

**EVALUACIÓN DE UN SISTEMA PARA LA MICORRIZACIÓN *in vitro* EN
PLANTAS DE MORA DE CASTILLA (*Rubus glaucus*)**



Pontificia Universidad Javeriana

URLEY ADRIAN PÉREZ MONCADA

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito para optar el título de

Master en Ciencias Biológicas

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

BOGOTÁ, D.C. 2011

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución N° 13 de Julio de 1996

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por los alumnos en su trabajo de grado. Solo velará porque no publique nada contrario al dogma y a la moral Católica y porque la tesis no contenga ataque personal contra persona alguna, antes bien se vea en ella el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

**EVALUACIÓN DE UN SISTEMA PARA LA MICORRIZACIÓN *in vitro* EN
PLANTAS DE MORA DE CASTILLA (*Rubus glaucus*)**



Pontificia Universidad Javeriana

URLEY ADRIAN PÉREZ MONCADA

APROBADO

Margarita Ramírez Gómez MPhil

Directora

Marcela Franco Correa PhD

Codirectora

BOGOTÁ, D.C. 2011

**EVALUACIÓN DE UN SISTEMA PARA LA MICORRIZACIÓN *in vitro* EN
PLANTAS DE MORA DE CASTILLA (*Rubus glaucus*)**



Pontificia Universidad Javeriana

URLEY ADRIAN PÉREZ MONCADA

APROBADO

Gabriel Roveda Hoyos MPhil
Jurado

Carolina Gonzalez PhD
Jurado

Claudia Cristina Rojas MSc
Jurado

**EVALUACIÓN DE UN SISTEMA PARA LA MICORRIZACIÓN *in vitro* EN
PLANTAS DE MORA DE CASTILLA (*Rubus glaucus*)**



Potificia Universidad Javeriana

URLEY ADRIAN PÉREZ MONCADA

APROBADO

Ingrid Schuler PhD

Decana Académica

Manuel A. Franco C. PhD

Director Postgrado

DEDICATORIA

A DIOS POR PERMITIR CULMINAR SATISFACTORIAMENTE MI TRABAJO Y NO PERDER LA FE PARA SEGUIR ADELANTE CADA DÍA

A MIS PADRES RAMON Y MARIA POR SU AMOR, CONFIANZA Y APOYO INCONDICIONAL.

A MIS HERMANOS, MAIRA YANETH, DAVID Y AYARID, POR SU APOYO Y CREER EN MÍ.

A MI NOVIA YENNY POR SER MI COMPAÑERA Y AMIGA EN LAS BUENAS Y EN LAS MALAS, QUIEN ME MOTIVO TODOS LOS DÍAS PARA SEGUIR ADELANTE.

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Margarita Ramirez Gómez, Directora del proyecto, por su valiosa colaboración, aporte técnico, orientaciones y enseñanzas.

Al Doctor Victor Nuñez, líder del proyecto, por darme la oportunidad de estar en su equipo de trabajo.

A la Doctora Marcela Franco Correa, por su asesoría y colaboración en el desarrollo de este trabajo de investigación.

A mi amiga Ligia del laboratorio de cultivo de tejidos, por su colaboración y asesoramiento en los ensayos *in vitro*.

A mis compañeros, Lina Conn y Yolanda Castro, por apoyarme y darme ideas valiosas durante el desarrollo del trabajo de grado.

Al grupo de personas de los laboratorios de micropropagación de plantas y cultivo de tejidos *in vitro*, Camilo, Patricia, Yolanda, Aura y Marco, por su colaboración en la micropropagación de mora en la fase de enraizamiento.

A quienes participaron de una u otra forma, en la realización del material de este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	16
1. OBJETIVOS	20
1.1 Objetivo general	20
1.2 Objetivos específicos.....	20
2 MARCO TEÓRICO.....	21
2.1 EL CULTIVO DE LA MORA DE CASTILLA.....	21
2.1.1 Propiedades Nutricionales.	22
2.1.2 Clasificación taxonómica.	23
2.1.3 Morfología.	23
2.1.4 Ciclo vegetativo.....	23
2.1.5 Requerimientos ambientales y edáficos.	24
2.1.6 Sistemas de propagación de mora.	24
2.2 HONGOS FORMADORES DE MICORRIZA ARBUSCULAR (HFMA)	25
2.2.1 Características generales de los HFMA.....	25
2.2.2 Filogenia de los Hongos Formadores de Micorriza Arbuscular (HFMA).....	27
2.2.2.1 La familia Glomeraceae.	29
2.2.3 Desarrollo de la simbiosis.	29
2.2.4 Fisiología de la simbiosis.	33
2.2.4.1 Metabolismo del carbono.	33
2.2.4.2 Nutrición fosforada.....	33
2.2.4.3 Nutrición nitrogenada.....	34
2.2.5 Beneficios de los hongos micorrícicos en plantas micropropagadas.	35
2.2.5.1 Desarrollo de un sistema radical.....	35
2.2.5.2 Incrementos en la tasa fotosintética.....	36
2.2.5.3 Aumento en la conductancia del agua.	36
2.2.5.4 Estrés ambiental.	36
2.2.6 Germinación de esporas de HFMA y su relación con flavonoides exudados de plantas hospederas.	37
3 METODOLOGÍA.....	38
3.1 LOCALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	38
3.2 FASES DE LA INVESTIGACIÓN	38
3.2.1 Obtención del inóculo de HFMA.	39

3.2.2	Desinfección y germinación de propágulos infectivos de HFMA bajo condiciones <i>in vitro</i>	40
3.2.3	Establecimiento de un sistema de cultivo autotrófico para la micorrización <i>in vitro</i> en plantas de Mora de Castilla (<i>Rubus glaucus</i>).....	43
3.2.3.1	Producción de plántulas <i>in vitro</i>	43
3.2.3.2	Obtención de un sistema para la micorrización <i>in vitro</i> en plantas de Mora de Castilla (<i>Rubus glaucus</i>) variedad sin espinas inoculadas con <i>Glomus</i> sp (GEV02).....	44
3.2.3.3	Comparación entre métodos de inoculación directos con <i>Glomus</i> sp. en plántulas de mora.	46
3.2.4	Evaluación de las variables.	47
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
4.1	OBTENCIÓN DEL INÓCULO DE HFMA.....	50
4.2	DESINFECCIÓN Y GERMINACIÓN DE PROPÁGULOS INFECTIVOS DE HFMA BAJO CONDICIONES <i>in vitro</i>	52
4.2.1	Desinfección de esporas de <i>Glomus</i> sp. (GEV02).....	52
4.2.2	Desinfección de fragmentos de raíces con vesículas.....	54
4.2.3	Germinación de esporas y crecimiento del tubo germinativo en fragmentos de raíces con vesículas del HFMA <i>Glomus</i> sp. (GEV02).....	55
4.3	OBTENCIÓN DE UN SISTEMA PARA LA MICORRIZACIÓN <i>in vitro</i> EN PLANTAS DE MORA DE CASTILLA (<i>Rubus glaucus</i>) VARIEDAD SIN ESPINAS INOCULADAS CON <i>Glomus</i> sp. (GEV02).....	58
4.4	COMPARACIÓN ENTRE MÉTODOS DE INOCULACIÓN DIRECTOS CON <i>Glomus</i> sp. (GEV02) EN PLÁNTULAS DE MORA.	60
	CONCLUSIONES.....	68
	RECOMENDACIONES.....	69
	BIBLIOGRAFÍA.....	70
	ANEXOS.....	92

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de producción de Mora por Departamento.....	22
Tabla 2. Características importantes de los tipos de micorrizas (Smith & Read, 2008).....	27
Tabla 3. Tratamientos evaluados para establecer un método de germinación de esporas y fragmentos de raíces micorrizadas de <i>Glomus</i> sp (EV02).	43
Tabla 4. Caracterización morfológica de las esporas de <i>Glomus</i> sp. (GEV02).	51
Tabla 5. Efecto de las diferentes concentraciones de quercetina en la germinación de esporas de <i>Glomus</i> sp (GEV02).....	56
Tabla 6. Efecto de las diferentes concentraciones de quercetina en el crecimiento del tubo germinativo en los fragmentos de raíces con vesículas de <i>Glomus</i> sp (GEV02).....	56
Tabla 7. Crecimiento de la parte aérea y radical de las plantas de mora de castilla (<i>Rubus glaucus</i>) en sistemas autotróficos en diferentes semanas de evaluación.....	61
Tabla 8. Biomasa en plantas de mora de castilla (<i>Rubus glaucus</i>) inoculadas con el HFMA <i>Glomus</i> sp. (GEV02) al momento de la cosecha 9 semanas.	63
Tabla 9. Indicadores de asociación simbiótica entre el HFMA <i>Glomus</i> sp. – mora de castilla (<i>Rubus glaucus</i>) al momento de la cosecha 9 semanas después de la inoculación (%F: Frecuencia de micorrización; %M: Intensidad de micorrización; %a: Intensidad de arbusculos).....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético de Glomeromycota. (a) Filogenia propuesta para los HFMA basada en la secuencia de la subunidad pequeña (SSU) del ARNr. (b) Estructura taxonómica propuesta del Phylum Glomeromycota con base en las secuencias SSU del ARNr. Tomado de Schüßler <i>et al.</i> (2001).....	28
Figura 2. Espora de <i>Glomus</i> sp. mostrando la hifa. Tomado de Redecker y Raab. (2006).....	29
Figura 3. (a). Morfología <i>Arum</i> tipo arbuscúlos. (b). Morfología intracelular tipo <i>Paris</i> . Tomado de Smith y Read (2008).....	31
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Glomus</i> sp. Modificado de Bago <i>et al.</i> (2000).....	32
Figura 5. Diagrama de flujo de fases de la investigación.....	38
Figura 6. Producción de <i>Glomus</i> sp (GEV02) bajo condiciones de invernadero en plantas de cebolla de bulbo (<i>Allium cepa</i> L).	39
Figura 7. Fragmentos de raíces de cebolla de bulbo con vesículas. V: Vesículas	40
Figura 8. Esquema de desinfección de esporas de <i>Glomus</i> sp (GEV02)	41
Figura 9. Esquema de desinfección de fragmentos de raíces de cebolla (<i>Allium cepa</i> L) con vesículas.	42
Figura 10. Desarrollo de plántulas <i>in vitro</i> de Mora de Castilla (<i>Rubus glaucus</i>) variedad sin espinas sembradas en medio Lepoivre en la etapa de enraizamiento.	44
Figura 11. Esquema de la abertura de los orificios en la base y en la tapa de una caja de Petri y su posterior introducción de la plántula de mora en la placa. Tomado de Nogales (2006).	45
Figura 12. Cámara húmeda construida para la aclimatación de las plántulas de mora.....	45
Figura 13. Disposición de los sistemas autotróficos de mora en placas petri de plástico cubiertas con una bolsa negra.....	47
Figura 14. Método de Trouvelot <i>et al.</i> (1986).....	48
Figura 15. Esporas de <i>Glomus</i> sp. (GEV02) aisladas de plantas de cebolla de bulbo (<i>Allium cepa</i> L.).	50

Figura 16. Esporas de <i>Glomus</i> sp (GEV02) en PVLG al microscopio óptico (100x).....	51
Figura 17. Selección de raíces con vesículas.....	51
Figura 18. Porcentajes de esporas con contaminaciones en diferentes evaluaciones (N=10) al cabo de dos semanas	53
Figura 19. Efecto de las diferentes concentraciones de quercetina comparadas con el control en la germinación de esporas de <i>Glomus</i> sp (GEV02).....	57
Figura 20. Efecto de las diferentes concentraciones de quercetina comparadas con el control en el crecimiento del tubo germinativo en los fragmentos de raíces con vesículas de <i>Glomus</i> sp (GEV02).....	57
Figura 21. Desarrollo de estructuras típicas de la simbiosis entre <i>Glomus</i> sp (GEV02) y plantas de mora bajo un sistema de cultivo autotrófico. a. Micelio extraradical b. formación de arbusculos; c. Formación de BAS; d. formación de nuevas esporas. A: Arbusculo, E: Espora.....	59
Figura 22. Imagen de plantas de Mora de Castilla (<i>Rubus glaucus</i>) creciendo en un sistema de cultivo autotrófico con diferentes tratamientos durante nueve semanas. a. Control; b. Inoculado con esporas libres; c. Inoculado con fragmentos de raíces con vesículas. La imagen fue tomada al momento de la cosecha.	60
Figura 23. Crecimiento de la parte aérea y radical de las plantas de mora de castilla (<i>Rubus glaucus</i>) en sistemas autotróficos (N=4).	62
Figura 24. Formación de arbusculos de <i>Glomus</i> sp (GEV02) en raíces de mora bajo condiciones <i>in vitro</i>	64
Figura 25. Dinámica de la producción de esporas de <i>Glomus</i> sp. (GEV02) asociadas a plantas autótrofas de mora de castilla (<i>Rubus glaucus</i>) en medio MSR libre de azúcar y vitaminas.....	65
Figura 27. Formación de nuevas esporas de <i>Glomus</i> sp. (GEV02) individualmente o en agrupaciones bajo condiciones <i>in vitro</i> . Imagen tomada en microscopio óptico (40X). a y b. esporas formadas individualmente; c y d. esporas formadas en agrupaciones.....	66

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Composición de la solución Hougland

ANEXO 2. Procedimiento para aislamiento y conteo de esporas.

ANEXO 3. Composición de las soluciones madres del medio MSR (Declecerk *et al.*, 1998).

ANEXO 4. Composición de las soluciones madres del medio Lepoivre (Valderrama *et al.* 2009).

ANEXO 5. Procedimiento para tinción de raíces micorrizadas.

ANEXO 6. Cuantificación de la colonización radical de micorrizas arbusculares.

.

ANEXO 7. Composición de la solución de polivinil-ácido láctico-glicerol (PVLG)

RESUMEN

El efecto benéfico que tiene los Hongos Formadores de Micorriza Arbuscular (HFMA) sobre la nutrición y el crecimiento de plantas micropropagadas ha sido bien documentado. Sin embargo, la mayoría de estos estudios han sido realizados bajo condiciones *ex vitro*, en invernadero o campo. Hasta el momento no se han realizado estudios de la respuesta de mora de castilla (*Rubus glaucus*) a la micorrización *in vitro*. En este trabajo, se pudo obtener un sistema de micorrización *in vitro* en sistemas de cultivo autotrófico para plantas de mora castilla (*Rubus glaucus*) evaluándose dos métodos de inoculación directa con el HFMA, *Glomus* sp (GEV02). Se estableció un método de desinfección y germinación de esporas y fragmentos de raíces con vesículas, para *Glomus* sp (GEV02), que permitió su uso bajo condiciones *in vitro*. El sistema de cultivo autotrófico fue exitoso para plantas de mora de castilla (*Rubus glaucus*); observándose un óptimo crecimiento de la parte aérea y radical de la planta. Adicionalmente en este estudio se pudo obtener un sistema que permitió el desarrollo de *Glomus* sp bajo condiciones *in vitro*, con formación de estructuras típicas de la simbiosis como una buena colonización intraradical, con producción de arbuscúlos y vesículas, así como el desarrollo de micelio extraradical con hifas ramificadas, y la formación de nuevas esporas. Este estudio abre las puertas para investigar varios aspectos de la simbiosis en donde plantas activas fotosintéticamente son necesarias.

Palabras claves: Hongos Formadores de Micorriza Arbuscular, cultivo autotrófico, *Rubus glaucus*, *Glomus* sp (GEV02), micorrización *in vitro*.

ABSTRACT

The beneficial effect that has the Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on nutrition and growth of micropropagated plants has been well documented. However, most of these studies have been carried out under *ex vitro* conditions in a greenhouse or field. So far there have been no studies of the response of blackberry (*Rubus glaucus*) to mycorrhizal colonization *in vitro*. In this work, we could obtain an *in vitro* mycorrhizal system in autotrophic culture systems for blackberry plants (*Rubus glaucus*) evaluated two methods of direct inoculation with the AMF, *Glomus* sp (GEV02). Established a method of disinfection and germination of spores and fragments of roots with vesicles, for *Glomus* sp (GEV02), which allowed its use under conditions *in vitro*. Autotrophic culture system was successful for plants of blackberry (*Rubus glaucus*), but there was an optimum growth of shoot and root of the plant. Additionally, in this study could get a system that allowed the development of *Glomus* sp *in vitro* conditions, with formation of structures typical of the symbiosis as a good colonization intraradical, producing arbuscules and vesicles, and extraradical mycelium development with branched hyphae, and spore formation. This study opens the door to investigate various aspects of symbiosis in which photosynthetically active plants are necessary.

Keywords: Arbuscular mycorrhizal fungi, autotrophic culture, *Rubus glaucus*, *Glomus* sp (GEV02), *in vitro* mycorrhization.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La Hortifructicultura ha sido considerada una de las actividades agrícolas más promisorias para el país. A nivel mundial, los mercados de frutas y hortalizas frescas y procesadas son unos de los más dinámicos del sector agroalimentario, y su crecimiento se ha visto favorecido por los cambios en las preferencias de los consumidores, ahora más inclinados al consumo de alimentos frescos y saludables.

En Colombia el sector frutícola viene registrando la tasa de crecimiento anual más alta dentro del ámbito agrícola del país. Las nuevas tendencias en el consumo de frutas y hortalizas en el mundo hacen particular énfasis en la calidad de los alimentos, donde las propiedades nutricionales y nutracéuticas son esenciales en aquellos llamados funcionales. Colombia posee una enorme riqueza en especies frutales con potencial como alimentos funcionales (Echeverry, 2003). En este sentido, se ha descrito que las especies del género *Rubus*, como la mora de castilla, se caracterizan por presentar un importante potencial nutracéutico, término utilizado para definir sustancias capaces no sólo de aportar nutrientes sino también de mejorar algunos aspectos medicinales (Cotes *et al.*, 2006; Clark *et al.*, 2007).

La mora de castilla (*Rubus glaucus*, Benth), pertenece a la familia Rosaceae, es una especie originaria de los Andes Tropicales de América. Esta especie se distribuye ampliamente en el país, se encuentra en forma silvestre, desde el departamento del Putumayo hasta el Valle del Magdalena y es posible cultivarla en altitudes entre 2.000 y 3.200 metros (Asohofrucol, 2004). Su fruto morado brillante se caracteriza por contener altos contenidos de azúcar, forma alargada y cónica (Franco y Giraldo, 1998).

De acuerdo con el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, la producción de mora en Colombia creció de 20.000 toneladas/año en 1992 a 90.000 toneladas/año en 2008; en este mismo período de tiempo, aumentó el área sembrada en mora de 3.000 hectáreas a 10.500 hectáreas. Por el contrario, el rendimiento se ha mantenido alrededor de 8 toneladas/hectárea (t/ha) durante este intervalo de 16 años, aunque en los departamentos con mayor producción en los últimos cinco años (Casanare, Santander y Cundinamarca) se han alcanzado rendimientos de hasta 15 (t/ha) (Agronet, 2010).

Diferentes exploraciones acerca del cultivo de la mora en Colombia muestran que esta actividad es realizada por pequeños y medianos agricultores. En muchas regiones constituye una de las principales fuentes de ingresos; generación de empleo rural; oferta de alimento y de agroindustria (Barrero, 2009). A pesar de la riqueza y del gran potencial de la mora, esta especie no

ha adquirido el grado de importancia esperado, lo cual puede atribuirse a varias limitaciones dentro de las que se destaca, la dependencia de un número reducido de variedades y la baja calidad genética del material de siembra, la propagación asexual, mediante acodos o estacas que, frecuentemente transmiten enfermedades fungosas, bacterianas y virales que dejan grandes pérdidas al agricultor (Ávilan *et al.*, 1989; Angulo, 2003), por cuanto se hace necesario el desarrollo de técnicas alternativas de propagación, mediante el cultivo de tejidos para garantizar una semilla vegetativa de alta calidad fisiológica, fitosanitaria y genética.

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* o micropropagación, constituye dentro de la biotecnología moderna, la técnica que mayor aporte práctico ha brindado en el sector (Cetz, 2005). Esta técnica permite una producción rápida de plantas de alta calidad, y libres de enfermedades (Raaman y Patharajan, 2006); así como un material de siembra uniforme que se puede obtener en períodos de tiempo relativamente cortos. En Colombia se ha incrementado, en la última década, el uso de la micropropagación de meristemas en frutales, mediante la técnica de cultivo de tejidos (Angulo, 2003).

A pesar de los múltiples beneficios que genera la micropropagación, existen limitantes para un uso más extendido de esta técnica. La transferencia de plántulas en condiciones *in vitro* a condiciones *ex vitro*, constituye uno de los pasos más críticos de la micropropagación, debido al alto grado de mortalidad de plántulas (entre 50 y 90%). Estas pérdidas se producen por problemas de aclimatación, como consecuencia de una cutícula poco desarrollada, estomas no funcionales con un inadecuado control del estado hídrico de la planta y un sistema radical débil, que facilita la deshidratación (Vestberg y Estaún, 1994; Elmeskaoui *et al.*, 1995; Alarcón y Ferrera-Cerrato, 2000; Schultz, 2001).

A pesar del empleo, en el pasado, de varias técnicas para mejorar el crecimiento y reducir las tasas de mortalidad de plántulas durante el trasplante, la mayoría de ellos, básicamente, tienen por objeto el control de las condiciones del medio ambiente, por ejemplo, el aumento de intensidad de la luz y la modificación de la concentración de CO₂, sin embargo, estas deben de estar acompañadas de estrategias que permitan garantizar el mantenimiento de dicho material en las fases posteriores del proceso, como el control de las condiciones ambientales en la fase de aclimatación y/o la asociación con microorganismos benéficos como los Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares (HFMA). La estrategia de la inoculación con HFMA se ha implementado con éxito para reducir el estrés durante el trasplante y garantizar un crecimiento rápido tanto del material vegetal propagado en condiciones de vivero o invernadero, como en plantas originadas en cultivo *in vitro*, debido a los efectos benéficos de esta asociación sobre la nutrición y el crecimiento de las plantas (Sbrana *et al.*, 1994; Elmeskaoui *et al.*, 1995;

Sharma *et al.*, 1996; Siqueira *et al.*, 1998; Duponnois y Plenchette, 2003; Kapoor *et al.*, 2008).

La simbiosis micorriza arbuscular es una asociación mutualista formada entre las plantas y una gran variedad de hongos del filo Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001). Estos hongos forman asociaciones simbióticas con más del 80% de las plantas terrestres incluyendo muchas plantas importantes para la hortifruticultura. Los HFMA son bien conocidos porque aumentan el vigor de las plantas por la absorción de agua y nutrientes minerales, especialmente fósforo. Además pueden proteger a las raíces de las plantas contra ciertos patógenos y mitigar los efectos de la extrema variación en la temperatura, el pH y el estrés hídrico (Siqueira, 1994).

La incapacidad de los HFMA para crecer en cultivos axénicos, sin presencia de hospedero, dio lugar al desarrollo de cultivos monoxénicos utilizando fragmentos de raíces como hospederos (Bécard y Fortin, 1988; Declerck *et al.*, 1998). Los sistemas de cultivos con raíces de zanahoria (*Dacus carota* L.) transformadas empleando *Agrobacterium rhizogenes* son útiles para el estudio de desarrollo de HFMA, ya que las raíces crecen rápido y sin la necesidad de reguladores de crecimiento, y sus requerimientos nutritivos son bajos. No obstante este sistema tiene varias limitaciones como la ausencia de tejidos fotosintéticos, de un balance hormonal y de relaciones fisiológicas normales de fuente de sumidero, así como la adición de sacarosa al medio de cultivo, para compensar la ausencia de fotosintatos, lo que puede modificar la bioquímica de la interacción planta – hongo (Nogales, 2006). En ese contexto el desarrollo de los sistemas de cultivos *in vitro* en los que plantas autótrofas son asociadas a HFMA parece esencial.

La micorrización *in vitro* hace referencia a la inoculación de plantas en un medio estéril de agar con un HFMA. No obstante, el establecimiento de la simbiosis micorrízica en condiciones axénicas presenta algunos inconvenientes como la contaminación del inóculo, el comportamiento del hospedador y la naturaleza biotrofa obligada del simbiote (Kapoor *et al.*, 2008). A pesar de que la técnica es importante para el desarrollo *in vitro* de plántulas micropropagadas, la mayoría de los estudios que incluyen HFMA en condiciones *in vitro* se han realizado con plántulas herbáceas, ya que estas son más fáciles de manipular en el laboratorio. Sin embargo, hoy en día la propagación vegetativa de algunas especies leñosas, permite obtener material genéticamente uniforme con esta técnica (Smith y Read, 1997).

Hasta el momento no se han realizado estudios de la respuesta de mora de castilla (*Rubus glaucus*, Benth) a la micorrización *in vitro*, aunque en varios estudios se han inoculado plantas de varias especies del género *Rubus* micropropagadas, asociadas con esporas de HFMA *ex vitro* en el momento del

transplante (Gribaudo *et al.*, 1996; Cassells *et al.*, 1996; Taylor y Harrier, 2000; Carreón-Abud *et al.*, 2003; Roveda *et al.*, 2007).

Recientemente se han desarrollado dos sistemas de micorrización *in vitro* (Voets *et al.*, 2005; Voets *et al.*, 2009), que podrían ser adaptados a mora de castilla. El sistema desarrollado por Voets *et al.* (2005), permitió la asociación exitosa de HFMA a plántulas de papa micropropagadas; en este sistema, las raíces y los HFMA se desarrollaron bajo estrictas condiciones de cultivo *in vitro*, mientras que la parte aérea se desarrollaba al aire libre, con una intensidad lumínica alta que permitía la fotosíntesis de la planta, las hifas que emergían de las esporas eran capaces de colonizar las raíces, de desarrollar micelio extraradical y producir nuevas esporas. El segundo sistema se desarrolló para plantas herbáceas crecidas a partir de semillas, y la fuente de inóculo utilizada fue la fase simbiótica del hongo, el HFMA procedente de una planta autotrófica donante (*Medicago truncatula*) colonizaba otra planta autotrófica receptora de *M. truncatula*, *in vitro*, y en nueve días las plántulas obtenían una buena colonización micorrízica (Voets *et al.*, 2009).

Sin embargo, al adaptar estos sistemas a especies leñosas, se presentan varios factores que deben considerarse. El establecimiento de la simbiosis en estas especies es más lento que en plantas herbáceas, debido en parte al crecimiento radical más lento; además la mayoría de las especies leñosas micropropagadas, necesitan un proceso de aclimatación antes de comenzar a vivir al aire libre, y también es previsible que la colonización radical de estas especies por parte del HFMA y su desarrollo dentro de ella, lleve más tiempo.

En el presente estudio se pretende adaptar y evaluar un sistema de cultivo autotrófico partiendo del sistema desarrollado por Voets *et al.* (2005), para la micorrización *in vitro* de plántulas micropropagadas de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth), ya que este tipo de sistemas permite observar en forma directa, no destructiva, la dinámica de la simbiosis incluyendo producción de esporas, colonización intraradical de las raíces y capacidad de reproducir el ciclo de vida del hongo, mientras la planta se desarrolla al aire libre con una intensidad lumínica que permite la fotosíntesis de esta.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

Evaluar las condiciones para el establecimiento de la asociación del Hongo Formador de Micorriza Arbuscular (HFMA) del género *Glomus* sp. en plantas de mora de castilla (*Rubus glaucus*), bajo condiciones *in vitro*.

1.2 Objetivos específicos

- Estandarizar una metodología para la desinfección y germinación de propágulos infectivos (esporas, fragmentos de raíces micorrizadas) del HFMA *Glomus* sp. que permita su uso bajo condiciones *in vitro*.
- Obtener un sistema de micorrización *in vitro* en sistemas de cultivo autotrófico para plantas de mora castilla (*Rubus glaucus*).
- Evaluar la capacidad del HFMA *Glomus* sp. para colonizar las raíces de plantas de mora, bajo condiciones *in vitro*.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 EL CULTIVO DE LA MORA DE CASTILLA

La mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) pertenece a la familia Rosaceae, fue descubierta por Hartw y descrita por Benth (1840). Es originaria de las zonas altas tropicales de América principalmente en Colombia, Ecuador, Panamá, Guatemala, Honduras, México y Salvador. El género *Rubus* es uno de los de mayor número de especies en el reino vegetal, las especies más conocidas son *Rubus idaeus* (frambuesa), *Rubus occidentalis* (frambuesa negra silvestre) y *Rubus folius* (zarzamora), las cuales se cultivan en zonas templadas.

Los cultivos de mora económicamente más importantes en el mundo incluyen: Fresa (*Fragaria ananassa* Duch., Rosáceae), Arándano azul (*Vaccinium corymbosum* L., *V. angustifolium* Ait., *V. ashei*, Ericaceae), Arándano rojo (*V. macrocarpon* Ait., Ericaceae), Frambuesa (*Rubus idaeus* L., Rosáceae), Mora (*Rubus* sp., Rosáceae). Los principales países productores son Francia, España, Suiza, Canadá, Guatemala, Argentina y Australia, el área plantada en el mundo pasó de 8.622 ha a 12.376 ha con un incremento de 44%, la producción para el año 2005 fue de 154.603 toneladas y los mayores incrementos se presentaron en México, Estados Unidos, China y Costa Rica (Strik *et al.*, 2006).

En Colombia el cultivo de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) se encuentra localizado en la región Andina con 11.728 ha sembradas, una producción de 99.727 t/año y un rendimiento de 8.5 t/ha (Agronet, 2010); estas áreas están localizadas principalmente en los departamentos de Cundinamarca, Santander, Antioquia y Huila (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de producción de Mora por Departamento.

Departamento	Area Cosechada (Hectáreas)	Producción (Toneladas)	Rendimiento (t/ha)
2009			
Antioquia	1.272	10.913	8.6
Boyacá	715	6.481	9.1
Caldas	285	2.98	10.5
Cauca	375	1.519	4.1
Cesar	215	1.574	7.3
Cundinamarca	3.465	34.219	9.9
Chocó	10	100	10.0
Huila	1.347	9.517	7.1
Meta	96	930	9.7
Nariño	557	2.827	5.1
Norte de Santander	465	4.161	8.9
Qúndio	110	438	4.0
Risaralda	435	3.956	9.0
Santander	1.327	14.134	10.7
Tolima	385	2.857	7.4
Valle del Cauca	664	3.105	4.7
Casanare	2	23	11.5
Putumayo	3	23	7.7
Total	11.728	99.727	8.5

Fuente: Anuario estadístico del sector agropecuario, 2009

2.1.1 Propiedades Nutricionales.

La mora es una fuente importante de vitaminas, minerales y antioxidantes (Sahar *et al.*, 2003; Nogueira *et al.*, 1998; Zheng y Wang, 2003; De Ancos *et al.*, 2000; Moyer *et al.*, 2002).

Desde hace poco más de una década, se ha reconocido que algunos alimentos tienen la capacidad no sólo de aportar nutrientes sino también de mejorar algunos aspectos medicinales, estos se han llamado "Alimentos Funcionales". Dentro de los componentes con alto valor agregado presentes en las frutas, se encuentran los antioxidantes (carotenoides, vitaminas, fenoles, flavonoides, glutatión y metabolitos endógenos) que capturan radicales libres, peróxidos y otras especies reactivas de oxígeno molecular, las cuales al incrementarse como subproductos del metabolismo normal, generan estrés oxidativo que afectan diversos procesos bioquímicos y fisiológicos y, finalmente causan la muerte celular (Milbury *et al.*, 2002; Stintzing *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2003).

Las especies del género *Rubus* spp. se caracterizan por producir triterpenos, esteroides, antraquinonas y elagitaninos (Sahar *et al.*, 2003) y especialmente

antocianinas a las cuales se le atribuyen determinadas actividades, entre las cuales se encuentran ansiolítica (Nogueira *et al.*, 1998), anticancerosa (Harris *et al.*, 2001), antimicrobiana (Panizzi *et al.*, 2002) y especialmente antioxidante (Cotes *et al.*, 2006), que parece estar involucrada en la prevención de problemas circulatorios, envejecimiento y cáncer (Zheng y Wang, 2003; De Ancos *et al.*, 2000; Moyer *et al.*, 2002).

2.1.2 Clasificación taxonómica.

Reino: Vegetal
Clase: Angiospermae;
Subclase: Dicotyledoneae;
Orden: Rosae;
Familia: Rosaceae;
Género: *Rubus*
Especie: *Rubus glaucus*

2.1.3 Morfología.

Es una planta perenne, de porte arbustivo, semierecto, de tallos rastreros o semi erguidos que forma macollas. Los tallos son de longitud variable y se pueden ramificar, los aguijones pueden estar o no presentes; los tallos emiten constantemente brotes en la base. Las hojas son alternas, con tres folíolos y de bordes aserrados, de color verde por encima y blanquecino por debajo; las ramas florecen en racimos terminales. Las flores son blancas de 2 a 2.5cm de diámetro y se disponen en racimos en las puntas de la rama o a veces toda la rama. El fruto está formado por muchas drupas y dentro de cada drupa hay una semilla; los frutos pueden ser de tamaño grande, mediano o pequeño, se maduran de manera dispereja porque la floración no es homogénea. Cuando maduran su color va de rojo a púrpura o de rojo a rojo oscuro. Las raíces se distribuyen en los primeros 30 cm del suelo con disposición horizontal y longitudinal de 0.5 a 1.2m de largo. Las raíces sostienen la planta y permiten su propagación al presentar yemas vegetativas capaces de activarse produciendo brotes (Franco y Giraldo, 1998).

2.1.4 Ciclo vegetativo.

La mora presenta tres etapas de desarrollo. La primera, en la que se obtienen las nuevas plantas ya sea en forma sexual o asexual. Una segunda o de formación y desarrollo vegetativo, donde se conforma la planta y una tercera etapa, la productiva que se inicia ocho meses después del trasplante, y se mantiene constante durante varios años. De acuerdo con el método de propagación utilizado, la obtención de una nueva planta, puede tomar de 10 hasta 30 días, desde el momento en que se realiza la propagación asexual. Posteriormente se inicia la etapa de vivero que puede tomar entre 45 y 60 días

para que estén listas las plantas para el trasplante a sitio definitivo. Contando desde el momento del trasplante, a los ocho meses se inicia la producción, la cual se va incrementando hasta estabilizarse en el mes 18. Se presentan uno o dos picos bien marcados de cosecha dependiendo de los periodos de lluvia en cada zona. Se estima una vida útil de 12 a 15 años dependiendo del manejo que se le de al cultivo. En Colombia, en zonas de Cundinamarca y Antioquia, existen cultivos que tienen entre 15 y 20 años de edad, pero los rendimientos reportados son inferiores a los registrados en los cultivos más jóvenes (Franco y Giraldo, 2002).

2.1.5 Requerimientos ambientales y edáficos.

El mejor desarrollo de la planta está entre 1800 y 2400m. Después de los 2400m. los rendimientos son menores y disminuye la calidad y tamaño de los frutos. Humedades relativas entre 70 y 80% favorecen el desarrollo del cultivo, así como temperaturas entre 11-18°C

El suelo ideal es el de textura franca, rico en materia orgánica, con buena capacidad de retención de humedad, pero que no se encharque. La mora crece en suelos ácidos, pero se desarrollan mejor en suelos que no lo sean; requiere suelos profundos, y es exigente en nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio (Franco y Giraldo, 1998).

2.1.6 Sistemas de propagación de mora.

La mora se puede propagar sexual o asexualmente, pero el método recomendado comercialmente es el asexual por ser más económico y de mejores resultados. La reproducción sexual no se emplea, porque las semillas tienen un bajo poder germinativo, largo período de germinación y lento desarrollo de las plántulas. La propagación asexual empleada tiene dos sistemas: la estaca y el acodo. Estos métodos de propagación implican sistemas laboriosos, extensiones de suelo de buena calidad y no se garantiza la obtención de plantas sanas.

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* o micropropagación, constituye dentro de la biotecnología, la técnica que mayor aporte práctico ha brindado (Cetz, 2005). La micropropagación es un método alternativo para la propagación clonal de plantas, la mayor diferencia entre la propagación convencional y la propagación *in vitro*, es que las plantas son producidas bajo condiciones estériles en un medio artificial. Bajo estas condiciones las plantas no son afectadas por condiciones adversas del clima y como consecuencia, el crecimiento se da mucho más rápido que cuando se utilizan los métodos tradicionales.

La micropropagación en *Rubus* típicamente involucra cultivo *in vitro* de ápices, el cual es considerado el método más eficiente para una rápida proliferación y eliminación de la variación somaclonal (Pelto y Clark, 2000). A nivel mundial se tienen varios reportes del cultivo *in vitro* de diferentes especies de *Rubus*, tales como: *R. parvifolius* y *R. caesiu* (Chang y Reed, 1999), *R. arcticus* (Kokko *et al.*, 1996), *R. idaeus* (Taylor y Harrier, 2001), *R. fruticosus* (mora), e híbridos entre mora y frambuesa (Swartz *et al.*, 1990). En Colombia, Marulanda y Márquez (2002), obtuvieron plantas procedentes de Caldas y Quindío mediante organogénesis a través de callos, las cuales, junto con las plantas en los subcultivos F4 y F15 del proceso de multiplicación *in vitro*, presentaron alta estabilidad genética (evaluada por marcadores RAPD), lo que llevó a recomendar hasta 10 subcultivos para la multiplicación masiva de *Rubus in vitro*. Castro y Diaz (2001), también han desarrollado propagación de mora de castilla *in vitro*, utilizando plantas madre seleccionadas para la obtención de yemas en la etapa de establecimiento.

2.2 HONGOS FORMADORES DE MICORRIZA ARBUSCULAR (HFMA)

2.2.1 Características generales de los HFMA.

Las micorrizas arbusculares son el resultado de la asociación mutualista entre algunos hongos del suelo y la raíz de la mayoría de las plantas. En ella, el micelio del hongo coloniza la corteza radical a modo de endófito y proyecta sus hifas tanto al interior como al exterior de la raíz (Forero *et al.*, 1996). Se estima que más del 80% de las plantas terrestres forman este tipo de asociación. Estas incluyen muchas especies de cultivo importantes en la agricultura y horticultura (Smith & Read, 1997). Frank, en el año de 1885, nombró a la simbiosis entre hongos y las raíces de las plantas como "Micorriza", término que procede del griego "mykos", hongo y "rhiza", raíz. Entre las asociaciones de micorrizas, la asociación micorriza arbuscular es la más común.

En la naturaleza pueden reconocerse diversos tipos de micorrizas, los cuales se presentan en el ecosistema en función de características relacionadas con la presencia de fósforo y nitrógeno, tanto orgánico como inorgánico, y su relación con el tipo de vegetación dominante (Tabla 2). Dentro de éstos se encuentran: a) micorriza orquideoide; b) micorriza ericoide; c) micorriza monotropoide; d) micorriza arbutoide; e) ectomicorriza, y f) micorriza arbuscular (Alarcón, 2007).

- a) Micorriza Orquideoide: Se forman en las plantas de la familia Orchidaceae, y hongos del phylum Basidiomicetos, algunos de ellos pueden ser parásitos de otras plantas. Sin embargo, en su condición micorrízica con orquídeas, estos hongos contribuyen en mutualismo a transferir carbono orgánico y nutrientes minerales a esta planta (Smith & Read, 1997).

- b) Micorriza ericoide: Plantas de la familia Ericaceae, los falsos pelos radicales son envueltos por abundantes hifas, las cuales penetran las células de la raíz pero no llegan a formar manto fúngico (Allaway y Ashford, 1996). Los hongos formadores de este tipo de micorriza corresponden al grupo de los Ascomicetos. Estos son responsable de manera importante de la movilización de nutrimentos, ya que muchas ericáceas crecen en hábitats donde la mayoría de los nutrimentos del suelo se encuentran en forma orgánica (Alarcón, 2007).
- c) Micorriza monotropoide: Este tipo de micorriza se forma también en plantas sin clorofila, aunque sus estructuras son similares a las formadas por la ectomicorriza y la micorriza arbutoide; es decir, forman manto fúngico y red de Hartig. Además, forman estructuras altamente especializadas del tipo de haustorios llamados clavos fúngicos, que penetran las células epidérmicas de tal forma que se van originando diversos hábitos de desarrollo de acuerdo con el crecimiento y la floración de la planta (Alarcón, 2007).
- d) Micorriza arbutoide: Este tipo de micorriza se caracteriza por formar manto fúngico, hifas externas y, usualmente red de Hartig bien desarrollada. Además, se presenta un desarrollo extensivo de hifas intercelularmente. Los hongos formadores de esta simbiosis pertenecen al grupo de los basidiomicetos (Smith & Read, 1997).
- e) Ectomicorriza: Establecen una asociación mutualista con las raíces de gimnospermas y angiospermas, principalmente leñosas, aunque solo alrededor del 3% de las plantas forman esta asociación (Palfner, 2001; Smith & Read, 1997). Estos hongos pertenecen a los tres grandes grupos de hongos terrestres, los Zygomycetes, los Ascomycetes y los Basidiomycetes, encontrándose en este último la mayor diversidad de géneros y especies que forman este tipo de asociación, se caracteriza principalmente porque las hifas del hongo limitan su desarrollo a los espacios intercelulares del córtex, sin penetrar las células vegetales de la raíz, dando lugar a una estructura característica denominada red de Hartig (Smith & Read, 1997).
- f) Micorriza arbuscular: Los hongos formadores de micorriza arbuscular pertenecen al phylum Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001). Se consideran biótrosos obligados, ya que para su desarrollo y reproducción requieren el sistema radical del hospedero. La principal característica morfológica de la colonización de la corteza de la raíz por estos hongos es su ramificación dicotómica repetida una vez que han penetrado en las células de dicha corteza, para la formación de los arbuscúlos, estructuras típicas de la colonización de dichos hongos.

Tabla 2. Características importantes de los tipos de micorrizas (Smith & Read, 2008)

Tipos de micorrizas	Micorriza Arbuscular	Ectomicorriza	Micorriza Arbutoide	Micorriza Monotropoide	Micorriza Ericoide	Micorriza Orquideoide
Hongos septados	-	+	+	+	+	+
aseptados	+	-	-	-	-	-
Colonización intracelular	+	-	+	+	+	+
Hongos con manto	-	+	+	+	-	-
Red de Hartig	-	+	+	+	-	-
Aclorofilos	-(+)	-	-	+	-	+
Taxones de Hongos	Glomero	Basidio/Asco (Glomero)	Basidio	Basidio	Asco	Basidio
Taxones de plantas	Bryo Pterido Gymno Angio	Gymno Angio	Ericales	Monotropoideae	Ericales Bryo	Orchidales

Los taxones de hongos se abrevian de Glomeromycota, Ascomycota y Basidiomycota. Los taxones de plantas de Bryophyta, Pteridophyta, Gymnospermas y Angiospermas

Esta íntima asociación entre hongos micorrícicos y plantas terrestres tiene una antigüedad de más de 460 millones de años (Redecker *et al.*, 2000), lo que ha condicionado decisivamente la biología de estos hongos. No se les conoce ninguna fase de reproducción sexual, pero sí la formación de esporas de resistencia sobre hifas vegetativas. Se trata de esporas multinucleadas, con un número de núcleos que oscila desde los 720 en *Scutellospora castanea* (Hosny *et al.*, 1998) a 2600 para especies del género *Gigaspora* (Cooke *et al.*, 1987; Bécard & Pfeffer 1993). Así mismo, estos hongos, especialmente los miembros del género *Gigaspora*, pueden ser hospederos de bacterias endosimbióticas (Bianciotto *et al.*, 1996) de función y origen desconocidos hasta el momento, e incapaces, al igual que los propios hongos que los albergan, de una fase de vida independiente (Jargeat *et al.*, 2004).

2.2.2 Filogenia de los Hongos Formadores de Micorriza Arbuscular (HFMA).

La clasificación de los HFMA es complicada y ha sufrido numerosos cambios a lo largo de las últimas décadas. Hasta finales del año 2000 los HFMA formaban parte de la clase de los Zigomicetos, y se agrupaban en un solo orden, los Glomales. Este orden estaba constituido por dos subórdenes (Glominae y Gigasporinae), tres familias (Glomaceae, Acaulosporaceae y Gigasporaceae) y seis géneros (*Glomus*, *Sclerocystis*, *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora*). Actualmente se considera que pertenecen al Phylum Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001), con más de 150 especies descritas. Tradicionalmente, la identificación de los HFMA se ha basado en las características morfológicas de las esporas. Sin lugar a duda estas estructuras contienen una información taxonómica importante (Sieverding y Oehl, 2006), pero ésta puede llegar a ser limitada y confusa. Este nuevo Phylum es creado mediante estudios filogenéticos y a través de la secuencia de genes de la subunidad pequeña del ARNr. La aplicación de las técnicas moleculares ha

permitido estructurar la taxonomía de estos hongos en cuatro órdenes en los que se incluyen nueve familias (Figura 1). Con base en estos estudios, separan a los hongos de un Phylum polifilético (Zygomycota) hacia otro que es aparentemente monofilético (Glomeromycota) (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007).

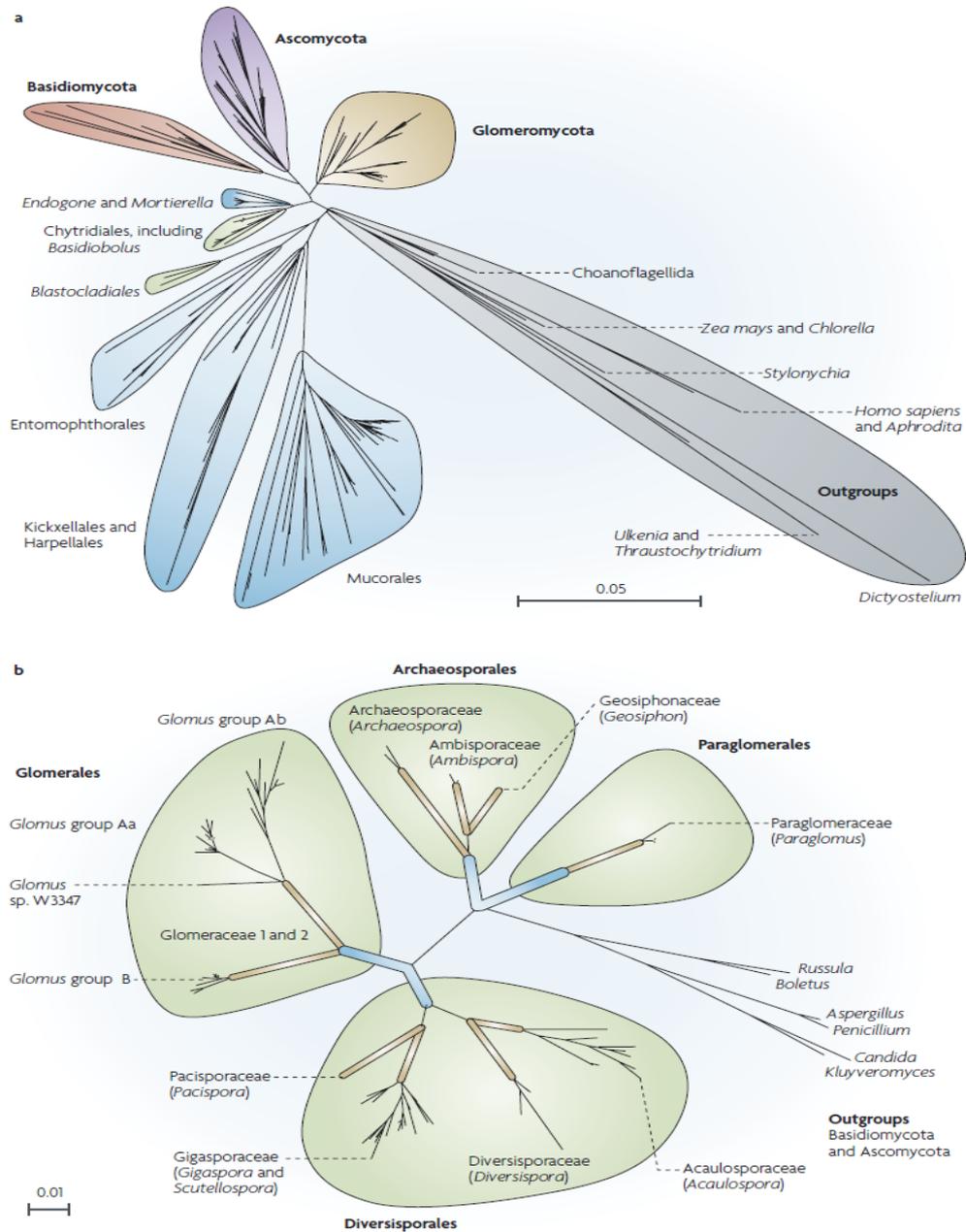


Figura 1. Árbol filogenético de Glomeromycota. (a) Filogenia propuesta para los HFMA basada en la secuencia de la subunidad pequeña (SSU) del ARNr. (b) Estructura taxonómica propuesta del Phylum Glomeromycota con base en las secuencias SSU del ARNr. Tomado de Schüßler *et al.* (2001).

2.2.2.1 La familia Glomeraceae.

La familia Glomeraceae está separada en dos, sobre la base de *Glomus macrocarpum* y *Claroidoglomeraceae* fam. nov. basado en el antiguo *Glomus claroideum* (Schüßler & Walter, 2010). Las esporas son glomoides, cerca de la superficie del suelo, en esporocarpos, por lo general con peridio parcial o total o esporas de forma individual en el suelo.

Glomus es el único género de la familia Glomeraceae de la división Glomeromycota; este es el género más grande de los HFMA, con cerca de 85 especies descritas, pero tal y como se define en la actualidad no es monofilético (Schüßler & Walter, 2010). Las esporas de *Glomus* se forma por gemación a partir de una punta de las hifas; la hifa esporogénica sigue estando a menudo sujeta a la espora madura (Figura 2). Las esporas germinan a través de esta unión de hifas o los restos de la misma. Este modo glomoides de la formación de esporas es simpliomórfico y se produce en varios linajes distintos como, *Glomus*, *Paraglomus*, *Archaeospora*, *Pacispora*, *Diversispora* y *Geosiphon* (Redecker y Raab, 2006).



Figura 2. Espora de *Glomus* sp. mostrando la hifa. Tomado de Redecker y Raab. (2006)

2.2.3 Desarrollo de la simbiosis.

La formación de la micorriza arbuscular implica una serie de pasos a partir del reconocimiento de la superficie de la raíz por el hongo hasta la formación de un apresorio, la penetración de células epidérmicas, desarrollo de hifas intrarradicales y arbusculares, y en algunos casos, la formación de vesículas. Todos estos pasos están, sin duda bajo un control genético (Peterson *et al.*, 2004).

El inicio de la colonización comienza con la germinación de las esporas y esta fase es independiente de la raíz del hospedero. Si bien es cierto que la colonización puede estar determinada por ciertos factores edáficos, de manera que favorezcan el desarrollo del micelio, se ha considerado que esta no es un

proceso totalmente dependiente de la presencia de la planta (Smith y Read, 1997). Sin embargo, la presencia de algunos exudados de plantas no micotróficas es determinante en el retraso de la germinación y la reducción de la colonización (Schreiner y Koide, 1993a y b). En esta fase denominada asimbiótica se presentan señales bioquímicas relacionadas con compuestos volátiles que forman parte de los exudados de las raíces. Uno de ellos es el CO₂, que es fundamental para la germinación de esporas y el crecimiento de la hifa germinativa (Bécard y Piché, 1989; citado por Ramírez y Villate, 2010). Sin embargo, éste no es el único compuesto involucrado en esta fase. Otros compuestos de los exudados radicales, como los flavonoides, favorecen ramificación de hifas (Vierheilig y Piché, 2002); es importante considerar que, raíces de maíz deficientes en producción de flavonoides, son colonizadas por HFMA, mostrando que los flavonoides no son esenciales para este proceso (Siquiera *et al.*, 1991; citado por Ramírez y Rodríguez, 2010). Uno de los compuestos de los exudados de las raíces, denominadas “factor de ramificación”, que induce una amplia ramificación de hifas, fue identificada en *Lotus japonicus* como una strigolactona, la cual ha demostrado ser una señal de fundamental importancia en el desarrollo de la simbiosis (Akiyama *et al.*, 2005; citado por Ramírez y Rodríguez, 2010).

Posterior a la germinación, el tubo germinal, una vez que llega a la epidermis de la raíz, debe recibir la señal procedente de ésta para dirigirse hacia ella y, a partir de ahí diferenciar y formar apresorio. En ausencia de un hospedero el crecimiento de la hifa con el tiempo se detiene, probablemente debido a la falta de moléculas de señalización a partir de los exudados radicales que estimulan la ramificación de las hifas (Tamasloukht *et al.*, 2003; Akiyama *et al.*, 2005; Besserer *et al.*, 2006). La detención del crecimiento parece ser programada, con retracción controlada del citoplasma, núcleos y la producción de tabiques, lo que permite a la espora y al micelio mantener la viabilidad a largo plazo y la capacidad de germinar de nuevo y colonizar las raíces (Koske, 1981; Logi *et al.*, 1998.), es por eso que antes de que la hifa agote sus reservas debe ser capaz de localizar las raíces e iniciar la formación del apresorio; es así que a partir del apresorio se inicia la penetración en la epidermis e inicia la colonización del tejido parenquimático de la raíz (Becard y Fortín, 1988).

A partir de la penetración de las hifas, en la parte cortical de la raíz pueden desarrollarse, al interior de las células, dos clases morfológicas estructurales diferentes de micorriza arbuscular: tipo *Arum* y tipo *Paris* (Figura 3). Gallaud (1904) describió estas dos clases, en función de sus hábitos de desarrollo en las células corticales. En el primer caso, la colonización se desarrolla de manera extensiva intracelularmente, formando a intervalos regulares pequeñas ramificaciones laterales que penetran las paredes celulares y se ramifican dicotómicamente de forma repetida, y en la parte terminal de las hifas se forman los arbuscúlos. En el tipo *Paris* no se observa desarrollo de las hifas intercelulares, pero existen enrollamientos extensivos de las hifas intracelulares que cruzan las células corticales, de las cuales se forman o no arbuscúlos muy

pequeños en forma intercalada (Smith y Read, 1997; Barker *et al.*, 1998). La formación de los arbusculos supone una alteración profunda de la célula vegetal, lo que se manifiesta principalmente por la deformación del plasmalema y del protoplasto para acomodar el arbusculo, el cual nunca penetra al citoplasma. Se produce igualmente una ordenación del citoesqueleto (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1981; Matsubara *et al.*, 1999), lo que conlleva a un cambio en la posición del núcleo, que pasa a una posición central, y una fragmentación de la vacuola. El arbusculo es excluido del citoplasma del hospedero por una membrana periarbuscular (PAM) (Parniske, 2008). La PAM es continua con la membrana plasmática de la planta, sin embargo, en esta se encuentran proteínas transportadoras de fosfato como PT4 que están ausentes en la membrana plasmática (Harrison *et al.*, 2002). La vida media de los arbusculos es muy breve, aproximadamente 7 días (Alexander *et al.*, 1989), transcurrido este tiempo los arbusculos se degeneran. En ciertas especies de hongos se observa también la formación de vesículas, estructuras ovoides llenas de glóbulos lipídicos cuya función parece ser el acúmulo de productos de reserva (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988). Especies de los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora* no forman vesículas dentro de la raíz, pero en el micelio externo producen células auxiliares. La función biológica de las células auxiliares sigue siendo especulativa (Bonfante y Bianciotto, 1995). Jabaji-Hare (1988) observó grandes cantidades de lípidos dentro de las células auxiliares de una especie de *Gigaspora*. De Souza y Declerck (2003) sugieren que las células auxiliares pueden jugar un posible papel en el almacenamiento de carbono, para su uso como energía para la producción de esporas y el desarrollo y/o reparación del micelio.

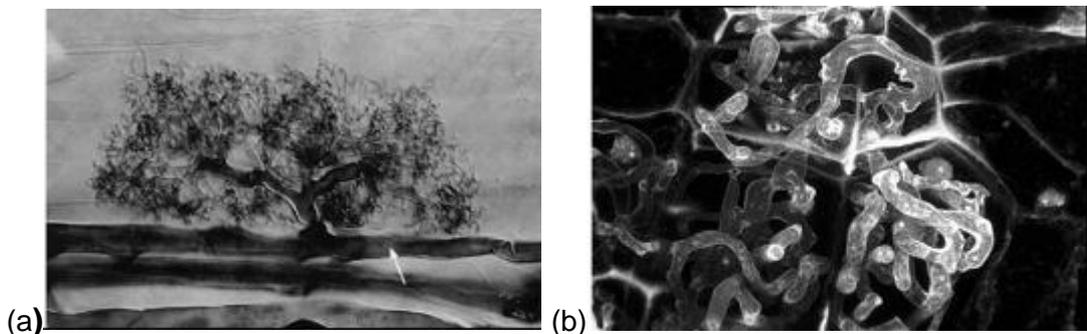


Figura 3. (a). Morfología *Arum* tipo arbusculos. (b). Morfología intracelular tipo *Paris*. Tomado de Smith y Read (2008).

Cuando la colonización interna está bien establecida, las hifas del hongo pueden crecer externamente desde la raíz de la planta hacia el suelo (micelio externo) y explorar un volumen de suelo inaccesible a las raíces; con ello la planta aumenta considerablemente su superficie de absorción, de 100 a 1000 veces y por tanto su capacidad de captación de nutrientes y de agua (Sieverding, 1991; Bürkett y Robson, 1994). Dado el carácter de simbiote estricto de los HFMA, la observación directa del micelio del hongo ha sido

extremadamente difícil hasta el desarrollo de las técnicas de cultivo monoxénico que permite el establecimiento de la simbiosis en una placa Petri con un medio artificial, entre raíces micotróficas y hongos micorrícicos (Beard y Fortín, 1988). Estas técnicas han permitido una mejor observación del micelio extraradical y la posibilidad de controlar el entorno de éste. Bago *et al.* (1998a) fueron los primeros en describir el desarrollo de esta fase externa de la simbiosis usando cultivos monoxénico de *Glomus intraradices*. Inicialmente se desarrollan unas hifas relativamente gruesas denominadas hifas exploradoras, estas hifas exploradoras sufren periódicas ramificaciones (hifas secundarias), que a su vez vuelven a ramificarse varias veces. Las hifas exploradoras son las responsables del avance del micelio; a intervalos regulares, se forman estructuras muy ramificadas, que recuerdan en cierta medida a los arbuscúlos, conocidas hoy día como BAS. Los BAS son estructuras transitorias y al cabo de pocos días pierden su contenido citoplasmático, a menos que desarrollen esporas. Las esporas, según el hongo micorrícico, pueden desarrollarse libres o agrupadas, en cuerpos fructíferos conocidos como esporocarpos, cerrándose de este modo el ciclo de vida (Figura 4).

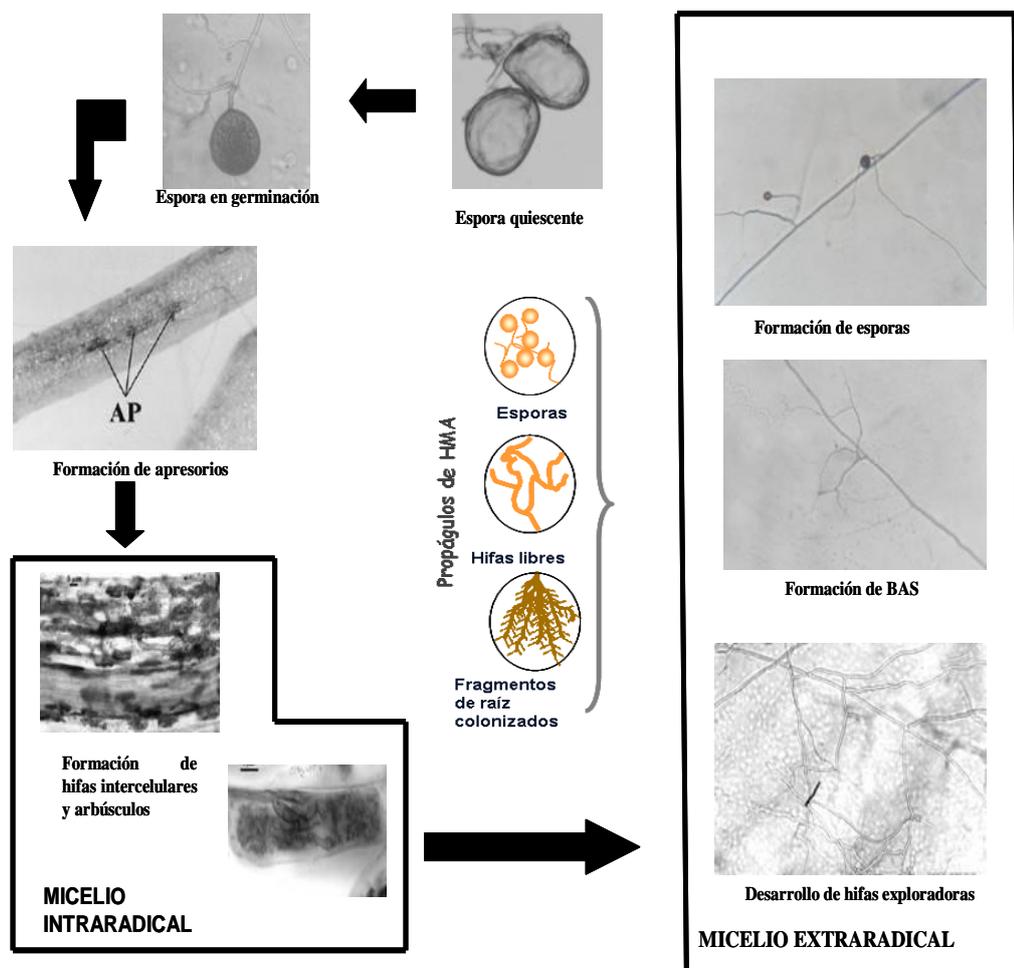


Figura 4. Ciclo de vida de *Glomus sp.* Modificado de Bago *et al.* (2000)

2.2.4 Fisiología de la simbiosis.

Con el establecimiento de los HFMA en el sistema radical se conforma la integración morfológica y estructural de la simbiosis, lo que determinará el nivel de mutualismo y el intercambio nutrimental en ambos simbioses. A continuación se resumen los aspectos fundamentales de la simbiosis, referidos principalmente al intercambio de nutrientes entre simbioses y su papel, en la absorción y movilización de micronutrientes.

2.2.4.1 Metabolismo del carbono.

Se ha estimado que hasta un 20% del carbono fijado fotosintéticamente puede ser trasladado desde la planta hasta los HFMA (Jakobsen y Rosendahl, 1990). El micelio intraradical es capaz de captar fructosa y glucosa, que son rápidamente transformados en trehalosa y en glucógeno (Shachar-Hill *et al.*, 1995; Pfeffer *et al.*, 1999). Se han aislado transportadores de carbohidratos regulados por la formación de la simbiosis e implicados en la transferencia de carbono a las células corticales, o en la salida de hexosas de las hojas (García-Rodríguez, 2005) aunque aún se desconocen las implicaciones en la transferencia de hexosas entre la planta y el hongo. Parte de estos carbohidratos son transformados en el micelio intraradical a compuestos lipídicos, que posteriormente serán transportados al micelio extraradical (Bago *et al.*, 2002), en donde mediante gluconeogénesis se transformarán en carbohidratos. El micelio extraradical depende de este aporte de productos carbonados dada la incapacidad de absorber hexosas del medio (Bago *et al.*, 2000). En los HFMA se produce una compartimentación del metabolismo, de forma que las capacidades de síntesis lipídicas sólo residen en el micelio intraradical, mientras que las capacidades gluconeogénicas se localizan únicamente en el micelio extraradical; no obstante en este micelio si se han encontrado otras rutas como son: glucólisis, ciclo de la urea, ruta de las pentosas fosfato, y vía de los ácidos tricarbónicos (Harrier *et al.*, 1998; Bago *et al.*, 1999). Ésta marcada compartimentación del metabolismo del hongo, asociada a la diferenciación que experimenta el micelio al establecer la simbiosis, podría estar en la base de la incapacidad del hongo para crecer independientemente de la planta.

2.2.4.2 Nutrición fosforada.

El fósforo (P) es un nutriente importante para la planta ya que representa el 0.2% en peso seco de ésta y como componente de moléculas tan importantes como ácidos nucleicos, fosfolípidos y ATP, por lo que su deficiencia impide el crecimiento adecuado de la misma. El P tiene una disponibilidad limitada en el suelo, debido a su difusión lenta y su tendencia a fijarse a varios componentes de la matriz del suelo. La tasa de absorción de fosfato por las raíces en crecimiento es mucho mayor que la tasa de la difusión del suelo de fosfato, lo que resulta en la formación de una zona de agotamiento alrededor del sistema

radicular y, en consecuencia, limita el suministro de P a la planta (Karandashovand y Bucher, 2005). La absorción de P por la planta se facilita de acuerdo con la arquitectura y morfología de la raíz, debido a que un sistema radical con elevada relación de superficie en volumen de área, será mucho más efectivo para explorar un mayor volumen de suelo (Lynch, 1995). Precisamente, en este sentido, la micorriza es importante para la planta en la adquisición de P, ya que en las plantas micorrizadas se incrementa el volumen de exploración de suelo mediante la extensa red de hifas que se forman (Smith y Read, 1997). Smith *et al.* (2003) distinguieron dos vías de absorción de fosfatos por las plantas, una es la vía directa de captación en la interfase suelo-planta a través de la epidermis y los pelos de la raíz; y la otra es la de las micorrizas a través de la captación vía micelio del hongo.

En la simbiosis micorrícica la absorción de fosfatos del suelo por el hongo es el primer paso en el proceso de transporte de fosfatos a la raíz. Se han identificados dos transportadores de fosfatos en HFMA como lo son el GvPT para *Glomus versiforme* (Harrison *et al.*, 2002) y el GiPT para *Glomus intraradices* (Maldonado-Mendoza *et al.*, 2001). La mayor parte del intercambio de este nutriente se produce dentro de las células corticales de la raíz, en una estructura de hifas ramificadas denominadas arbusculos; en éstos se ha identificado un tipo de proteínas transportadoras de fosfatos del cual el más caracterizado ha sido el PHT1 (Rausch *et al.*, 2001; Javot *et al.*, 2007b). Los estudios de expresión génica han demostrado que los miembros específicos de estas familias de proteínas se expresan en las raíces de las plantas colonizadas. Por ejemplo, el gen *Medtu: Pht1; 4* se expresa exclusivamente en las raíces colonizadas y el producto de la proteína está específicamente localizado en la membrana peri-arbuscular dentro de las células arbusculadas (Harrison *et al.*, 2002; Javot *et al.*, 2007a). Bajo este contexto el intercambio de P hacia la planta está determinado por la presencia de transportadores de alta afinidad y las H⁺-ATPasas, así como procesos pasivos. Los fosfatos absorbidos son incorporados en ácidos nucleicos, fosfolípidos y otras moléculas fosforiladas o se condensan en polifosfatos dentro del hongo. Con el fin de evitar la acumulación de iones fosfatos, que dificultarían el funcionamiento normal del hongo mediante un incremento en la presión osmótica, estos se polimerizan formando cadenas de polifosfatos de unas 17 unidades aproximadamente, que se acumula sobre todo en las vacuolas (Rasmussen *et al.*, 2000). El fosfato es transportado como polifosfato al micelio intraradical y una vez allí es hidrolizado, liberándose el fosfato mediante la actividad de ciertas fosfatasas alcalinas presentes en la vacuola (Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1987).

2.2.4.3 Nutrición nitrogenada.

El nitrógeno es un elemento no metálico necesario para la formación de aminoácidos, purinas y pirimidinas, y por lo tanto está indirectamente implicado en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (Mohammadi *et al.*, 2008). Los

HFMA son capaces de transferir nitrógeno (N) a la planta, mediante la absorción de amonio (NH_4) o nitrato (NO_3) (Tobar *et al.*, 1994; Bago *et al.*, 1996). Así mismo, hay indicios de cierta capacidad de transporte de N orgánico, especialmente aminoácidos (Hawkins *et al.*, 2000). Los hongos micorrícicos parece ser que prefieren como fuente de nitrógeno el NH_4 frente al NO_3 (Johansen *et al.*, 1996). El NH_4 absorbido sería rápidamente incorporado a glutamato, para dar glutamina por distintas vías, aunque el más probable parece ser el ciclo de la Glutamina sintasa/Glutamato sintasa ya que estas actividades se han detectados en HFMA (Johansen *et al.*, 1996; Breuninger *et al.*, 2004).

La asimilación de NO_3 parece estar facilitada por la enzima nitrato reductasa, cuya actividad se ha detectado en esporas (Ho y Trappe, 1975) y en extractos de raíces micorrizadas (Subramanian y Charest, 1998). Así mismo se ha aislado el gen de una nitrato reductasa, que se expresa fundamentalmente en el arbúsculo (Kaldorf *et al.*, 1998). Esta actividad nitrato reductasa permitiría la reducción del nitrato y su incorporación a la glutamina en forma de amonio. La transferencia de nitrógeno a la planta ocurre en un proceso asociado al ciclo de la urea y al transporte de polifosfato, propuesto por primera vez por Bago *et al.* (2001).

2.2.5 Beneficios de los hongos micorrícicos en plantas micropropagadas.

La transferencia de plántulas cultivadas *in vitro* a condiciones *ex vitro*, es uno de los pasos más importantes para la adaptación fisiológica de éstas; esta fase de aclimatación es el comienzo de una condición heterótrofa a una autótrofa implicando procesos fisiológicos necesarios para la supervivencia (Kapoor *et al.*, 2008). Durante la aclimatación, las plántulas deben aumentar la absorción de agua y minerales así como la tasa fotosintética (Grattapaglia y Machado, 1990). Los hongos micorrícicos son bien conocidos porque aumentan el vigor de las plantas por absorción de agua y nutrientes minerales, especialmente el fósforo; así mismo pueden proteger a las plantas contra ciertos patógenos de la raíz y mitigar los efectos de las variaciones extremas de temperatura el pH y estrés hídrico (Siqueira, 1994). Se han realizado numerosos estudios en la inoculación de hongos micorrícicos en la etapa de aclimatación o incluso bajo condiciones *in vitro* (Sbrana *et al.*, 1994; Elmeskaoui *et al.*, 1995; Sharma *et al.*, 1996; Siqueira *et al.*, 1998; Duponnois y Plenchette, 2003; Kapoor *et al.*, 2008; Roveda *et al.*, 2007). Los beneficios asociados a la inoculación con HFMA se discuten a continuación

2.2.5.1 Desarrollo de un sistema radical.

Los HFMA ayudan al desarrollo de un sistema de raíces más fuerte mediante el aumento de la superficie de las raíces existentes (Puthur *et al.*, 1998). La

colonización de una raíz por los hongos micorrícicos puede alterar la morfología de un sistema de raíces en su estructura, espacial y temporalmente así como de forma cuantitativa (Atkinson, 1992; Berta *et al.*, 1993.; Atkinson *et al.*, 1994; Norman *et al.*, 1996). Las raíces colonizadas son muy ramificadas, como consecuencia de esto, la inoculación con micorrizas estimula el enraizamiento y crecimiento, y por lo tanto la supervivencia al trasplante de esquejes y plántulas en un medio de cultivo (Berta *et al.*, 1993; Atkinson *et al.*, 1994).

2.2.5.2 Incrementos en la tasa fotosintética.

Las asociaciones con hongos micorrícicos han demostrado que mejoran la eficiencia fotosintética, porque estos hongos aumentan la nutrición fosforada en las plantas, debido a un efecto que tiene el P en las reacciones de asimilación de CO₂; por ejemplo la tasa fotosintética, está fuertemente influenciada por la concentración de P inorgánico en el cloroplasto (Herold, 1980). Se ha demostrado también que la concentración de clorofila es mayor en plantas inoculadas con HFMA en comparación con aquellas que no están inoculadas (Giri *et al.*, 2003; Kapoor *et al.*, 2007).

2.2.5.3 Aumento en la conductancia del agua.

La inoculación con HFMA en plántulas micropropagadas juega un papel importante en la economía del agua. La simbiosis micorrícica mejora la conductividad hidráulica de la raíz en el suelo que en última instancia influye en el potencial hídrico y las tasas de transpiración en las hojas (Kapoor *et al.*, 2008). Se ha demostrado que las raíces inoculadas con HFMA, codifican un gen para una acuaporina y la expresión de este se localiza en la vacuola altamente compartimentada del arbusculo que contienen las células vegetales (Roussel *et al.*, 1997; Krajinski *et al.*, 2000).

2.2.5.4 Estrés ambiental.

Se ha demostrado que los HFMA juegan un papel importante en el alivio contra diversos tipos de estrés abiótico, como lo son los metales pesados, salinidad del suelo y la sequía (Caldwell y Virginia, 1989). Aunque hay muy pocos estudios sobre la tolerancia a metales pesados en plántulas micropropagadas inoculadas con HFMA, Ruffyikiri *et al.*, (2000) demostraron una mayor resistencia de plántulas de banano micorrizadas *in vitro* a la toxicidad por aluminio que aquellas que no estaban micorrizadas. La simbiosis micorrícica bien desarrollada puede mejorar la supervivencia de plantas micropropagadas por la mejora en las relaciones hídricas, mejor adquisición de nutrientes, resistencia contra ciertos patógenos, mejora la estructura del suelo contribuyendo a la formación de agregados, y producción de reguladores de crecimiento vegetal (Berreck y Haselwandter, 2001).

2.2.6 Germinación de esporas de HFMA y su relación con flavonoides exudados de plantas hospederas.

El establecimiento de la asociación simbiótica entre las plantas y los HFMA implica un complejo intercambio de señales entre los dos simbioses (Gadkar *et al.*, 2001; Vierheilig y Piche, 2002). El incremento en el crecimiento de la hifa cerca a la raíz de la planta se atribuye a que probablemente existen moléculas específicas presentes en los exudados radiculares del hospedero indicando que de algún modo ocurre un fenómeno de reconocimiento en las etapas tempranas de formación del HFMA (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1989). De acuerdo a lo mencionado anteriormente una de las moléculas que se ha identificado, implicada en señales entre los simbioses, con respuestas, tanto de la germinación como del crecimiento de la hifa son los flavonoides (Morandi, 1996; Vierheilig *et al.*, 1998). Los flavonoides se conocen como compuestos claves en la señalización de una serie de interacciones planta-microorganismos, por ejemplo en la simbiosis *Rhizobium* spp-Leguminosa; estos actúan como moléculas quimiotácticas para los rizobios y como inductores específicos de genes de nodulación (genes-*nod*) (Perret *et al.*, 2000).

El efecto de los flavonoides en las diferentes etapas del ciclo de vida de los HFMA, como la germinación de esporas, elongación de las hifas y su ramificación, formación de las células auxiliares y la formación de esporas secundarias se puede estudiar en experimentos *in vitro*. Los datos obtenidos en estos experimentos *in vitro* han demostrado que muchos de los flavonoides afectan el crecimiento de los HFMA en todas las etapas (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1989, Morandi 1996, Vierheilig *et al.*, 1998; Scervino *et al.*, 2005a). Se ha establecido que la presencia de flavonoides en los exudados radiculares promueve la germinación de esporas, pero también la inhiben como en el caso del flavonoide Formononetina (7-hidroxi-4metoxisoflavona) que fue probado en los trabajos de Tsai y Philips (1991). Sin embargo, también se han demostrado resultados muy positivos empleando bajas concentraciones de Quercetina (3, 3',4',5,7-pentahidroxiflavona) con un incremento en la germinación de esporas que, además, no solo promovió la germinación de la espora sino también el alargamiento de la hifa y su ramificación (Bécard *et al.*, 1992). Sin embargo, éste no es el único compuesto involucrado en la germinación de la espora y su ramificación; existen otros exudados de la raíz como las strigolactonas, apocarotenoides derivados del metabolismo secundario de la planta y que, junto con los flavonoides, terpenoides, y reguladores de crecimiento están implicados en el diálogo molecular entre los HFMA y las plantas, lo que sugiere que los metabolitos secundarios de las plantas juegan un papel esencial en la regulación y el desarrollo de la micorrización (Akiyama 2007).

3 METODOLOGÍA

3.1 LOCALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

El trabajo se llevó a cabo en los laboratorios de Cultivo de Tejidos Vegetales, Micropropagación de Plantas y Ecofisiología Vegetal del Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB) y el CI Tibaitatá, de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA) en el centro de investigación Tibaitatá, localizado a 2543 m, en la Sabana de Bogotá Kilómetro 14 Vía Occidente a Mosquera, Cundinamarca.

3.2 FASES DE LA INVESTIGACIÓN

A continuación se detallan cada una de las fases de investigación contempladas en el desarrollo de los experimentos de la siguiente manera: I. Obtención del inóculo, II. Desinfección y germinación de propagulos infectivos (esporas y fragmentos de raíces con vesículas) de HFMA bajo condiciones *in vitro*. III. Establecimiento de un sistema de cultivo autotrófico para la micorrización *in vitro* en plantas de mora castilla (*Rubus glaucus*), IV. Evaluación de las variables. (Figura 5).

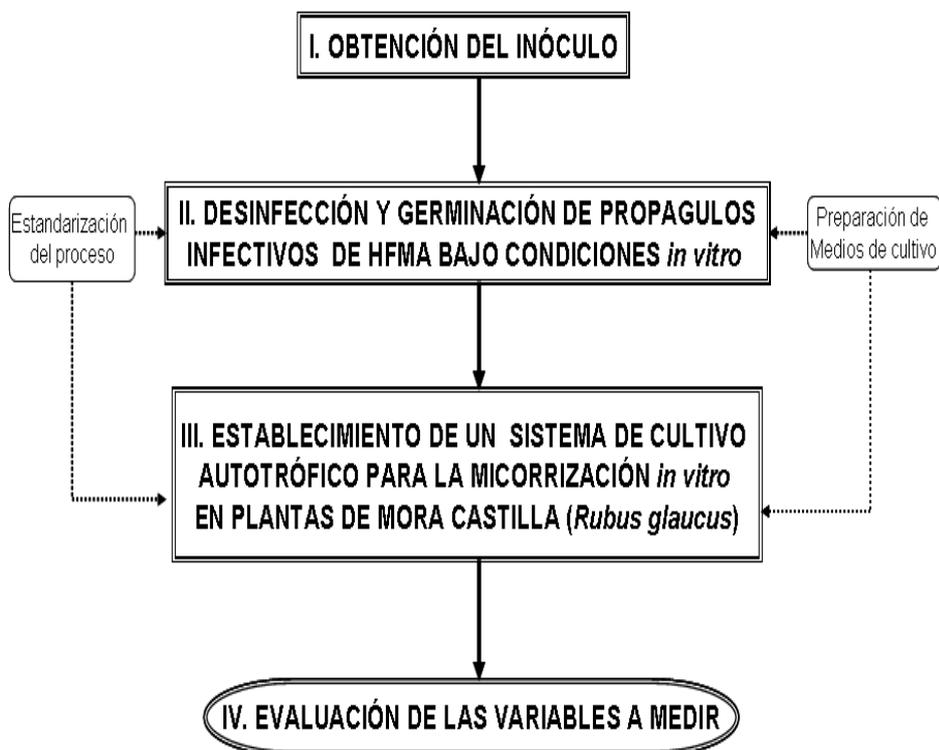


Figura 5. Diagrama de flujo de fases de la investigación

3.2.1 Obtención del inóculo de HFMA.

Se utilizaron esporas de *Glomus* sp. (GEV02), proveniente de un cultivo de mora de castilla (*Rubus glaucus*). La producción del HFMA se realizó bajo condiciones de invernadero en materas de 300 g utilizando como hospedero cebolla de bulbo (*Allium cepa* L) y como sustrato una mezcla de suelo: arena (3:1) estéril (Figura 6). La producción de plántulas de cebolla se hizo a partir de semillas sexuales, del híbrido Yellow Granex F1PRR, este híbrido presenta las siguientes características: semilla seleccionada, con una pureza de 99% y con una germinación del 94%.

Las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2% y sembradas en turba Canadiense Growing Mix F15, que consiste en un sustrato inerte, estéril y con muy poca disponibilidad de nutrientes. La inoculación con base en esporas de *Glomus* sp. (GEV02) se aplicó directamente al sustrato, con una concentración de 50 esporas por plántula. Debido a que la turba es un sustrato inerte, que sólo le sirve de soporte a la planta y que contiene muy poca disponibilidad de nutrientes, se fertilizó cada dos días con la solución nutritiva de Hougland (Anexo 1).



Figura 6. Producción de *Glomus* sp (GEV02) bajo condiciones de invernadero en plantas de cebolla de bulbo (*Allium cepa* L).

Se evaluó el número de esporas por gramo de suelo seco mediante la técnica de tamizado húmedo y decantación propuestas por Gendermann & Nicholson (1963), con modificaciones (Anexo 2), este método se basa en el lavado de una muestra de suelo en agua corriente y pasarla por varios tamices de diámetro descendente. La presente en el último tamiz es resuspendida en una

solución de sacarosa, para separar las esporas de las partículas de suelo mediante centrifugación. Por lo general se utilizan tamices de 425 y 38 μ m con la finalidad de aislar las esporas lo más limpias posibles y/o hacer el conteo de las mismas.

Adicionalmente, se utilizaron fragmentos de raíces micorrizadas de *Allium cepa* L de 16 semanas después de la inoculación con el hongo, se cortaron las raíces más jóvenes y se seleccionaron bajo un estéreo microscopio (Olympus SZ60) fragmentos con vesículas (Figura 7).

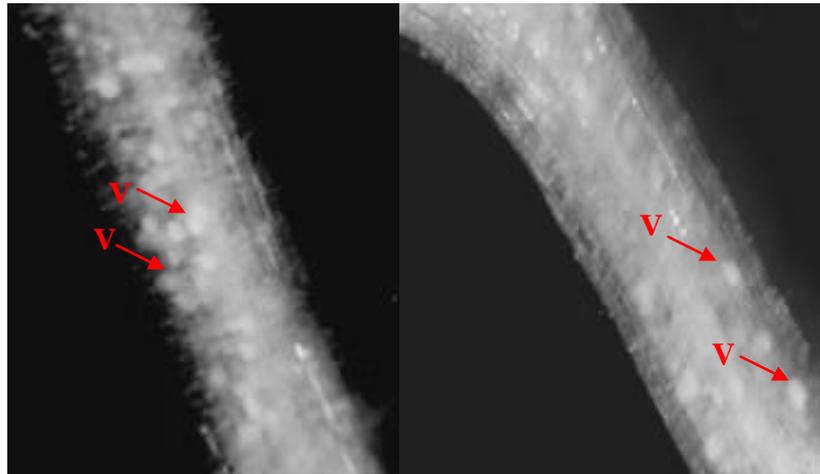


Figura 7. Fragmentos de raíces de cebolla de bulbo con vesículas. V: Vesículas

A partir de estos cultivos se obtuvo el inóculo micorrícico (esporas y fragmentos de raíces con vesículas) correspondiente para iniciar el cultivo *in vitro* de HFMA.

3.2.2 Desinfección y germinación de propágulos infectivos de HFMA bajo condiciones *in vitro*.

Las esporas utilizadas en el proceso de desinfección provenían de una multiplicación realizada en invernadero como se describe en el apartado 3.2.1. Para la desinfección de esporas de *Glomus* sp. (GEV02), se aislaron 50 esporas y se introdujeron en un sistema de vacío, realizando 3 enjuagues con agua destilada estéril, y a continuación se procedió a realizar la desinfección, utilizando varios agentes como cloramina T con la inclusión de un surfactante tween 20, etanol, hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio, así como la adición de una solución de antibióticos (estreptomina y gentamicina sulfatada) esterilizada con un filtro Millipore de 0.25 μ m, evaluando distintas

combinaciones de tiempo y concentración de cada agente desinfectante, de acuerdo con lo reportado por Cranenbrouck *et al.* (2005), con modificaciones.

Después de la aplicación de cada solución (desinfectante y antibiótica) las esporas se lavaron con agua destilada estéril tres veces consecutivas. Una vez finalizada cada evaluación, las esporas tratadas se separaron a cajas de Petri que contenían medio Modificado Strullu – Romand (MSR) (Anexo 3) (Declerck *et al.* 1996a, modificado de Strullu y Romand, 1986) empleando una micropipeta de 100µl y se incubaron en oscuridad durante 2 semanas a 28°C en posición invertida (Figura 8).

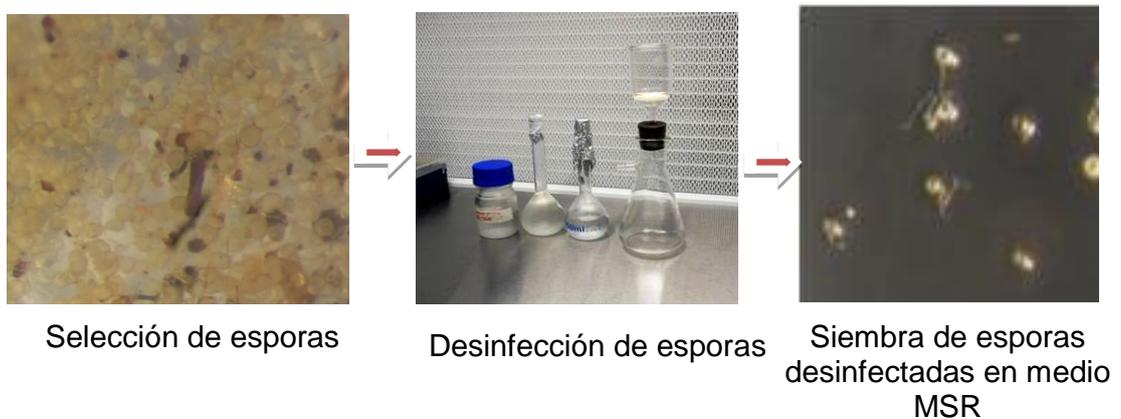


Figura 8. Esquema de desinfección de esporas de *Glomus* sp (GEV02)

Los fragmentos de raíces micorrizadas con *Glomus* sp. (GEV02) utilizados para el proceso de desinfección fueron obtenidos a partir de una multiplicación que se realizó bajo condiciones de invernadero en plantas de cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) tal y como se describe en el apartado 3.2.1. Después de 16 semanas, se cortaron 80 fragmentos de 1 cm de longitud aproximadamente, que contenían gran cantidad de vesículas. En primer lugar, los fragmentos de raíces se limpiaron con agua destilada estéril durante un minuto en ultrasonido, y a continuación se desinfectaron empleando la metodología descrita por Declerck *et al* (1998). El método de desinfección fue el siguiente: desinfección en etanol al 96% durante 10 s, hipoclorito de calcio al 6% durante 1min, cloramina T más tween 20 al 2% durante 10 min, seguido de una solución antibiótica que contenía 200 mg de estreptomicina sulfatada y 100 mg de gentamicina sulfatada durante 10 min. El proceso de desinfección fue llevado a cabo en una cámara de flujo laminar (Figura 9).



Figura 9. Esquema de desinfección de fragmentos de raíces de cebolla (*Allium cepa* L) con vesículas.

Después de la aplicación de cada solución (desinfectante y antibiótica) los fragmentos de raíces con vesículas se lavaron con agua destilada estéril tres veces consecutivas. Los fragmentos fueron colocados en cajas de Petri que contenían medio Modificado Strullu – Romand (MSR) (Declerck *et al.* 1996a, modificado de Strullu y Romand 1986) empleando una pinza y se incubaron en oscuridad durante 2 semanas a 28°C en posición invertida. Se inocularon 10 cajas de Petri a razón de 8 fragmentos de raíces por caja. El medio MSR se preparó a partir de soluciones madre de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y FeNaEDTA. Para un litro de medio de cultivo se añadían:

- 10 ml de la solución de macronutrientes
- 10 ml de la solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- 1 ml de la solución de micronutrientes
- 5 ml de la solución de FeNaEDTA

Después de ajustar el pH a 5.8 se añadían 3 g de phytigel. Las cajas de Petri inoculadas tanto con esporas como con fragmentos de raíces micorrizadas se incubaron en posición invertida, a una temperatura de 25°C, en oscuridad.

Por otra parte, se sabe que las esporas pueden germinar en ausencia de un hospedero, incluso la hifa puede elongarse, pero si no encuentra un hospedero se aborta el proceso, sin embargo, se ha comprobado que los exudados radicales podrían estimular la germinación de las vesículas y el crecimiento de las hifas en las esporas (Diop *et al.*, 1994a); de acuerdo a lo mencionado anteriormente una de las moléculas que se han identificado en la emisión de señales, en las respuestas, tanto de la germinación como del crecimiento de la hifa son los flavonoides. Los flavonoides se conocen como compuestos claves en la señalización de una serie de interacciones planta-microorganismos

(Perret *et al.*, 2000). De acuerdo con lo anterior se evaluó un protocolo para establecer un método de germinación de esporas y fragmentos de raíces micorrizadas de *Glomus* sp (GEV02), utilizando diferentes concentraciones del flavonoide quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxi flavona), según Scervino *et al.* (2005), con modificaciones. El diseño experimental seleccionado fue completamente al azar con 4 tratamientos y tres repeticiones. Los tratamientos evaluados se muestran en la tabla 3. Estos tratamientos fueron evaluados durante 2, 4, 8 y 12 días, tanto para las esporas como para los fragmentos de raíces con vesículas

Tabla 3. Tratamientos evaluados para establecer un método de germinación de esporas y fragmentos de raíces micorrizadas de *Glomus* sp (EV02).

Tratamientos	Concentración del flavonoide (μM)
1	Control
2	2
3	5
4	8

Luego de realizar la desinfección de los propágulos infectivos (apartado 4.2.1 y 4.2.2); se inocularon 5 esporas y 5 fragmentos de raíces por cada repetición en medio modificado Strullu & Romand (MSR), se incubaron en oscuridad a 28°C en posición invertida.

3.2.3 Establecimiento de un sistema de cultivo autotrófico para la micorrización *in vitro* en plantas de Mora de Castilla (*Rubus glaucus*).

3.2.3.1 Producción de plántulas *in vitro*.

El material de partida para establecer el sistema de cultivo autotrófico de las plantas de mora de castilla (*Rubus glaucus*) de la variedad sin espinas, fue proporcionado por el Laboratorio de Micropropagación de Plantas del Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB) de CORPOICA, provenientes de una etapa de multiplicación. El material vegetal se enraizó en el medio basal Lepoivre modificado (Valderrama *et al.*, 2009). El medio Lepoivre modificado se preparó a partir de soluciones madre de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y FeNaEDTA (Anexo 4). Para un litro de medio de cultivo se añadían:

- 50 ml de la solución de macronutrientes 1
- 50 ml de la solución de macronutrientes 2
- 1 ml de la solución de micronutrientes
- 10 ml de la solución de FeNaEDTA
- 0.4 mg de tiamina

- 100 mg de inositol
- 0.1 mg de AIB
- 20 g de sacarosa.

Después de ajustar el pH a 5.8 se añadían 7 g de agar y se calentaba toda la solución hasta su disolución. A continuación se repartían 30 ml de medio en tubos y se introducían en autoclave (120°C durante 20 min). Las plántulas se mantuvieron en un cuarto de crecimiento con una temperatura promedio de 22°C, fotoperíodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad y una intensidad lumínica de 200 lux (Figura 10).



Figura 10. Desarrollo de plántulas *in vitro* de Mora de Castilla (*Rubus glaucus*) variedad sin espinas sembradas en medio Lepoivre en la etapa de enraizamiento.

3.2.3.2 Obtención de un sistema para la micorrización *in vitro* en plantas de Mora de Castilla (*Rubus glaucus*) variedad sin espinas inoculadas con *Glomus* sp (GEV02).

Se estableció un sistema de cultivo autotrófico para plántulas de mora tal y como lo describen Voets *et al.* (2005), en plántulas de patata. Se realizaron dos orificios en un extremo de una caja de Petri (\pm 2mm de diámetro), uno en la base y otro en la tapa (Figura 11); las placas contenían 30 ml de medio MSR sin sacarosa ni vitaminas y solidificado con 3 g/l de Phytigel. A continuación se transfirieron plántulas de mora de castilla variedad sin espinas micropropagadas de 10 semanas de edad (de 5cm de longitud aproximadamente) que estaban creciendo en sistemas de cultivo *in vitro* tradicionales (apartado 3.2.3.1). Las raíces se colocaron en contacto con la superficie del medio, mientras que el tallo sobresalía a través del orificio de la placa. Las placas se sellaron con papel vinipel y el orificio se cubrió con grasa

de silicona (E Merck, D-6100 Darmstadt, F R. Germany) para evitar contaminación.

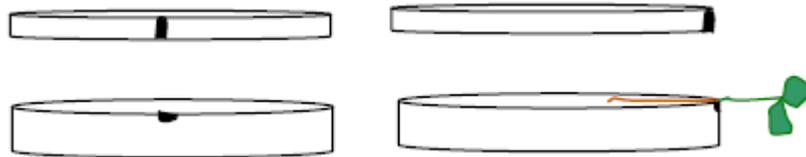


Figura 11. Esquema de la abertura de los orificios en la base y en la tapa de una caja de Petri y su posterior introducción de la plántula de mora en la placa. Tomado de Nogales (2006).

Los sistemas autotróficos se cubrieron con bolsas de plástico negras para proteger las raíces de la luz, pero dejando la parte aérea al aire libre. Para evitar la desecación y el shock al transplante se ubicaron verticalmente en una cámara húmeda construida con cuatro tubos en el fondo del recipiente llenos de agua para mantener la humedad (Figura 12), y toda la estructura se mantuvo en un cuarto de crecimiento con una intensidad lumínica de 16h luz / 8h oscuridad y una temperatura de 22°C día/ 18°C noche. Periódicamente, dependiendo de la necesidad de las plantas, se añadió medio MSR sin sacarosa ni vitaminas, esterilizado a 120°C durante 20 minutos, a las placas de Petri para mantener un nivel adecuado de nutrientes a las plantas.

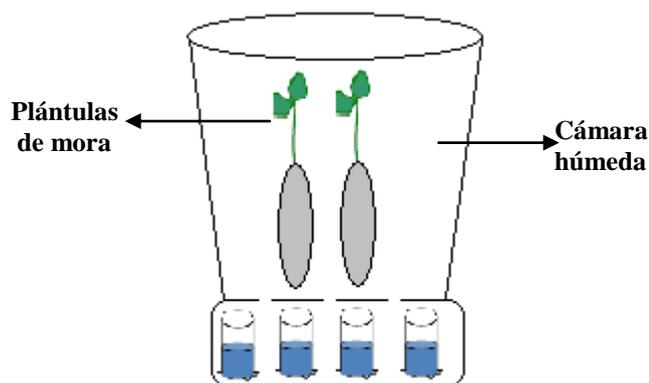


Figura 12. Cámara húmeda construida para la aclimatación de las plántulas de mora.

3.2.3.3 Comparación entre métodos de inoculación directos con *Glomus* sp. en plántulas de mora.

Se compararon dos métodos de inoculación directa con el HFMA en sistemas de cultivo *in vitro* autotrófico. En el primero, se utilizaron fragmentos de raíces con vesículas y en el segundo se utilizaron esporas individuales. Los dos tipos de inóculo se obtuvieron de acuerdo a como se describe en el apartado 3.2.1.

En el primer método, se tomaron fragmentos de raíces micorrizadas con 16 semanas. Bajo un estéreo microscopio (Olympus SZ60) se seleccionaron los fragmentos que contenían vesículas (1cm de longitud). En primer lugar los fragmentos fueron desinfectados en ultrasonido bajo una cámara de flujo laminar; las raíces fueron sucesivamente lavadas en una solución de etanol 95%, hipoclorito de calcio 2%, cloramina T 2% y una solución de antibióticos (estreptomina + gentamicina sulfatada), después de cada paso de desinfección las raíces fueron lavadas tres veces con agua destilada estéril. Una vez desinfectados los fragmentos de raíces micorrizadas, fueron transferidos a una placa de petri con medio MSR e incubados a 28°C en oscuridad en posición invertida hasta su posterior germinación de las vesículas. Los fragmentos no contaminados que tenían emergencia de micelio al cabo de 7 días fueron transferidos a una nueva caja de Petri en medio MSR sin sacarosa ni vitaminas, donde se transfirieron plántulas de mora de castilla (*Rubus glaucus*) variedad sin espinas de aproximadamente 2cm de longitud obtenidas por micropropagación y desarrolladas en tubos con medio Lepoivre (apartado 3.2.3.1).

En el segundo método se tomaron esporas individuales. Las esporas fueron extraídas por el método de Gendermann & Nicholson (1963) (apartado 3.2.1); bajo un estéreo microscopio se seleccionaron con la ayuda de una micropipeta esporas sanas, y posteriormente se procedió al proceso de desinfección. Las esporas fueron lavadas en una solución de cloramina T + tween 20, seguido de una solución de antibióticos (estreptomina + gentamicina sulfatada), después de cada paso de desinfección las esporas fueron lavadas tres veces con agua destilada estéril; el proceso se realizó bajo una cámara de flujo laminar. Una vez desinfectadas las esporas, fueron transferidas a una caja de Petri con medio MSR e incubados a 25°C en oscuridad en posición invertida hasta su posterior formación de tubo germinativo. Al cabo de 7 días se trasladaron grupos de 5 esporas pregerminadas a una nueva caja de Petri con medio MSR sin sacarosa ni vitaminas, donde se transfirieron plántulas de mora de castilla (*Rubus glaucus*) variedad sin espinas de aproximadamente 3 cm.

Se establecieron 5 sistemas de cultivo *in vitro* autotrófico por cada método de inoculación, que se introdujeron en la cámara húmeda descrito en el apartado 3.2.3.2. Todo el experimento se mantuvo en un cuarto de crecimiento con una temperatura promedio de 22°C, fotoperíodo de 16 horas luz / 8 horas

oscuridad y una intensidad lumínica de 200 lux. Después de la segunda semana cuando las raíces de las plantas comenzaban a crecer activamente, se indujo la aclimatación de las plántulas mediante la apertura progresiva de la cámara húmeda. Después de cuatro días los sistemas de plantas se sacaron de la cámara húmeda y se colocaron al aire libre dentro del cuarto de crecimiento, dejando la parte aérea fuera mientras que la raíz quedaba dentro de la caja petri y cubierta con una bolsa negra para protegerla de la luz (Figura 13).



Figura 13. Disposición de los sistemas autotróficos de mora en placas petri de plástico cubiertas con una bolsa negra.

3.2.4 Evaluación de las variables.

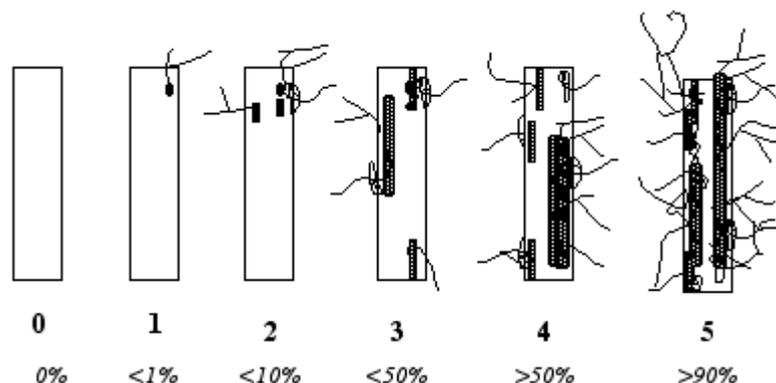
La investigación se llevó a cabo bajo condiciones controladas en cuartos de crecimiento. Se realizó un diseño completo al azar, con tres tratamientos y 5 repeticiones. Cada sistema de cultivo *in vitro* autotrófico fue considerado como una unidad experimental. Los tratamientos evaluados fueron: un tratamiento sin inocular (testigo absoluto), un tratamiento inoculado con fragmentos de raíces de cebolla con vesículas y un tratamiento inoculado con esporas individuales.

A partir de la cuarta semana, se realizaron observaciones de contacto entre las hifas fúngicas y las raíces de las plántulas de mora utilizando un estereomicroscopio (Olympus SZ60). A las 5, 6, 7, 8 y 9 semana se evaluaron las siguientes variables:

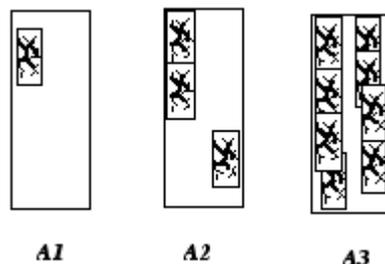
A nivel simbiótico: se cuantificó el número de esporas producidas con el fin de determinar el desarrollo fúngico, y en la 9 semana se midió la longitud del micelio extraradical con el método de intersección en placa (Newman, 1966); así como el porcentaje de colonización de Hongos Formadores de Micorrizas Arbuscular (HFMA), empleando la metodología de tinción con azul de tripán,

propuesta por Phillips & Hayman (1970) (Anexo 5), el cual consiste en una decoloración de raíces con una solución de KOH en baño de María y posterior acidificación con HCl. Las raíces fueron teñidas con azul de tripán. Una vez finalizada la tinción, se montan en láminas con 10 raíces de más o menos 1cm de longitud cada una para su posterior lectura en el microscopio (Motic BA 400) para la evaluación de colonización de los HFMA; las medidas de la colonización radical, se tomaron usando el método de Trouvelot *et al.* (1986), donde se cuantifica la frecuencia de micorrización (%F), es decir el número de raíces colonizadas con relación al total de raíces por planta e intensidad de micorrización (%I), que indica el porcentaje de colonización por raíz; asignando a cada fragmento un número de 0 a 5 en función del nivel de infección por el hongo, así como un valor A0 hasta A3 con base en la riqueza de arbusculos del fragmento estudiado (Figura 14) (Anexo 6). Posteriormente un programa informático calcula la frecuencia de colonización, la intensidad de la misma y la riqueza de arbusculos (<http://www.dijon.inra.fr/mychintec/Mycocalc-prg/download.html>).

Puntuación de la colonización micorrícica



Puntuación en la abundancia de arbusculos



A0: ningún arbusculo, A1: pocos arbusculos, A2: frecuentes arbusculos y A3: abundantes arbusculos

Figura 14. Método de Trouvelot *et al.* (1986)

A nivel fisiológico: se evaluó la longitud de las raíces y de la parte aérea. A la novena semana se midió el peso fresco y seco de la parte foliar y radical para determinar el desarrollo de las plantas.

Las plantas se cosecharon a la novena semana después de la inoculación tanto de los fragmentos de raíces con vesículas como con las esporas.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 OBTENCIÓN DEL INÓCULO DE HFMA

El trabajo de investigación partió de la obtención de esporas de *Glomus* sp. (GEV02), proveniente de un cultivo de mora de castilla (*Rubus glaucus*). Al cabo de 16 semanas se evaluó el número de esporas por gramo de suelo seco mediante la técnica de tamizado húmedo y decantación, propuestas por Gendermann & Nicholson (1963), con modificaciones, obteniéndose una concentración de 300 esporas/g de suelo seco (Figura 15). Las esporas se recogieron con ayuda de una micropipeta y se depositaron en tubos eppendorf con agua destilada estéril a 4°C hasta su posterior desinfección.



Figura 15. Esporas de *Glomus* sp. (GEV02) aisladas de plantas de cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.).

Se siguió la clave taxonómica de Schenk y Pérez (1990), para la identificación morfológica de la espora, que permite determinar el número de capas que presentan las paredes de la espora, morfología de la hifa de sustentación, cicatrices y otras características determinantes en la caracterización de los HFMA, tal y como lo muestra la tabla 4, para el género de *Glomus* sp (GEV02). Para su observación al microscopio óptico (de 10x a 100x) las esporas se dispusieron en un portaobjetos inmersas en polivinil-ácido láctico-glicerol (PVLG) (Anexo 7) usado como medio de conservación (Figura 16).

Tabla 4. Caracterización morfológica de las esporas de *Glomus* sp. (GEV02).

Género	Color	Tamaño	Descripción
<i>Glomus</i> sp.	0/10/100/0 0/10/80/0	75-92µm	Globosa, subglobosa, esporas terminales y en esporocarpos, 3 paredes, el tubo germinal se origina de la capa mas delgada de la hifa



Figura 16. Esporas de *Glomus* sp (GEV02) en PVLG al microscopio óptico (100x)

Adicionalmente se obtuvieron raíces de *Allium cepa* L. que contenían gran cantidad de vesículas, estas fueron cortadas en fragmentos, de un cm de longitud, almacenándose en tubos eppendorf con agua destilada estéril a 4°C hasta su posterior desinfección (Figura 17).

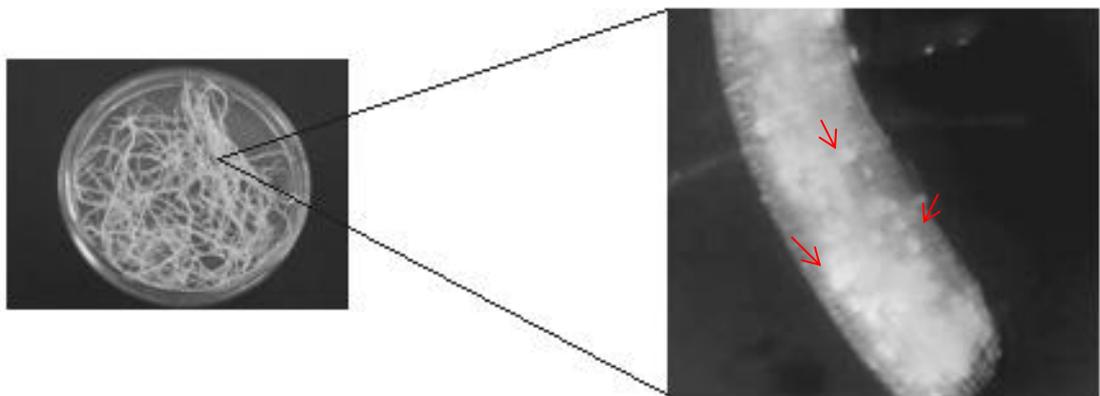


Figura 17. Selección de raíces con vesículas

Estos dos tipos de inóculos (esporas y fragmentos de raíces con vesículas) son los que se utilizan en la mayoría de los casos para iniciar un cultivo monoxénico (Fortin *et al.*, 2002); sin embargo, también se han utilizado esporocarpos de *Glomus mosseae* para iniciar cultivos *in vitro* (Budi *et al.*, 1999). El uso de formas intraradicales como las vesículas de HFMA parece ser una buena oportunidad para establecer cultivos *in vitro*, ya que éstas actúan como órganos de reserva y tienen un potencial de inóculo más alto que otros propágulos de HFMA, tales como las esporas e hifas (Strullu y Romand, 1986; Mosse, 1988; Declerck *et al.*, 1998; Diop, 2003). Varios autores han explotado la forma intraradical de HFMA para lograr la producción en masa de *Glomus* sp. (Diop, 1995; Diop *et al.*, 1994a; Declerck *et al.*, 1996a; 1998). En general, las raíces micorrizadas utilizadas para iniciar un cultivo monoxénico provienen de plantas de cebolla (*Allium porrum* L.), estas son ampliamente utilizadas debido a su carácter micotrófico, sus raíces son transparentes y las vesículas pueden ser más fácilmente observadas (Fortin *et al.*, 2002).

4.2 DESINFECCIÓN Y GERMINACIÓN DE PROPÁGULOS INFECTIVOS DE HFMA BAJO CONDICIONES *in vitro*.

4.2.1 Desinfección de esporas de *Glomus* sp. (GEV02)

La desinfección superficial de los propágulos, en general usados como inoculantes, es un requisito de suma importancia para la exitosa formación de la micorriza bajo condiciones *in vitro* (Breuninger y Requena, 2004). La descontaminación se requiere tanto para evitar la proliferación de contaminantes, como para asegurar que los microorganismos asociados con las esporas de estos hongos no influyan en los resultados experimentales (Fernández *et al.*, 2005). De acuerdo con lo anterior se evaluó un protocolo para establecer un método de desinfección de esporas de *Glomus* sp. (GEV02).

Las esporas se desinfectaron tal y como se describe en el apartado 3.2.2 de acuerdo con lo reportado por Cranenbrouck *et al.* (2005), con modificaciones. Los resultados obtenidos con cada combinación ensayada se detallan a continuación.

- Evaluación I: Desinfección durante 1min en etanol al 96%, 3 min en hipoclorito de sodio al 3%, 10 min en cloramina T más tween 20 al 2%, seguido de una solución antibiótica que contenía 200 mg de estreptomina sulfatada y 100 mg de gentamicina sulfatada durante 10 min. El porcentaje de contaminación de las esporas fue del 80%, observándose daño en las esporas; por lo que en la siguiente evaluación se decidió disminuir el tiempo de desinfección, así como la concentración del etanol y del hipoclorito de sodio.

- Evaluación II: Desinfección durante 2 min en etanol al 70%, 2 min en hipoclorito de sodio al 2%, 10 min en cloramina T más tween 20 al 2%, seguido de una solución antibiótica que contenía 200 mg de estreptomina sulfatada y 100 mg de gentamicina sulfatada durante 10 min. El porcentaje de contaminación de las esporas fue del 50%, y aunque disminuyó con respecto a la primera evaluación, se observaron daños a las esporas por el hipoclorito de sodio debido a que este es un producto inestable que se degrada cuando se mantiene unido a los propágulos del hongo. Además la solución de hipoclorito de sodio cuando no se lava bien, se concentra alrededor de las esporas desinfectadas, y esto puede tener un efecto tóxico (Cranenbrouck *et al.*, 2005). Por tal motivo se decidió en la siguiente evaluación reemplazar el hipoclorito de sodio por el de calcio y eliminar del proceso de desinfección al etanol.
- Evaluación III: Desinfección durante 2min en hipoclorito de calcio al 1%, 10min en cloramina T más tween 20 al 2%, seguido de una solución antibiótica que contenía 200 mg de estreptomina sulfatada y 100 mg de gentamicina sulfatada durante 10 min. Con ésta evaluación se consiguió reducir la contaminación al 1%, sin observar daño a las esporas (Figura 18).

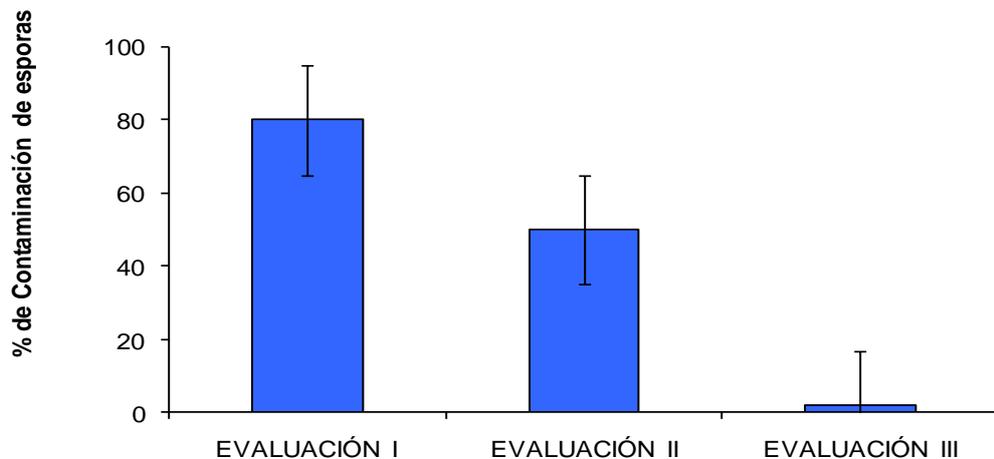


Figura 18. Porcentajes de esporas con contaminaciones en diferentes evaluaciones (N=10) al cabo de dos semanas

Se inocularon 10 cajas de Petri por cada evaluación a razón de 5 esporas por caja.

Se estableció como método de desinfección el propuesto en la evaluación III. Este nuevo procedimiento garantizó la ausencia de contaminación en las esporas, lo cual pudo ser comprobado al inocularlas sobre medio MSR y no presentar crecimiento microbiano después de una semana en incubación.

Estos resultados fueron similares a los descritos por Budi *et al.* (1999), en esporocarpos de *Glomus moseae* donde utilizaron agentes desinfectantes como cloramina T y Tween 20, hipoclorito de calcio, solución de estreptomina, gentamicina, observándose una reducción de la contaminación del 90%, con un alto nivel de germinación después de tres semanas de incubación.

En otro estudio de desinfección realizado (Fernández *et al.*, 2005) a esporas de *Glomus mosseae* utilizando cloramina T 2% y solución de Kanamicina, estreptomina sulfatada, estos autores obtuvieron un buen control de la contaminación en las esporas, aún a los 25 días de incubación. Eskandari y Danesh (2010), utilizaron cloramina T 2% y 2-3 ml de tween20 durante 10 min, seguido de una solución de estreptomina (0.02%) y gentamicina sulfatada (0.01%) durante 10 min, para la desinfección superficial de *Glomus intraradices* proveniente de un cultivo de trigo, observando unos porcentajes de contaminación menores al 5% en las esporas tratadas.

La exitosa combinación de cloramina T y estreptomina fue desarrollada para las especies de *Glomus* por Mosse (1962), y más tarde una combinación de cloramina T, estreptomina y gentamicina con la inclusión de un tensoactivo Tween 20 fue reportado por Mertz *et al.* (1979), para especies de *Gigaspora*. La desinfección de esporas de hongos micorrízicos empleadas como inóculo es crucial para la formación y el desarrollo exitoso de la micorrización en condiciones *in vitro*, por ser la presencia de contaminantes uno de los mayores problemas que atentan contra el estudio de estos microorganismos en condiciones controladas (Fernández *et al.*, 2005); además las metodologías de desinfección deben ser establecidas para cada especie de hongo en particular, pues el efecto de los desinfectantes o las combinaciones de estos varían en función de la especie utilizada (Walley y Germida, 1996).

4.2.2 Desinfección de fragmentos de raíces con vesículas

Con la metodología empleada para la desinfección de fragmentos de raíces micorrizados propuesta por Declerck *et al.* (1998), no se encontró ningún tipo de contaminación al cabo de 3 semanas de incubación, lo cual pudo ser comprobado al inocular los fragmentos sobre un medio rico (MSR) desde el punto de vista nutricional lo cual origina que se presenten contaminantes indeseables que no se expresan en un medio tan pobre como el Agar Agua (Fernández *et al.*, 2005). Estos resultados son similares a otros estudios realizados en la desinfección de fragmentos de raíces con vesículas (Cranenbrouck *et al.*, 2005; Eskandari y Danesh, 2010)

Strullu y Romand (1986, 1987) demostraron que las raíces con vesículas aisladas individualmente, eran capaces de germinar y formar nuevas esporas en condiciones *in vitro* cuando se asociaban a una raíz susceptible a ser

micorrizada. Esta técnica ha permitido desarrollar los cultivos monoxénicos de *Glomus intrarradices*, Schenck & Smith y *Glomus vermiforme* Karsten & Berch (Strullu *et al.*, 1997) y dio lugar al estudio del ciclo de vida en *Glomus* spp. (Diop *et al.*, 1994a, b); la producción en masa de miles de propágulos viables (Declerck *et al.*, 1996a) y su atrapamiento en perlas de alginato, que ofrece un nuevo tipo de inóculo de alta calidad, libre de patógenos (Declerck *et al.*, 1996b).

4.2.3 Germinación de esporas y crecimiento del tubo germinativo en fragmentos de raíces con vesículas del HFMA *Glomus* sp. (GEV02)

La colonización de las raíces de las plantas por Hongos Formadores de Micorriza Arbuscular (HFMA), supone un diálogo molecular entre la planta y los hongos (Harrison, 1998). Este diálogo se inicia en la etapa pre-simbiótica de los hongos y podría ser regulado por metabolitos secundarios de la planta antes de que el hongo penetre en la raíz (Scervino *et al.*, 2009). Los flavonoides son Metabolitos secundarios presentes en la mayoría de las plantas y desempeñan un papel importante en muchas interacciones planta – microorganismo (Phillips y Tsai, 1992; Akiyama *et al.*, 2002; Larose *et al.*, 2002; Vierheilig *et al.*, 2002; Scervino *et al.*, 2009). De acuerdo con lo anterior se evaluó un protocolo para establecer un método de germinación de esporas y fragmentos de raíces micorrizadas de *Glomus* sp. (GEV02), utilizando diferentes concentraciones del flavonoide quercetina, según Scervino *et al.* (2005), con modificaciones.

En la tabla 5 y 6 se muestra el efecto de las diferentes concentraciones del flavonoide quercetina, sobre la germinación (%) de las esporas y el crecimiento del tubo germinativo en los fragmentos de raíces con vesículas.

Según el análisis de varianza (GLM) se observan diferencias estadísticas altamente significativas ($P \leq 0.01$) en el efecto que tiene la quercetina en la germinación de propágulos infectivos (esporas y fragmentos de raíces con vesículas). Según los resultados de la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey se observa que el tratamiento inoculado con una concentración de $5 \mu\text{M}$, mostró la mayor germinación de esporas (80%) (Tabla 5) (Figura 19) y el crecimiento del tubo germinativo en los fragmentos de raíces (33.3%) (Tabla 6) (Figura 20) a los cuatro días y dos días respectivamente, después de la incubación. Sin embargo, para todas las concentraciones de quercetina evaluada (2, 5 y $8 \mu\text{M}$) se presentó germinación de esporas y fragmentos de raíces. La germinación en el control fue más tardía con respecto a los demás tratamientos, observándose germinación de esporas y fragmentos de raíces con vesículas a los 12 días. Estos resultados demuestran el efecto estimulador de la quercetina en la germinación de las esporas y crecimiento del tubo germinativo en las vesículas de *Glomus* sp (GEV02).

Tabla 5. Efecto de las diferentes concentraciones de quercetina en la germinación de esporas de *Glomus* sp (GEV02).

Fuente de variación	% Germinación			
	2 días	4 días	8 días	12 días
Esporas				
Tratamientos				
Control	0.0a	0.0b	0.0c	33.3c
Q2µM	0.0a	13.3b	46.6b	73.3b
Q5µM	0.0a	80.0a	100a	100a
Q8µM	0.0a	0.0b	40.0b	93.3b
Coefficiente de variación	-	49.49	24.74	13.33
GLM	ns	**	**	**

** : Diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$), ns: Diferencias no significativas; de acuerdo con el ANAVA. Letras diferentes indican: Diferencias significativas ($P \leq 0.05$), de acuerdo con la prueba de Tukey

Tabla 6. Efecto de las diferentes concentraciones de quercetina en el crecimiento del tubo germinativo en los fragmentos de raíces con vesículas de *Glomus* sp (GEV02).

Fuente de variación	% de germinación de hifas			
	2 días	4 días	8 días	12 días
Fragmentos de raíces con vesículas				
Tratamientos				
Control	0.0b	0.0b	0.0b	20.0b
Q2µM	0.0b	13.3b	13.3b	33.3b
Q5µM	33.3a	46.6a	73.3a	80.0a
Q8µM	6.6b	13.3b	20.0b	46.6ab
Coefficiente de variación	81.6	54.5	48.4	28.69
GLM	**	**	**	**

** : Diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$), ns: Diferencias no significativas; de acuerdo con el ANAVA. Letras diferentes indican: Diferencias significativas ($P \leq 0.05$), de acuerdo con la prueba de Tukey

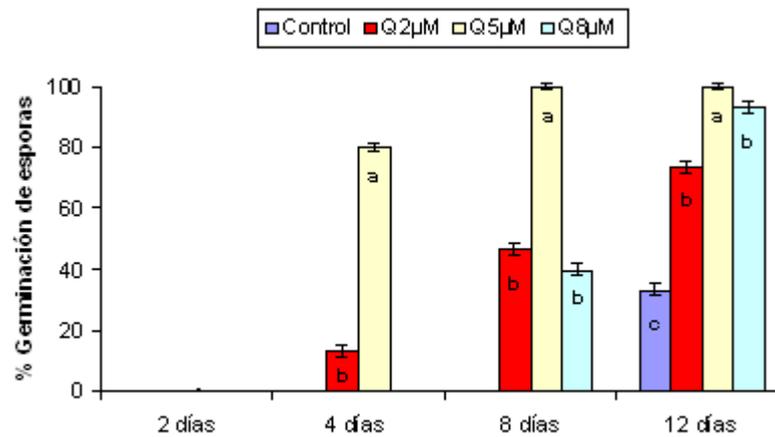


Figura 19. Efecto de las diferentes concentraciones de quercetina comparadas con el control en la germinación de esporas de *Glomus* sp (GEV02).

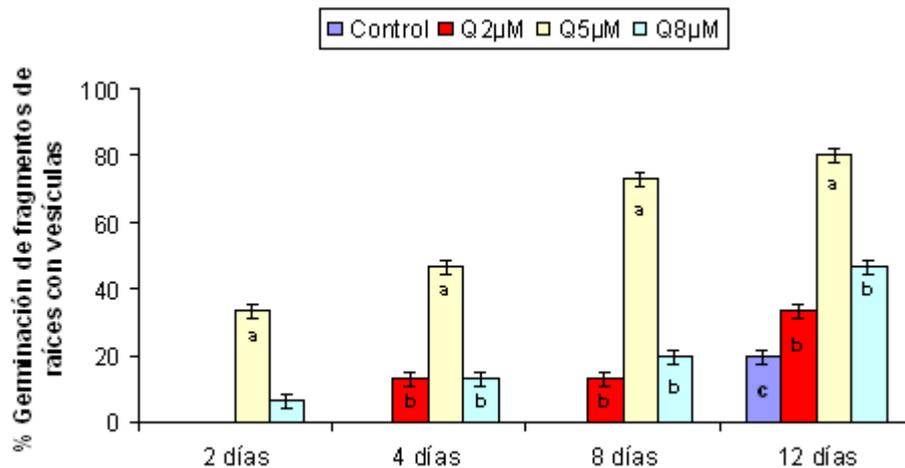


Figura 20. Efecto de las diferentes concentraciones de quercetina comparadas con el control en el crecimiento del tubo germinativo en los fragmentos de raíces con vesículas de *Glomus* sp (GEV02).

Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Tsai y Phillips (1991), en donde obtuvieron las máximas germinaciones en esporas de *G. etunicatum* y *G. macrocarpum* con concentraciones de quercetina de 1 a 2.5µM a partir del tercer día de inoculadas, con una longitud de hifas mayor con respecto al tratamiento control, estos autores observaron que la longitud de la hifa aumentaba su crecimiento en los tratamientos con quercetina bajo condiciones *in vitro*. De este mismo modo Bécard *et al.* (1992) demostraron el efecto estimulante que tiene la quercetina hasta concentraciones de 10µM en combinación con CO₂, en la germinación de esporas de *Glomus* sp y *Gigaspora margarita*; observando que todas las esporas germinadas en

presencia de quercetina continuaban su crecimiento hasta 42 días; como se pudo observar en el presente trabajo.

Muchos estudios se han realizado sobre el efecto de los flavonoides en la etapa pre-simbiótica de los HFMA; la mayoría se han realizado con hongos del género *Gigaspora*, en menor grado con especies de *Glomus* y prácticamente nada con otros géneros (Morandi, 1996, Vierheilig *et al.*, 1998; Scervino *et al.*, 2005a; 2005b; 2006; 2007; 2009). Los datos de los estudios realizados *in vitro* han demostrado que muchos de los flavonoides como la quercetina afectan el crecimiento de los HFMA en todas las etapas pre-simbiótica (Morandi, 1996; Vierheilig *et al.*, 1998). Vierheilig *et al.* (1998) sugieren que los flavonoides presentan especificidad por géneros e incluso tiene un efecto entre especies de HFMA. La mayoría de los estudios sobre el efecto de los flavonoides se ha centrado en las etapas pre-simbiótica de HFMA como la germinación de esporas y el crecimiento de hifas, pero muy pocos en el formación de las células auxiliares y la diferenciación de las hifas (Morandi, 1996, Vierheilig *et al.*, 1998). Sin embargo, algunos flavonoides pueden estar involucrados en un solo paso del desarrollo de los HFMA, pero no en el otro, por ejemplo la luteolina en *Gigaspora margarita* no parece estimular el crecimiento de las hifas, pero sí la formación de las células auxiliares (Bécard *et al.*, 1992).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, no solo garantizaron la ausencia de contaminación y la homogeneidad del proceso germinativo, sino que también posibilitaron la obtención de esporas y fragmentos de raíces con vesículas, viables para iniciar la colonización en el hospedero (germinadas) a solo cuatro días de su incubación; permitiendo disponer del 100% de los propágulos del HFMA *Glomus* sp. (GEV02) para ser empleados en estudios posteriores de inoculación de plántulas de Mora de Castilla (*Rubus glaucus*) en condiciones *in vitro*.

4.3 OBTENCIÓN DE UN SISTEMA PARA LA MICORRIZACIÓN *in vitro* EN PLANTAS DE MORA DE CASTILLA (*Rubus glaucus*) VARIEDAD SIN ESPINAS INOCULADAS CON *Glomus* sp. (GEV02).

En este estudio se pudo obtener un sistema que permitió el desarrollo del HFMA *Glomus* sp. (GEV02) bajo condiciones *in vitro*, con formación de estructuras típicas de la simbiosis como una buena colonización intraradical, observándose los primeros puntos de contacto entre las hifas del hongo y las raíces de las plantas a la 3 semana de haber sido inoculados, con producción de arbuscúlos y vesículas, así como el desarrollo de micelio extraradical con hifas ramificadas, BAS (del inglés *Branched Absorbing Structures*, Estructuras Ramificadas de Absorción), cuya hipotética función sería la absorción de nutrientes del suelo (Bago, 2000). Esta hipótesis está respaldada por las modificaciones estructurales que ocurren a nivel del BAS; una disminución progresiva de la pared hacia el ápice de las hifas, lo que facilitaría la absorción

de nutrientes, y un aumento en el número de mitocondrias en la base del mismo, aumenta la disponibilidad de energía para el transporte (Bago *et al.*, 1998); y finalmente la formación de nuevas esporas (Figura 21); tal y como se describen en el desarrollo de cultivos monoxénicos de HFMA utilizando fragmentos de raíces de zanahorias transformadas empleando *Agrobacterium rhizogenes* (Bécard y Fortin, 1988; Déclerck *et al.*, 1998); sin la necesidad de realizar muestreos destructivos.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por varios autores (Voets *et al.*, 2005, 2009; Dupré de Boulois *et al.*, 2006; Nogales, 2006; Koffi *et al.*, 2009) en plantas autótrofas bajo condiciones de cultivo *in vitro*, donde permitió la asociación exitosa de *Glomus intraradices* (MUCL 41833, 43194) y *Glomus sp.* (MUCL 43195) con las plantas micropropagadas.

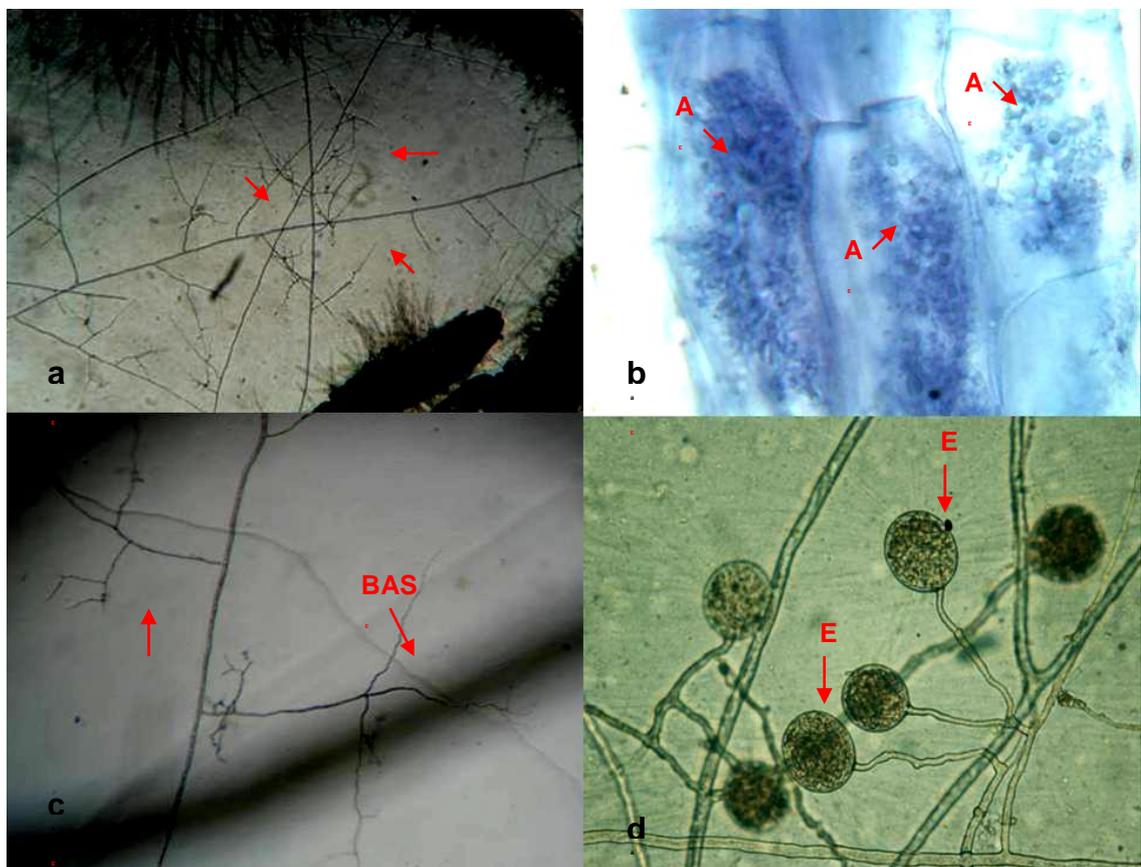


Figura 21. Desarrollo de estructuras típicas de la simbiosis entre *Glomus sp* (GEV02) y plantas de mora bajo un sistema de cultivo autotrófico. a. Micelio extraradical b. formación de arbusculos; c. Formación de BAS; d. formación de nuevas esporas. A: Arbúsculo, E: Espora.

Adicionalmente el sistema autotrófico descrito por Voets *et al.*, 2005 fue exitoso para plantas de mora de castilla (*Rubus glaucus*) variedad sin espinas;

observándose un óptimo crecimiento de la parte aérea y radical de la planta (Figura 22).

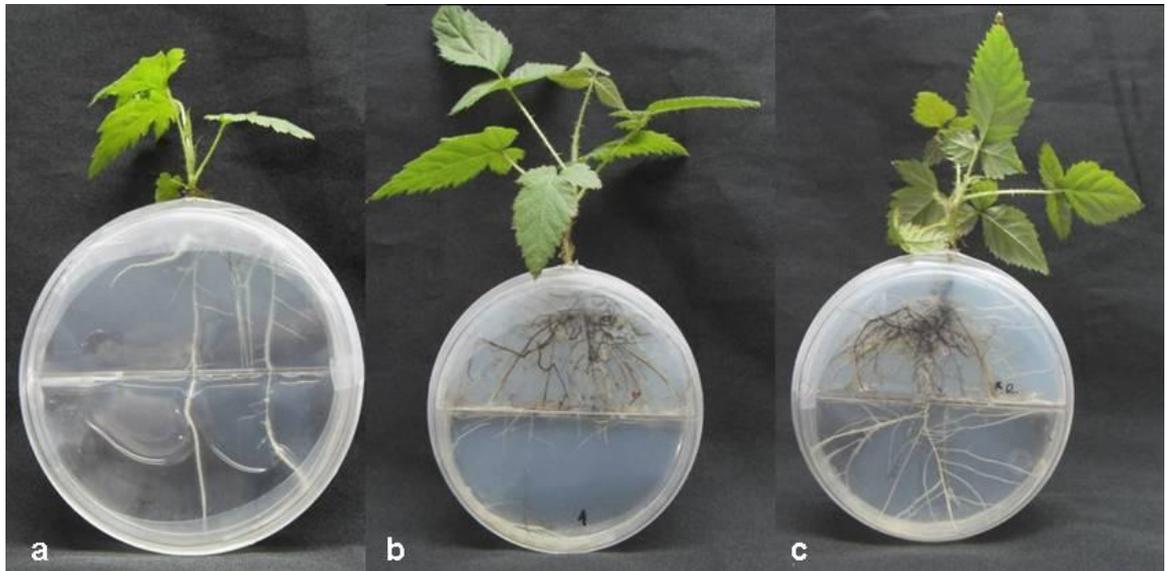


Figura 22. Imagen de plantas de Mora de Castilla (*Rubus glaucus*) creciendo en un sistema de cultivo autotrófico con diferentes tratamientos durante nueve semanas. a. Control; b. Inoculado con esporas libres; c. Inoculado con fragmentos de raíces con vesículas. La imagen fue tomada al momento de la cosecha.

Las plantas se asociaron con *Glomus* sp (GEV02) en medio MSR, utilizado para el cultivo de órganos de raíces de zanahoria transformadas (Cranenbrouck *et al.*, 2005). El medio carecía de sacarosa y vitaminas, y fue utilizado en trabajos realizados para la micorrización *in vitro* de papa (Voets *et al.*, 2005), vid (Nogales, 2006), *Medicago truncatula* (Dupré de Boulois *et al.*, 2006; Voets *et al.*, 2009) y banano (Koffi *et al.*, 2009).

4.4 COMPARACIÓN ENTRE MÉTODOS DE INOCULACIÓN DIRECTOS CON *Glomus* sp. (GEV02) EN PLÁNTULAS DE MORA.

Para las variables longitud aérea y radical, no se observaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos inoculados con respecto al control, de acuerdo con el análisis de varianza (GLM) (Tabla 7). Sin embargo, los valores obtenidos en promedio de la longitud aérea y radical en los tratamientos inoculados con esporas (6.7 y 171.5 cm) y fragmentos de raíces con vesículas (6.5 y 204.5 cm) del HFMA *Glomus* sp. (GEV02) fueron más altos que el control (5.7 y 149.8 cm) a la novena semana de ser evaluados, y estos tratamientos inoculados se pudieron cosechar una semana antes que el control (Figura 23).

Tabla 7. Crecimiento de la parte aérea y radical de las plantas de mora de castilla (*Rubus glaucus*) en sistemas autotróficos en diferentes semanas de evaluación.

		Longitud (cm)									
		5 semana		6 semana		7 semana		8 semana		9 semana	
Fuente de variación		área	radical	área	radical	área	radical	área	radical	área	radical
Tratamientos											
Control		3.0a	53.4a	3.2a	71.3a	3.6a	96.6a	5.1a	133.9a	5.7a	149.8a
Esporas		3.5a	61.0a	3.6a	85.8a	4.1a	122.9a	5.8a	160.1a	6.7a	171.5a
Raíces		3.6a	69.7a	3.9a	90.3a	4.2a	96.5a	6.1a	182.3a	6.5a	204.5a
Coefficiente de variación		23.54	46.35	17.26	43.24	15.49	38.1	18.24	31.42	16.40	32.62
GLM		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

ns: Diferencias no significativas de acuerdo con el ANAVA ($P \leq 0.05$)

Estos resultados demuestran el efecto positivo que puede tener el sistema de micropropagación autotrófica con respecto al sistema de micropropagación convencional independiente del tratamiento evaluado. Kozai y Kubota (2005), describen que la micropropagación con plantas autótrofas tiene muchas ventajas sobre la micropropagación convencional con respecto en la mejora de la fisiología de la planta en los cuales incluyen: aumento en el crecimiento y la tasa fotosintética; altos porcentajes de supervivencia a condiciones *ex vitro*; eliminación de trastornos morfológicos y fisiológicos, sin la formación de callos en la base de los explantes. La micropropagación autótrofa se define estrictamente como la micropropagación sin sacarosa en el medio de cultivo, en los que el crecimiento o la acumulación de carbohidratos de los cultivos dependen por completo de la fotosíntesis y de la absorción de nutrientes inorgánicos (Kozai 1991; Zobayed *et al.*, 2004, citado por Xiao *et al.*, 2010).

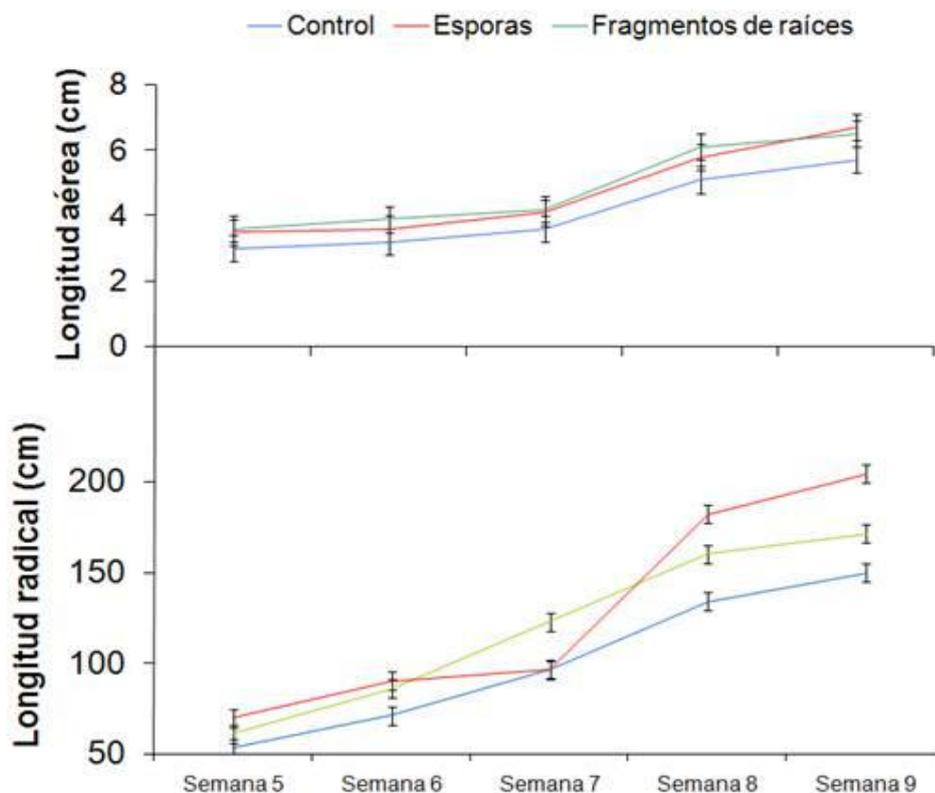


Figura 23. Crecimiento de la parte aérea y radical de las plantas de mora de castilla (*Rubus glaucus*) en sistemas autotróficos (N=4).

Las plantas inoculadas con fragmentos de raíces con vesículas o con esporas individuales de *Glomus* sp. (EV02) tuvieron una mayor producción de biomasa aérea y radical, observándose diferencias significativas en estos tratamientos con respecto al control (Tabla 8), y en el momento de la cosecha las raíces ocupaban casi todo el volumen de la caja de Petri. Estos incrementos en biomasa bajo el sistema autotrófico puede asociarse a efectos nutricionales favorables vinculados con la asociación simbiótica *in vivo*, aunque también puede verse reflejado un efecto hormonal y/o fisiológicos de las especies de HFMA sobre las plantas que colonizan (Ludwig, 2000).

Resultados similares obtuvo Nogales (2006), en sistemas de cultivo autotrófico en plantas de vid inoculados con *Glomus intraradices*, en donde al cabo de la 6 - 7 semana las plantas produjeron una gran biomasa aérea y radical, y las raíces ocuparon casi la totalidad de la caja de Petri no dejando casi espacio para seguir creciendo. Así mismo, en los sistemas descritos por Voets *et al.* (2005), Dupré de Boulois *et al.* (2006) y Koffi *et al.* (2009), para cuando las plantas alcanzaron un nivel alto de colonización micorrícica, estaban prácticamente desarrolladas.

Tabla 8. Biomasa en plantas de mora de castilla (*Rubus glaucus*) inoculadas con el HFMA *Glomus* sp. (GEV02) al momento de la cosecha 9 semanas.

Fuente de variación	Novena semana	
	Peso seco aéreo (g)	Peso seco radical (g)
Tratamientos		
Control	0.16b	0.05b
Esporas	0.27a	0.12a
Raíces	0.31a	0.11a
Coefficiente de variación	12.8	21.55
GLM	*	*

* Diferencias significativas ($P \leq 0.05$) de acuerdo con el ANAVA. Letras diferentes indican: Diferencias significativas ($P \leq 0.05$), de acuerdo con la prueba de Tukey.

El sistema de micorrización *in vitro* con plantas autótrofas pueden mejorar la condición física de las plantas *in vitro* y *ex vitro*, reflejado en un mayor crecimiento y desarrollo de las plantas, aumentando la capacidad fotosintética al expandir sus hojas, mientras que los HFMA mejoran el crecimiento y desarrollo de la planta al modificar la morfología de la raíz y el fortalecimiento en su función de absorción (Liu y Yang, 2008). En estudios realizados *in vivo* con mora de castilla (*Rubus glaucus*) y *Glomus* sp (MA4) en la etapa de endurecimiento, se obtuvo una mayor acumulación de biomasa foliar y radical, área foliar y mejor estado nutricional (P, N, Ca y Mg) de las plantas micropropagadas (Roveda *et al.*, 2007).

En los indicadores de asociación simbiótica como la frecuencia de micorrización (%F), intensidad de la micorrización (%M), intensidad de arbusculos, micelio extraradical y formación de nuevas esporas no se observaron diferencias estadísticas significativas en los dos tratamientos inoculados con el HFMA *Glomus* sp. (GEV02) (Tabla 9).

Tabla 9. Indicadores de asociación simbiótica entre el HFMA *Glomus* sp. – mora de castilla (*Rubís glaucus*) al momento de la cosecha 9 semanas después de la inoculación (%F: Frecuencia de micorrización; %M: Intensidad de micorrización; %a: Intensidad de arbusculos).

Fuente de variación	%F	%M	%a	Longitud del micelio extraradical (cm)	No esporas formadas
Tratamientos					
Control	–	–	–	–	–
Esporas	100a	7.8a	0.93b	471.56a	1078.0a
Raíces	100a	7.4a	2.2a	538.33a	1351.5a
Coefficiente de variación	0.0	21.32	121.0	15.36	13.30
GLM	ns	ns	*	ns	ns

ns: Diferencias no significativas; * Diferencias significativas ($P \leq 0.05$) de acuerdo con el ANAVA.

Letras diferentes indican: Diferencias significativas ($P \leq 0.05$), de acuerdo con la prueba de Tukey

Las raíces de las plantas de mora fueron colonizadas por *Glomus* sp. observándose un 100% en la frecuencia de micorrización (%F). Las micorrizas arbusculares observadas fueron de tipo de *Arum*, en que las hifas crecen en los espacios intercelulares del córtex de la raíz, y los arbusculos se desarrollan como ramificaciones terminales intracelulares (Gallaud 1904) (Figura 24). La colonización fue observada principalmente en las raíces primarias y secundarias.

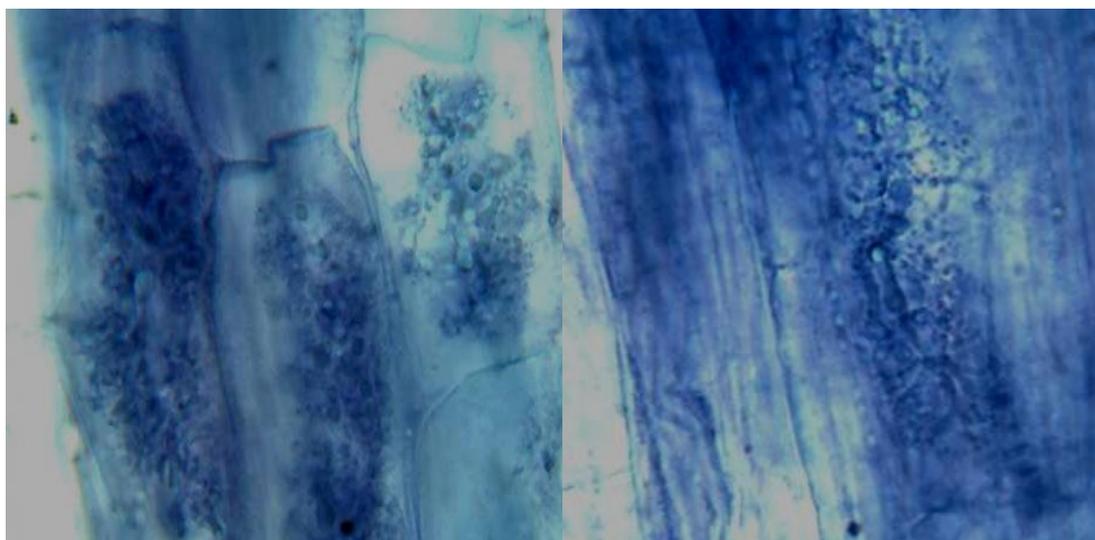


Figura 24. Formación de arbusculos de *Glomus* sp (GEV02) en raíces de mora bajo condiciones *in vitro*.

En presencia de las raíces de mora *Glomus* sp. (GEV02) desarrolló un abundante micelio extraradical con valores promedio de 471.56 cm para el tratamiento inoculado con esporas libres y 538.33 cm para el tratamiento inoculado con fragmentos de raíces con vesículas (Tabla 9). En el sistema de cultivo con plantas autótrofas se pudo detallar la arquitectura del micelio extraradical, donde se observaron las hifas principales y secundarias con una gran ramificación, así como la formación de BAS (del inglés *Branched Absorbing Structures*, Estructuras Ramificadas de Absorción); estas últimas estructuras se han propuesto como sitios preferentes para la producción de esporas (Bago *et al.*, 1998). Los resultados observados en la arquitectura del micelio fueron similares a los observados en los primeros estudios que se realizaron bajo condiciones *in vitro* en cultivo monoxénico con raíces de zanahoria transformadas (Bago *et al.*, 1998; 2004).

Según el análisis de varianza (GLM) no se observaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) en el número de esporas entre los dos métodos de inoculación (esporas libres y fragmentos de raíces micorrizados) (Tabla 9), sin embargo, el tratamiento inoculado con fragmentos de raíces obtuvo un mayor número de esporas formadas (1351, 5), en comparación con el tratamiento inoculado con esporas libres (1078,0) durante las semanas evaluadas hasta la cosecha (Figura 25). Las esporas se formaron en hifas terminales en forma individual o en agrupaciones, fueron de un color blanco-amarillo y contenían numerosas gotas de lípidos (Figura 27), su tamaño promedio varió de 60 a 90 μ m

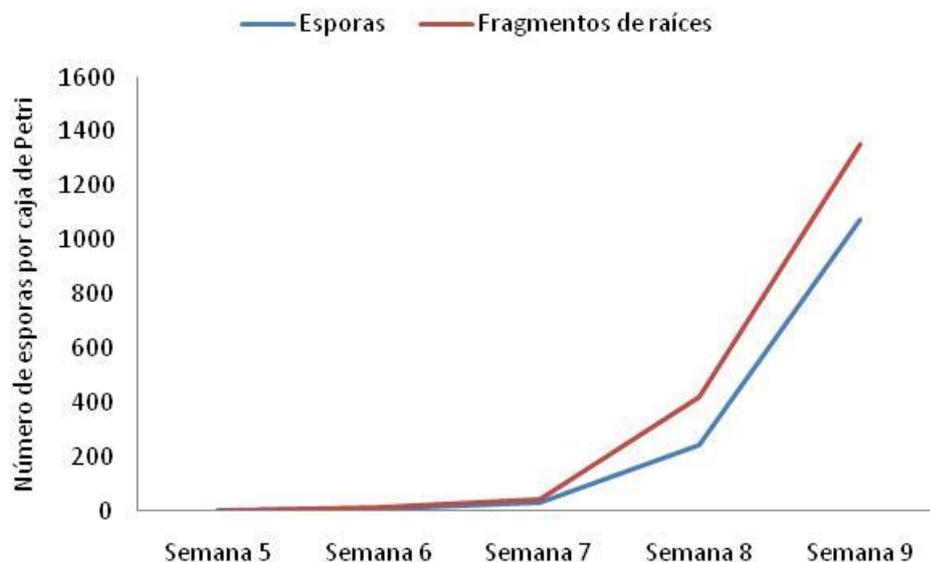


Figura 25. Dinámica de la producción de esporas de *Glomus* sp. (GEV02) asociadas a plantas autótrofas de mora de castilla (*Rubus glaucus*) en medio MSR libre de azúcar y vitaminas.

Estos estudios concuerdan con realizados en cultivos monoxénicos donde utilizaron fragmentos de raíces de *Allium porrum* con vesículas o vesículas aisladas como inóculo (Declerck *et al.*, 1996a, 1998, 2000; Diop *et al.*, 1994a). Declerck *et al.* (1996a) demostraron que los fragmentos de raíces micorrizadas presentaban un mayor potencial de inóculo que las esporas. Los fragmentos de raíz que contienen vesículas, producen múltiples hifas germinadas aumentando el número de puntos de penetración en la raíz. La esporulación en subcultivos es mayor con fragmentos de raíces micorrizadas que con esporas (Declerck *et al.*, 1996a). Por el contrario, las esporas germinadas producen un número limitado de hifas infectivas y en consecuencia una tasa de colonización limitada (Voets *et al.*, 2009).

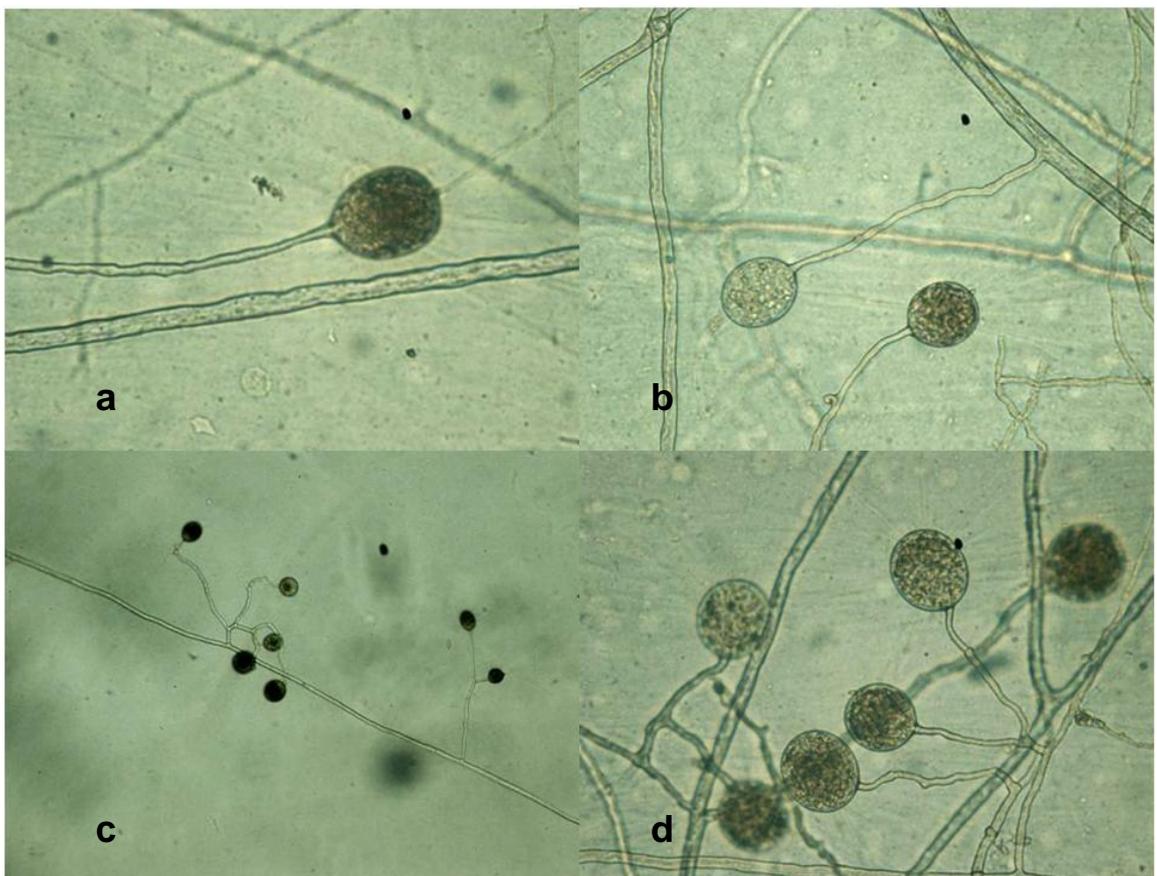


Figura 26. Formación de nuevas esporas de *Glomus* sp. (GEV02) individualmente o en agrupaciones bajo condiciones *in vitro*. Imagen tomada en microscopio óptico (40X). a y b. esporas formadas individualmente; c y d. esporas formadas en agrupaciones

Se demostró que el sistema de cultivo autotrófico era adecuado para la micorrización *in vitro* de plantas de mora. La longitud del micelio extraradical y la producción de esporas después de 6 semanas fueron similares a las obtenidas en plantas de papa (Voets *et al.*, 2005). Nueve semana después el

HFMA *Glomus* sp. (GEV02) había producido una gran cantidad de micelio extraradical y de esporas. A pesar de que no se detectaron diferencias significativas en los parámetros de crecimiento fúngico entre los dos métodos de inoculación (esporas y fragmentos de raíces con vesículas), el tratamiento inoculado con esporas libres necesitó de más tiempo para formar nuevas esporas. No obstante, a pesar de que los dos métodos de inoculación (esporas y fragmentos de raíces con vesículas) estudiados fueron eficaces para obtener plantas micorrizadas, dependiendo del tipo de estudio que se vaya a desarrollar, se deberá seleccionar el más adecuado.

CONCLUSIONES

- Se estableció un método de desinfección y germinación de propágulos infectivos (esporas y fragmentos de raíces con vesículas), para el Hongo Formador de Micorriza Arbuscular, *Glomus* sp. (GEV02), que permitió su uso bajo condiciones *in vitro*. Este procedimiento no solo garantizó la ausencia de contaminación y la homogeneidad del proceso germinativo, sino que también posibilitó la obtención de esporas y fragmentos de raíces con vesículas, viables para iniciar colonización de hospedero (germinadas) a solo cuatro días de su incubación; permitiendo disponer del 100% de los propágulos del HFMA *Glomus* sp. (GEV02) para ser empleados en estudios posteriores de inoculación de plántulas de mora de castilla (*Rubus glaucus*) en condiciones *in vitro*.
- Las plantas de mora micropropagadas se asociaron con éxito, por primera vez, con un Hongo Formador de Micorriza Arbuscular bajo condiciones *in vitro*. Las raíces de las plantas de mora fueron colonizadas por *Glomus* sp. observándose un 100% en la frecuencia de micorrización (%F). Las micorrizas arbusculares observadas fueron de tipo de *Arum*, en que las hifas crecen en los espacios intercelulares del córtex de la raíz, y los arbusculos se desarrollan como ramificaciones terminales intracelulares. La colonización fue observada principalmente en las raíces primarias y secundarias.
- El sistema de cultivo autotrófico permitió el desarrollo del sistema simbiótico HFMA *Glomus* sp. asociado a las raíces de plántulas de mora castilla micropropagadas en condiciones *in vitro*. Los resultados experimentales confirman la formación de estructuras típicas de la simbiosis, sin la necesidad de realizar muestreos destructivos. Además de la alta producción de propágulos, como esporas, donde a partir de 5 esporas inoculadas se obtuvieron más de 1000 esporas en la novena semana después del establecimiento en sistema de cultivo autotrófico con plantas de mora, lo que indica que esta técnica puede ser una herramienta útil para la multiplicación de HFMA bajo condiciones *in vitro*, con fines de investigación.
- Las plantas inoculadas con fragmentos de raíces con vesículas o con esporas individuales de *Glomus* sp. (EV02) tuvieron una mayor producción de biomasa aérea y radical, y en el momento de la cosecha las raíces ocupaban casi todo el volumen de la caja de Petri
- El sistema de cultivo autotrófico es una herramienta útil para la inoculación de mora de castilla (*Rubus glaucus*) micropropagadas con HFMA.

RECOMENDACIONES

- Las metodologías de desinfección y germinación deben ser establecidas para cada especie de HFMA en particular, pues el efecto de los desinfectantes y del flavonoide estudiado puede variar en función de la especie utilizada y las cantidades requeridas pueden variar.
- Utilizando la micorrización *in vitro* con plantas autótrofas se podrán realizar estudios genéticos de los HFMA
- Realizar nuevos estudios para evaluar el comportamiento de las plantas asociadas a *Glomus* sp en condiciones de campo, para observar el efecto que tiene la micorrización desde la etapa *in vitro*.
- Realizar nuevos estudios bajo condiciones *in vitro* sobre el transporte de nutrientes y metales pesados a través de los HFMA en la interacción hongo-planta.
- Evaluar el potencial uso de esta técnica como estudios para multiplicación de HFMA bajo condiciones *in vitro*, con fines de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

AGRONET. Estadísticas del sector agropecuario producto mora. [en línea]: <www.agronet.gov.co> [Consulta: 25 Noviembre 2010].

Akiyama, K., Matsuoka, H., Hayashi, H. 2002. Isolation and identification of a phosphate deficiency-induced C-glycosylflavonoid that stimulates arbuscular mycorrhiza formation in melon roots. *Molecular Plant Microbe Interaction*. Vol 15: 334-340.

Akiyama, K., Matsuzaki, K., Hayashi, H. 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*. Vol 435: 824-827.

Akiyama, K. 2007. Chemical identification and functional analysis of apocarotenoids involved in the development of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Biosci Biotechnol Biochem*. Vol 71: 1405–1414

Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R. 2000. Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular. IRENAT-Colegio de Postgraduados. Montecillo. Mundi Prensa, México. p. 141-148.

Alarcón A. 2007. Micorriza arbuscular. En: Ferrera-Cerrato Ronald, Alarcón Alejandro, Editores, *Microbiología Agrícola*. Editorial Trillas. p. 90-118.

Alexander, T., Meier, R., Toth, E., Weber, H. 1989. Dynamics of arbuscule development and degeneration in mycorrhizas of *Triticum aestivum* L. and *Avena sativa* L. with reference to *Zea mays* L. *New Phytol*. Vol 110:363-370.

Allaway, W., y Ashford, A. 1996. Structure of the hair roots in *Lysinema ciliatum* R. Br. And its implications for their water relations. *Ann. Bot*. Vol 77:383-388

Angulo, R. 2003. Frutales exóticos de clima frío moderado. Bayer Crop Science S.A. p. 99-118.

Anuario estadístico del sector agropecuario. 2009. Dirección de Política Sectorial. Grupo Sistemas de Información. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

Asohofrucol. 2004. Fondo Nacional de fomento Hortofrutícola, Departamento Administrativo Nacional de Estadística, SISAC, Ministerio de Agricultura y desarrollo Rural. I Censo Nacional de 10 frutas agroindustriales y promisorias. 63p.

Atkinson, D. 1992. Tree root development: the role of models in understanding the consequences of arbuscular endomycorrhizal infection. *Agronomie*. Vol 12:817–820.

Atkinson, D., Berta, G., Hooker, J. 1994. Impact of mycorrhizal colonization on root architecture, root longevity and formation of growth regulators. In: Gianinazzi, S., Schüepp, H. (Eds.), *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems*. Birkhauser-Verlag, Basel, Switzerland, p. 89–99.

Ávilan, L., Bautista, D., Leal, F., 1989. *Manual de fruticultura*. Maracay: América, p. 1111 - 1132.

Bago, B., Chamberland, H., Goulet, A., Vierheilig, H., Lafontaine, J., Piché, Y. 1996. Effect of nikkomycin z, a chitin-synthase inhibitor, on hyphal growth and cell wall structure of two arbuscular-mycorrhizal fungi. *Protoplasma*. Vol 149:80-92.

Bago, B. 2000. Putative sites for nutrient uptake in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plan and Soil*. Vol 226: 263-274.

Bago, B., Pfeffer, P., Shachar-Hill, Y. 2000. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiol*. Vol 124: 949-957.

Bago, B., Zipfel, W., Williams, R., Jun, J., Arreola, R., Lammers, P., Pfeffer, P., y Shachar-Hill, Y. 2002. Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol*. Vol 128:108-124.

Bago, B., Pfeffer, P., Douds, D., Brouillette, J., Bécard, G., y Shachar-Hill, Y. 1999. Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiol*. Vol 121:263-271.

Bago, B., Azcón-Aguilar, C., Piché, Y. 1998a. Architecture and development dynamics of the external mycelium at the arbuscular mycorrhizal *Glomus intraradices* grown under monoxenic conditions. *Mycologia*. Vol 90:52-62.

Bago, B., Azcón-Aguilar, C., Goulet, A., y Piché, Y. 1998b. Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol*. Vol 139: 375-388.

Bago, B., Pfeffer, P., Shachar-Hill, Y. 2001. Could the urea cycle be translocating nitrogen in the arbuscular mycorrhizal symbiosis?. *New Phytol*. Vol 149:4-8

Bago, B., Cano, C., Azcón-Aguilar, C., Samson, J., Coughlan, A.P., Piché, Y. 2004. Differential morphogenesis of the extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus grown monoxenically on spatially heterogeneous culture media. *Mycologia*. Vol 96: 452-462.

Barrero, M. 2009. Caracterización, evaluación y producción de material limpio de mora con alto valor agregado. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA. Compilación de artículos técnicos. 84p.

Barker, S., Tagu, D., Delp, G. 1998. Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbiosis. *Plant Physio*. Vol 116:1201-1207

Bécard, G., Fortin J. 1988. Early events of arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed root. *New Phytologist*. Vol 108:211-218

Bécard, G., Douds, D.D., y Pfeffer, P.E. 1992. Extensive In Vitro Hyphal Growth of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the Presence of CO₂ and Flavonols. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 58 (3):821-825.

Bécard, G., y Piché, Y. 1989. Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Appl Environ Microbiol*. Vol 55:2320–2325.

Bécard, G., Pfeffer, P.E. 1993. Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during in vitro development. *Protoplasma*. Vol 174:62-68.

Berreck, M., Haselwandter, K. 2001. Effect of the arbuscular mycorrhizal symbiosis upon uptake of caesium and other cations by plants. *Mycorrhiza*. Vol 10:275–280.

Berta, G., Fusconi, A., Trotta, A. 1993. VA mycorrhizal infection and the morphology and function of root systems. *Environ. Exp. Bot.* Vol 33:159–173.

Besserer, A., Puech-Pages, V., Kiefer, P. 2006 Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biology*. Vol 4, 1239–1247

Bianciotto, V., Bandi, C., Minerdi, D., Sironi, M., Tichy, H., Bonfante, P. 1996. An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol 62:3005-3010.

Bonfante, P., Bianciotto, V. 1995. Presymbiotic versus symbiotic phase in arbuscular endomycorrhizal fungi: morphology and cytology. In: Varma A, Hock B, eds. *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology*. Springer-Verlag. p 229–247.

Bonfante, F. P. 2001. At the interface between mycorrhizal fungi and plants: the structural organization of the cell wall, plasma membrane and cytoskeleton. *The Mycota IX, Fungal Associations* Hock (Eds) Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 45-61

Breuninger, M., Trujillo, C.G., Serrano, E., Fischer, R., Requena, N. 2004. Different nitrogen source modulate activity but not expression of glutamine synthetase in arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Genetics and Biology*. Vol 41:542-552.

Breuninger, M., Requena, N. 2004. Recognition events in AM symbiosis: analysis of fungal gene expression at the early appressorium stage. *Fungal Genetics and Biology*. Vol 41(8): 794-804

Budi, S.W., Blal, B., Gianinazzi, S. 1999. Surface-sterilization of *Glomus mosseae* sporocarps for studying endomycorrhization *in vitro*. *Mycorrhiza*. Vol 9: 65–68.

Bürkett, B., Robson, A. 1994. Zn uptake in subterranean clover (*Trifolium subterraneum*) by three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in a root-free sandy soil. *Soil Biol Biochem.* Vol 26:1117-1124.

Caldwell, M.M., Virginia, R.A. 1989. Root systems. In: Pearcy, R.W., Ehleringer, J.A., Mooney, H.A., Rundel, P.W. (Eds.), *Plant Physiological. Ecology-Field Methods and Instrumentation.* Chapman and Hall, London, pp. 367–398.

Carreón-Abud, Y., Soriano-Bello, E., Martínez-Trujillo M. 2003. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by micropropagated blackberry (*Rubus fruticosus* var. brazos) plants. *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*, 161–165.

Cassells, A.C., Mark, G.L., Periappuram, C. 1996. Establishment of arbuscular mycorrhizal fungi in autotrophic strawberry cultures *in vitro*. Comparison with inoculation of microplants *in vivo*. *Agronomie.* Vol 16: 625-632.

Castro, D., Díaz, J. 2001. Alternativas para el manejo integrado del cultivo de la Mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth.). *Centro de Publicaciones Universidad Católica de Oriente. Rionegro.* p 2-6.

Cetz, J. 2005. Micropropagación de chile dulce (*Capsicum annuum* L. var. Najera.) y chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) con miras al mejoramiento genético del cultivo. *Tesis de Maestría. CATIE, Costa Rica.* 86 p.

Clark, J., Stafne, E., Hall, H., Finn, C. 2007. Blackberry Breeding and Genetics. En: *Plant Breeding Reviews.* J. Janick (Ed.), John Wiley & Sons, Inc. Vol 29:19-144.

Cotes, A., Cristancho, E., García, M. 2006. ANTIOXIDANTES Oportunidades para la producción agropecuaria y agroindustrial. *Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, CORPOICA. Produmedios, Bogotá, Colombia.* 43p.

Cooke, J., Gemma, J., Koske, R. 1987. Observation of nuclei in vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia.* Vol 79: 331-333.

Cranenbrouck, S., Voets, L., Bivort, C., Renard, L., Strullu, D.G., Declerck, S. 2005. Methodologies for in vitro cultivation of arbuscular mycorrhizal fungi with root organs. In: *In vitro* culture of mycorrhizas. Declerck S., Strullu D.G., Fortin J.A. (Eds). Springer-Verlag, Heidelberg, 341–375p

Chang, Y., Reed, B.M. 1999. Extended cold acclimation and recovery medium alteration improve regrowth of *Rubus* shoot tips following cryopreservation. *Cryo-Letters*. Vol 20:371-376

De Ancos, B., Gonzales, E., Cano, M. 2000. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 51:502-509

De Souza, F., Declerck, S. 2003. Mycelium development and architecture, and spore production of *Scutellospora reticulata* in monoxenic culture with Ri T-DNA transformed carrot roots. *Mycologia*. Vol 95(6):1004–1012

Declerck, S., Strullu, D.G., Plenchette, C. 1996a. *In vitro* mass-production of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus versiforme*, associated with Ri T-DNA transformed carrot roots. *Mycol Res*. Vol 100:1237–1242.

Declerck, S., Strullu, D.G., Plenchette, C., Guillemette, T. 1996b. Entrapment of in vitro produced spores of *Glomus versiforme* in alginate beads: in vitro and in vivo inoculum potentials. *J. Biotechnol*. Vol 48: 51-57.

Declerck, S., Strullu, D., Plenchette, C. 1998. Monoxenic culture of the intraradical forms of *Glomus* sp. Isolated from a tropical ecosystem: a proposed methodology for germoplasm collection. *Mycologia*. Vol 90: 579-585.

Declerck, S., Cranenbrouck, S., Dalpé, Y., Séguin, S. 2000. *Glomus proliferum* sp. nov.: a description based on morphological, biochemical, molecular and monoxenic cultivation data. *Mycologia*. Vol 92(6): 1178-1187.

Diop, T.A. 2003. *In vitro* culture of arbuscular mycorrhizal fungi: advances and future prospects. *African Journal of Biotechnology* Vol. 2 (12): 692-697

Diop, T.A. 1995. Ecologie des champignons mycorhiziens à vésicules et à arbuscules associés à *Acacia albida* (del) dans les zones sahéliennes et soudano-guinéennes du Sénégal. Tesis de Doctorado en Biología y Fisiología Vegetal, Angers, France.

Diop, T.A., Plenchette, C., Strullu, D.G. 1994a. Dual axenic culture of sheared-root inocula of vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi associated with tomato roots. *Mycorrhiza*. Vol 5:17–22

Diop, T.A., Plenchette C, Strullu, D.G. 1994b. *In vitro* culture of sheared mycorrhizal roots. *Symbiosis*. Vol 17:217-227.

Dupré de Boulois, H., Voets, L., Delvaux, B., Jakobsen, I., Declerck, S. 2006. Transport of radiocaesium by arbuscular mycorrhizal fungi to *Medicago truncatula* under *in vitro* conditions. *Environ. Microbiol.* Vol 8: 1926-1934.

Duponnois, R., Plenchette, C. 2003. Helper bacterium enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of Australian *Acacia* species. *Mycorrhiza*. Vol 13: 85-91.

Echeverry L. 2003. Bioprospección en productos naturales. Instituto Alexander Von Humboldt y Programa de Política y legislación Proyecto de Accesos a Recursos Genéticos. Informe de Trabajo. Medellín Colombia. 44p.

Elmeskaoui, A., Damont, J., Poulin, M., Piché, Y., Desjardins, Y. 1995. A tripartite culture system for endomycorrhizal inoculation of micropropagated strawberry plantlets *in vitro*. *Mycorrhiza*. Vol 5:313-319.

Eskandari, A., Danesh, Y. R. (2010). Study on life cycle of arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* using *in vitro* culturing technique. *Journal of Phytology* 2010. Vol 2(6): 69–75.

Fernández, K., Fernández, F., Rivera, R., Olalde, V. 2005. Metodología para la germinación de esporas de *Glomus mosseae*. *Cultivos tropicales*. Vol 28(2): 11-16.

Ferrera–Cerrato, R., Alarcón, A. 2007. Micorriza arbuscular. En: *Microbiología Agrícola*. Editorial Trillas. p. 90-118

Forero Guerrero Eduardo., Azcón –Aguilar Concepción., Barea José Miguel., Moyersoen Bernard., Orozco Cielo. 1996. MICORRIZAS. RECURSO BIOLÓGICO DEL SUELO.

Fortin, J.A., Bécard, G., Declerck, S., Dalpé, Y., St-Arnaud, M., Andrew, P., Coughlan., Piché, Y. 2002. Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. Can. J. Bot. Vol 80: 1–20.

Franco, G., Gallego, J., Tamayo, A., Heredia, L., Medina, G. 2000. Fertilización de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth). En zonas frías del departamento de Caldas. En: Memorias del tercer seminario frutales de clima frío Moderado. Centro de Desarrollo Tecnológico de Frutales C.D.T.F. Manizales. p. 81-87

Franco, G., Giraldo, J. 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. P. 25-30.

Franco, G., Giraldo M. 2002. El Cultivo de la Mora. Quinta edición corregida. Manual de Asistencia Técnica. CORPOICA, Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, SENA, Comité Técnico Agropecuario del Risaralda, UMATA Risaralda. 81p

Gadkar, V., David-Schwartz, R., Kunik, T., Kapulnik, Y. 2001. Arbuscular Mycorrhizal Fungal Colonization. Factors Involved in Host Recognition. Plant Physiology. Vol. 127: 1493–1499.

Gallaud, I. 1904. Études sur les mycorrhizes endotrophes. Lille, France : Le Bigot Frères.

García Rodríguez, Sonia. 2005. Efecto de las micorrizas arbusculares sobre la regulación de genes implicados en el metabolismo carbonado en plantas de tomate (*Solanum esculentum*). Tesis Doctoral.

Gendermann, J.W., Nicholson, T.H. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. Trans. Br. Mycol. Soc. Vol 46: 235-244.

Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. 1987. Enzymatic studies on the metabolism of vesicular arbuscular mycorrhizal II. Soluble alkaline phosphatase specific to mycorrhizal infection in onion roots. *Physiol Plant Pathol*. Vol 12: 45-53.

Gianinazzi-Pearson, V., Morandi, D., Dexheimer, J., Gianinazzi, S. 1981. Ultrastructural and ultracytochemical features of *Glomus tenuis* mycorrhizal. *New Phytol*. Vol 88: 633-639.

Gianinazzi-Pearson, V., Branzanti, B., Gianinazzi, S. 1989. *In vitro* enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudate and plant flavonoids. *Symbiosis*. 7: pp 243-247.

Gianinazzi-Pearson, V., Azcón-Aguilar, C. 1991. Fisiología de las micorrizas vesículo-arbusculares. En Olivares J. y Barea J.M, *Fijación y movilización biológica de nutrientes, fijación de N y micorrizas*, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España. Vol 11:175-202.

Giri, B., Kapoor, R., Mukerji, K.G. 2003. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and salinity on growth, biomass and mineral nutrition of *Acacia auriculiformis*. *Biol. Fert. Soil*. Vol 38: 170–175.

Grattapaglia, D., Machado, M.A., 1990. Micropropagac, año. In: Torres, A.C., Caldas, L.S. (Eds.), *Técnicas e aplicac, ões da cultura de tecidos de plantas*. ABCTP/Embrapa-CNPq, Brasilia. 99–170p.

Gribaudo, I., Zanetti, R., Morte, M.A., Previati, A., Schubert, A. 1996. Development of mycorrhizal infection in *in vitro* and *in vivo*-formed roots of woody fruit plants. *Agronomie*. Vol 16: 621-624.

Harrison, M.J., Van Buuren, M.L. 1995. A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature*, Vol. 378:626–629.

Harrier, L.A., Wright F., Hooker, J.E. 1998. Isolation of the 3-phosphoglycerate kinase gene of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol & Gerd.) Gerdemann & Trappe. *Curr Genet*. Vol 34:386-392.

Harrier, L., Watson, C. 2004. The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and/or sustainable farming systems. *Pest Manag. Sci*. Vol 60: 149–157

Harris, G. K., Gupta, A., Nines, R.G., Kresty, L.A., Habib, S.G., Frankel, W.L. 2001. Nutrition and Cancer. Vol 40: 125-133.

Harrison, M.J., Dewbre, G.R., Liu, J.Y. 2002. A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. Plant Cell. Vol 14: 2413–2429.

Harrison, M.J. 1998. Development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Current Opinion Plant Biology. Vol 1: 360-365.

Hawkins, H.J., Johansen, A., George, E. 2000. Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. Plant Soil. Vol 226: 275-285.

Herold, A. 1980. Regulation of photosynthesis by sink activity—the missing link. New Phytol. Vol 86:131–144

Ho, I., Trappe, J.M. 1975. Nitrate reducing capacity of two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Mycologia. Vol 67: 886-888.

Hosny, M., Gianinazzi-Pearson, V., Dullieu H. 1998. Nuclear DNA content of 11 fungal species in Glomales. Genome. Vol 41: 422-428.

Jabaji-Hare, S. 1988. Lipid and fatty-acid profiles of some vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi: contribution to taxonomy. Mycologia. Vol 80:622–629.

Jakobsen, I., Rosendahl, L. 1990. Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. New Phytol. Vol 115:77–83.

Javot, H., Penmetsa, R.V., Terzaghi, N., Cook, D.R., Harrison, M.J. 2007a. A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol 104: 1720–1725.

Javot, H., Pumplin, N., Harrison, M.J. 2007b. Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. Plant Cell Environ. Vol. 30: 310–322.

Jargeat, P., Cosseau, C., Ollah, B., Jauneau, A., Bonfante, P., Batut, J., Becard, G. 2004. Isolation, free-living capacities, and genome structure of "candidate *Glomeribacter gigasporarum*", the endocellular bacterium of the mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. J Bacteriol. Vol 186: 6876-6884.

Johansen, A., Finlay, R.D., Olsson, P.A. 1996. Nitrogen metabolism of the external hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. New Phytol. Vol 133: 705-712.

Kaldorf, M., Schmelzer, E., Bothe, H. 1998. Expression of maize and fungal nitrate reductase genes in arbuscular mycorrhiza. Mol Plant Microbe Int. Vol 11: 439-448.

Kapoor, R., Chaudhary, V., Bhatnagar, A.K. 2007. Effects of Arbuscular mycorrhizal and phosphorus application on artemisinin concentration in *Artemisia annua* L. Mycorrhiza. Vol 17:581–587.

Kapoor, R., Sharma, D., Bhatnagar, A. 2008. Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications. Sci Hortic. Vol 116:227-239.

Karandashovand, V., Bucher, M. 2005. Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *TRENDS in Plant Science*, Vol.10 (1):22-29.

Koske, R.E. 1981. Multiple germination by spores of *Gigaspora gigantea*. Transactions of the British Mycological Society. Vol 76: 328–330.

Kokko, H.I., Kivineva, M., Kärenlampi, S.O. 1996. Single-step immunocapture RT-PCR in detection of raspberry bushy dwarf virus. BioTechniques. Vol 20: 842-846.

Koffi, M.Ch., Enrique de la Providencia, I., Elsen, A., Declerck, S. 2009. Development of an *in vitro* culture system adapted to banana mycorrhization. African Journal of Biotechnology Vol. 8 (12): 2750-2756.

Kozai, T., Kubota, C. 2005. Concepts, definitions, ventilation methods, advantages and disadvantages. In: Kozai T, Afreen F, Zobayed SMA (eds) Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system. Springer, Dordrecht, pp 19–30.

Kozai, T. 1991. Acclimatization of micropropagated plants. In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry. High-Tech and Micropropagation I.* Springer-Verlag, Berlin, Germany. Vol. 17: 127–141.

Krajinski, F., Biela, A., Schubert, D., Gianinazzi-Pearson, V., Kaldenhoff, R., Franken, P., 2000. Arbuscular mycorrhiza development regulates the RNA abundance of *Mtaqp1* encoding a mercury-insensitive aquaporin of *Medicago truncatula*. *Planta*. Vol 211: 85–90.

Larose, G., Chenevert, R., Moutoglis, P., Gagne, S., Piche, Y., Vierheilig, H. 2002. Flavonoid levels in roots of *Medicago sativa* are modulated by the developmental stage of the symbiosis and the root colonizing arbuscular mycorrhizal fungus. *Journal of Plant Physiology*. Vol 159: 1329-1339

Liu, Wen-Ke; Yang, Qi-Chang. 2008. Integration of mycorrhization and photoautotrophic micropropagation in vitro: feasibility analysis for mass production of mycorrhizal transplants and inoculants of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. Vol 95:131–139.

Logi, C., Sbrana, C., Giovannetti, M. 1998. Cellular events involved in survival of individual arbuscular mycorrhizal symbionts growing in the absence of the host. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 64: 3473–3479.

Ludwig, L.M. 2000. Hormonal balance in plants during colonization of mycorrhizal fungi. En: *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. P 262-285

Lynch, J. 1995. Root architecture and plant productivity. *Plant Physiologist*. Vol. 109: 7-13

Maldonado-Mendoza, I.E., Dewbre, G.R., Harrison, M.J. 2001. A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Mol. Plant–Microbe Interact*. Vol. 14: 1140–1148.

Marulanda, M.L., Marquez, M.P. 2002. Evaluación de la estabilidad genética de vitroplantas de *Rubus glaucus* Bent mediante marcadores moleculares RAPD. *Actualidades Biológicas*. Vol 24 (76): 31-36.

Matsubara, Y., Uetake, Y., Peterson, R.L. 1999. Entry and colonization of *Asparagus officinalis* root by arbuscular mycorrhizal fungi with emphasis on changes in host microtubules. *Can J Bot.* Vol 77: 1159-1167.

Mertz, J., Heithaus, J.J., Bush, R.L. 1979. Mass production of axenic spores of the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Trans Br Mycol Soc.* Vol 72:167–169

Milbury, P., Cao, G., Prior, R., Blumberg, J. 2002. Bioavailability of elderberry anthocyanins. *Mechanisms of Ageing and Development.* Vol 123: 997-1006.

Mohammadi, E.G., Rezaee, D., Prasad, R., Varma, A. 2008. Mycorrhizal Fungi: What We Know and What Should We Know?. En: Varma Ajit (Editor), *Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics.* Tercera edición. Springer, pp. 3-27

Morandi, D. 1996. Occurrence of phytoalexins and phenolic compounds in endomycorrhizal interactions, and their potential role in biological control. *Plant and Soil.* Vol 185: 241–25.

Mosse, B. 1962. The establishment of vesicular-arbuscularmycorrhiza under aseptic conditions. *J Gen Microbiol.* Vol 27:509–520

Mosse, B. 1988. Some studies relating to “independent” growth of vesicular-arbuscular endophytes. *Can. J. Bot.* Vol 66:2533-2540

Mugnier, J., Mosse, B. 1987. Vesicular-arbuscular infections in Ri T-DNA transformed roots grown axenically. *Phytopathology.* Vol 77:1045-1050

Moyer, R.A., Hummer, K.E., Finn, C.E., Frei, B., Wrolstad R.O.E. 2002. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: vaccinium, rubus, and ribes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* Vol 50: 519-525.

Newman, E. I. 1966. A method of estimating the total length of root in a sample. *Journal of Applied Ecology.* Vol 3: 139

Nogales García, Amaia Miren. 2006. Estudio de la interacción entre el Hongo Formador de Micorrizas Arbusculares *Glomus intraradices* Schenck y Smith y el hongo patógeno *Armillaria mellea* (Vahl:fr) P. Kuhn en Vid. Tesis Doctoral

Nogales García, Amaia Miren. 2006. Estudio de la interacción entre el Hongo Formador de Micorrizas Arbusculares *Glomus intraradices* Schenck y Smith y el hongo patógeno *Armillaria mellea* (Vahl:fr) P. Kuhn en Vid. Tesis Doctoral.

Nogueira, E., Rosa, G.J.M., Haraguchi, M., Vassilieff, V.S. 1998. Anxiolytic effect of *Rubus brasiliensis* in rats and mice. Journal of Ethnopharmacology. Vol 61:111-117.

Norman, J.R., Atkinson, D., Hooker, J.E., 1996. Arbuscular mycorrhizal fungal induced alteration to root architecture in strawberry and induced resistance to the root pathogen *Phytophthora fragariae*. Plant Soil. Vol 185: 191–198.

Palfner, G. 2001. Taxonomische Studien an Ektomykorrhizen aus den Nothofagus-Wäldern Mitelsüdchiles, Bibliotheca Mycologica Band . J. Cramer Berlin, Stuttgart. 190.

Panizzi, L., Capón, C., Catalana, S., Cioni, P.L., Morelli, I. 2002. *In vitro* antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. Journal of Ethnopharmacology. Vol 79: 165-168

Parniske, Martin. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. Nature Reviews. Microbiology. Vol 6:763- 775

Pelto, M.C., Clark, J.R. 2000. *In vitro* shoot tip culture of *Rubus* Part 1. Review. Small fruits Rev. Vol: 69-82.

Perret, X., Staehelin, C., Broughton, W.J. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. Microbiol. Mol. Biol. Rev. Vol 64: 180-201.

Peterson, L.R., Hugues, B., Massicotte., Melville, H.L. 2004. MYCORRHIZAS: Anatomy and Cell Biology. 57-79.p.

Pfeffer, P.E., Douds, D.D.J., Becard, G., Shachar-Hill, Y. 1999. Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiol.* Vol 120: 587-598.

Phillips, D.A., Tsai, S.M. 1992. Flavonoids as plant signals to the rhizosphere microbes. *Mycorrhiza.* Vol 1: 55–58.

Phillips, J.M., Hayman, D.S. 1970. Improved procedure of clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transaction of the British Mycological Society.* Vol 55: 159-161.

Pierik, R. 1988. *In vitro* culture of higher plants as a tool in the propagation of horticultural crops. *Acta Hort.* Vol 226: 25–40.

Preece, J., Sutter, E. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: Debergh PC, Zimmerman RH (eds) *Micropropagation Technology and Applications.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp 71–93

Puthur, J.S., Prasad, K.V.S.K., Sharmila, P., Pardha, Saradhi. P. 1998. Vesicular arbuscular mycorrhizal fungi improves establishment of micropropagated *Leucaena leucocephala* plantlets. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* Vol 53: 41–47.

Raaman, N., Patharajan, S. 2006. Integration of arbuscular mycorrhizal fungi with micropropagated plants. In: Mukerji, K.G., Manoharachary, C. (Eds.), *Current Concepts in Botany.* I.K. International Publishing House, India.

Ramírez Gómez, M y Rodríguez Villate, A. 2010. Señales de reconocimiento entre plantas y hongos formadores de micorriza arbuscular. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria.* Vol 11(1): 53-60.

Rasmussen, N., Lloyd, D.C., Ratcliffe, G., Hansen, P.E., Jakobsen, I. 2000. ³¹P NMR for the study of P metabolism and translocation in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil.* Vol 226: 245-253.

Rausch, C., Daram, P., Brunner, S., Jansa, J., Laloi, M., Leggewie, G., Amrhein, N., Bucher, M. 2001. A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. *Nature*. Vol 414: 462–470

Redecker, D., Kodner, R., Graham, L.E. 2000. Glomelean fungi from the Ordovician. *Science*. Vol 289: 1920-1921.

Redecker, D., Raab, P. 2006. Phylogeny of the Glomeromycota (arbuscular mycorrhizal fungi): recent developments and new gene markers. *Mycologia*. Vol 98(6): 885–895.

Roussel, H., Bruns, S., Gianinazzi-Pearson, V., Hahlbrock, K., Franken, P. 1997. Induction of a membrane intrinsic protein-encoding mRNA in arbuscular mycorrhiza and elicitor-stimulated cell suspension cultures of parsley. *Plant Sci*. Vol 126:203–210.

Rufyikiri, G., Declerck, S., Dufey, J.E., Delvaux, B. 2000. Arbuscular mycorrhizal functioning might alleviate Aluminium toxicity in banana plants. *New Phytol*. Vol 148 (2): 343–352.

Roveda, G., Cabra, L., Ramírez, M., Peñaranda, A. 2007. Efecto de las micorrizas Arbusculares sobre la aclimatación y endurecimiento de microplántulas de mora (*Rubus glaucus*). *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. Vol 8(1): 28-36.

Sahar, A.M., Hussein, A., Mahmoud, A.M., Nawwara. 2003. Caffeoyl sugar esters and an ellagitannin from *Rubus sanctus*. *Phytochemistry*. Vol 63: 905-911

Santamaria, J.M., Davies, W.J., Atkinson, D.J., 1993. Stomata of micropropagated Delphinium plants respond to ABA, CO₂, light and water potential, but fail to close fully. *J. Exp. Bot*. Vol 44: 99–107.

Sbrana, C., Giovannetti, M., Vitagliano, C. 1994. The effect of mycorrhizal infection on survival and growth renewal of micropropagated fruit rootstocks. *Micorriza*. Vol 5:153-156.

Scervino, J.M., Ponce, M.A., Erra-Bassells, R., Vierheilig, H., Ocampo, J.A., Godeas, A. 2005a. Flavonoids exhibit fungal species and genus specific effects on the presymbiotic growth of *Gigaspora* and *Glomus*. *Mycol. Res.* Vol 109 7: 789–794.

Scervino, J.M., Ponce, M.A., Erra-bassells, R., Vierheilig, H., Ocampo J.M., Godeas, A. 2005b. Arbuscular mycorrhizal colonization of tomato by *Gigaspora* and *Glomus* species in the presence of root flavonoids. *Journal of Plant Physiology* Vol 162: 625—633.

Scervino, J.M., Ponce, M.A., Erra-Bassells, R., Vierheilig, H., Ocampo, J.A., Godeas, A. 2006. Glycosidation of apigenin results in a loss of activity on different growth parameters of arbuscular mycorrhizal fungi from the genus *Glomus* and *Gigaspora*. *Soil Biol. Biochem.* Vol 38: 2919–2922.

Scervino, J.M., Ponce, M.A., Erra-bassells, R., Bompadre, J., Vierheilig, H., Ocampo J.M., Godeas, A. 2007. The effect of flavones and flavonols on colonization of tomato plants by arbuscular mycorrhizal fungi of the genera *Gigaspora* and *Glomu*. *Can. J. Microbiol.* Vol 53: 702-709.

Scervino, M.J., Ponce, M.A., Monica D.I., Vierheilig, H., Ocampo, J.A., Godeas, A. 2009. Development of arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of different patterns of *trifolium repens* shoot flavonoids. *Rev. Cienc. Suelo Nutr. J. Soil. Sci. Plant Nutr.* Vol 9(2): 102-115

Schenck, N.C., Pérez, Y. 1990. Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. 283 p.

Schereiner, R.P., Koide, R.T. 1993a. Antifungal compounds from the root of mycotrophic and non-mycotrophic plant species, *New Phytol.*, Vol 123: 99-105. _____. (1993b). Mustards, mustard oils and mycorrhizas. *New Phytol.*, Vol 123: 107-113.

Schüßler A., Schwarzott, D., Gerig, H., Walker, C. 2001a. Analysis of partial Glomales SSU rRNA gene sequences: implications for primer desing and phylogeny. *Mycological Research.* Vol 105, pp. 5-15.

Schüßler A., Schwarzott D y Walker C. (2001b). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research.* Vol 105, pp. 1413-1421.

Schüßler Arthur and Walter Christopher. 2010. The *Glomeromycota*. A species list with new families and new genera. <http://www.lrz.de/~schuessler/amphylo/>

Schüßler, A., Schwarzott, D., Walker, C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* Vol 105: 1413–1421.

Schultz, C. 2001. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhiza on survival and post vitro development of micropropagated oil palms (*Elaeis guineensis* Jacq.). p. 5-14. Elektronische Dissertationen der Georg-Aug-Universität Göttingen.

Sharma, M., Bhatia, A., Adholeya, A. 1996. Growth responses and dependence of *Acacia nilotica* var. cupriciformis on the indigenous arbuscular mycorrhizal consortium of a marginal wasteland soil. *Mycorrhiza*. Vol 6:441-446.

Sharmila, P., Puthur, J., Pardha Saradhi, P. 2000. Vesicular arbuscular mycorrhizal fungi improves establishment of micropropagated plants. In: Mukerji, K.G. (Ed.), *Mycorrhizal Biology*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 235–250.

Shachar-Hill, Y., Pfeffer, P.E., Douds, D.D., Osman, S.F., Doner, L.W., Ratcliffe, R.G. 1995. Partitioning of intermediary carbon metabolism in vesicular arbuscular mycorrhizal leek. *Plant Physiol.* Vol 108: 7-15.

Shi, J., Yu, J., Pohorly, J., Kakuda, Y. 2003. Polyphenolics in grape seeds: biochemistry and functionality. *J Med Food*. Vol 6: 291-9.

Siqueira, J. 1994. Micorrizas. In: Araújo, R.S., Hungaria, M. (Eds.), *Microrganismos de importancia agrícola*. Embrapa-CNPAP, Embrapa-CNPSo. Embrapa-SPI, Brasília, pp. 151–194.

Siqueira, J., Saggini-júnior, O., Flores-aylas, W., Guimarães, P. 1998. Arbuscular mycorrhizal inoculation and superphosphate application influence plant development and yield of coffee in Brazil. *Mycorrhiza*. Vol 7:293-300.

Sieverding, E. 1991. Vesicular- arbuscular mycorrhiza management in tropical adrosystms *GTZ*, Eschborn, Germany pp. 3714.

Sieverding, E., Oelh, F. 2006. Revision of *Entrophospora* and description of *Kuklospora* and *Intraspora*, two new genera in the arbuscular mycorrhizal Glomeromycetes. *J Applied Bot Food Qual*. Vol 80: 69-81

Smith, S. E., Read, D. J. 1997. Mycorrhizal Symbiosis. Second Edition. Academic Press, London. pp. 26-160.

Smith, S.E., Smith, F.A., Jakobsen, I. 2003 Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plant irrespective of growth responses. Plant Physiol. Vol 133, pp. 16–20

Smith, S. E., Read, D. J. 2008. Mycorrhizal Symbiosis. Third Edition. Academic Press is an imprint of Elsevier. pp. 2-6.

Smith, S.E., Gianinazzi-Pearson, V. 1988. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. Vol 39: 221–244

Stintzing, F., Carle, R. 2004. Functional properties anthocyanin and betalains in plant, foods and human nutrition. Trends in Food Science & Technology. Vol 15: 19-38.

Strik, B., Finn, C., Clark, J.R., Bañados, M.P. 2006. Worldwide Production of Blackberries. International Society for Agricultural Science. Rubus Symposium, held in Chile in December, 2005.

Strullu, D.G., Romand, C. 1986. Méthode d' obtention d' endomycorrhizes à vésicules et arbuscules en conditions axéniques. C. R. Acad. Sci. Vol 303: 41-47.

Strullu, D.G., Romand, C. 1987. Culture axénique de vésicules isolées a partir d' endomycorrhizes et ré-association in vitro á des racines de tomate. C. R. Acad. Sci., Paris. Vol 292: 153-156.

Strullu, D.G., Diop, T.A., Plenchette, C. 1997. Réalisation de collections *in vitro* de *Glomus intraradices* (Schenck et Smith) et de *Glomus versiforme* (Karsten et Berch) et proposition d'un cycle de développement. C.R. Acad. Sci. Paris. Vol 320: 41–47.

Subramanian, K.S., Charest, C. 1998. Arbuscular mycorrhizae and nitrogen assimilation in maize after drought and recovery. Phys Plant. Vol 102: 285-296.

Swartz, H.J., Bors, R.H., Mohamed, F.A., Naess, S.K. 1990. The effect of in vitro pre-treatment on subsequent shoot organogenesis from excised *Rubus* and *Malus* leaves. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* Vol 21: 179-184.

Taylor, J., Harrier, L. 2000. A comparison of nine species of arbuscular mycorrhizal fungi on the development and nutrition of micropropagated *Rubus idaeus* L. cv. Glen Prosen (Red Raspberry). *Plant and Soil.* Vol 225: 53–61.

Tafur, R. 2006. Propuesta frutícola para Colombia y su impacto en la actividad económica nacional, regional y departamental. En: *Memorias 1er Congreso Colombiano de Horticultura.* 17-20 de octubre de 2006. Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas. P. 47-68. ISBN 9587017447

Tamasloukht, M., Séjalon-Delmas, N., Kluever, A. 2003 Root factors induce mitochondrial related gene expression and fungal respiration during the developmental switch from asymbiosis to presymbiosis in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. *Plant Physiology.* Vol 131, 1468–1478

Tobar, R., Azcón, R., Barea, J.M. 1994. Improved nitrogen uptake and transport from ¹⁵N-labelled nitrate by external hyphae of arbuscular mycorrhiza under water stressed condition. *New Phytol.* Vol 126: 119-122.

Trouvelot, A., Kough, J.L., Gianinazzi-Pearson, V. 1986. Mesure du taux de mycorrhization VA d' un système racinaire. Recherche de méthodes d' estimation ayant une signification fonctionnelle. In: Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S, eds. *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae.* Paris, INRA Press, pp. 217-221

Tsai, S.M., Phillips, D.A. 1991. Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores *in vitro*. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol 57: 1485-1488.

Valderrama Ana, Milena., Álvarez Roberto, Barrero Luz, Stella., Robayo Mónica., Núñez Víctor. 2009. Validación y escalamiento de plántulas de mora *in vitro* y manejo *ex vitro* para entrega a agricultores de Silvana. En: *Caracterización, Evaluación y Producción de material limpio de mora con alto valor agregado.* Barrero Luz Estella. Cundinamarca – Colombia. CORPOICA. 84p.

Vestberg, M., Estaún, V., 1994. Micropropagated plants, an opportunity to positively manage mycorrhizal activities. En: Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems. Birkhäuser, Basel. p. 217-226.

Vierheilig, H., Bago, B., Albrecht, C., Poulin, M.J., Piche, Y. 1998. Flavonoids and arbuscular-mycorrhizal fungi. Advantage Experimental Medicine Biology. Vol 439:9–33.

Vierheilig, H., Piche, Y. 2002. Signalling in arbuscular mycorrhiza: facts and hypotheses. Advantage Experimental Medicine Biology. Vol 505: 23–39.

Vierheilig, H., Bago, B., Lerat, S., Piché, Y. 2002. Shoot-produced, light-dependent factors are partially involved in the expression of the arbuscular mycorrhizal (AM) status of AM host and non-host plants. Journal Plant Nutrition Soil Science. Vol 165: 21-25.

Voets, L., Dupre de Boulois, H., Renard, L., Strullu, Désire-Georges., Declerck, S. 2005. Development of an autotrophic culture system for the *in vitro* mycorrhization of potato plantlets. FEMS Microbiology Letters. Vol 248 : 111–118.

Voets, L., Enrique de la Providencia, I., Fernández, K., IJdo, M., Cranenbrouck, S., Declerck, S. 2009. Extraradical mycelium network of arbuscular mycorrhizal fungi allows fast colonization of seedlings under *in vitro* conditions. Mycorrhiza. Vol 19: 347-356.

Walley, F., Germida, J.J. 1996. Failure to decontaminate *Glomus clarum* NT4 spores is due to wall associated bacteria. Mycorrhiza. Vol 6: 43-49.

Wang, H., Parent, S., Gosselin, A., Desjardins, Y. 1993. Study of vesiculararbuscular mycorrhizal peat-based substrates on symbiosis establishment, acclimatization and growth of three micropropagated species. J. Am. Soc. Hort. Sci. Vol 118, 896–901.

Xiao, Y., Niu, G., Kozai, T. 2010. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. Plant Cell Tiss Organ Cult.

Zheng, W., Wang, S.Y. 2003. Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 49: 4076-4082.

Ziv, M. 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants. In: Debergh, P.C., Zimmerman, R.H. (Eds.), *Micropropagation Technology and Applications*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 45–69.

ANEXOS

ANEXO 1. Composición de las soluciones madres de Hougland

- Solución de macronutrientes (1L)

KNO ₃	101.1 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	115.08 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	246.48 g

- Solución de nitrato de calcio (1L)

Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	236.16 g
--	----------

- Solución de micronutrientes (1L)

KCl	1.864g
H ₃ BO ₃	0.773g
MnSO ₄ .H ₂ O	0.0169g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.288g
CuSO ₄ .7H ₂ O	0.062g
H ₂ MoO ₄ (85%MoO ₃)	0.04g

- Solución NaFeEDTA (100ml)

NaFeEDTA	3g
----------	----

- PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN FINAL (1 Litro)

Macronutrientes	
	ml
KNO ₃	6
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	4
NH ₄ H ₂ PO ₄	2
MgSO ₄ .7H ₂ O	1
Micronutrientes	
KCl	2
H ₃ BO ₃	
MnSO ₄ .H ₂ O	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	
CuSO ₄ .7H ₂ O	
H ₂ MoO ₄ (85%MoO ₃)	
NaFeDTPA (10%Fe)	0,3 - 1

ANEXO 2. Procedimiento para aislamiento y conteo de esporas

El método utilizado para el aislamiento y conteo de esporas del suelo es el descrito por Gendermann & Nicolson, 1963, con algunas modificaciones. Este método se basa en suspender una muestra de suelo en agua corriente y pasarla por varios tamices de diámetro descendente. Por lo general se utilizan de 425 y 38 μm con la finalidad de aislar las esporas lo más limpias posibles y/o hacer el conteo. Cuando se emplea este método, se debe tener mucho cuidado y evitar salpicaduras que puedan incidir en los resultados.

Tomar de 1 a 10gr de suelo seco y colocarlos en un beaker de 250ml, adicionando aproximadamente 100ml.

1. Agitar con ayuda de un sheaker por 15 minutos. Después de transcurrido este tiempo, adicione agua y viértalo sobre los tamices previamente ubicados debajo de un fregadero.

2. Lavar con agua corriente el contenido del tamiz superior.

3. Del tamiz de 38 μm recoger con cuidado la interfase y verterla en un tubo de centrifuga de 50ml con 20 a 25 ml de agua.

4. Adicionar con una jeringa con manguera rígida acoplada, 15ml de solución de sacarosa 72% con Twen 80 al 2%, de manera, que la solución quede por debajo del material suspendido en agua. Equilibrar los tubos y centrifugar durante 5 minutos a 200 rpm.

5. Saque cuidadosamente los tubos de la centrifuga, tratando de no romper la interfase agua-sacarosa. Con la ayuda de una jeringa, recorra toda la superficie de la interfase y un poco de esta, para recoger las esporas que no atravesaron la solución.

6. Pasar el contenido de la jeringa por el tamiz de 38 μm y lavar para eliminar la sacarosa.

7. Recoger el contenido del tamiz sobre papel filtro, con ayuda de un embudo.

8. Hacer conteo con ayuda de un estereoscopio.

PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE SOLUCIONES EN EL AISLAMIENTO DE ESPORAS MICORRIZADAS

1. Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 1 litro

H ₂ O ₂	50ml
H ₂ O destilada	950ml

2. Solución de Twen 80 al 2% + sacarosa 2M 1 litro

Twen 80	20 gr
Azúcar comercial	720 gr
H ₂ O destilada	400 ml

Mantener en nevera

3. Polivinil lacto glicerol

Alcohol polivinílico (C ₂ H ₄ O) _n	16 gr
H ₂ O destilada	10 ml
Acido láctico (C ₃ H ₆ O ₃)	10 ml
Glicerol (C ₃ H ₈ O ₃)	1ml

Guardar en frasco gotero ámbar

ANEXO 3. Composición de las soluciones madres del medio MSR
(Declecerk *et al.*, 1998)

- Solución de macroelementos (10ml/L)

KNO ₃	7600mg/L
MgSO ₄ *7H ₂ O	73900mg/L
KH ₂ PO ₄	410mg/L
KCl	6500mg/L

- Solución de nitrato de calcio (10ml/L)

Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O	35900mg/L
--	-----------

- Solución de microelementos (1ml/L)

MnSO ₄ *4H ₂ O	2.45mg/L
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0.28mg/L
H ₃ BO ₄	1.85mg/L
CuSO ₄ *5H ₂ O	0.22mg/L
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0.0024mg/L
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ *4H ₂ O	0.034mg/L

- Solución de NaFeEDTA (5ml/L)

NaFeEDTA	320mg/L
----------	---------

- Solución de vitaminas (5ml/L)

Ácido nicotínico	200mg/L
Piridoxina HCL	180mg/L
Tiamina HCL	200mg/L
Calcio pantotenato	180mg/L
Biotina	0.2mg/L
Cianocobalamina	80mg/L

pH 5.8

ANEXO 4. Composición de las soluciones madres del medio Lepoivre
(Valderrama *et al.* 2009).

Componente	Solución madre	Cantidad por litro
Macro lepoivre	20X	50ml
Micro Lepoivre	100X	1ml
Hierro MS	50X	10ml
Tiamina	1000ppm	0.4ml
GA3	1000ppm	1.0ml
AIB	600ppm	0.17ml
Inositol		0.1g
Azucar		20g
Agar		7g
pH		5.8

ANEXO 5. Procedimiento para tinción de raíces micorrizadas

El método utilizado para la tinción de raíces micorrizadas es el de tinción con Azul de Tripán, descrito por Phillips y Haymana, 1970.

- 1.Lavar las raíces con abundante agua corriente.
- 2.Cubrir las raíces con solución de KOH al 10%.
- 3.En esta solución, colocarlas al baño de María (90oC) durante 10 a15 minutos.
- 4.Lavar con agua corriente las raíces, utilizando preferiblemente un tamiz adecuado, para evitar perdidas durante el enjuague.
- 5.Lavado e inmersión en solución fresca de KOH al 10% y H₂O₂ al 10%, mezclados en proporción 1:1 (V/V). dependiendo del tipo de la raíz se debe dejar de 5 a 10 minutos.
- 6.Lavar con agua corriente las raíces.
- 7.Acidificar con una solución de HCL al 1N durante 10 minutos.
- 8.Decantar el HCL. Sin lavar.
- 9.Adicionar Azul de Tripan al 0.05% y colocar las raíces al baño de María por 10 minutos.
- 10.Retirar el colorante y guardarlo en un recipiente.
- 11.Lavar las raíces en agua destilada y dejarlas en reposo por 12 horas para eliminar el exceso de colorante.
- 12.Montar en lámina y laminilla, 10 raíces, de más o menos 1 cm de largo cada una.
- 13.Observar al microscopio.

ROCEDIMIENTO PARA PREPARACION DE SOLUCIONES EN TINCION DE RAÍCES MICORRIZADAS

1. Hidróxido de potasio al 10% (KOH 10%) 1 litro.

KOH 85%	117.6 gr
H ₂ O destilada	Hasta completar volumen

2. Peroxido de hidrógeno al 10% (H₂O₂ 10%) 1 litro.

H ₂ O ₂ al 30%	333.33 ml
H ₂ O destilada	666.67 ml

3. Acido clorhídrico 1N (HCL 1N) 1 litro.

HCL 36.5-30% d 1.192	83.89 ml
H ₂ O destilada	Hasta completar volumen

4. Lacto glicerol 0.5 litros.

Acido láctico C ₃ H ₆ O ₃	125 ml
Glicerina C ₃ H ₈ O ₃	250 ml
H ₂ O destilada	125 ml

5. Azul de Tripán 0.05% 0.5 litros.

Lacto glicerol	500ml
Azul de Tripán (C ₃₄ H ₂₄ N ₆ Na ₄ O ₁₄ S ₄)	0.25 gr

ANEXO 6. Cuantificación de la colonización radical de micorrizas arbusculares

Para cuantificar los niveles de colonización de HFMA en plántulas de mora de castilla, se utilizó el método de Trovelot *et al*, 1986. Este método consiste en tomar 30 fragmentos de raíz, de un centímetro de longitud y teñirlos según la técnica de Phillips y Hayman, 1970 (Anexo 5). Para evaluar la infección total de la raíz, hay que valorar cada uno de los 30 fragmentos por separado, de manera que primero se valora la presencia del hongo (hifas), con una escala de 0 hasta 5, según la cantidad de hifas presentes en cada fragmento y segundo, se valora la cantidad de vesículas y/o arbusculos presentes en la parte micorrizada a través de las clases A, A, **A**, de manera que A indica un 10% de vesículas y/o arbusculos, A un 50% y **A**, un 100% de vesículas y/o arbusculos en la parte micorrizada.

Por lo tanto, este sistema doble de anotación hay que utilizarlo en cada uno de los 30 fragmentos por separado y se empieza así a calcular los parámetros de infección. Siempre se debe tener en cuenta que los parámetros representados por letras mayúsculas (%F, %M, %A y/o %V), se hacen referencia al sistema radical completo, mientras que los representados por letras minúsculas (%a y/o v, mA, mA, m**A** y %m) hacen referencia sólo a la parte micorrizada del sistema radical.

Los parámetros determinados a través de ésta metodología fueron:

a) Frecuencia de micorrización. Indica la capacidad del hongo para entrar en contacto con la raíz (se considera cualquier tipo de estructura: apresorio, hifas internas, arbusculos o vesículas). Es el porcentaje de raíces del total estudiado, que aparecen infectadas, expresadas en la siguiente ecuación:

$$\%F = \frac{\text{Número total de fragmentos micorrizados}}{\text{Número total de fragmentos (N)}} * 100$$

b) Intensidad de micorrización. Indica la intensidad con que el hongo infecta la corteza radical, es decir mide la efectividad con que el hongo penetra y coloniza la raíz. Se determina con la siguiente fórmula:

$$\%M = (95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1) / N$$

c) Intensidad de micorrización de los fragmentos que están infectados. Este parámetro cambia poco en relación con la M, ya que su significado es el

mismo, pero sólo referido a la parte radical que tiene infección MA y se determina así:

$$\%m = M * 100 / F$$

d)cantidad de arbusculos y/o vesículas en la parte micorrizada. Refleja la proporción de arbusculos y/o vesículas media que existe en cada fragmento micorrizado, así:

$$\%a = (100m_{\underline{A}} + 60 m_{\underline{A}} + 10 m_A)/100$$

Para determinar este parámetro, hay que calcular $m_{\underline{A}}$, $m_{\underline{A}}$, y m_A . Así $m_{\underline{A}}$, $m_{\underline{A}}$, y m_A , indica la parte micorrizada que presenta una infección muy rica en arbusculos y/o vesículas, medianamente rica y pobre, respectivamente. Se calcula sabiendo que cada uno viene definido de la siguiente manera:

$$m_{\underline{A}} = (95n_{5\underline{A}} + 70n_{4\underline{A}} + 30n_{3\underline{A}} + 5n_{2\underline{A}} + n_{1\underline{A}}) * F/M (N-no)$$

$$m_{\underline{A}} = (95n_{5\underline{A}} + 70n_{4\underline{A}} + 30n_{3\underline{A}} + 5n_{2\underline{A}} + n_{1\underline{A}}) * F/M (N-no)$$

$$m_A = (95n_{5A} + 70n_{4A} + 30n_{3A} + 5n_{2A} + n_{1A}) * F/M (N-no)$$

Una vez conocidos estos tres valores, ya se puede calcular %a.
no: Número de fragmentos no micorrizados

e)Contenido de arbusculos y/o vesículas del sistema radical completo. Se determina por la siguiente formula:

$$\%A = a * M/100$$

ANEXO 7. Composición de la solución de polivinil-ácido láctico-glicerol (PVLG)

Preparación de PVLG

Componente	Cantidad (100ml)
Ácido láctico	50ml
Glicerol	5ml
Alcohol polivinílico	15g

Aforar a 100ml con agua destilada

Nota: primero se diluye bien el ácido láctico y el glicerol, luego se le adiciona el PVLG. Dejar en baño de maría por 6-9 horas.