecological tale of why. *BioScience* 51(11):923-931.
- BRUNDRETT, M. 1991. Mycorrhizas in Natural Ecosystems. *Advances in Ecological Research* 21: 171-313.
- CHAPELA, I.H., L.J. OSHER, T.R. HORTON y M.R. HENN. 2001. Ectomycorrhizal fungi introduced with exotic pine plantations induce soil carbon depletion. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 1733-1740.
- CLAPP J. P., J. P. W. YOUNG, J. W. MERRYWEATHER y A. H. FITTER. 1995. Diversity of fungal symbiosis in arbuscular mycorrhizas from a natural community. *New Phytologist* 130: 259-265.
- CUENCA, G., Z. DE ANDRADE y G. ESCALANTE. 1998a. Arbuscular mycorrhizae in the rehabilitation of Tropical Fragile Degraded Lands. *Biology and Fertility of Soils* 26(2): 107-111.
- CUENCA, G., Z. DE ANDRADE y G. ESCALANTE. 1998b. Diversity of Glomalean spores from natural, disturbed and revegetated communities growing on nutrient-poor tropical soils. *Soil Biology and Biochemistry* 30(6): 711-719.
- CUENCA, G., Z. DE ANDRADE, M. LOVERA, L. FAJARDO, E. MENESES, M. MÁRQUEZ y R. MACHUCA. 2002. El uso de arbustos nativos micorrizados para la rehabilitación de áreas degradadas de La Gran Sabana, Estado Bolívar, Venezuela. *Interciencia* 27(4): 165-172.
- FÖLSTER, H. y N. DEZZEO. 1994. La degradación de la vegetación. Pp. 145-186, *in* N. Dezzeo (ed.): *Ecología de la Altiplanicie de La Gran Sabana* (Guayana Venezolana). Scientia Guaianae.
- GAZEY, C., L.K. ABBOTT y A. D. ROBSON. 1992. The rate of development of mycorrhizas affects the onset of sporulation and production of external hyphae by two species of *Acaulospora*. *Mycological Research* 96: 643-650.
- GIANINAZZI-PEARSON, V., D. VAN TUINEN, E. DUMAS-GAUDOT y H. DULIEU. 2001. Exploring the genome of Glomalean fungi. Pp 3-17, *in* B. Hock (ed.): *The Mycota IX*, Fungal Associations. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- GIOVANETTI, M. y B. MOSSE. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84:489-500.
- HUBER, O. 1994. Ecología de la Altiplanicie de La Gran Sabana (Guayana Venezolana) I. La vegetación. *Arbustales*. N. Dezzeo, editora. Scientia Guaianae 4, xxxviii + 205 pp.
- HUBER, O. y G. FEBRES. 2000. *Guía Ecológica de La Gran Sabana*, The Nature Conservancy, Caracas.
- KOSKE, R. E. y B. TESSIER. 1983. A convenient, permanent slide mounting medium. *Mycological Society American Newsletter* 34: 59.
- JANOS, D.P. 1996. Mycorrhizas, succession and the rehabilitation of deforested lands in the humid tropics. Pp 129-162, *in* J.C. Frankland, N. Magan y G.M. Gadd (eds.): *Fungi and environmental change*. Cambridge University Press.
- MC GONIGLE, T.P. y A.H. FITTER. 1990. Ecological specificity of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations. *Mycological Research* 94: 120-122
- MC GONIGLE, T.P., M.H. MILLER, D.G. EVANS, G.L. FAIRCHILD y J.A. SWAN. 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 115: 495-501.
- MORTON, J.B. 1993. Problems and solutions for the integration of glomalean taxonomy, systematic biology, and the study of endomycorrhizal phenomena. *Mycorrhiza* 2: 97-109.
- MORTON, J. B., S. P. BENTIVENGA y W. W. WHEELER. 1993. Germ plasm in the international collection of arbuscular and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (INVAM) and procedures for culture development, documentation and storage. *Mycotaxon* 48: 491-528.
- PHILLIPS, J.M. y D.S. HAYMAN. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158-161.
- PORTER, W.M. 1979. The "Most Probable Number" method for enumerating infective propagules of vesicular

- arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Australian Journal of Soil Research* 17: 515-519.
- RAMÍREZ, N. 2000. Biología reproductiva de la vegetación de sabana en la Alta Guayana venezolana. Informe final presentado ante Fundacite Guayana.
- ROSALES, J., G. CUENCA, N. RAMÍREZ y Z. DE ANDRADE. 1997. Native colonizing species and degraded land restoration in La Gran Sabana, Venezuela. *Restoration Ecology* 3(5): 147-155.
- SCHUSSLER, A., D. SCHWARZOTT y C. WALKER. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105:1413-1421.
- SIEVERDING, E. 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. GTZ, Eshborn, Germany.
- SILVA, L.F.C. y J.O. SIQUIERA. 1991. Crescimento e teores de nutrientes de mudas de abacateiro, mangueira e mamoeiro sob influencia de diferentes espécies de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo* 15: 283-288.
- SIQUEIRA, J.O., J.O. SAGGIN, W. FLORES AYLAS y P.T. GUIMARAES. 1998. Arbuscular mycorrhizal inoculation and superphosphate application influence plant development and yield of coffee in Brazil. *Mycorrhiza* 7: 293-300.
- SMITH, S.E. y D.J. READ. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*, 2nd ed. Academic Press.
- SPAIN, J.L. y J.C. DE MIRANDA. 1996. *Scutellospora cerradensis*: an ornamented species in the Gigasporaceae (Glomales) from the cerrado region of Brazil. *Mycotaxon* LX: 129-136.
- SUÁREZ, N. y Z. BARUCH. 1994. Viabilidad y germinación en *Trachypogon plumosus* (Poaceae). *Ecotropicos* 7(1): 37-40.
- TIESSEN, H. y J.O. MOIR. 1993. Characterization of available P by sequential extraction. In Carter MR (ed): *Soil sampling and methods of analysis*. Lewis Publisher, Ann Arbor.
- VAN DER HEIJDEN, M.G.A., J.N. KLIRONOMOS, M. URSIC, P. MOUTOGLIS, R., R. STREITWOLF-ENGEL, T. BOLLER, A. WIEMKEN y I.R. SANDERS. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69-72.
- WALKER, C. 1983. Taxonomic concepts in the Endogonaceae: spore wall characteristics in species descriptions. *Mycotaxon* XVIII(2): 443-455.
- WALKER, C., C.W. MIZE y H.S. MC NABB. 1982. Populations of endogonaceous fungi at two locations in central Iowa. *Canadian Journal of Botany* 60: 2518-2529.

Recibido 28 febrero 2003; revisado 02 julio 2003; aceptado 02 julio 2003