

ECOLOGÍA MOLECULAR DE LOS HONGOS ECTOMICORRÍZICOS

MOLECULAR ECOLOGY OF ECTOMYCORRHIZAL FUNGI

Aída Rodríguez-Tovar^{1, 2}, Beatriz Xoconostle-Cáarez² y María Valdés^{1*}

¹ Laboratorio de Microbiología Agrícola, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional (IPN). Carpio y Plan de Ayala s/n Col. Sto. Tomás C.P. 11340 México, D.F. Tel: 01 (55) 5729-6208. Correo electrónico: mvaldes@encb.ipn.mx ² Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y Estudios Avanzados, IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508. San Pedro Zacatenco, C.P. 07360 México, D. F. Tel. 01 (55) 5561-3800 Ext. 4315

* Autor para correspondencia

RESUMEN

Esta revisión tiene por objeto evaluar el impacto de las técnicas de biología molecular para el estudio ecológico de hongos micorrízicos (EM). Se describe la utilidad de diferentes genes y las técnicas moleculares que se han empleado en la identificación de los hongos micorrízicos que se encuentran tanto en las raíces de plantas hospederas como en los suelos, así como en estudios de evolución y filogenia, que han ayudado a conocer el origen de estos simbioses y el impacto que representan en la ecología de las plantas. Se describe el uso de los genes ribosomales (rDNA) (regiones muy conservadas) y de los espacios intergénicos (IGS e ITS) (regiones muy variables), como una herramienta confiable y muy utilizada en los últimos años por taxónomos y ecólogos. Se aborda el uso de secuencias mitocondriales, microsatelitales y de las regiones repetidas del genoma (RAPDs), sin olvidar la identificación basada en los morfotipos de las ectomicorizas. Esto último de acuerdo con los cambios morfológicos que se presentan en la raíz durante el establecimiento de la ectomicorriza, lo cual permiten evidenciar las raíces asociadas con hongos EM e identificar hongos que están en simbiosis. Se discuten técnicas relacionadas con la transformación de los hongos EM y el posible impacto de su transformación sobre la simbiosis, que puede ser de gran utilidad en el desarrollo de hongos con características específicas que puedan promover las bondades de la simbiosis ectomicorrízica.

Palabras clave: Micorriza, genes, transformación, morfotipos, huellas genómicas.

SUMMARY

This review was done to evaluate the impact of molecular biology techniques for ecological studies of mycorrhizal fungi. The usefulness of different genes and molecular techniques used in the identification of mycorrhizal fungi living in the roots of their hosts and in soil is described. Such techniques are also used in evolution and phylogeny studies to gain insights in the origin of symbionts and the impact that it represents in plant ecology. It describes the use of highly conserved ribosomal genes (rDNA) and its intergenic spacers (IGS and ITS) (hypervariable regions), that in recent years have been reliable and useful tools for taxonomists and ecologists. The review approaches the

use of mitochondrial, microsatellites and RAPD sequences, as well as the identification based on ectomycorrhizal morphotypes. The later according to morphological changes induced in the root during the ectomycorrhizal association, which have been helpful to evidence the root fungal association and to identify fungal species present in specific symbiosis. Genetic transformation of the ectomycorrhizal fungi and the effect of their transformation are discussed in relation to their symbiosis. In the near future this can be useful to develop fungal strains with specific characteristics capable of a better stimulation of ectomycorrhizal symbiosis.

Index words: Mycorrhiza, genes, transformation, morphotypes, finger printing.

INTRODUCCIÓN

Los dos tipos de micorriza de mayor distribución en el planeta, son la Micorriza Arbuscular (MA) y la Ectomicorriza (EM). Esta revisión se refiere sobre todo a esta última. La simbiosis ectomicorrízica es una asociación mutualista entre las raíces (diámetro menor de 2 mm) de árboles y ciertos hongos (Ascomicetos y Basidiomicetos). Los árboles que dominan en la mayoría de los bosques boreales y templados, así como grandes extensiones de los bosques subtropicales y tropicales, forman este tipo de micorriza en sus raíces (Read, 1999). Muchos árboles de algunas familias son dependientes de esta asociación para su supervivencia y crecimiento normal (Smith y Read 1997), como los de Pináceas (pinos), Fagáceas (haya, encino, roble), Betuláceas (abedul, aile o aliso), y los de la familia tropical asiática Dipterocarpacea (Mangachapuy). Algunos de estos árboles, como ailes y pinos, responden a la presencia del hongo EM con incrementos en su crecimiento, que va desde 200 % hasta 538 %, y supervivencia en campo de 68 % (Valdés y Galicia, 1997; Valdés, 1986).

La simbiosis EM juega un papel fundamental en la biología y ecología de los árboles al incrementar la toma de agua y nutrientes, así como al proteger a los mismos contra patógenos radicales (Smith y Read, 1997; Read, 1999). Estas funciones se entenderán mejor si se toma en cuenta que la proporción longitudinal entre la raíz y el micelio absorbente de la EM en la etapa de plántula de los pinos es 1:10⁵ (Read, 1991).

La simbiosis tiene además relevancia porque los hongos asociados son de importancia económica por su valor culinario, como la trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) en Francia y recientemente en Nueva Zelanda; la trufa blanca (*T. magnatum* Pico) en Italia; el hongo blanco o matsutake (*Tricholoma matsutake*) en Japón; el duraznillo, chantarel o rebozuelo (*Cantharellus cibarius* Fr.) y el enchilado o lactaire (*Lactarius*) en Europa y Norte América, etc. Algunos de estos hongos llegan a tener un costo hasta de US \$3 000 por kg (Hall *et al.*, 1994). En México, los llamados “hongueros” (colectores de hongos silvestres) cobran el kilogramo de hongos comestibles comunes entre \$10 y \$20; sin embargo, cuando colectan el hongo blanco o matsutake para los compradores que los exportan a Japón, reciben \$500 por kg.

Las raíces de los árboles que son colonizadas por hongos ectomicorrízicos son aquéllas clasificadas como finas o absorbentes, de un grosor menor de 2 mm (Vogt *et al.*, 1997). Estas raíces se encuentran en el suelo del bosque expuestas a cientos de especies de hongos EM (Dahlberg *et al.*, 1997; Dahlberg, 1999) y cada especie existe en el mismo suelo como una población de muchos individuos con diferencias genéticas conocidos con el nombre de clonas fúngicas o *genets*. La variación fenotípica de los *genets* es estable (Débaud *et al.*, 1999), aunque pueden variar en su capacidad de colonizar los genotipos de las plantas y en su capacidad de promover el crecimiento de las mismas, así como en su adaptación a los factores abióticos (sobre todo al contenido de N y valor de pH del suelo). Dichos factores pueden afectar la simbiosis y la diseminación de las clonas fúngicas o *genets* en el ecosistema forestal. Las clonas de los hongos EM en el suelo de los bosques pueden variar en cantidad tanto en el tiempo como en el espacio, de 150 a 300/m² y de más de 150 años (Dahlberg y Stenlid 1994; Gherbi *et al.*, 1999; Bonello *et al.*, 1998).

Los estudios de composición de las especies EM y de la dinámica de las mismas en el suelo forestal, han sido difíciles porque una gran cantidad de hongos EM no manifiestan crecimiento o crecen poco en medios de cultivo; además, la forma tradicional de identificarlos taxonómicamente está basada en sus estadios sexuales y las estructuras vegetativas de los mismos hongos se encuentran en forma hipogea, lo que hace difícil su identificación. Aún más, los

resultados del trabajo con cuerpos fructíferos podrían ser dudosos (Valdés *et al.*, 2003; Dahlberg *et al.*, 1997), porque muchos carpóforos también son hipogeos y raramente son tomados en cuenta. No obstante, se conocen los rasgos fisiológicos y ecológicos de algunos hongos EM.

Son muchos los aspectos que se desconocen de las comunidades de hongos EM en su hábitat. Sería de gran valor entender en un ecosistema cómo es su estructura en términos de número y abundancia de especies, su distribución espacial y temporal, el origen y mantenimiento de su variación genética, la autoecología de las especies dominantes, los factores ambientales que afectan su población, etc. Si se logra obtener tal conocimiento científico, éste podría ser un aliado valioso en la elaboración de programas tanto de repoblación y reforestación de ecosistemas forestales, así como de plantaciones en los que las especies arbóreas de importancia económica puedan inocularse para que se asocien con hongos EM seleccionados, no sólo en su capacidad de promover su crecimiento sino también en su adaptación a diferentes factores ecológicos.

Para entender la diversidad, estructura y dinámica de las poblaciones EM, así como la biología de este importante grupo de hongos, es esencial conocer la estructura de su genoma, su organización y su función. Los hongos EM poseen varias regiones génicas que han mostrado ser de gran utilidad para identificarlos, por lo que en este escrito se describen tales regiones y, en forma breve, los avances en su transformación genética.

LOS HONGOS

Las comunidades de hongos EM son ricas en especies y se conocen más de 5 000 especies dentro de 15 familias pertenecientes a los llamados hongos verdaderos, Ascomycetos y Basidiomicetos. La mayoría de las especies descritas pertenecen a los Basidiomicetos. Los hongos EM no son monofiléticos; según Bruns *et al.* (1998) y Horton y Bruns (2001), mediante estudios tradicionales y moleculares se ha mostrado que durante la evolución del planeta aparecieron varias veces y que también se extinguieron.

Los Ascomycetos y Basidiomicetos comparten algunas características morfológicas como el micelio septado, estado dicariótico en su ciclo de vida, estructuras asociadas con la producción de esporas, conidios y a veces sistemas complejos de dispersión (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Los Ascomycetos se distinguen por las *ascas*, células en forma de saco que contienen las ascosporas. Tienen dos fases reproductivas, una sexual con formación de *ascas* y *ascosporas* y la otra asexual con producción de esporas en el mismo micelio. Se clasifican solamente por sus

estructuras sexuales. Algunos de ellos sólo tienen fase sexual y otros producen gametangios uninucleados o multinucleados. Estos hongos EM también forman cuerpos fructíferos subterráneos o *hipogeos* (Brundrett *et al.*, 1996).

Los Basidiomicetos producen esporas en la parte externa de una estructura microscópica especializada llamada basidio. Las basidiosporas son haploides y al madurar pueden ser uninucleadas o binucleadas. El micelio primario u homocariote se origina en la germinación de una basidiospora; el micelio secundario proviene de la interacción de dos micelios homocariotes compatibles, es heterocariote y frecuentemente binucleado. Para mantener su condición dicariótica, muchos Basidiomicetos forman estructuras especiales llamadas *fibulas* durante la división conjugativa de los núcleos, en la punta de una hifa en crecimiento. El micelio terciario está representado por tejidos especializados como son los basidiocarpos de las especies más complejas (Alexopoulos *et al.*, 1996).

La capacidad de las células para unirse está controlada por sistemas genéticos complejos en Ascomicetos y Basidiomicetos. Las fusiones pueden ocurrir durante la plasmogamia, durante la reproducción sexual o entre las estructuras vegetativas.

Los hongos EM no siguen el patrón de diversidad de las comunidades vegetales, el cual aumenta de los polos hacia las regiones tropicales. Por ejemplo, los bosques de las latitudes del norte tienen más de 1000 especies de hongos EM, mientras que en las zonas tropicales el número de hongos micorrízico arbusculares es de sólo 25 (Allen *et al.*, 1995). Los taxones EM identificados son 5 400 (Molina *et al.*, 1992), en contraste con los hongos MA cuyo número es de 150 (Allen *et al.*, 1995), y están incluidos en seis géneros de hongos MA y en 148 de hongos EM (Brundrett *et al.*, 1996).

LOS GENES PARA IDENTIFICAR LOS HONGOS EM

Para evaluar la biodiversidad de los hongos es necesario hacer primero su identificación de especie y de los aislados. En los últimos años el desarrollo de las herramientas moleculares ha permitido conocer la estructura, dinámica y variabilidad genética de la población fúngica EM en su hábitat. La más útil para el estudio de las comunidades EM ha sido la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) que permite identificar los microorganismos (Gardes *et al.*, 1991; Bruns y Gardes, 1993; Henrion *et al.*, 1992). Los procedimientos basados en PCR, ya sean reacciones simples o complejas (anidadas), abarcan un vasto número de protocolos; entre los

más empleados están: a) Las regiones hipervariables del rDNA (IGS o espacio intergénico, e ITS o espacio transcrito interno); b) Los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) de los productos de la PCR; c) La amplificación de las secuencias cortas repetidas (microsatélites); y d) La obtención al azar del DNA polimórfico.

Genes ribosomales. La PCR más estudiada ha sido la de los genes ribosomales y sus espacios intergénicos, (Figura 1). Estas regiones tienen muchas ventajas:

1. Tienen una organización conservada en el genoma de todos los eucariontes y su presencia está en unidades repetidas una junta a la otra (Débaud *et al.*, 1999).
2. Tienen un gran número de copias, lo que facilita su amplificación (van Tuinen *et al.*, 1999).
3. Contienen regiones muy conservadas (18S, 5.8S y 28S), lo que ha permitido un fácil diseño de iniciadores (Gardes y Bruns, 1993).
4. Estas regiones conservadas están separadas por secuencias divergentes, muy variables, polimórficas en longitud y en secuencias, debido a deleciones e inserciones; son muy informativas y representan una huella genómica para cada hongo (Gardes *et al.*, 1991; Martín *et al.*, 1998b; Bruns y Gardes, 1993; Henrion *et al.*, 1994).

Las regiones más divergentes de los genes ribosomales son los espacios intergénicos ITS y el IGS. La ecología microbiana en estudios de comunidades ectomicorrízicas le ha dado un uso muy frecuente a la amplificación de los genes ribosomales, casi exclusivamente para identificar los componentes de la misma comunidad, a diferencia de lo que se hace en las comunidades de procariontes en las que se utiliza tanto para identificar como para cuantificar.

La variabilidad en la secuenciación observada en las 2 regiones ITS de los genes ribosomales que separan la subunidad ribosomal pequeña 5.8 de la subunidad ribosomal grande 25S, ha sido determinante para distinguir un hongo de otro. La mayoría de los estudios de ecología molecular de los hongos EM se ha hecho con restricción de estas regiones que están separadas por el gen ribosomal 5.8S. En los hongos es de un tamaño de 650 a 900 pb e incluye al gene 5.8S. Los RFLPs de los hongos en asociación con su planta hospedera han sido analizados con un par de iniciadores (ITS1F e ITS4) descritos por Bruns y Gardes (1993); estos iniciadores fueron diseñados para amplificar el gene 5.8S y las regiones ITS de los basidiomicetos, (Figura 1). La variabilidad interespecie del ITS1 y del ITS2, ha sido especialmente estudiada para establecer marcadores para las especies de los hongos de gran valor culinario,

como las trufas (Henrion *et al.*, 1994; Mello *et al.*, 1996, 1999).

Un ejemplo de los aspectos prácticos del uso del ITS es el de la trufa de Perigord (*Tuber melanosporum*) en la industria. Este hongo renombrado en la gastronomía francesa por sus cualidades organolépticas, e importancia económica por la producción y venta de plántulas EM y cuerpos fructíferos frescos y procesados, ha sido mezclado con trufa asiática negra (*T. indica*) en algunos productos comerciales. Con el objeto de evitar fraude, daño ecológico resultante de introducción accidental o voluntaria y proteger la actividad profesional de las personas involucradas en la producción de *T. melanosporum*, algunos científicos han diseñado un método de tipificación rápido y confiable para discriminar entre las 2 trufas en diferentes productos comerciales, con base en el ITS (Mabru *et al.*, 2001).

Esta misma región ITS también se puede secuenciar y sus datos son probablemente los ideales para usar en la identificación taxonómica, porque tienen el poder resolutivo para ubicar hongos desconocidos dentro de una especie

o al menos en un grupo de especies. Otra ventaja de los datos obtenidos del gen ITS, es que bastan las secuencias de los ITS de ejemplares desconocidos para buscar en el banco de genes (GenBank), o en la base de datos de nucleótidos del EMBL (European Molecular Biology Laboratory); la variación dentro de los espacios es tan amplia, que sólo los taxones muy cercanos se pueden encontrar (Horton y Bruns, 2001).

El uso de los iniciadores ITS1F-ITS4B ha sido aplicado recientemente a muestras de suelo con gran éxito. Landeweert *et al.* (2003), en suelos de bosque de coníferas, hicieron extracción del DNA total del mismo, amplificaron el DNA micelial de los basidiomicetos, que clonaron y secuenciaron; de esta manera obtuvieron 25 grupos fúngicos a los que llamaron “unidades taxonómicas operacionales”, de los que 16 mostraron homologías con hongos conocidos, y otros no pudieron ser identificados. Lo interesante de este enfoque en el uso de estos iniciadores, es que lograron ver la distribución espacial de los hongos EM en los horizontes del perfil de los suelos estudiados.

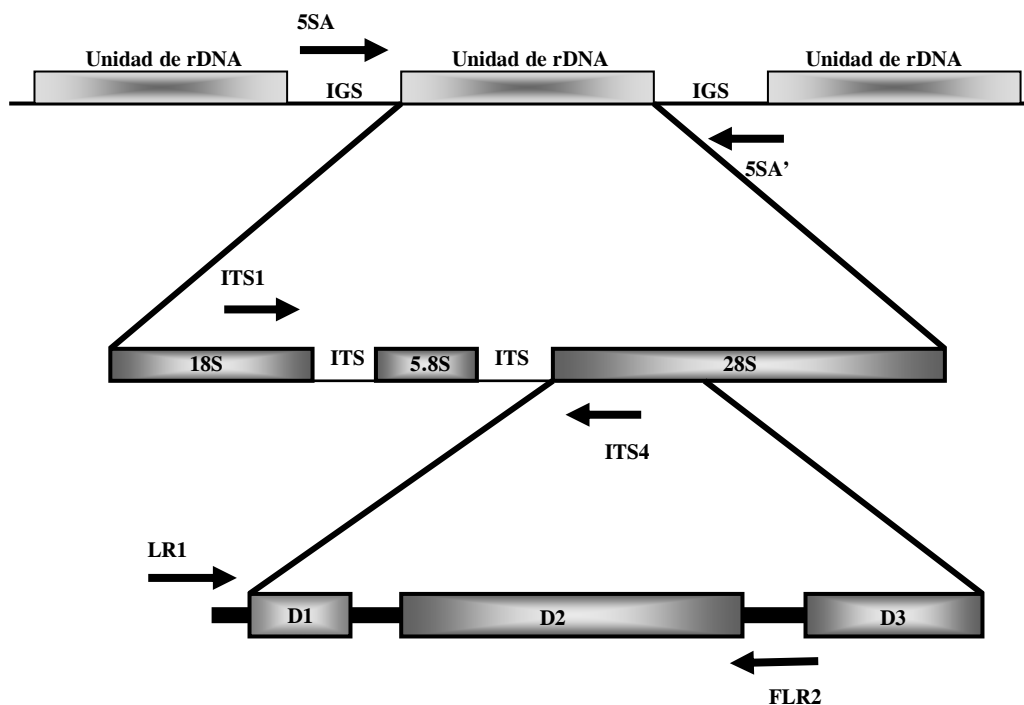


Figura 1. Genes ribosomales y sus espacios interunitarios, espacios intergénicos y dominios de la subunidad grande. Los iniciadores para amplificar los espacios intergénicos y los dominios también están indicados (Gardes y Bruns, 1993; van Tuinen *et al.*, 1998; Jacquot *et al.*, 2000).

El espacio intergénico IGS1, que se encuentra localizado en el extremo 3' del 28S y el extremo 5' del 5.8S se ha usado para tipificar los cuerpos fructíferos de algunos hongos EM, pues los diferentes tipos de IGS1 dan patrones únicos de estos fragmentos de DNA en términos de número y tamaño en los productos de la PCR. Así, haciendo análisis heteroduplex (para identificar homo y heterocigotos) de este espacio intergénico, se ha identificado variación genética con patrones únicos IGS1 de cuerpos fructíferos de *Laccaria amethystina* (Gherbi *et al.*, 1999). Con este mismo espacio genético IGS1 y técnicas para atrapar esporas, se ha logrado observar la dispersión de las mismas (flujo de genes) en *Schizophyllum commune*, y la diversidad entre las poblaciones de este hongo en el Caribe (James y Vilgalys, 2001). Los iniciadores para amplificar el IGS son varios, como 5SA, 5SA', 5S, y otros.

El polimorfismo de los fragmentos de restricción, tanto del ITS como del IGS, ha sido adecuado para conocer también la sistemática de los Ascomicetos como las morillas (Buscot *et al.*, 1996), hongos de gran importancia culinaria y económica (*Morchella esculenta*).

El gen ribosomal 5.8S ha mostrado por sí solo ser útil en aplicaciones de ecología y evolución, así como para determinar la ubicación de hongos asexuados dentro de grandes grupos taxonómicos y de hongos EM (Cullings y Vogler, 1998).

El gen ribosomal 18S es la región del genoma de los Glomeromycota (hongos formadores de MA) más secuenciada para estudios de filogenia (Simon *et al.*, 1992, 1993). Los datos filogenéticos obtenidos de las secuencias del rDNA 18S de diferentes hongos se han usado para fechar su origen entre 353 a 462 millones de años (Simon *et al.*, 1993), lo que corresponde al periodo en que las plantas primitivas colonizaron los continentes (Pirozynski y Dalpé, 1989). Aunque los iniciadores diseñados para este gen son efectivos para detectar hongos en las raíces de las plantas, su sensibilidad y especificidad se incrementa cuando se combina con una técnica de enriquecimiento selectivo del DNA amplificado (SEAD, por sus siglas en inglés) (Clapp *et al.*, 1995).

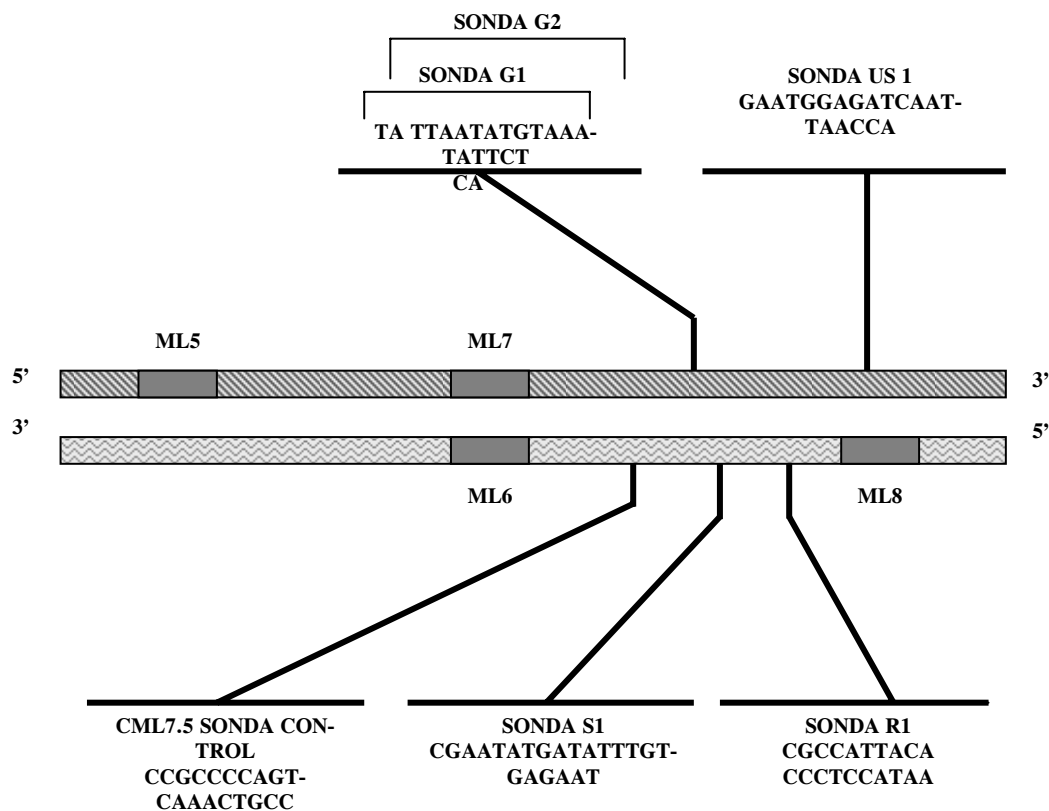


Figura 2. Regiones ML5, ML6, ML7, ML8 de la subunidad grande de los genes mitocondriales con sus iniciadores para identificar basidiomicetos (Bruns y Gardes, 1993).

El gen ribosomal 28S es una región polimórfica del gen ribosomal, cuyo extremo 5' es otro punto de identificación por ser más informativo debido a su variabilidad, lo que ha permitido obtener nuevas secuencias de los Agaricales y Boletales (Moncalvo *et al.*, 2000).

Durante la evolución ha habido grandes variaciones en el tamaño de esta molécula; la mayor parte está restringida a los dominios D1 y D2 (Figura 1). El D2 es polimórfico en longitud y en secuencias (por inserciones y por deleciones), lo que ha conducido a la generación de iniciadores para distinguir entre taxones de Glomales (van Tuinen *et al.*, 1998, 1999). El polimorfismo del dominio D2 del rDNA 28S es tan grande que permite construir iniciadores con diferentes niveles de especificidad. Los iniciadores utilizados pueden ser LR1, NDL22, 5.23 ó 5.25. Cuando esta región se utiliza como DNA molde para hacer una segunda reacción de PCR, se logra distinguir entre micelios de diferentes hongos en cultivo, en suelo, en micorrizósfera y en micorriza (Jacquot *et al.*, 2001).

Genes mitocondriales. La región ML5-ML6 de la subunidad grande de los genes mitocondriales, región de alrededor 416 pb (Figura 2), se ha utilizado también para

identificar Basidiomicetos EM (Bruns *et al.*, 1998). Esta región puede ubicar secuencias desconocidas a nivel de familia como Russulaceae, Amanitaceae, etc. Una desventaja importante con los genes mitocondriales es que en los hongos estos genes pueden presentar intrones que dificultan la amplificación, además de que en ocasiones da poca resolución (y a veces ninguna) dentro de las mismas familias.

Satélites. Su uso para obtener huellas genéticas de los hongos EM se refiere a la amplificación de microsatélites. Estas regiones hipervariables organizadas repetidamente una tras otra y caracterizadas por una amplia tasa de mutación, las hace muy informativas en variación genética entre y dentro de las especies. Algunos oligonucleótidos específicos para estas secuencias simples repetidas son efectivos como iniciadores simples para la PCR (Figura 3). Estos oligonucleótidos fueron originalmente diseñados como sondas de hibridación en ensayos de huellas genéticas tradicionales. Los minisatélites tienen 20 repeticiones y los microsatélites hasta 8. Son muchos los iniciadores que se pueden ensayar en la PCR, (CT)₈, (GT)₈, (GAC)₅, (GTG)₅, (GACA)₅, (TGTC)₅, etc. (Martin *et al.*, 1998a).

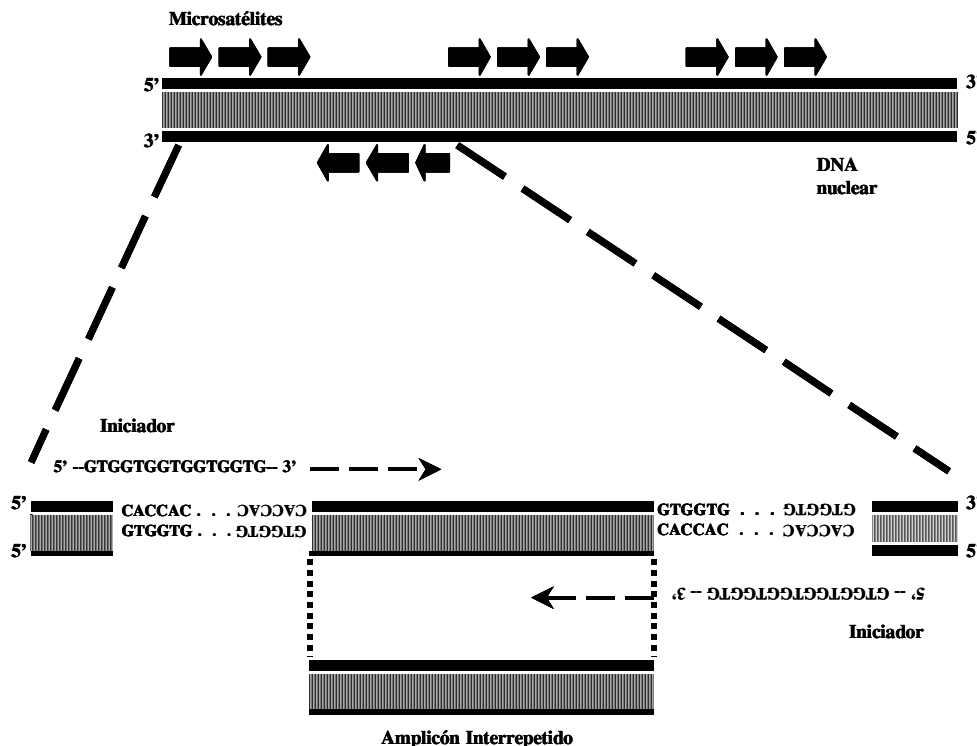


Figura 3. DNA inter-repetido (repeticiones microsatélite). Los nucleótidos complementarios de las repeticiones microsatélite sirven como iniciadores cuando dos repeticiones invertidas se ubican una junto a otra (Martin *et al.*, 1998a).

Estos marcadores son herramientas potenciales para el estudio de la identificación, diversidad y distribución de los genets o clonas fúngicas y de la estructura de la población a escalas espacial diferente como es el caso de la llamada falsa trufa (*Rhizopogon vinicolor*) (Kretzer *et al.*, 2000). Con estos marcadores, en este hongo se encontró diversidad alélica en 19 colecciones que representan 19 genets o clonas. Buscot *et al.*, (1996), al estudiar el comportamiento de poblaciones de núcleos en micelios heterocariontes en miembros de la familia Morchellaceae, hicieron la PCR del microsatélite con el iniciador (GTG)₅ y demostraron que esta familia de hongos muestra menos polimorfismo del DNA intraespecífico que otros Ascomycetos.

Por otro lado, Gherbi *et al.* (1999) al estudiar la variaciones en tiempo y espacio de *Laccaria amethystina* colectado en un bosque de *Fagus* (haya), clasificaron los cuerpos fructíferos del basidiomiceto en un tipo específico de ITS1 según su patrón de restricción; después analizaron de acuerdo a la amplificación al azar de los microsatélites (RAMS, por sus siglas en inglés) y lograron probar que el árbol puede ser colonizado por diferentes clonas cada año, y encontraron hasta 130 genets/100 m² en un año y de éstos sólo 8 al año siguiente. Así mismo, se ha podido mostrar que la distribución espacial puede tener origen en la fructificación errática de las clonas persistentes subterráneas, en el mismo bosque cerrado de haya.

Otro protocolo interesante y confiable por su precisión para estudiar la ecología de los hongos EM se refiere a las secuencias características de las regiones amplificadas o SCAR (por sus siglas en inglés); es otro protocolo interesante y confiable por su precisión para estudiar la ecología de los hongos EM. Se hacen con base en la obtención de marcadores polimórficos al azar (RAPDs) y a partir de aquí se eligen bandas presentes únicamente en el DNA del hongo en estudio, es decir bandas características del mismo, las que después de probadas en su especificidad, se secuencian y se diseñan iniciadores. Este método ha resultado muy efectivo para detectar micorrizas formadas por un hongo introducido (*Laccaria bicolor*) en plantaciones europeas del abeto Douglas (*Pseudotsuga menziesii*). Los marcadores SCAR han mostrado también ser marcadores potenciales para tipificar las clonas fúngicas nativas y podrían serlo en el estudio de la persistencia de las cepas introducidas en las poblaciones locales de hongos ectomicorrízicos (Weber *et al.*, 2002).

MORFOTIPIFICACIÓN

Es importante mencionar que el uso de los caracteres morfológicos de los ápices ectomicorrizados de los árboles constituye una herramienta valiosa en la identificación de los hongos que generan su formación. Es bien conocido que las características morfológicas y anatómicas que confieren los hongos EM a las raicillas (menores de 2 mm) que se transforman en ectomicorriza, son de gran utilidad para distinguir un hongo de otro. Los ápices ectomicorrizados o morfotipos difieren ampliamente en su anatomía (Figura 4), lo que ha sido confirmado repetidamente (Agerer, 1987-1996; Ingleby *et al.* 1990; Agerer, 1999, 2001; Kranabetter y Friesen, 2002). Las características morfológicas que se consideran para tipificar son:

- Tipo de ramificación (sin ramificar, monopódica-pinada, monopódica piramidal, dicotómica, pinada irregular, coraloide, tuberosa).
- Color (gran variedad y combinaciones, y modificación por la edad).
- Rizomorfos (forma, frecuencia, ocurrencia, conexión con el manto fúngico).
- Micelio extra matricial (con hifas diferentes en forma y densidad).
- Superficie del manto (liso, granuloso, espinoso, algodonoso).
- Cistidios (forma, color, superficie)..

La eficacia del uso de este método morfológico ha sido comprobada con técnicas moleculares, como es el caso de la identificación de los hongos asociados a *Monotropa uniflora*. Esta angiosperma carente de clorofila, parásita de plantas autótrofas ectomicorrízicas, es micoheterótrofa. De esta forma se probó que la relación hongo-*Monotropa* tiene gran especificidad; la planta se asocia sólo con miembros de la familia Russulaceae (Young *et al.*, 2002).

De la misma manera, los hongos asociados a la planta actinorrízica fijadora de N₂ asociada con Frankia *Dryas octopetala*, especie ártica de montaña, fueron identificados por evidencias morfológicas (morfotipos) y confirmados a través de RFLPs y secuencias del ITS (Harsington y Mitchell, 2002).



Amanita muscaria



Lactarius pubescens



Figura 4. Ejemplos de morfotipos de ectomicorizas. a) Micorriza formada por *Amanita muscaria*; b) Micorriza formada por *Lactarius pubescens* (Ingleby et al., 1990).

TRANSFORMACIÓN

La manipulación genética molecular de microorganismos requiere del desarrollo de sistemas de transformación mediada por plásmidos, que incluye diferentes pasos: la introducción de DNA exógeno en las células receptoras, la expresión de los genes presentes en el DNA introducido, y el mantenimiento estable y replicación del material genético insertado, lo que permitirá la expresión de las características fenotípicas deseadas (Finchman, 1989). Las técnicas de manipulación genética de hongos han sido usadas para el mejoramiento de especies de interés agrícola e industrial.

Se han desarrollado sistemas de transformación, sobre todo en grupos de hongos filamentosos patógenos, tanto de humanos como de plantas y hongos de interés biotecnológico, entre los cuales están la producción de protoplastos, la electroporación (Chassy *et al.*, 1988), biobalística (Sanford, 1988) y, aprovechando la maquinaria de *Agrobacterium tumefaciens* para transferir material genético en forma natural, también se generó el método conocido como Agro-transformación (Bundock y Hooykaas, 1996).

PROTOPLASTOS

Éste es el método más común para llevar a cabo la transformación genética de muchos microorganismos; la preparación de protoplastos de células fúngicas requiere del uso de enzimas que degradan la pared celular, cuya elección es un paso crítico porque puede alterar la tasa de transformación. Los protoplastos se protegen osmóticamente con sorbitol y pueden congelarse a -70°C .

Los protoplastos viables del micelio de los hongos ectomicorrízicos pueden ser usados para responder interrogantes en torno al intercambio de metabolitos o compartimentación química, procesos que no tienen posibilidades de estudiarse con hifas intactas, con cultivo de tejidos ni en las mismas micorizas. Desafortunadamente son pocos los reportes del aislamiento de protoplastos de hongos EM.

La transformación con protoplastos se ha logrado en varios hongos ectomicorrízicos, como *Laccaria bicolor* (Kropp y Fortín, 1986), *Amanita muscaria* (Chen y Hampp, 1993) y *Cenococcum geophilum* (Stülten *et al.*,

1995). Aunque la frecuencia de regeneración es baja, es apropiada para llevar a cabo experimentos de transformación en *Laccaria laccata* (Barrett *et al.*, 1990) y *Hebeloma cylindrosporium*; éste último es el segundo hongo EM que se ha transformado (Marmeisse *et al.*, 1992). Otros hongos, como *Suillus luteus* y *Pisolithus tinctorius* (Barrett *et al.*, 1989), no regeneran protoplastos en ningún medio de cultivo hasta ahora ensayado.

ELECTROPORACIÓN

Es una técnica basada en la permeabilización reversible de las membranas celulares, inducida por una breve descarga eléctrica. Las alteraciones que ocurren en la membrana durante un pulso eléctrico permiten que se introduzca material genético al microorganismo, lo que resulta en una transformación genética (Chassy *et al.*, 1988). Los cambios físicos y biológicos que ocurren después de haber sido sometidas las células a un potencial eléctrico de 200-400 V consisten en que las mismas forman áreas grandes de despolarización, lo que permite que la membrana sea permeable a micro y macromoléculas (Neumann y Rosenheck, 1972, Chassy *et al.*, 1988). Hay evidencias de que la matriz lipídica pueda ser considerada como el sitio de la permeabilización y se ha postulado que las uniones lípido-proteína podrían ser los sitios de la electroporación. Entre los factores críticos que presenta la técnica están el voltaje aplicado y el tiempo de pulso, pues hay valores específicos para cada microorganismo.

BIOBALÍSTICA

Otro método exitoso para la transformación genética de hongos es la biobalística o bombardeo, también conocido como de los microproyectiles y de aceleración de partículas (Klein *et al.*, 1992). Éste es un proceso en el cual se emplean microproyectiles cubiertos de DNA que son liberados a alta presión sobre células o tejidos intactos (Sanford, 1988). Con este método se ha logrado la transformación de dos hongos EM, *Paxillus involutus* (Bills *et al.*, 1995) y *Laccaria bicolor* (Bills *et al.*, 1999), además del hongo MA *Gigaspora rosea* (Forbes *et al.*, 1998).

TRANSFORMACIÓN MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens*

Esta bacteria es un patógeno que habita el suelo y rizósfera de muchas plantas superiores a las que induce cambios morfogénicos; la enfermedad originada es conocida como *agalla de la corona* que se manifiesta por la formación de un tumor. Éste lo forma la planta debido a la transferencia a su genoma de un fragmento de DNA de la bacteria llamado T-DNA presente en el plásmido Ti (Piers

et al., 1996). La modificación genética de la planta por *A. tumefaciens* es un evento natural y único de la transferencia de material genético entre organismos de dos reinos diferentes (Bundock *et al.*, 1995; Bundock y Hooykaas, 1996). El proceso depende de la inducción de varios elementos génicos componentes de *Agrobacterium* requeridos en la transformación de las células vegetales: a) El T-DNA (genes responsables de tumores); b) Región *vir*, y c) Tres *loci* de virulencia ubicados en el cromosoma.

De Groot *et al.* (1998) lograron modificar diferentes hongos filamentosos con este sistema; Chen y Hampp (1993) describen también la transformación de una cepa comercial de *Agaricus bisporus*, mediante cuerpos fructíferos (Chen *et al.*, 2000), lo que mostró ser más eficiente que el uso de protoplastos. Tres basidiomicetos formadores de EM, *Suillus bovinus*, *Hebeloma cylindrosporium*, y *Paxillus involutus*, son ahora transgénicos con el uso de este sistema (Pardo *et al.*, 2002).

PERSPECTIVAS

La transformación de estos hongos tiene un potencial enorme. La manipulación genética es relativamente sencilla, ya que incorporan con cierta facilidad DNA exógeno a su cromosoma con gran estabilidad. Podría facilitar el diseño de proyectos de investigación con muchas ventajas para producir inoculantes que evitarían el uso de fertilizantes o de pesticidas durante la producción de plántulas en vivero, etapa de alta vulnerabilidad de los árboles.

Se podría incrementar la eficiencia de la simbiosis a través de la manipulación para incrementar el transporte de agua y nutrientes, de mayor producción de fitohormonas, de hacer plantas más tolerantes a fitopatógenos, a estrés hídrico, salino o de pH extremo, etc., lo que podría asegurar el éxito al plantar arbolitos con fines de reforestación en áreas degradadas. No menos importante sería manipular genéticamente los hongos ectomicorrízicos para mejorar las funciones radicales; es preferible hacerlo a través de estos hongos habitantes naturales de la raíz, que hacerlo en la planta dado que ésta podría provocar una respuesta indeseable en las otras partes de su organismo. La transformación del microorganismo endofítico en lugar de la raíz, evitaría también el uso de promotores específicos de la respuesta de la raíz.

La interfase formada por el hongo ectomicorrízico entre la planta y el suelo, hace del hongo un buen instrumento para estrategias genéticas que involucren funciones rizosféricas. Se sabe que la rizósfera es un lugar en donde hay cambios extremos de humedad donde puede registrarse escasez, de modo que los microorganismos ahí presentes pueden sufrir un efecto osmótico. La osmo-regulación

con producción de osmolitos podría hacerse a través de genes de bacterias. Esta interfase formada por el hongo, también puede utilizarse para la estimulación o inhibición específica de ciertos microorganismos rizosféricos cuyos efectos benéficos pueden ser directos o indirectos para la planta.

La transformación de los hongos EM abre la posibilidad de llevar a cabo estudios moleculares para entender la asociación simbiótica establecida por estos hongos. Por ejemplo, la simbiosis que se integra entre *Pisolithus tinctorius* y el eucalipto ha sido ampliamente estudiada; estos estudios han llevado a la clonación de mensajeros que presumiblemente codifican genes involucrados en la simbiosis (Martin *et al.*, 1998b). Este tipo de trabajos abren la puerta para que mediante ensayos de mutagénesis dirigida sea posible demostrar la funcionalidad de los mensajeros.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras desean agradecer a la QBP Paola Ramírez su apoyo en la elaboración de los esquemas de los genes. MV y ART agradecen a CONACYT el apoyo financiero del proyecto clave 4333-N y de una beca para estudios de grado, respectivamente. Un agradecimiento especial a los Revisores Técnicos y al Editor anónimos, cuyas sugerencias han sido muy valiosas.

BIBLIOGRAFÍA

- Agerer R (1987-1996) Colour Atlas of Ectomycorrhizae. Einhorn-Verlag Eduard Dietenberger, Schwäbisch Gmünd.
- Agerer R (1999) Anatomical characteristics of identified ectomycorrhizas: an attempt towards a natural classification. In: Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology. A Varma, B Hock (eds.). Springer-Verlag, Berlin. pp:633-682.
- Agerer R (2001) Exploration types of ectomycorrhizae. A proposal to classify ectomycorrhizal mycelial system according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. Mycorrhiza 11:107-114.
- Alexopoulos C J, C W Mims, M Blackwell (1996) Introductory Mycology. John Wiley and Sons, Inc., New York. 869 p.
- Allen E B, M F Allen, D J Helm, J H Trappe, R Molina, E Rincón (1995) Patterns and regulation of mycorrhizal plant in fungal diversity. Plant and Soil 170:47-62.
- Barrett V, P A Lemke, R K Dixon (1989) Protoplast formation from selected species of ectomycorrhizal fungi. Appl. Microbiol. Biotech. 30:381-387.
- Barrett V, R K Dixon, P A Lemke (1990) Genetic transformation of a mycorrhizal fungus. Appl. Microbiol. Biotech. 33:313-316.
- Bills S N, D L Richter, G K Podila (1995) Genetic transformation of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* by particle bombardment. Mycol. Res. 99:557-561.
- Bills S N, G K Podila, S T Hiremath (1999) Genetic engineering of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* for use as biological control agent. Mycologia 91:237-242.
- Bonello P, T D Bruns, M Gardes (1998) Genetic structure of a natural population of the ectomycorrhizal fungus *Suillus pungens*. New Phytol. 138:533-542.
- Brundrett M, N Bougher, B Dell, T Grove, N Malajczuk (1996) Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ACIAR Monograph. 374 p.
- Bruns T D, M Gardes (1993) Molecular tools for the identification of ectomycorrhizal fungi: taxon-specific oligonucleotide probes for suilloid fungi. Molec. Ecol. 2:233-242.
- Bruns T D, T M Szaro, M Gardes, K W Cullings, J J Pau, D L Taylor, T R Horton, A Kretzer, M Garbelotto, Y Li (1998) A sequencing data base for the identification of ectomycorrhizal basidiomycetes by phylogenetic analysis. Molec. Ecol. 7:257-272.
- Bundock P A, den Dulk-Ras, A Beijersbergen, J Hooykaas (1995) Transkingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. 14:3206-3214.
- Bundock P, J Hooykaas (1996) Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA in the *Saccharomyces cerevisiae* genome by illegitimate recombination. PNAS USA 93:15272-15275.
- Buscot F, D Wipp, C Di Batista, J C Munch, B Botton, F Martin (1996) DNA polymorphism in morels: PCR/RFLP analysis of the ribosomal DNA spacers and microsatellite-primed PCR. Mycol. Res. 100:63-71.
- Chassy B M, A Mercenier, J Flickinger (1988) Transformation of bacteria by electroporation. Trends Biotech. 8:303-309.
- Chen X Y, R Hampp (1993) Isolation and regeneration of protoplasts from gills of *Agaricus bisporus*. Curr. Microbiol. 26:307-312.
- Chen X, M Stone, C Schlagnoufer, C P Romaine (2000) A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. Appl. Env. Microbiol. 66:4510-4513.
- Clapp J P, J P W Young, J W Merryweather, A H Fitter (1995) Diversity of the fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. New Phytol. 130:259-265.
- Cullings K W, D R Vogler (1998) A 5.8S nuclear ribosomal RNA gene sequence database: applications to ecology and evolution. Molec. Ecol. 7:919-923.
- Dahlberg A (1999) Somatic incompatibility in ectomycorrhizae. In: Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology. A Varma, B Hock (eds). Springer-Verlag. Berlin, Germany. pp:111-132.
- Dahlberg A, J Stenlid (1994) Size, distribution and biomass of genetis in populations of *Suillus bovinus* (L. Fr) Roussel revealed by somatic incompatibility. New Phytol. 128:225-234.
- Dahlberg A, L Jonsson, J E Nylund (1997) Species diversity and distribution of biomass above and below ground ectomycorrhizal fungi in an old Norway spruce forest in south Sweden. Can. J. Bot. 75:1323-1335.
- De Groot, M J A, P Bundock, J J Hooykaas, A G M Beijersbergen (1998) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. Nature Biotech. 16:839-842.
- Débaud J C, R Marmeisse, F Gay (1999) Intraspecific genetic variation in ectomycorrhizal fungi. In: Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology. A Varma, B Hock (Eds). Springer Verlag, Berlin, Germany. pp:79-113.
- Finchman, J R S (1989) Transformation in fungi. Microbiol. Rev. 53:148-170.
- Forbes P J, S Millam, J E Hooker, L A Harrier (1998) Transformation of the arbuscular mycorrhiza *Gigaspora rosea* by particle bombardment. Mycol. Res. 102:497-501.
- Gardes M, T J White, J A Fortin, T D Bruns, J W Taylor (1991) Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. Can. J. Bot. 69:180-190.
- Gardes M, T D Bruns (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molec. Ecol. 2:113-118.
- Gherbi H, C Delaruelle, M A Selosse, F Martin (1999) High genetic diversity in a population of the ectomycorrhizal basidiomycete

- Laccaria amethystina* in a 150-years-old beech forest. *Molec. Ecol.* 8:2003-2013.
- Hall I R, G T Brown, J Byars, N Dimas (1994) The Black Truffle. 2nd. Ed. New Zeland Inst. for Crop and Food Research Limited. Christchurch, New Zeland. 107 p.
- Harsington T J, D T Mitchell (2002) Characterization of *Dryas octopetala* ectomycorrhizae from limestone karst vegetation, western Ireland. *Can. J. Bot.* 80:970-982.
- Henrion B, G Chevalier, F Martin (1994) Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycol. Res.* 98:37-43.
- Henrion B, F Le Tacon, F Martin (1992) Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA genes. *New Phytol.* 122:289-298.
- Horton T R, T D Bruns (2001) The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molec. Ecol.* 10:1855-1871.
- Ingleby K, P A Mason, F T Last, L V Fleming (1990) Identification of ectomycorrhizas. Research Publication No. 5, I. T. E. Nature Environ. Res. Council. London. 112 p.
- James T Y, R Vilgalys (2001) Abundance and diversity of *Schizophyllum commune* spore clouds in the Caribbean detected by selective sampling. *Molec. Ecol.* 10:471-479.
- Jacquot E, D van Tuinen, S Gianinazzi, V Gianinazzi-Pearson (2000) Monitoring species of arbuscular mycorrhizae fungi *in planta* and in soil by nested PCR: application to the study of the impact of sewage sludge. *Plant and Soil* 226:179-188.
- Jacquot E, S van Tuinen, O Chatagnior, S Gianinazzi, V Gianinazzi-Pearson (2001) 25S rDNA-based molecular monitoring of glomalean fungi in sewage sludge-treated field plots. *Environ. Microbiol.* 3(8):525-531.
- Klein T M, E D Wolf, R Wu, J C Sanford (1992) High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. 1987. *Biotechnology* 24:384-386.
- Kranabetter J M, J Friesen (2002). Ectomycorrhizal community structure on western hemlock (*Tsuga heterophylla*) seedlings transplanted from forests into openings. *Can. J. Bot.* 80:861-868.
- Kretzer A M, R Molina, J W Spatafora (2000) Microsatellite markers for the ectomycorrhizal basidiomycete *Rhizopogon vinicolor*. *Molec. Ecol.* 9:1190-1191.
- Kropp B R, J A Fortin (1986) Formation and regeneration of protoplasts from the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *Can. J. Bot.* 64:1224-1226.
- Landeweert R, P Leeflang, T Kuyper, E Hoffland, A Rosling, K Wernars, E Smit (2003) Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:327-333.
- Mabru D, C Dupré, J P Douet, P Leroy, C Ravel, J M Ricard, B Medina, M Castroviejo, G Chevalier (2001) Rapid molecular typing method for the reliable detection of Asiatic black truffle (*Tuber indicum*) in commercialized products, fruiting bodies and mycorrhizal seedlings. *Mycorrhiza* 11:89-94.
- Marmeisse R, G Gay, J C Débaud, L A Casselton (1992) Genetic transformation of the symbiotic basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum*. *Curr. Gen.* 22:41-45.
- Martin F, G Costa, C Delaruelle, J Diez (1998a) Genomic fingerprinting of ectomycorrhizal fungi by microsatellite-primed PCR. *In: A Varma B Hock (ed.). Mycorrhiza Manual.* Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp:463-474.
- Martin F, C Delaruelle, M Ivory (1998b) Genetic variability in intergenic spacer of ribosomal DNA in *Pisolithus tinctorius* associated with pine, *Eucalyptus* and *Azelia* in lowland Kenyan forest. *New Phytol.* 139:341-352.
- Mello A, C Nosenzo, F Meotto, P Bonfante (1996) Rapid typing of truffle mycorrhizal roots by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycorrhiza* 6:417-421.
- Mello A, L Garnerio, P Bonfante (1999) Specific PCR primers as a reliable tool for the detection of white truffles of mycorrhizal roots. *New Phytol.* 141:511-516.
- Molina R, H Massicotte, J M Trappe (1992) Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community ecological consequences and practical implications. *In: Mycorrhizal functioning: an integrated plant-fungal process.* M. F. Allen (ed). Chapman and Hall. London. pp:357-423.
- Moncalvo J M, F M Lutzoni, S A Rehner (2000) Phylogenetic relationships of agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Syst. Biol.* 49:278-305.
- Neumann E, K Rosenheck (1972) Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J. Membr. Biol.* 29:10:279-290.
- Pardo A G, M Hanif, M Raudaskoski, M M Gorfer (2002) Genetic transformation of ectomycorrhizal fungi mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Mycol. Res.* 106:132-137
- Piers K L, J D Heath, X Liang, K M Stephens, E W Nester (1996) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of yeast PNAS USA. 93:1613-1618.
- Pirozynski K A, Y Dalpé (1989) Geological history of Glomaceae with particular reference to mycorrhizal symbiosis. *Symbiosis* 7:1-36.
- Read D J (1991) Mycorrhizal fungi in natural and semi-natural plant communities. *In: Ecophysiology of Ectomycorrhizae of Forest Trees.* M. Wallenberg Foundation, Stockholm, Sweden. M. Wallenberg Foundation Symposia Proc. Vol. 7:27-53.
- Read D J (1999) Mycorrhizae. The state of the Art. *In: Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology.* A Varma, B Hock (eds). Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp:3-36.
- Sanford J C (1988) The biolistic process. *Trends Biotech.* 8:299-302.
- Simon L, M Lalonde, T D Bruns (1992) Specific amplification of the 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:291-295.
- Simon L, R C Lévesque, M Lalonde (1993) Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent single stranded conformation polymorphism polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:4211-4215.
- Smith S E, D J Read (1997) Mycorrhizal Symbioses. 2nd. Ed. Academic Press. London. 605 p.
- Stilten C H, F X Kong, R Hampp (1995) Isolation and regeneration of protoplasts from the ectomycorrhizal ascomycete *Cenococcum geophilum* Fr. *Mycorrhiza* 5:259-266.
- Valdés M (1986) Survival and growth with specific ectomycorrhizal after 3 years on a highly eroded site. *Can. J. Bot.* 64:885-888.
- Valdés M, M C Galicia (1997) Interaction between actinorhizal and mycorrhizal associations on *Alnus accuminata* ssp *glabrata*. *Ciencia For. Méx.* 22:3-13.
- Valdes M, J Córdova, M Gómez, A M Fierros (2003) Understory vegetation and ectomycorrhizal sporocarp diversity response to pine regeneration methods in Oaxaca, Mexico. *Western J. Appl. For.* 18:101-108.
- van Tuinen D, E Jacquot, B Zhao, A Gallote, V Gianinazzi-Pearson (1998). Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Molec. Ecol.* 7:879-887.
- van Tuinen D, B Zhao, V Gianinazzi-Pearson (1999) PCR in studies of arbuscular mycorrhizal fungi: from primers to application. *In: Mycorrhiza Manual.* A Varma (ed). Springer, Berlin. pp:387-399.
- Vogt K, H Ashbjornsen, A Ercelawn, F Montagnini, M Valdés (1997) Roots and mycorrhizas. *In: Management of Soil, Nutrients and Water in Tropical Plantation Forests.* E K S Nambiar, A G Brown (eds). CSIRO Cambera, Australia. pp:247-286.
- Weber J, J Díez, M A Selosse, D Tagu, F Le Tacon (2002) SCAR markers to detect mycorrhizas of an American *Laccaria bicolor*

strain inoculated in European Douglas-fir plantations. Mycorrhiza 12:19-27.

Young B W, H B Massicotte, L E Tackaberry, Q F Baldwin, K N Egger (2002) *Monotropa uniflora*: morphological and molecular

assessment of mycorrhiza retrieved from sites in the sub-boreal spruce bioclimatic zone in central British Columbia. Mycorrhiza 12:75-82.