

COMPATIBILIDAD ENTRE NUEVOS PLAGUICIDAS QUÍMICOS SISTÉMICOS Y EL HONGO MICORRIZÓGENO *GLOMUS INTRARADICES* SCHENK Y SMITH

Rigel Fernández Valle, Marlene M. Veitía Rubio y Yoandry Rodríguez Rivero

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5.^a B y 5.^a F, Playa, La Habana, C.P. 11600, rfernandez@inisav.cu

RESUMEN

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) influyen favorablemente en la nutrición vegetal; sin embargo, poco se conoce sobre la interacción de nuevos plaguicidas en los ecosistemas agrícolas. Actualmente la protección de cultivos se realiza generalmente por métodos químicos con tratamientos sobre las semillas. De este modo se determinó la colonización micorrízica, la densidad visual y la micomasa de micelio interno a la raíz, con el fin de detectar si hay inhibición de la simbiosis de *Glomus intraradices* en semillas de maíz tratadas con cuatro plaguicidas sistémicos. La combinación de fungicida e insecticida (neonicotinoide + triazol + fenilpirrol) propició una mayor colonización del hongo simbionte al registrar una colonización que promedió 62,62 %. Bajo las dosis recomendadas existe total compatibilidad entre *G. intraradices* y las moléculas empleadas en este ensayo. El tratamiento de semillas de maíz puede considerarse en programas de manejo integrado de plagas.

Palabras claves: micorrizas arbusculares vesiculares, plaguicidas, *Glomus*, maíz

ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizae fungi (AMF) improve plants nutrition. However, the effect of new pesticides on agro-ecosystems is still unknown. Currently crops protection is done generally by chemical methods applied over seeds. Thus, the percent of mycorrhizal colonisation, visual density and the estimation of mycelium micomass endophytic to roots were determined, in order to find whether existence of inhibitory effect remains over symbiosis of *Glomus intraradices* at corn seeds enfolded with four systemic pesticides. Combination of fungicide and insecticide (neonicotinoide + triazol + fenilpirrol) enhance an upper mycorrhizal colonisation recording 62.62 %. Under such conditions, recommended doses have total compatibility between *G. intraradices* and molecules used in this assay. Film coating of corn seeds can be suggested at integrated pest's control management, as well.

Key words: vesicular arbuscular mycorrhizae, pesticides, *Glomus*, corn

INTRODUCCIÓN

La influencia de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en la nutrición vegetal ha sido ampliamente documentada [Smith y Read, 1997; Brundrett, 2002] debido a las ventajas que brinda esta simbiosis planta-hongo. Registros fósiles ubican a estos hongos desde el período Ordovícico [Redecker *et al.*, 2000], y al interactuar con más del 85 % de las familias de plantas terrestres, se consideran fundamentales en la conquista del medio terrestre por las plantas [Brundrett, 2002].

Estos hongos inducen cambios anatómicos o morfológicos en el sistema radical [Atkinson *et al.*, 1994; Vigo

et al., 2000], que a su vez alteran las poblaciones de rizobacterias en el rizoplasma [Azcón-Aguilar y Barea, 1992]. De forma general, los mecanismos que involucran a los HMA en la bioprotección vegetal se justifican mediante la mejoría de la nutrición mineral de la planta anfitriona y la competencia con hongos fitopatógenos por fuentes de carbono y del espacio endófito o ectófito [Pérez, 2010].

La protección de los cultivos en la agricultura moderna se realiza fundamentalmente con agroquímicos. Estos pueden aplicarse de forma directa en determinadas eta-

pas del cultivo, mediante el tratamiento de las semillas. Wan *et al.* (1998) han documentado que el herbicida glifosato tiene efectos negativos sobre la germinación de esporas de *Glomus intraradices* Schenk y Smith, en condiciones *in vitro*; sin embargo Mujica *et al.* (1999) y Powell *et al.* (2009) han reportado lo contrario en cultivos de sorgo y soya, respectivamente.

No casualmente se seleccionó a *G. intraradices* para este tipo de estudio de compatibilidad. Dicha especie, junto a *Glomus mosseae* [(Nicol. & Gerd.) Gerdemann & Trappe], dentro del orden *Glomerales*, se consideran las *vedettes*, ya que son el ingrediente activo de la mayoría de los inoculantes comerciales a nivel mundial, ya sea en actuación independiente o en unión a otras especies de HMA.

La más reciente actualización de compatibilidad entre fungicidas e inoculantes de HMA fue realizada por Hernández-Dorrego y Mestre (2010), pero en ese estudio todos los fungicidas fueron aplicados tanto al suelo como por vía foliar.

Se desconoce la acción que algunos insecticidas y fungicidas aplicados a las semillas pueden causar sobre los microorganismos del suelo; pero se conoce que al someterse a constante estrés físico y químico, disminuyen su abundancia y diversidad [Helgason *et al.*, 1998]. El uso intensivo de productos químicos, sobre

todo plaguicidas y fertilizantes, constituyen una de las causas principales de la reducción en la diversidad biológica en los suelos, y dentro de ella los HMA [Convenio sobre la Diversidad Biológica, 1996].

El tratamiento de las simientes con bioproductos basados en HMA es una metodología que cobra auge entre los agricultores, mientras se reformulan nuevos plaguicidas y se aplican sobre las semillas, de forma que disminuyen los costos de producción y se incrementan los rendimientos en los cultivos [Agropanorama.com s/a].

Es por todo lo anterior que se propone determinar si existe inhibición de la colonización de *G. intraradices* en semillas de maíz *Zea mays* L., tratadas con nuevos fungicidas e insecticidas, solos y combinados, bajo condiciones semicontroladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo constó de cuatro variantes denominadas INS1, INS2, INFG y INS3, un testigo de HMA sin plaguicida y un control (Tabla 1). Cada una con cinco réplicas en un diseño completamente aleatorizado.

Se utilizó un total de 0,5 kg de semillas de maíz var. Rodrigo esparcidas sobre un papel gaceta para secar durante 4 h a temperatura ambiente.

Tabla 1: Variantes y moléculas empleadas con sus respectivas dosis y efectos

Variante	Ingrediente activo	Actividad biológica	Grupo químico	Dosis (mL de pc/kg de semilla)
INS1	Clotianidin	Insecticida	Neonicotinoide	2,5
INS2	Tiodicarb36,90 + imidacloprid 12,30	Insecticida	Carbamato + neonicotinoide	10
INFG	Thiametoxam 262,5 + difenoconazol 25 + fludioxonil 25	Insecticida Fungicida	Neonicotinoide + triazol + fenilpirrol	3
INS3	Imidacloprid	Insecticida	Neonicotinoide	8
Testigo HMA+	<i>Glomus intraradices</i> (IES-9)	Simbionte	—	—
Control	—	—	—	—

pc: Producto comercial.

Luego de secadas se seleccionaron 50 semillas por cada variante, que se colocaron en placas Petri sobre papel de filtro humedecido con agua destilada hasta germinar. Al determinar el porciento de germinación se seleccionaron 10 por cada tratamiento según su calidad y desarrollo homogéneo.

Las esporas se obtuvieron por el método del tamizado en húmedo [Gerdemann y Nicolson, 1963] de un culti-

vo monoaxénico (IES-9), perteneciente a la Colección Cubana de Hongos Micorrizógenos Arbusculares (CCHMA) del Instituto de Ecología y Sistemática (Citma).

Solo se tomaron en cuenta las esporas que lucían viables por su forma, color y contenido lipídico bajo el microscopio estereoscópico, acorde con criterios de la colección internacional de estos hongos, conocida por

sus siglas en idioma inglés (INVAM). A excepción del control, las diez semillas escogidas de cada variante fueron inoculadas con pipeta de Pasteur a nivel de sus hipocótilo a razón de 10 esporas de *G. intraradices* por semilla (Fig. 1), con el fin de garantizar su adherencia a la raíz. Teóricamente un solo propágulo es capaz de generar la simbiosis [INVAM, 2010].

Las semillas previamente inoculadas y revestidas con cada tratamiento fueron sembradas en macetas de 1 L. En cada una de las réplicas se sembraron dos semillas con suelo ferralítico rojo estéril Ferralsol [FAO, 1998]. Las plántulas se expusieron a condiciones naturales de luminosidad y se regaron en días alternos durante un mes con agua corriente.

A los treinta días se procesaron todas las muestras, por ser el período recomendado durante el cual está vigente el efecto de las moléculas involucradas en cada caso. A las raicillas se les determinó el porcentaje de colonización micorrízica (% CM).

En cada caso se extrajeron al azar algo más de 200 mg de muestra de las raicillas con pinzas de disección, y luego se sometieron a la clarificación y tinción con Trypan Blue [Phillips y Hayman, 1970]. Una vez teñidas se observaron al microscopio estereoscópico en una placa Petri con retículo de 1,27 cm² y se contaron las intersecciones de raicillas con las líneas del retículo en la base de la placa (> de 100 intersecciones), conforme al método de Giovannetti y Mosse (1980).

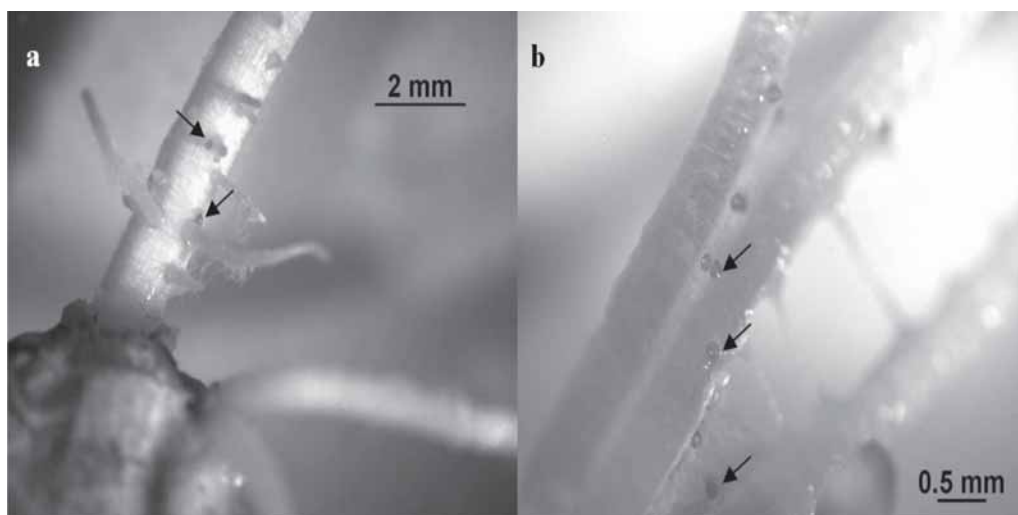


Figura 1. a) Semilla tratada con una de las variantes e inoculada con esporas de *G. intraradices* (IES-9). b) Detalles de raicillas del maíz con esporas.

Se clasificó la densidad visual de colonización (% DV) de 0 a 5 (Fig. 2) con sus respectivos valores de 0 al 47,5 %, según Herrera *et al.* (2004). El % DV es una variable que explica el grado de funcionalidad de la colonización. Se tomaron imágenes digitales al microscopio estereoscópico, con aumento de 2,5x a través de una cámara con *software* específicos a 1300 x 1030 dpi. También se realizaron fotos con microscopio compuesto y aumentos de 100x y 40x. A partir de las mismas muestras de raicillas y de los valores del % DV se estimó además la micomasa de micelio endófito (ME), según la fórmula:

$$ME = DV (\%) \frac{PSR}{100}$$

donde:

ME: Micomasa de micelio endófito
DV: Densidad visual de colonización
PSR: Peso seco de raicillas

Para comparar los valores medios de cada tratamiento se realizó un ANOVA, y como *post-hoc* la prueba Tukey a un nivel de significación del 5 %. Se realizó previamente el test de Levene para comprobar la homogeneidad de varianza. Todo el procesamiento estadístico se efectuó mediante el *software* SPSS vers.16 [SPSS Inc., 2007].

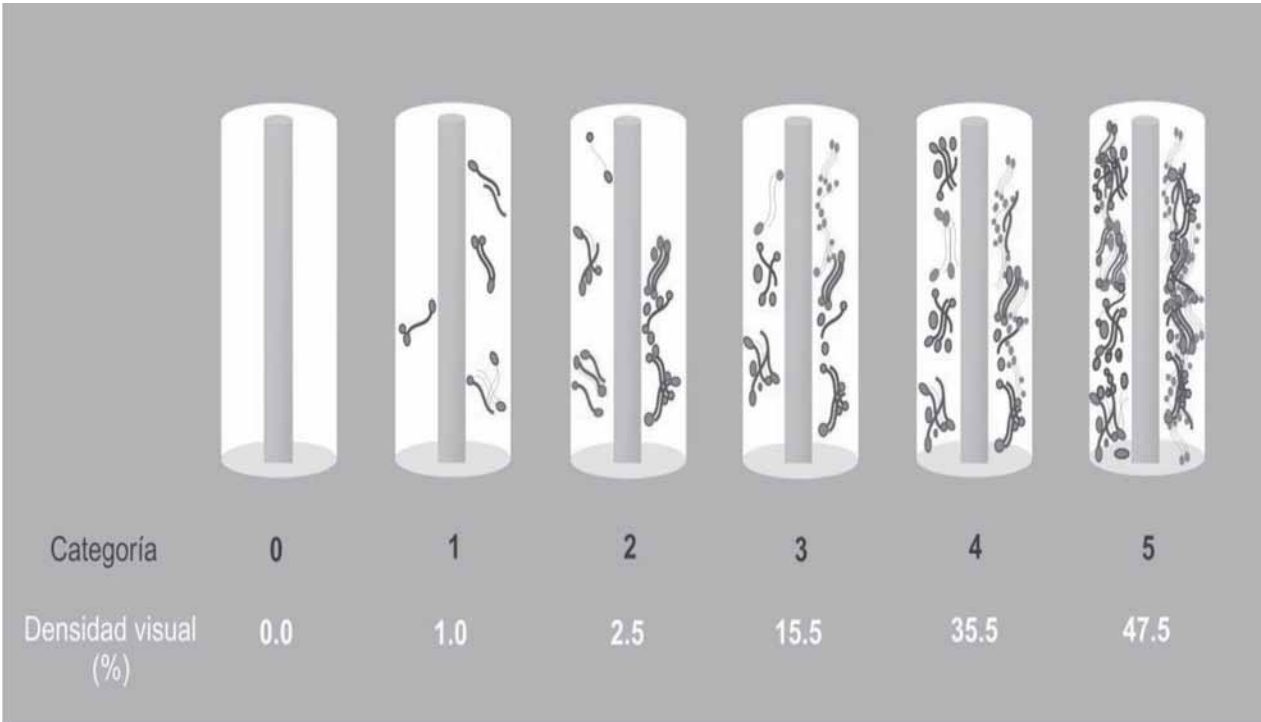


Figura 2. Diagrama de densidad de la colonización de raicillas por HMA [Herrera *et al.*, 2004].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de ME se reportan en $\text{mg} \times \text{dm}^{-3}$. Es conveniente expresar esta variable fúngica respecto a unidades de volumen y no de masa de suelo, pues en los suelos tropicales la densidad es muy variable [Herrera *et al.*, 2004]. Se partió de una variable cualitativa, de presencia o ausencia, como el % CM para poder estimar cuán óptima es la simbiosis, a partir de considerar siempre que el mayor valor que alcanza es del 47,5 %. De lo

contrario, sería disfuncional la simbiosis y colapsaría el tejido cortical de la raíz [Herrera *et al.*, 2004].

Se observó una colonización aceptable por parte de *G. intraradices* (Tabla 2). No fue frecuente observar vesículas o esporas internas en las raíces teñidas; sin embargo, se pudieron observar estructuras incipientes (Fig. 3a) y algunas ya maduras (3b). El mayor valor de % CM se alcanzó en INS2 (tiodicarb 36,90 + imidacloprid 12,30), mientras el mínimo se registró en el testigo HMA⁺.

Tabla 2. Variantes empleadas y variables estimadas

Variantes	% CM ± E.E.	% CM		% DV ± E.E.	ME ± E.E. (mg x dm ⁻³)
		Máx.	Mín.		
INS1	58,25 ± 5,63 a	72,73	38,52	2,35 ± 0,86	1,34 ± 0,50
INS2	59,99 ± 10,05 a	87,38	24,76	4,06 ± 1,68	2,28 ± 0,93
INFG	62,62 ± 9,39 a	77,12	25,71	4,16 ± 1,12	2,27 ± 0,62
INS3	59,11 ± 5,72 a	74,77	45,83	2,87 ± 0,74	1,55 ± 0,36
Testigo HMA ⁺	47,42 ± 12,75 a	69,37	11,76	2,10 ± 0,87	1,14 ± 0,46
Control	0 b	0	0	0	0

(n = 5). E.E.: Error estándar.

El INFG (thiametoxam 262,5 + difenoconazol 25 + fludioxonil 25) produjo el mayor valor promedio de co-

lonización de todos los tratamientos, aunque no existieron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre ellos.

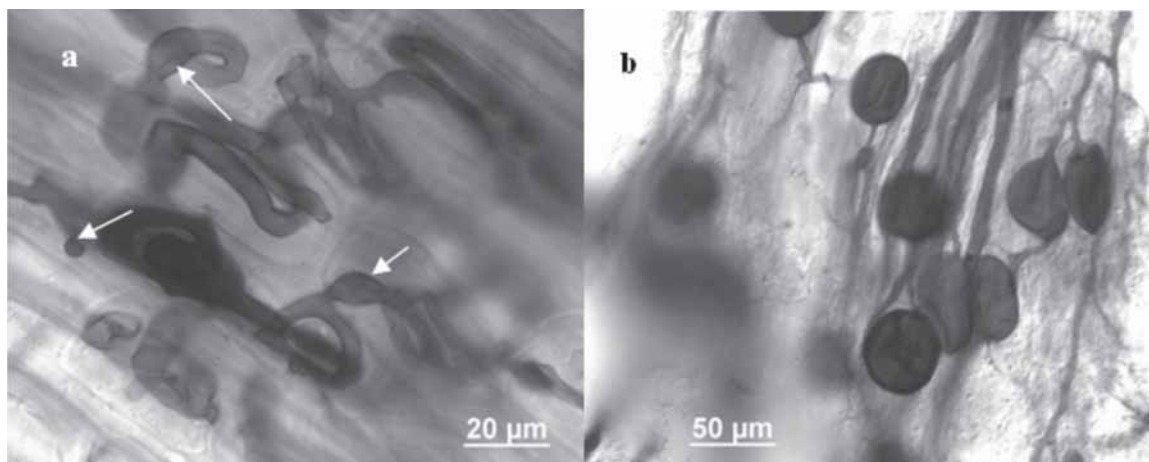


Figura 3. a) Raíz teñida con Trypan Blue (foto tomada al microscopio compuesto (100x)). Se destacan con flechas protuberancias en estructuras de intercambio tipo Paris. b) Esporas o vesículas internas a la raíz (foto tomada al microscopio compuesto (40x)).

Los valores estimados de la densidad visual fueron ligeramente bajos en todos los tratamientos, resultado quizás influido por el corto tiempo que duró el ensayo. En cambio, todas las semillas tratadas con plaguicidas tuvieron un valor promedio de % DV por encima del valor del testigo. Los valores de ME en INS2 y INFG fueron muy similares (Tabla 2), e incluso mayores que el tratamiento testigo HMA. Esto sugiere que las dosis recomendadas de los plaguicidas utilizados no afectan de forma negativa la simbiosis entre la planta y *G. intraradices*.

Los altos valores de % CM alcanzados por INSFG pudieran estar influenciados por el efecto vigorizante de las raíces del Thiamethoxam, que a su vez modula positivamente la respuesta de la simbiosis. Según Acevedo (2009), esta molécula estimula el crecimiento de las raíces en maíz.

Aun cuando no exista diferencia significativa entre los valores de % CM registrado respecto al testigo, estos resultados sugieren que la presencia de moléculas xenobióticas en la planta pudieran inducir algún estrés que aprovecha oportunamente el hongo simbionte para expresar mayor colonización. Quizás las alteraciones al metabolismo secundario de la planta [Leitner *et al.*, 2010] genera mayor gasto energético y coloca a la planta hospedera en asimetría competitiva, por lo que asume más fácilmente el consorcio con el HMA. En este sentido, recientemente se ha identificado en *G. intraradices* un gen que codifica para transportadores de membrana que contribuyen a la detoxificación del citosol, y actúan ante

estrés oxidativo y acumulación de metales en niveles tóxicos [González-Guerrero *et al.*, 2010].

Se pudiera afirmar, para continuar el enfoque energético del consorcio planta-hongo, que la colonización por *G. intraradices* es potenciada a favor del hongo. La inducción o activación de estos transportadores en el HMA favorece la detoxificación o tolerancia a algunas sustancias xenobióticas. En términos de eficiencia energética le resulta a la planta menos costoso asumir la simbiosis que activar sus propios mecanismos de tolerancia a moléculas ajenas.

Estos resultados coinciden con los de Afek *et al.* (1991) y Hwang *et al.* (1993), quienes obtuvieron superiores % CM en presencia del fungicida metalaxyl a dosis pequeñas. Algunos fungicidas incluso no tienen efecto alguno sobre los HMA [Goslin *et al.*, 2006]. Recientemente se encontró que el fenhexamid producía cierta atenuación del crecimiento de *G. intraradices* en hifas externas a la raíz transgénica de chicoria (*Cichorium intybus* L.) sin afectar la colonización, mientras el fenpropimorph afectaba negativamente la colonización y el desarrollo de las estructuras externas a la raíz [Campagnac *et al.*, 2010]. El fenpropimorph y el fenhexamid son inhibidores de la biosíntesis de esteroides; sin embargo, la misma especie de HMA responde diferente, independientemente del efecto de las moléculas xenobióticas.

Numerosas pruebas necesitan realizarse para discernir entre tipo de cultivo, ecotipo de HMA involucrado en la simbiosis, método de aplicación del biocida y estado fenológico de la planta al momento de la aplicación. Según Goslin *et al.* (2006), existe un desafío mayor, el cual consiste en discriminar efectos individuales de los biocidas aplicados a un cultivo durante todo su ciclo. Otros ensayos con nuevos productos y dosis debieran emplearse para corroborar o rechazar la validez del enfoque energético de la asociación planta-HMA ante el efecto de moléculas xenobióticas. La aplicación de productos químicos directamente a la semilla abre una nueva línea de estudios en la compatibilidad de microorganismos del suelo con los plaguicidas sintéticos de acción sistémica.

CONCLUSIONES

- El tratamiento combinado de fungicida e insecticida (neonicotinoide + triazol + fenilpirrol) propicia una mayor colonización micorrízica.
- La colonización de *G. intraradices* en maíz es independiente del volumen o dosis recomendadas para los productos comerciales evaluados.
- Los plaguicidas probados, aplicados a la semilla, pueden integrarse a los programas de manejo de plagas.
- Ninguna de las moléculas empleadas en este ensayo es incompatible o produce efecto negativo sobre la colonización por esta especie de hongo micorrizógeno.

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Eduardo Furrázola Gómez (Instituto de Ecología y Sistemática) por facilitar parte del análisis de las muestras en su laboratorio. De igual modo, los autores agradecen la obtención de las imágenes digitales en su laboratorio y el suministro de la cepa IES-9.

A la Fundación Rufford Maurice Laing para la conservación de la naturaleza por el apoyo con un modesto presupuesto.

A la máster en Ciencias Ángela Porras y a la técnica Rebeca Ramírez (Inisav) por su inestimable ayuda con el análisis estadístico y procesamiento de las muestras, respectivamente.

REFERENCIAS

Acevedo, J. C.: «Evaluación del efecto de la aplicación de Thiamethoxam sobre la calidad de semilla de cinco híbridos de maíz (*Zea mays* L.) y cinco variedades de arroz (*Oryza sativa* L.)», tesis de Maestría como requisito parcial para optar al título de Máster en Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Área Agraria, Bogotá, Colombia, 2009.

Afek, U.; J. A. Menge; E. L. V Johnson: «Interaction Among Mycorrhizae, Soil Solarization, Metalaxyl, and Plants in the Field», *Plant Dis.* 75: 665-671, 1991.

Agropanorama.com, <http://www.agropanorama.com/index.asp#03agricultura> (consultado: feb. de 2011).

Atkinson, D.; G. Berta; J. E. Hooker: «Impact of Mycorrhizal Colonisation on Root Architecture, Root Longevity and the Formation of Growth Regulators», *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems*, Birkhäuser Verlag, Basel, 1994, pp. 89-99.

Azcón-Aguilar, C.; J. M. Barea: «Interactions Between Mycorrhizal Fungi and Other Rhizosphere Microorganisms», *Mycorrhizal Functioning. An integrative Plant-Fungal Process*, Routledge, Chapman & Hall, Nueva York, 1992, pp.163-198.

Brundrett, M. C.: «Coevolution of Roots and Mycorrhizas of Land Plants», *New Phytol.* 154: 275-304, Inglaterra, 2002.

Campagnac, E.; A. Lounès-Hadj; D. Debiane; J. Fontaine; F. Laruelle; G. Garçon; A. Verdin; R. Durand; P. Shiral; A. Grandmougin-Ferjani: «Arbuscular Mycorrhiza Partially Protect Chicory Roots Against Oxidative Stress Induced by Two Fungicides, Fenpropimorph and Fenhexamid», *Mycorrhiza* 20: 167-178, Inglaterra, 2010.

Convenio sobre la Diversidad Biológica: «Consideración de la diversidad biológica agrícola en el marco del convenio sobre la diversidad biológica», Tema 9.1 del programa provisional. Conferencia de las partes en el convenio sobre la diversidad biológica, Tercera Reunión, Buenos Aires, 1996.

FAO: «World Reference Base for Soil Resources», ISSS-ISRIC-FAO, Roma, 1998.

Gerdemann, J. W.; T. H. Nicolson: «Spores of Mycorrhizal Endogone Species Extracted from Soil by Wet-Sieving and Decanting», *Transactions of the British Mycological Society* 46: 235-244, Inglaterra, 1963.

Giovannetti, M.; B. Mosse: «An Evaluation of Techniques for Measuring Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Infection in Roots», *New Phytol.* 84: 489-500, Inglaterra, 1980.

González-Guerrero, M.; K. Benabdellah; A. Valderas; C. Azcón-Aguilar; N. Ferrol: «*GintABC1* Encodes a Putative ABC Transporter of the MRP Subfamily Induced by Cu, Cd, and Oxidative Stress in *Glomus intraradices*», *Mycorrhiza* 20 (2): 137-146, Inglaterra, 2010.

Goslin P.; A. Hodge; G. Goodlass; G. D. Bending: «Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Organic Farming», *Agriculture, Ecosystem and Environment* 113 (1-4): 17-35, Inglaterra, 2006.

Helgason T.; T. J. Daniell; R. Husband; A. H. Fitter; J. P. W Young: «Ploughing up the Wood-Wide Web?», *Nature*, Inglaterra, 1998, pp. 394-431.

Hernández-Dorrego, A.; J. Mestre: «Evaluation of Some Fungicides on Mycorrhizal Symbiosis Between Two *Glomus* Species from Commercial Inocula and *Allium porrum* L. Seedlings», *Spanish Journal of Agricultural Research* 8 (1): 43-50, España, 2010.

Herrera, R. A.; E. Furrázola; R. L. Ferrer; R. Fernández; Y. Torres: «Functional Strategies of Root Hairs and Arbuscular Mycorrhizae in an Evergreen Tropical Forest, Sierra del Rosario, Cuba», revista *CENIC Ciencias Biológicas* 35 (3): 113-123, La Habana, 2004.

Hwang, S. F.; P. Chakravarty; D. Prevost: «Effects of Rhizobia, Metalaxyl, and VA Mycorrhizal Fungi on Growth, Nitrogen-Fixation, and Development of Pythium Root-Rot of Sainfoin», *Plant Dis.* 77: 1093-1098, Inglaterra, 1993.

INVAM.com: «Colección internacional de micorizas arbusculares», <http://invam.caf.wvu.edu/taxonomy> (consultado: sept. de 2010).

Leitner, M.; R. Kaiser; B. Hause; W. Boland; Axel Mithöfer: «Does Mycorrhization Influence Herbivore-Induced Volatile Emission in *Medicago truncatula*?», *Mycorrhiza* 20: 89-101, Inglaterra, 2010.

- Mujica, M. T.; S. Fracchia; J. A. Ocampo; A. Godeas: «Influence of the Herbicides Chlorsulfuron and Glyphosate on Mycorrhizal Soybean Intercropped with the Weeds *Brassica campestris* or *Sorghum halepensis*», *Symbiosis* 27: 73-81, Inglaterra, 1999.
- Pérez, E.: «Hongos micorrízicos arbusculares (HMA) para la bioprotección de patógenos en el cultivo del tomate (*Solanum Lycopersicum* L.)», tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas, La Habana, 2010.
- Phillips, J. M.; D. S. Hayman: «Improved Procedures? for Clearing Roots and Staining Parasitic and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi for Rapid Assessment of Infection», *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55: 158-161, Inglaterra, 1970.
- Powell, J. R.; R. G. Campbell; K. E. Dunfield; R. H. Gulden; M. M. Hart; D. J. Levy-Booth; J. N. Klironomos; K. P. Pauls; C. J. Swanton; J. T. Trevors; P. M. Antunes: «Effect of glyphosate on the tripartite symbiosis formed by *Glomus intraradices*, *Bradyrhizobium japonicum* and genetically modified soybean» *Applied Soil Ecology* 41: 128-138. Inglaterra. 2009.
- Redecker, D.; R. Kodner; L. E. Graham: «Glomalean Fungi from the Ordovician», *Science* 289: 1920-1921, EE. UU., 2000.
- Smith, S. E.; D. J. Read: *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press. Cambridge, MA, EE. UU., 1997.
- SPSS Inc.: SPSS vers.16, Chicago, Illinois, 2007.
- Vigo, C.; J. R. Norman; J. E. Hooker: «Biocontrol of the Pathogen *Phytophthora parasitica* by Arbuscular Mycorrhizal Fungi Is a Consequence of Effects on Infection Loci», *Plant Pathol.* 49: 509-514, Inglaterra, 2000.
- Wan, M. T.; J. E. Rahe; R. G. Watts: «A New Technique for Determining the Sublethal Toxicity of Pesticides to the Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus intraradices*», *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 1421-1428, Inglaterra, 1998.