

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Gabriel Roveda¹, Lucrecia Cabra²,
María Margarita Ramírez³
y Andrea Peñaranda⁴

ABSTRACT

Effect of arbuscular mycorrhizas on the acclimation and hardening of microplantlets of Andean blackberry (*Rubus glaucus*)

The transfer of Andean blackberry plantlets from *in vitro* to *ex vitro* conditions is one of the most critical phases of the micropropagation technique due to the high mortality rate of plantlets (50-90%), as a consequence of a poorly developed cuticle, non-functional stomates and a weak radicle system that facilitates dehydration by water stress. This investigation focused on obtaining clean plantlets originated from tissue culture and hardened with arbuscular mycorrhizas (HMA). The research was performed under controlled conditions; an experimental design of random complete blocks was used with eight treatments, three repetitions and four experimental units as follows; three control treatments without inoculation, without fertilizing (T_0), with 50% fertilizing (T_{50}) and with 100% fertilizing (T_{100}), and five treatments inoculated with HMA (MA1, MA2, MA3, MA4 and Mycobiol®) plus T_{50} . The major benefits of inoculation with HMA were achieved with the strain MA4 isolated from Sylvania (Cundinamarca) and with native spores classified as *Glomus* sp. and *Acaulospora* sp. The inoculated plants showed better adaptation to the environment, reflected in plant size, accumulation of foliar and radicle biomass, wider foliar area, and better nutritional state reflected in a higher absorption of essential nutrients (P, N, Ca, and Mg). The use of the strain MA4 allowed the substitution of 50% of commercial fertilization since it achieved similar values to T_{100} in the absorption of P and Ca, and higher absorption for N and Mg. The levels of root colonization by the fungus explained this vegetative behavior.

Key words: inoculation, *ex vitro*, native strains, adaptation, nutrition.

Recibido: abril 20 de 2007
Aceptado: junio 2 de 2007

1. Investigador master principal, Grupo de Recursos Biofísicos, Centro de Investigación Tibaitatá, Mosquera (Cundinamarca), CORPOICA. e-mail: groveda@corpoica.org.co
2. Tesista. Licenciatura en Biología, Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá.
3. Investigadora master principal, Grupo de Recursos Biofísicos, Centro de Biotecnología y Bioindustria, Centro de Investigación Tibaitatá, Mosquera (Cundinamarca), CORPOICA.
4. Ingeniera de producción biotecnológica, Universidad Francisco de Paula Santander, Cúcuta.

Efecto de las micorrizas arbusculares sobre la aclimatación y endurecimiento de microplántulas de mora (*Rubus glaucus*)

RESUMEN

La transferencia de plántulas de mora de condiciones *in vitro* a *ex vitro* es una de las fases más críticas de la técnica de micropropagación debido al alto grado de mortalidad de plántulas (50 a 90%), como consecuencia de una cutícula poco desarrollada, estomas no funcionales y un sistema radical débil que facilita la deshidratación por estrés hídrico. Esta investigación se orientó a la obtención de plántulas limpias procedentes de cultivo de tejidos y endurecidas con micorrizas arbusculares (HMA). La investigación se realizó bajo condiciones controladas; se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar con ocho tratamientos, tres repeticiones y cuatro unidades experimentales, así: tres tratamientos testigo sin inoculación, sin fertilizar (T_0), con 50% de fertilización (T_{50}), y con 100% de fertilización (T_{100}), y cinco tratamientos inoculados con HMA (MA1, MA2, MA3, MA4 y Mycobiol) más T_{50} . Los mayores beneficios de la inoculación con HMA se lograron con la cepa MA4 aislada de Sylvania (Cundinamarca) y con esporas nativas clasificadas como *Glomus* sp. y *Acaulospora* sp. Las plantas inoculadas mostraron mejor adaptación al ambiente, expresada en el porte, la acumulación de biomasa foliar y radical, mayor área foliar y mejor estado nutricional expresado en una mayor absorción de nutrientes esenciales (P, N, Ca y Mg). El uso de la cepa MA4 permitió sustituir el 50% de la fertilización comercial debido a que obtuvo valores similares a T_{100} en la absorción de P y Ca, y superiores a ésta en la absorción de N y Mg. Este comportamiento vegetal se explicó por los niveles de colonización del hongo en las raíces.

Palabras claves: inoculación, *ex vitro*, cepas nativas, adaptación, nutrición.

INTRODUCCIÓN

LA MORA (*RUBUS GLAUCUS*) se encuentra entre los frutales promisorios y de gran importancia comercial en Colombia. Los principales departamentos productores se localizan en la zona andina, entre los cuales se destacan Cundinamarca (36%), Santander (22%), Valle (7%) y Antioquia (8%), los cuales representan 73% del total de la producción nacional y 74% del área sembrada (Asohofrucol y DANE, 2004).

La producción de mora a nivel nacional se ha venido incrementando de manera destacada, pues en los últimos años pasó de 48.121 toneladas (t) en 1998 a 78.738 t en 2003, con un crecimiento cercano a 32,7% anual, lo que representa un importante renglón para la economía por la producción de alimentos y por la generación de divisas para el país. Sin embargo, este incremento en la producción ha sido consecuencia principalmente del aumento en el área cultivada, que en estos años pasó de 5.662 hectáreas en 1998 a 10.001 hectáreas en 2003, con crecimiento del 35% anual durante este período (CCI, 1999; Asohofrucol y DANE, 2004).

Existe un amplio potencial para incrementar los rendimientos por hectárea en el cultivo de la mora a través del uso de tecnologías apropiadas. Los rendimientos anuales por hectárea bajo las condiciones de producción en Colombia varían ampliamente entre 6 y 16 t·ha⁻¹, para un promedio nacional de 11 t·ha⁻¹ al año, de acuerdo con el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural citado por Asohofrucol y DANE (2004).

Algunos de los principales limitantes de la producción de mora se relacionan con problemas fitosanitarios que se originan en la semilla, debido a que la mayoría de los cultivos establecidos utilizan propagación asexual mediante acodos o estacas, los cuales transmiten enfermedades fungosas, bacterianas y virales entre las plantas que ocasionan grandes pérdidas al agricultor (Avilán, Bautista y Leal, 1989; Angulo, 2003).

En los últimos años se ha utilizado la micropropagación a partir de meristemas mediante la técnica de cultivo de tejidos *in vitro* (Angulo, 2003); este sistema, además de permitir la propagación masiva de

clones específicos, garantiza alta calidad, mayor uniformidad y la obtención de semilla limpia, con materiales libres de patógenos (Jaizme-Vega y Barea, 1992 y Jaizme-Vega, 1999).

A pesar de los múltiples beneficios que genera la micropropagación, existen limitantes para un uso más extendido de esta técnica. La transferencia de plántulas *in vitro* a condiciones *ex vitro* es uno de los pasos más críticos de la micropropagación, debido a los altos grados de mortalidad de plántulas (entre 50 y 90%) (Sutter, 1985; Ziv *et al.*, 1987), como consecuencia de una cutícula poco desarrollada, estomas no funcionales y un sistema radical débil que facilita la deshidratación por estrés hídrico (Vestberg y Estaún, 1994; Elmeskaoui *et al.*, 1995; Alarcón y Ferrera-Cerrato, 2000; Schultz, 2001).

Por otra parte, se ha observado que algunas plantas micropropagadas como la uva, la manzana, la piña, el aguacate, el plátano y el anón, presentan por lo general alta dependencia de las relaciones micorrícicas (Nemec, 1986). Según esto, al inocular las plantas micropropagadas con hongos de micorrizas arbusculares (HMA), se logra alcanzar un crecimiento óptimo (Gianinazzi *et al.*, 1990). Este conocimiento ha permitido en la actualidad integrar ambas biotecnologías, la micropropagación *in vitro* y el uso de la inoculación micorrícica, en diversas plantas de interés (Lovato *et al.*, 1995 y 1996).

Existen tres etapas en las que la inoculación con HMA puede potencialmente llevarse a cabo, a saber: 1) durante la fase de enraizamiento *in vitro*; 2) después del enraizamiento *ex vitro*, al inicio del período de aclimatación en etapa de vivero; 3) *ex vitro*, después de la etapa de vivero y antes de iniciar el trasplante a condiciones de invernadero, conocida como 'etapa de endurecimiento' (Vestberg y Estaún, 1994). Con relación a la primera etapa, la fase *in vitro*, la fase de enraizamiento tiene lugar sobre un medio de agar, mientras que la germinación y el desarrollo del micelio del hongo ocurre en condiciones axénicas (Azcón-Aguilar *et al.*, 1997a). No obstante, se conoce que existe una aparente contradicción entre las bajas demandas de nutrientes por la espora durante su germinación y el alto uso

de sustancias nutritivas en los sistemas de micropropagación *in vitro*, debido a que las plántulas tienen un desarrollo incipiente del sistema radical.

La inoculación *in vitro* aparentaba ser más fácil y prometedora al inocular plántulas propagadas axénicamente para luego ser transplantadas a materas (Rovallanirina *et al.*, 1990; Schubert *et al.*, 1992). Sin embargo, la inoculación *ex vitro* ha sido ampliamente utilizada, tanto después del enraizamiento *in vitro*, como al iniciar el trasplante a condiciones de invernadero o etapa de endurecimiento, debido a que probablemente es un método más adecuado para viveros comerciales.

Las ventajas de la inoculación con HMA *ex vitro* en plantas micropropagadas *in vitro* se han probado en muchas especies de frutales como uvas, manzana, ciruelo, piña, aguacate, fresa, frambuesa, cereza (Varma y Schüepp, 1995; Vidal *et al.*, 1992; Fortuna *et al.*, 1996; Lovato *et al.*, 1996; Azcón-Aguilar *et al.*, 1997b), plátano (Jaizme-Vega y Azcón, 1995; Jaizme-Vega, 1999), patrones clonales de peral y melocotonero (Rapparini *et al.*, 1994), pistacho (Schubert y Mazzitelli, 1988), kiwi (Schubert *et al.*, 1992) anón y cereza silvestre, todas las cuales mostraron una mejor adaptación, toma de nutrientes y crecimiento vegetal (Azcón-Aguilar *et al.*, 1997a; Lovato *et al.*, 1994).

La fase de aclimatación es un paso crítico en el ciclo de la micropropagación. Investigaciones recientes en plantas de casava o yuca (Azcón-Aguilar *et al.*, 1997b) y micropropagación de los rizomas de árboles frutales (Monticelli *et al.*, 2000 citado por Schultz, 2001) han demostrado que la inoculación con micorrizas al inicio de esta etapa reduce el choque del trasplante y aumenta así la supervivencia porque estabiliza la planta (Schultz, 2001).

Comparando lo que tarda la colonización al comienzo de la aclimatación, o al principio de la etapa de endurecimiento, se ha visto que en algunos casos, aunque la simbiosis se estableció en ambas fases, se produjo mejor respuesta de la planta cuando la inoculación tuvo lugar al principio de la etapa de endurecimiento, dado que permite el desarrollo de la colonización y el establecimiento del hongo (Vidal *et al.*, 1992; Azcón-Aguilar *et al.*, 1992 citado en Jaizme-Vega, 1999).

Vestberg y Estaún (1994) establecieron un protocolo de inoculación el cual debe rediseñarse para cada caso particular. Este protocolo considera las siguientes variables: 1) el grado de desarrollo de la raíz; 2) la duración de los períodos de aclimatación y endurecimiento (cambio de la fase heterotrófica a la fase autotrófica del hongo); y 3) los objetivos de la inoculación con HMA, tales como: incrementar crecimiento vegetal, aumentar supervivencia de plántulas, bajar los aportes de fertilizantes, aumentar la resistencia al estrés abiótico y biótico (Jaizme-Vega, 1999).

Es importante para este tipo de experimentos la selección de las mejores cepas del hongo formador de micorriza arbuscular para un eficiente desarrollo micorrícico en plantas micropropagadas (Guillemin *et al.*, 1992; Vestberg, 1992; Lovato *et al.*, 1995).

Si bien se conocen las bondades de una etapa de endurecimiento del material *in vitro*, muchos de los laboratorios comerciales que emplean estas técnicas de propagación no realizan el endurecimiento de los materiales antes del trasplante definitivo a campo, por considerar este proceso difícil y costoso, y porque representa entre 35 y 75% del costo total de la semilla (Encina, 1996).

El principal propósito de esta investigación fue la obtención de semilla limpia de mora, endurecida, procedente de cultivo de tejidos e inoculada con Hongos de Micorrizas Arbusculares (HMA), para mejorar la supervivencia de las plántulas y reducir el uso de fertilizantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

La investigación se realizó en los invernaderos y laboratorios de micropropagación y ecofisiología vegetal del Centro de Investigaciones Tibaitatá (CORPOICA). El diseño experimental seleccionado fue el de bloques completos al azar, con ocho tratamientos y tres repeticiones, cada tratamiento con cuatro unidades experimentales; se realizaron dos tipos de muestreo: uno de seguimiento o monitoreo, con una frecuencia quincenal, y tres muestreos destructivos a 30, 80 y 120 días después del trasplante.

Los tratamientos evaluados fueron los siguientes: tres tratamientos testigo sin inoculación, uno sin fertilizar o testigo absoluto (T_0), uno con 50% de fertilización (T_{50}), y un testigo comercial con 100% de fertilización (T_{100}) y cinco tratamientos inoculados con HMA (MA1, MA2, MA3, MA4 y Mycobiol) y con 50% de la fertilización comercial.

Preparación del sustrato e inoculantes

Después de la fase de enraizamiento *in vitro* al inicio de la etapa de aclimatación se utilizaron recipientes de plástico con turba canadiense (sustrato estéril) previamente humedecida; a los 30 días después de la siembra (dds) se pasaron a materas desinfectadas con 1,8 kg de un sustrato compuesto por una mezcla de suelo y cascarilla de arroz en proporción 3:1 (V:V). De acuerdo con el análisis de suelo, las características químicas fueron: pH ligeramente ácido (5,0), alto contenido de materia orgánica (11,4%), niveles bajos de fósforo ($9 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), situación ideal para la evaluación de HMA. De igual manera, se evaluaron nutrientes como azufre ($23 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), calcio ($3 \text{ cmol}^+\cdot\text{kg}^{-1}$), magnesio ($1,9 \text{ cmol}^+\cdot\text{kg}^{-1}$), potasio ($1,7 \text{ cmol}^+\cdot\text{kg}^{-1}$), cobre ($1,8 \text{ cmol}^+\cdot\text{kg}^{-1}$), manganeso ($16 \text{ cmol}^+\cdot\text{kg}^{-1}$), sodio ($0,3 \text{ cmol}^+\cdot\text{kg}^{-1}$), zinc ($6,9 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), hierro ($360 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) y boro ($0,3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$).

Los inóculos de micorriza arbuscular se obtuvieron a partir muestras de suelo rizosférico de cultivos establecidos de mora de los departamentos de Antioquia y Cundinamarca; a partir de estas muestras se inició la multiplicación de las cepas nativas de hongos de micorriza arbuscular, para luego proceder a inocular las plántulas de mora.

Inoculación y condiciones experimentales

Se utilizaron propágulos de mora de tres semanas en enraizamiento *in vitro*, propagadas en el laboratorio de micropropagación de plantas de CORPOICA en el C.I. Tibaitatá. La inoculación se realizó al momento de la siembra en el laboratorio de ecofisiología vegetal, utilizando una concentración de 200 esporas por planta. Éstas permanecieron en recipientes con turba durante 30 días y se cubrieron los primeros doce días con una película de vinilpel para mantener la humedad relativa alta. Cada tres días se aplicó solu-

ción nutritiva de Hoagland a todos los tratamientos y cuatro semanas más tarde se pasaron a materas y se trasladaron al invernadero.

Sistema de muestreo y variables analizadas

Se realizaron tres muestreos destructivos de la siguiente manera: en la fase de aclimatación (*ex vitro*), a los 30 dds, y durante la fase de *endurecimiento* de los materiales a los 80 y 120 días después del trasplante (ddt), momento en el que se cuantificaron los efectos de la inoculación sobre la acumulación de biomasa en plantas, el crecimiento vegetal y la absorción de nutrientes. Adicionalmente, se analizó la asociación simbiótica mora-HMA a través del porcentaje de colonización en raíz de micorrizas arbusculares, empleando la metodología de tinción con azul de tripan propuesta por Phillips y Hayman (1970), para lo cual se tomaron muestras de raíces a los 80 y 120 ddt. El monitoreo de tamaño de la planta se realizó a partir de los 83 ddt hasta los 160 ddt, con una frecuencia quincenal.

Se cuantificó la concentración de nutrientes (N, P, K, Ca, Mg y S) en tejido vegetal teniendo en cuenta la metodología del Laboratorio de Suelos y Tejidos del Programa Nacional de Recursos Biofísicos (CORPOICA). Para la cuantificación del fósforo y el azufre se utilizó un método colorimétrico mediante molibdato-vanadato y cloruro de bario, respectivamente. La concentración de K, Mg y Ca en tejido vegetal se determinó mediante espectrometría de absorción atómica y la concentración de nitrógeno

se determinó por el método de Kjeldahl (AOAC, 1996).

Finalmente, los resultados experimentales obtenidos se compararon estadísticamente mediante análisis de varianza ($P\leq 0,05$ y $P\leq 0,01$) y la prueba de comparación de Tukey, con un nivel de confianza de ($P\leq 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de los HMA en la acumulación de biomasa de plantas de mora durante las etapas de aclimatación y endurecimiento

La acumulación de biomasa en las plantas de mora se determinó en la parte aérea de la planta (tejido foliar) y en la raíz. Durante la fase inicial de aclimatación de propágulos (30 dds) no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para materia seca foliar y fresca radical, de acuerdo con el análisis de varianza (GLM); no obstante, a partir de los 80 ddt, ya en la etapa de endurecimiento, se presentaron diferencias altamente significativas (Tabla 1).

Durante la fase de aclimatación se inicia el proceso de colonización del hongo en las raíces de las plántulas de mora. Este proceso no genera beneficios a la planta por tratarse del establecimiento de la simbiosis, donde se demandan fotosintatos de carbono provenientes de la planta. Los beneficios de la asociación simbiótica se presentan en una etapa posterior, durante el endurecimiento de las plántulas, como se explica a continuación: inicialmente se observaron diferencias debidas a la fertilización entre los tratamientos testigo, donde el tratamiento T_{100} mostró los valores más altos en

Tabla 1. Efecto de la inoculación con Hongos Formadores de Micorriza Arbuscular (HMA) nativos en plántulas de mora durante las etapas de aclimatación y endurecimiento.

Fuentes de variación	Etapa de aclimatación 30 dds		Etapa de endurecimiento			
	Peso fresco radical (g)	Peso seco foliar (g)	80 ddt		120 ddt	
			Peso seco foliar (g)	Peso fresco radical (g)	Peso seco foliar (g)	Peso fresco radical (g)
GLM	ns	ns	**	**	**	*
T_0	0,19a	0,05a	0,19b	1,19b	0,47b	2,61b
T_{50}	0,30a	0,06a	1,80ab	4,07ab	6,42b	9,46ab
T_{100}	0,39a	0,07a	2,51a	6,64a	10,33a	16,16ab
MA 1	0,16a	0,05a	1,59ab	2,69ab	6,62ab	15,62ab
MA 2	0,22a	0,05a	1,20ab	3,34ab	8,70a	15,06ab
MA 3	0,22a	0,05a	1,52ab	3,25ab	10,51a	22,09a
MA 4	0,27a	0,08a	2,94a	6,85a	9,60a	20,49a
Mycobiol	0,10a	0,05a	1,60ab	4,09ab	8,00ab	16,48ab
Coefficiente de variación (cv)	40,96	33,27	39,22	36,22	35,23	35,19

** : diferencias altamente significativas ($P<0,01$); * : diferencias significativas ($P<0,05$); ns : diferencias no significativas de acuerdo al Anava. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P<0,05$) de acuerdo con la prueba de Tukey. dds: días después de la siembra. ddt: días después del trasplante.

acumulación de materia seca, superiores al testigo absoluto (sin fertilización), similares al testigo T₅₀ a los 80 ddt pero ligeramente más altos en las variables peso seco foliar y peso fresco radical. Sin embargo, a los 120 ddt las diferencias en peso seco foliar fueron más marcadas entre el testigo T₁₀₀ y los otros dos testigos, T₀ y T₅₀, los cuales presentaron resultados estadísticamente similares. En cuanto al peso fresco radical los tres tratamientos, T₁₀₀, T₅₀ y el testigo absoluto, mostraron valores similares.

Entre los tratamientos micorrizados se destacó la cepa MA4 con 50% de fertilización en la acumulación de materia seca foliar y fresca radical a los 80 ddt y 120 ddt con relación al testigo absoluto. Es importante resaltar que estas diferencias de la cepa MA4 superaron al testigo absoluto y T₅₀ a los 120 ddt, en peso seco foliar más no en el peso fresco radical. Sin embargo, algunas otras cepas como la MA2 y MA3 presentaron valores similares a la cepa MA 4 a los 120 ddt en materia seca foliar. En todos estos tratamientos se incluyó un 50% de fertilización.

Estos resultados permitieron ver el efecto benéfico de algunas cepas de HMA sobre la acumulación de biomasa, así: la cepa MA4 presentó valores superiores al testigo absoluto a los 80 ddt, y a los 120 ddt con el T₅₀ en la variable peso seco foliar, mostrando en ambos casos valores similares al T₁₀₀. Este resultado muestra la capacidad de esta cepa para sustituir el 50% de la fertilización en plantas de mora.

Efecto de los HMA sobre otros parámetros de crecimiento vegetal y el porcentaje de colonización radical

Para evaluar los parámetros de crecimiento se tuvieron en cuenta las variables ‘longitud de la planta’, ‘área foliar’ y ‘número de ramas por planta’. La primera variable fue monitoreada con una frecuencia quincenal, mientras que las otras dos variables se determinaron a los 120 ddt. De igual forma, el porcentaje de colonización fue cuantificado a los 120 ddt.

Con respecto a la longitud de la planta se encontraron diferencias altamente significativas (P≤0,01) entre tratamientos en la mayoría de los muestreos, excepto a los 97 ddt, según el análisis de varianza (GLM) (Tabla 2).

Al observar lo tratamientos testigo en la mayoría de los muestreos, las plantas con algún nivel de fertilización (T₁₀₀ y T₅₀) fueron similares entre sí, excepto a partir de los 125 ddt, pero diferentes significativamente (P≤0,05) frente al testigo absoluto. Este resultado confirma el efecto de los niveles de fertilización en el porte de plantas de mora. Es importante destacar que a partir de los 125 ddt el tratamiento T₁₀₀ se diferencia de los otros dos testigos, T₅₀ y T₀.

La variable ‘longitud de la planta’ se vio afectada por la inoculación con HMA de la siguiente forma: las plantas inoculadas con la cepa MA1 inicialmente fueron las de mayor porte con respecto a los demás tratamientos inoculados y al testigo absoluto. Sin embargo, el tratamiento con la cepa MA4 fue el que indujo mayor porte de planta, con similares resultados al T₁₀₀ y superior al testigo absoluto después de los 111 ddt y al T₅₀ a partir de los 125 ddt.

Con respecto al área foliar se presentaron diferencias altamente significativas entre tratamientos, según la prueba de Tukey. En estas diferencias se destaca el comportamiento de las plantas inoculadas con la cepa MA4 (572,29 cm²) con la mayor área foliar, superior al testigo absoluto (29,4 cm²) y al tratamiento MA2 (191,96 cm²), pero similar al resto de los tratamientos, los que obtuvieron valores de 386,82 cm² T₁₀₀, 281,58 cm² T₅₀ y de las plantas inoculadas con las cepas MA1 (275,45 cm²), MA3 (268,92 cm²) y Mycobiol (295,97 cm²).

Para la variable número de ramas se encontraron igualmente diferencias alta-

mente significativas (P< 0,01) de acuerdo con el análisis de varianza; se observa claramente el efecto de la inoculación con HMA para todas las cepas utilizadas (MA1, MA2, MA3, MA4 y Mycobiol) con respecto al testigo absoluto, al presentar mayor número de ramas por planta (Tabla 2); los otros dos testigos, T₁₀₀ y T₅₀, obtuvieron valores intermedios en número de ramas, similares a los tratamientos inoculados.

Este resultado es de gran importancia dentro del crecimiento y desarrollo de esta especie, debido a que es una planta perenne de tipo arbustivo cuyos tallos emiten constantemente brotes en su base, y este tipo de crecimiento está relacionado con la nutrición de la planta (Franco y Giraldo, 1998).

Con base en los resultados obtenidos se puede concluir que plantas inoculadas con la cepa MA4 presentaron valores similares al tratamiento T₁₀₀, a pesar de tener solamente 50% de fertilización. Ello indica que se puede sustituir el 50% de la fertilización si se utiliza esta cepa como biofertilizante. Adicionalmente, los beneficios no sólo se pueden expresar en las etapas de aclimatación y endurecimiento, sino posiblemente durante todo el ciclo de cultivo.

Efecto de la inoculación con HMA sobre los índices de asociación simbiótica en plantas de mora durante la etapa de endurecimiento

La inoculación con HMA en este ensayo se realizó usando aislamientos de cepas nativas, los cuales provenían de plantaciones establecidas de mora en donde se hizo identificación taxonómica para

Tabla 2. Efecto de la inoculación con Hongos de Micorriza Arbuscular (HMA) nativos en plántulas de mora sobre algunos parámetros de crecimiento y en la colonización.

Fuentes de variación	Etapas de desarrollo vegetativo							
	Longitud					Área foliar	Número de ramas	% colonización
	83 ddt	97 ddt	111 ddt	125 ddt	139 ddt	cm ²	#	
GLM	**	ns	**	**	**	**	**	**
T ₀	5,3c	5,7a	6,6c	6,8c	7d	29,40c	1b	15b
T ₅₀	9,43ab	9,7a	11,4ab	11,7b	12cd	281,58abc	2ab	11b
T ₁₀₀	10,50ab	11,8a	15,16a	16,8a	18,5ab	386,82ab	2ab	17b
MA 1	11,20a	11,5a	13,0ab	14,2ab	15,8bc	275,45abc	3a	47a
MA 2	9,20ab	9,6a	10,93abc	11,9b	14,2bc	191,96bc	4a	37a
MA 3	8,50b	8,8a	9,8bc	10,5bc	12,4cd	268,92abc	3a	38a
MA 4	10,30ab	8,4a	14,5a	18,5a	22,1a	572,29a	4a	40a
Mycobiol	8,9ab	10,1a	10,6ab	11,5b	12,9bc	295,97abc	3a	40a
Coefficiente de variación (cv)	10,05	24,90	13,86	12,27	13,77	41,15	19,14	18,95

** : diferencias altamente significativas (P<0,01), * : diferencias significativas (P<0,05), ns : diferencias no significativas de acuerdo al Anava. Letras diferentes indican diferencias altamente significativas (P<0,05) de acuerdo con la prueba de Tukey; ddt: días después del trasplante.

determinar los géneros que se encontraban en cada muestra. La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos en la identificación de géneros de HMA.

El grado de asociación simbiótica se determinó a través de variables relacionadas con la colonización de HMA en las raíces de mora, expresada como 'porcentaje de colonización', índice que determina la proporción de raíces colonizadas por HMA frente al total de raíces de la planta.

De acuerdo con la Tabla 2, se observan diferencias altamente significativas ($P \leq 0,01$) entre tratamientos en los porcentajes de colonización según el análisis de varianza (GLM). Estas diferencias se establecen fundamentalmente entre tratamientos inoculados con HMA y no inoculados (T_{100} , T_{50} y T_0). Los resultados experimentales confirman el efecto de la inoculación en los tratamientos tratados con HMA, los cuales presentan niveles de colonización superiores a 37%, frente a los testigos que presentaron porcentajes de colonización inferiores de 17%.

La colonización de HMA en los tratamientos testigo es causada por la presencia de cepas nativas de micorrizas, con 22 esporas por gramo de suelo, debido a que los sustratos utilizados no fueron previamente desinfectados. Sin embargo, los niveles de colonización en los tratamientos testigos son bajos, menores que aquellos inoculados, lo que demuestra la importancia de la práctica de inoculación y la mayor eficiencia de las cepas inoculadas con relación a las cepas presentes en el sustrato (Figura 1).

Adicionalmente, en el caso del testigo T_{100} los bajos niveles de colonización pueden ser explicados por el efecto inhibitorio debido a la mayor disponibilidad de fósforo en el suelo, la cual inhibe los procesos de colonización de HMA (Sieverding, 1991). No obstante, esta afirmación no es suficiente para explicar los bajos niveles de colonización en los tratamientos T_{50} y T_0 ; por lo tanto, se sugiere baja eficiencia en las cepas encontradas en el sustrato utilizado para el experimento; por el contrario, las cepas utilizadas en los tratamientos inoculados mostraron mayor eficiencia con valores de colonización cercanos a 40%.

En general se puede decir que la inoculación con cepas nativas de HMA de suelos de Cundinamarca y Antioquia produjo resultados favorables en plantas micropropagadas de mora, pues junto con las técnicas utilizadas para la etapas de aclimatación y endurecimiento permitió alcanzar 100% de supervivencia en todos los tratamientos.

El efecto de las cepas MA4 y MA3 sobre las plántulas finalizando el experimento fue satisfactorio en cuanto a la longitud de las plantas, generación de nuevos brotes y desarrollo foliar. Adicionalmente, se observó que las plantas micorrizadas presentaban una menor incidencia de enfermedades. En cuanto al desarrollo radical se encontró que los HMA beneficiaron el crecimiento radical, lo cual es muy importante para las plan-

tas procedentes de cultivos de tejidos, debido a que éstas presentan inicialmente una raíz débil y poco funcional, la cual es sustituida por nuevas raíces.

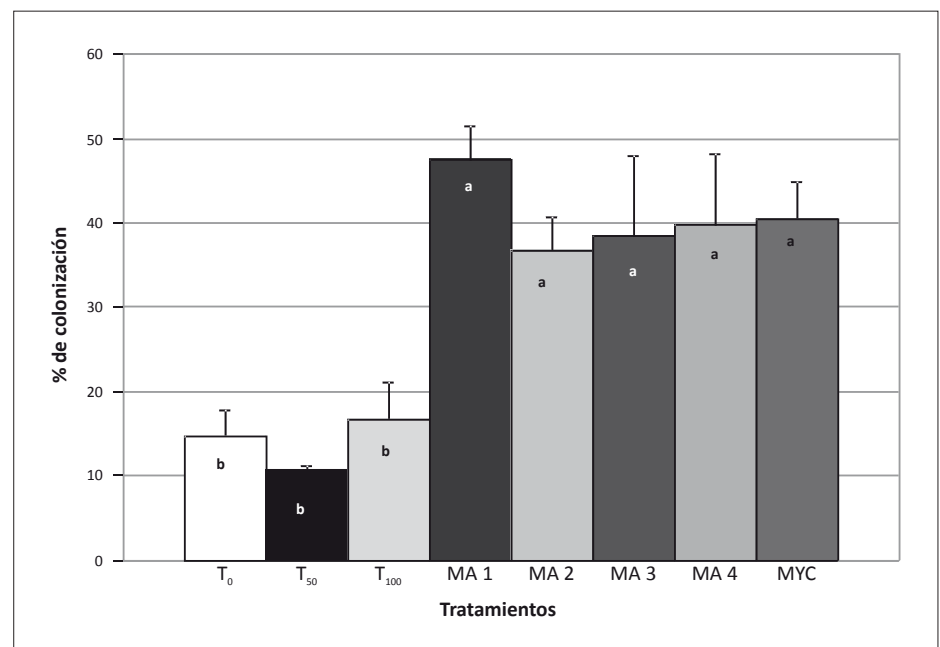
Los resultados son similares a los reportados por Alarcón y Ferrera-Cerrato (2000) para el género *Rubus*, en el cual la inoculación con HMA en plantas procedentes de cultivo de tejidos, favorecieron el crecimiento y desarrollo de las plantas, lo que contribuye con la optimización de los recursos encaminados hacia la horticultura y la fruticultura (Gianinazzi *et al.*, 1990; Alarcón y Ferrera-Cerrato, 2000).

Efecto de las HMA sobre la absorción de nutrientes en plantas de mora

A partir de la determinación de la concentración de nutrientes en tejido vegetal y los valores de materia seca vegetal

Tabla 3. Géneros de Hongos de Micorriza Arbuscular (HMA) identificados en las cepas nativas procedentes de cultivos de mora establecidos.

Cepa	Géneros
MA 1	<i>Gigaspora</i> sp.
	<i>Acaulospora</i> sp.
	<i>Glomus</i> sp.
MA 2	<i>Acaulospora</i> sp.
	<i>Glomus</i> sp.
MA 3	<i>Gigaspora</i> sp.
	<i>Acaulospora</i> sp.
	<i>Glomus</i> sp.
	<i>Scutellospora</i> sp.
MA 4	<i>Acaulospora</i> sp.
	<i>Glomus</i> sp.



T_0 : testigo absoluto; T_{50} : tratamiento comercial con 50% de fertilización; T_{100} : tratamiento comercial con 100% de fertilización; MA1: HMA nativo cepa 1; MA2: HMA nativo cepa 2; MA3: HMA nativo cepa 3; MA4: HMA nativo cepa 4. Myc: Mycobiol, inóculo mixto de HMA. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) de acuerdo con la prueba de Tukey.

Figura 1. Efecto de la inoculación con HMA en el porcentaje de colonización de plántulas de mora.

cuantificados en los laboratorios de ecofisiología vegetal y química de suelos, se calculó la absorción de nutrientes esenciales en plantas de mora a los 120 ddt. Los nutrientes analizados fueron nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S).

La Tabla 4 muestra los valores promedio de absorción de nutrientes para los tratamientos evaluados acompañados de la síntesis del análisis de varianza (GLM), los coeficientes de variación y el resultado de la prueba de comparación entre tratamientos Tukey, representada en letras minúsculas.

De acuerdo con el análisis de varianza (GLM) se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tratamientos para las variables P, N, Ca y Mg; los otros nutrientes, K y S, no presentaron diferencias significativas entre tratamientos.

Con relación a la absorción de fósforo, se destacan las plantas inoculadas con la cepa MA4 seguida del tratamiento T_{100} con valores de 14,44 y 12,83 mg/planta, respectivamente, los cuales fueron similares entre sí y significativamente superiores ($P < 0,05$) al testigo absoluto con 2,12 mg/planta, según Tukey. Los demás tratamientos T_{50} MA1, MA2, MA3 y Mycobiol presentaron valores intermedios entre 6,37 y 9,47 mg/planta, similares tanto al tratamiento MA4 y T_{100} como al testigo absoluto.

Es importante recordar que la fertilización fosfatada de los tratamientos con HMA fue sólo de 50 % con respecto al testigo comercial con 100% de fertilización; sin embargo, según el análisis estadístico, las inoculaciones con la cepa MA4 fueron similares al testigo comercial (T_{100}) en cuanto a la absorción de fósforo. Los resultados obtenidos concuerdan con lo citado por algunos autores, entre ellos Sanders y Tinker (1973) y Jakobsen (1995), quienes afirman que la absorción de fósforo por los tejidos radicales puede ser influida positivamente por la presencia de los HMA. Sin embargo, este aumento en la eficiencia de la absorción de fósforo está determinado por la cepa utilizada; así la Cepa MA4 fue la más eficiente, mientras que la cepa MA2 fue la menos eficiente, aunque no se detectaron diferencias significativas entre los dos tratamientos.

Tabla 4. Efecto de Micorrizas Arbusculares (HMA) en plántulas de mora sobre la absorción de nutrientes en tejido foliar a los 120 ddt por planta durante la etapa de invernadero.

Fuentes de variación	N mg/planta	P mg/planta	Etapa de desarrollo vegetativo			
			Ca mg/planta	Mg mg/planta	K mg/planta	S mg/planta
GLM					ns	ns
T0	24,81b	2,12b	3,68b	2,18b	11,98a	0,19a
T50	132,76ab	9,47ab	12,43ab	7,37ab	32,34a	0,52a
T100	173,11ab	12,83a	16,88a	9,65ab	35,79a	0,55a
MA 1	142,57ab	7,80ab	9,74ab	6,58ab	21,36a	1,09a
MA 2	86,63b	6,37ab	8,04ab	5,23ab	19,2a	0,37a
MA 3	115,22ab	7,18ab	10,14ab	6,38ab	21,43a	0,51a
MA 4	236,91a	14,44a	18,46a	11,90a	41,42a	1,37a
Mycobiol	129,16ab	7,68ab	10,03ab	6,65ab	19,95a	0,69a
Coefficiente de variación (cv)	40,01	43,43	37,14	38,88	58,47	78,56

** : diferencias altamente significativas ($P < 0,01$), * : diferencias significativas ($P < 0,05$), ns : diferencias no significativas de acuerdo al Anava. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) de acuerdo con la prueba de Tukey; ddt: días después del trasplante.

Con relación a los fertilizantes fosfatados se ha establecido que en presencia de los HMA inducen en sus hospederos una mayor eficiencia, cuando éstos se aplican en cantidades moderadas que no inhiben la actividad micorrízica (Sieverding, 1991). El fósforo es un elemento importante para las plantas porque participa en la respiración, en la fotosíntesis, actúa en el metabolismo de las plantas en forma de ATP y hace parte de los ácidos nucleicos como el ADN y ARN.

Con respecto a la absorción de N, las plantas inoculadas con la cepa MA4 (236,91 mg/planta) fueron significativamente superiores al testigo absoluto (24,81 mg/planta) y a la cepa MA2 (86,63 mg/planta), pero similares a los demás tratamientos, T_{100} con 173,11 mg/planta, T_{50} con 132,76 mg/planta y las cepas MA1 (142,57 mg/planta), MA3 (115,22 mg/planta) y Mycobiol (129,16 mg/planta), según Tukey.

Las plantas requieren de nitrógeno en grandes cantidades, debido a su importancia en muchos de los procesos vitales y por formar parte de compuestos esenciales para las células, tales como los aminoácidos y los ácidos nucleicos. Por tanto, la deficiencia del nitrógeno inhibe rápidamente el crecimiento de la planta. Esta deficiencia se puede ver en las plantas inoculadas con la cepa MA2 que tuvieron un comportamiento similar con el testigo absoluto, con un menor crecimiento y desarrollo, presentando plantas de menor porte con respecto a los otros tratamientos. Estos resultados muestran que la importancia de los HMA, particularmente la cepa MA4, no sólo se limita a mejorar la absorción de fósforo, sino que

participa en la toma de nutrientes esenciales como el nitrógeno.

Con relación a la absorción de calcio, se destacan el tratamiento T_{100} y las plantas inoculadas con la cepa MA4, con valores de 16,88 y 18,46 mg/planta, los cuales fueron similares entre sí y significativamente superiores ($P < 0,05$) al testigo absoluto con 3,68 mg/planta. Los demás tratamientos presentaron valores intermedios entre T_{100} MA4 y T absoluto, con los siguientes valores 12,43 mg/planta para T_{50} y niveles de absorción entre 8,04 y 10,14 mg/planta para plantas inoculadas con las cepas MA1, MA2, MA3 y Mycobiol.

El calcio es un nutriente esencial de vital importancia en procesos como la división celular (mitosis) y es un constituyente fundamental para el normal funcionamiento de las membranas celulares. Además se considera un segundo mensajero para las diversas respuestas de la planta al medio ambiente y está relacionado con la acción de varias fitohormonas. Su deficiencia se manifiesta como una necrosis en las zonas meristemáticas, tales como yemas apicales y nuevas raíces (Taiz y Zeiger, 2006).

En cuanto a la absorción de magnesio, nuevamente la cepa MA4 mostró los mayores niveles de absorción de este nutriente (119 mg/planta). Estos valores fueron significativamente superiores al testigo absoluto con 2,18 mg/planta y similares a los otros tratamientos, T_{100} con 9,65 mg/planta, T_{50} con 7,37 mg/planta, y los micorrizados MA1 (6,58 mg/planta), MA2 (5,23 mg/planta), MA3 (6,38 mg/planta) y Mycobiol (6,65 mg/planta), de acuerdo con Tukey.

El magnesio participa en la activación de las enzimas involucradas en los procesos de respiración, fotosíntesis y en la síntesis de ADN y ARN, y hace parte de la molécula de clorofila. La deficiencia de este nutriente se ve reflejada en una pérdida prematura de las hojas, por lo que es de vital importancia para las plantas (Taiz y Zeiger, 2006).

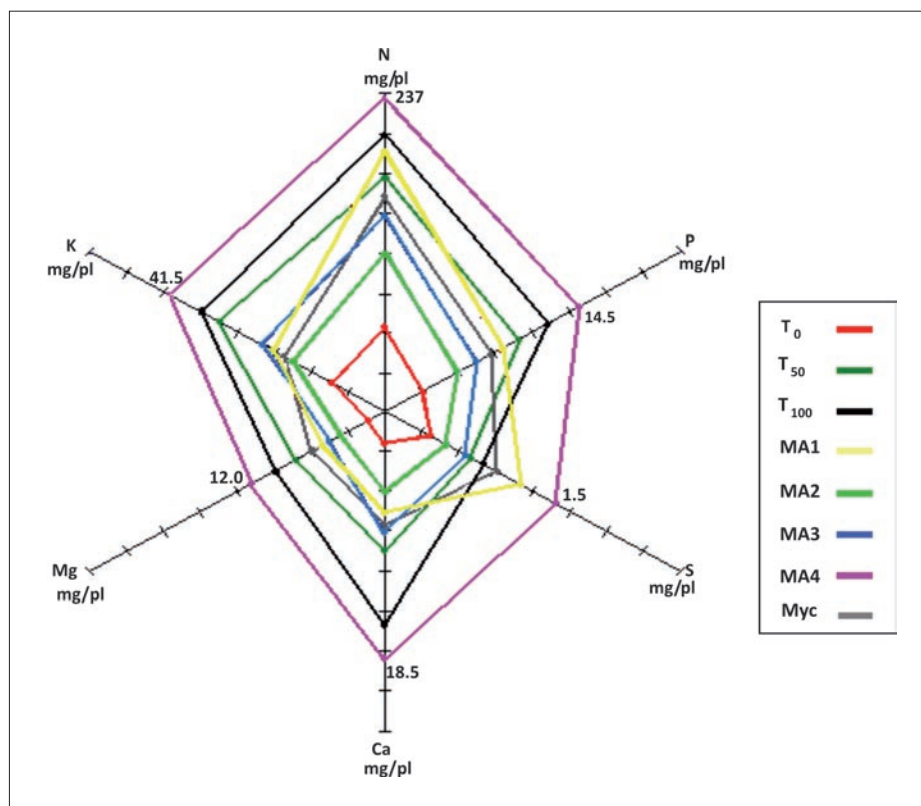
Como síntesis de los principales resultados obtenidos, se observa un efecto benéfico de la inoculación con HMA con relación a la absorción de nutrientes esenciales (N, P, Ca y Mg) en el tejido vegetal. Sin embargo, es importante anotar que todas las cepas no contribuyen de igual forma a mejorar la absorción de nutrientes en plantas de mora. Aquellas plantas inoculadas con la cepa MA4 mostraron mayor nivel de absorción de nutrientes, seguidas por el tratamiento T_{100} , mientras que el testigo absoluto y MA2 son los tratamientos con menores niveles nutricionales en plantas de mora a los 125 días después del trasplante, como se ilustra en la Figura 2.

Los resultados experimentales permiten destacar el tratamiento inoculado con la cepa MA4, la cual promueve la mayor absorción de los nutrientes mencionados (P, N, Ca y Mg) y, como consecuencia, incrementa la acumulación de biomasa en plantas a partir de los 80 días después del trasplante, en la parte aérea de planta y en la raíz, que se expresan con un mayor porte de planta. Lo anterior confirma la necesidad de seleccionar las cepas más eficientes para lograr obtener los beneficios de la asociación simbiótica.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son la primera fase para el desarrollo de biofertilizantes en mora, a partir de cepas nativas de alta eficiencia en la absorción de nutrientes. Las inoculaciones con cepas específicas de HMA, como la cepa MA4 permiten sustituir 50% de la fertilización comercial utilizada en el testigo comercial T_{100} .

CONCLUSIONES

Las plantas inoculadas con algunas cepas de HMA presentaron efectos benéficos en el crecimiento y desarrollo de las plantas de mora: acumulación de biomasa, tanto



T_0 : testigo absoluto; T_{50} : tratamiento comercial con 50% de fertilización; T_{100} : tratamiento comercial con 100% de fertilización; MA1: HMA nativo cepa 1; MA2: HMA nativo cepa 2; MA3: HMA nativo cepa 3; MA4: HMA nativo cepa 4. Myc: Mycobiol. inóculo mixto de HMA.

Figura 2. Efecto de los HMA en la absorción de nutrientes en tejido foliar en plántulas de mora.

en la parte aérea como radical, y efectos positivos sobre el área foliar y el porte de las plantas. En segundo lugar, se determinaron efectos benéficos relacionados con la nutrición vegetal, expresados en la absorción de elementos esenciales tales como fósforo, nitrógeno, calcio y magnesio. De igual manera, este comportamiento vegetal pudo ser explicado por los niveles de colonización del hongo en las raíces de la planta.

Los mayores beneficios de la micorrización se lograron con la inoculación de plántulas con la cepa MA4, procedente de la finca "El Arenal" en Sylvania-Cundinamarca, con esporas nativas de los géneros *Glomus* sp. y *Acaulospora* sp. Las plantas de mora mostraron mejor adaptación al medio expresada en el porte, en la acumulación de biomasa foliar y radical, en mayor área foliar y en mejor estado nutricional, con mayor absorción de nutrientes esenciales (P, N, Ca y Mg).

El uso de la cepa MA4 permitió la sustitución del 50% de la fertilización comercial, tal como lo corroboran los resultados en donde el tratamiento citado obtuvo

valores similares o superiores al T_{100} . Así, las plantas inoculadas con la cepa MA4 presentaron absorciones similares de fósforo y calcio al testigo comercial, T_{100} y superiores a éste en la absorción de nitrógeno y magnesio.

Otros de los efectos benéficos de los HMA en plantas de mora procedentes de cultivos de tejidos, es la disminución del estrés que sufre la planta al ser trasladada de un medio completamente aséptico, donde dispone de todos los nutrientes necesarios para su normal crecimiento, a condiciones climáticas y nutricionales menos favorables (invernadero), situación que afecta la supervivencia de plántulas micropropagadas debido a un pobre desarrollo del sistema radical y un sistema estomático no funcional.

Las anteriores conclusiones permiten considerar la cepa MA4 como promisoría en programas de biofertilización en plantaciones de mora y como componente importante de las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en cultivos convencionales o de producción limpia.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Alarcón, A. y R. Ferrera-Cerrato. 2000. Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular. IRENAT - Colegio de Postgraduados. Montecillo. MundiPrensa, México D.F. pp. 141-148.
- Angulo, R. 2003. Frutales exóticos de clima frío moderado. Bayer Crop Science S.A. Bogotá. pp. 99-118.
- AOAC. 1995. Official Methods of analysis. 16th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C. 350 p.
- ASOHOFRUCOL – DANE. 2004. I Censo nacional de 10 frutas agroindustriales y promisorias. En: http://www.frutasyhortalizas.com.co/portal/Business/product_view.php; consulta: febrero de 2007.
- Avilán, L., D. Bautista y F. Leal. 1989. Manual de fruticultura. Ed. América, Maracay, Venezuela. pp. 1111 - 1132.
- Azcón-Aguilar, C., M. Cantos., A. Troncoso y J.M. Barea., 1997a. Beneficial effect of arbuscular mycorrhizas on acclimatization of micropropagated cassava plantlets. *Scientia Horticulturae* 72(1): 63-71.
- Azcón-Aguilar, C., I.G. Padilla., C.L. Encina., R. Azcón, y J.M. Barea. 1997b. Arbuscular mycorrhizal inoculation enhances plant growth and changes root system morphology in micropropagated *Annona cherimola* Mill. *Agronomie* 16(10): 647-652.
- Azcón-Aguilar, C., A. Barceló, M.T. Vidal y G. De La Viña. 1992. Further studies on the influence of mycorrhizae on growth and development of micropropagated avocado plants. *Agronomie* 12: 837-840.
- CCI - Corporación Colombia Internacional. 1999. Boletín CCI: SIM. Perfil de producto. No. 4. abril – junio.
- Elmeskaoui, A., J.P. Damont., M.J. Poulin., Y. Piche y J. Desjardins. 1995. A tripartite culture systems for endomycorrhizal inoculation of micropropagated strawberry plantlets *in vitro*. *Mycorrhiza* 5: 313-319.
- Encina, C.L. 1996. Enraizamiento y aclimatación de plantas obtenidas *in vitro*. *Encuentros en la biología*, ISSN 1134-8496, No. 31.
- Franco, G. y J.M. Giraldo. 1998. El cultivo de la mora. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA. Regional 9. Programa Nacional de Transferencia de Tecnología Agropecuaria, PRONATTA. Manual de asistencia técnica. LITOAS, Manizales. pp. 9-14.
- Fortuna, P., A.S. Citernes, S. Morini, C. Viagliano y M. Giovannetti. 1996. Influence of arbuscular mycorrhizae and phosphate fertilization on shoot apical growth of micropropagated apple and plum rootstocks. *Tree Physiology* 16(9): 757-763.
- Gianinazzi, S., V. Gianinazzi-Pearson y A. Trouvelot. 1990. Role and use of mycorrhizas in horticultural crop production. 23rd I.H.C. Plenary Lectures. Intern. Soc. for Hort. Sci. 25-30.
- Guillemin J.P., S. Gianinazzi. y A. Trouvelot. 1992. Screening of VA endomycorrhizal fungi for establishment of micropropagated pineapple plants. *Agronomie* 12: 831-836.
- Jaizme-Vega, M.C. 1999. Aplicaciones de las Micorrizas Arbusculares (MA) sobre plataneras micropropagadas. En: Rosales, F.E., S.C. Tripon y J. Cerna (eds). Producción de banano orgánico y/o ambientalmente amigable. Memorias del taller internacional realizado en la EARTH, Guácimo, Costa Rica - 27-29 de julio de 1998. Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano, Montpellier, Francia.
- Jaizme-Vega M.C. y R. Azcón. 1995. Response of some tropical and subtropical cultures to endomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 5: 213-217.
- Jaizme, M.C. y J.M. Barea. 1992. VAM inoculation of micropropagated banana plantlets (*Musa acuminata* Colla AAA) in the Canary islands. Meeting Cost 8.10. 20-23 mayo. Dijon. Francia.
- Jakobsen I. 1995. Transport of phosphorus and carbon in VA mycorrhizas. En: Varma, A. y B. Hock (eds.). *Mycorrhiza structure, function, molecular biology and biotechnology*. Springer-Verlag, Berlín, Alemania. pp. 297-324.
- Lovato, P.E., N.H. Hammat, V. Gianinazzi-Pearson y S. Gianinazzi. 1994. Mycorrhization of micropropagated mature wild cherry (*Prunus avium* L.) and common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Agric. Sci. Finl.* 3: 297-303.
- Lovato P.E., H. Schüepp, A. Trouvelot y S. Gianinazzi. 1995. Application of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in orchard and ornamental plants. En: A. Varma y B. Hock (eds.). *Mycorrhiza structure, function, molecular biology and biotechnology*. Springer-Verlag, Heidelberg, Alemania. pp. 521-559.
- Lovato, P.E., V. Gianinazzi-Pearson, A. Trouvelot, y S. Gianinazzi. 1996. The state of art of mycorrhizas and micropropagation. *Advanced Horticulture Science* 10: 46-52.
- Monticelli S., G. Puppi y C. Damiano. 2000. Effects of *in vivo* mycorrhization on micropropagated fruit tree rootstocks. *Applied Soil Ecology* 15(2): 105-111.
- Nemec, S. 1986. Mycorrhizae in horticulture system. En: *Ecophysiology of VA Mycorrhizal plants*. (Ed G.R. Safir), CRC, Boca Raton. Fl. pp. 193-211.
- Phillips, J.M. y D.S. Hayman. 1970. Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular fungi for rapid assessment of infection. *Trans. British Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- Rapparini F., R. Baraldi, C. Bertazza, B. Branzanti y S. Predieri. 1994. Vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation of micropropagated fruit trees. *J. Hortic. Sci.* 69: 1101-1109.
- Roalánirina, F., S. Gianinazzi, A. Trouvelot y M. Carre. 1990. Production of endomycorrhizal explants of micropropagated grapevine rootstocks. *Agric. Eco. Environ.* 29: 323-327.
- Sanders F.E. y P.B. Tinker. 1973. Phosphate flow into mycorrhizal roots. *Pestic. Sci.* 4: 385-395.
- Schultz, C. 2001. Effect of (vesicular-) arbuscular mycorrhiza on survival and *post vitro* development of micropropagated oil palms (*Elaeis guineensis* Jacq.) pp. 5-14. *Elektronische Dissertationen der Georg-Aug-Universität Göttingen*. En: <http://webdoc.sub.gwdg.de/diss/2002/schultz/schultz.pdf>; consulta: diciembre de 2006.
- Schubert A., y A. Mazzitelli., 1988. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae on growth of *in vitro* propagated *Pistacia integerrima*. *Acta Hort.* pp: 441-443.
- Schubert A., C. Bodrino y L. Gribaudo., 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) micropropagated plants. *Agronomie* 12: 847-850.
- Sieverding, E. 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystem. Germany: GTZ. 370 p.
- Sutter, E.G. 1985. Morphological, physical and chemical characteristics of epicuticular wax on ornamental plants regenerated *in vitro*. *Ann Botanic* 55: 321-329.
- Taiz, L. y E. Zeiger. 2006. *Plant physiology*. 4th edition. Sinauer Associates Inc., Berlín, Alemania. pp. 75-78.
- Varma, A. y H. Schüepp. 1995. Mycorrhization of the commercially important micropropagated plants. *Critical Reviews in Biotechnology* 15(3-4): 313-328.
- Vestberg M. 1992. The effect of vesicular arbuscular mycorrhizal inoculation on the growth and root colonization of ten strawberry cultivars. *Agric. Sci. Finl.* 1: 527-535.
- Vestberg M. y V. Estaún. 1994. Micropropagated plants, an opportunity to positively manage mycorrhizal activities. En: *Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable Agriculture and Natural Ecosystems*. Birkhäuser, Basel. pp. 217-226.
- Vidal, M.T., C. Azcón-Aguilar, J.M. Barea, y F. Pliegoalfaro. 1992. Mycorrhizal inoculation enhances growth and development of micropropagated plants of avocado. *Hortscience* 27: 785-787.

Ziv, M., A. Schwartz y A. Fleminger. 1987. Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated *in vitro*, implication of hardening. Plant Sc. 52: 127-134.