

135
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

GERMINACION DE UN HONGO ENDOMICORRIZICO
VESICULO-ARBUSCULAR (*Glomus fasciculatum*) EN
MEDIOS AXENICOS Y ENSAYO DE INOCULACION
IN VITRO DE *Mammillaria hultziopochtlí*



FACULTAD DE CIENCIAS
DIRECCION ESCOLAR

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
BIOLOGO

P R E S E N T A

María del Pilar Ortega Larrocea



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

ABRIL 1994



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ACLARACION

Por razones de trámites administrativos, no fue posible realizar el cambio de título de esta tesis.

El título correcto es:

Germinación de un hongo endomicorrízico vesículo-arbuscular (Glomus sp.) en medios axénicos y ensayo de micorrización in vitro de Mammillaria huitzilopochtli.

DIRIGIDA POR EL M. EN C. SERGIO PALACIOS MAYORGA.

Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM.

ASESORADA POR EL DR. ABRAHAM RUBLUO ISLAS.

**Laboratorio de Biotecnología Vegetal y Genética del Jardín Botánico,
Instituto de Biología, UNAM.**

Esta tesis forma parte de los siguientes proyectos:

Estudio de la biología de los hongos micorrízicos vesículo-arbusculares como biomejoradores del suelo. Laboratorio de Biología de Suelos del Departamento de Edafología. Instituto de Geología, UNAM.

Recuperación y readaptación de plantas en peligro de extinción. Laboratorio de Biotecnología Vegetal y Genética del Jardín Botánico, UNAM.

Dedicada a
Mario y Maribel
en agradecimiento a
sus inagotables esfuerzos
e interminable apoyo;

A mis hermanas
a quienes *no dejo de admirar*

A Adolfo
guía paciente y tolerante.

AGRADECIMIENTOS

Hago presente mi más profundo agradecimiento:

Al M. en C. Sergio Palacios Mayorga por la dirección de esta tesis, el gran apoyo brindado en el transcurso de mi investigación y la orientación que me proporcionó en todo momento.

Al Dr. Abraham Rubluo Islas por la asesoría de esta tesis, el apoyo otorgado y sus valiosísimas sugerencias.

A la H. Comisión Dictaminadora:

M. en C. Nicolás Aguilera Herrera.

Laboratorio de Edafología del Departamento de Biología. Facultad de Ciencias, UNAM.

M. en C. Sergio Palacios Mayorga.

Laboratorio de Biología de Suelos del Departamento de Edafología. Instituto de Geología, UNAM.

Dr. Abraham Rubluo Islas.

Laboratorio de Biotecnología Vegetal Y Genética del Jardín Botánico. Instituto de Biología, UNAM.

M. en C. Guadalupe Vidal Gaona.

Sección de Micología del Herbario. Facultad de Ciencias, UNAM.

Biól. Adolfo Andrade Cetto.

Unidad de Ambientes Controlados e Invernadero. Facultad de Ciencias, UNAM.

por la atinada revisión del manuscrito, sus excelentes comentarios y sugerencias.

A los biólogos Eduardo González e Ingrid Brunner, ya que sin su asesoría en la enseñanza de las técnicas de laboratorio, no se hubiera podido realizar este trabajo.

A la M. en C. Kumiko Shimada y los compañeros de los laboratorios de Biología de suelos y Biotecnología Vegetal, por el continuo interés que mostraron en el transcurso del trabajo.

A los biólogos José Antonio Hernández y Alfredo Gamboa del laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias, por su valiosa ayuda en la toma de las fotomicrografías.

A las M. en C. Ernestina Vallejo y Kumiko Shimada, Pedro Avilés y Humberto Núñez, por su colaboración en los análisis de suelos.

A la UNAM y sus instituciones: Instituto de Geología, Jardín Botánico del Instituto de Biología, Unidad de Ambientes Controlados e Invernadero de la Facultad de Ciencias; por las facilidades y el apoyo técnico que me fueron otorgados durante el desarrollo de esta tesis.

Y muy especialmente a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por haberme apoyado con una beca.

INDICE

	Página
RESUMEN	1
I. INTRODUCCION.	2
1.1 Hipótesis y objetivos.	3
II. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.	
2. 1. Germinación y desarrollo de hongos micorrízicos vesículo-arbusculares en medios axénicos.	4
2. 2. Micorrización vesículo-arbuscular <i>in vitro</i> .	5
2. 3. Micorrizas en cactáceas.	7
2. 4. LAS MICORRIZAS VESICULO-ARBUSCULARES.	
2. 4. 1. Generalidades.	8
2. 4. 2. Relación endófito-hospedero: morfofisiología de las micorrizas VA.	9
2. 4. 3. Factores que determinan la colonización.	12
2. 4. 4. Entidades de colonización: propágulos de micorrizas VA.	13
2. 4. 5. Beneficios que aportan a las plantas las asociaciones micorrízicas del tipo VA.	16
2. 5. CULTIVO <i>IN VITRO</i> .	
2. 5. 1. Micropropagación de especies vulnerables.	18
2. 5. 2. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Mammillaria</i> .	19
2. 5. 3. Manipulación de algunas plantas <i>in vitro</i> con microorganismos.	20
2. 6. GERMINACION DE CLAMIDOSPORAS.	
2. 6. 1. Proceso de germinación de clamidosporas.	24

2.6.2. Condiciones fisiológicas que afectan la germinación y crecimiento hifal.	26
2.6.3. Condiciones ecológicas que afectan la germinación de las esporas.	28
2.6.4. Germinación de esporas de hongos micorrízicos vesículo-arbusculares en medios axénicos.	30
2.6.5. Condiciones físicoquímicas que regulan la germinación y crecimiento en medios axénicos.	34

III. MATERIALES Y METODOS.

3.1 Origen, control y multiplicación del aislado micorrízico.	39
3.1.1. Aislamiento de propágulos del suelo.	39
3.1.2. Control de calidad del aislado.	40
3.1.2.1. Evaluación de la colonización.	42
3.1.2.2. Selección del aislado.	43
3.2. Cuento, separación y siembra de propágulos en medios nutritivos.	44
3.2.1. Pruebas de germinación de esporas en distintos medios axénicos agarificados.	45
3.2.2. Pruebas de crecimiento micelial a partir de segmentos de raíces colonizadas en medios agarificados.	46
3.3. Micorrización <i>in vitro</i> con clamidosporas	47
3.4. Procedimientos para evaluar la germinación de las esporas, desarrollo micelial y colonización de las plantas <i>in vitro</i> .	48

IV. RESULTADOS Y DISCUSION.

4.1. Selección del propágulo para la micorrización <i>in vitro</i> .	49
4.2. Germinación de clamidosporas de <i>Glomus</i> sp. en medios axénicos agarificados.	51
4.3. Resultados de la micorrización <i>in vitro</i> de <i>Mammillaria huitzilopochtli</i> con <i>Glomus</i> sp.	59

V. CONCLUSIONES.	63
------------------	----

ANEXOS

1. Resultados del control de calidad del aislado micorrízico original y de la separación y conteo del propágulo.	64
2. Solución nutritiva Long Ashton.	65
3. Elaboración de medios agarificados: testigos y extractos de suelo.	66
4. Medio Murashige & Skoog.	67
5. Medio Hepper & Smith.	69
6. Medio Allen <i>et al.</i>	71
7. Medio de crecimiento de hongos micorrízicos VA por Bécard & Fortin.	72
8. Análisis de algunas propiedades fisicoquímicas de los suelos utilizados.	73
BIBLIOGRAFIA	74

RESUMEN

Se analizó el porcentaje de germinación *in vitro* de esporas de *Glomus* sp., en doce medios axénicos agarificados (testigos de agar-agua a distintos valores de pH, medios nutritivos y extractos de suelo), así como los ensayos preliminares para la selección de los propágulos (esporas y raíces colonizadas) que se utilizarían en los experimentos de micorrización *in vitro* de *Mammillaria huitzilopochtli*. De los resultados obtenidos en estas pruebas, se decidió eliminar, como propágulos, a los segmentos de raíces debido a la alta contaminación que desarrollaban en los medios de cultivo.

La prueba estadística aplicada en los resultados de germinación, fue el análisis de varianza ($P=0.05$) para una población de 50 esporas con tres repeticiones por tratamiento. Se observaron diferencias significativas entre los medios, resultando el más apropiado para la germinación, el preparado con el extracto de suelo que se usó para el transplante de *Mammillaria*. En este medio, se obtuvo el porcentaje de germinación más alto (80 %), seguido por el medio nutritivo Hepper & Smith (67 %). No se encontró un efecto en la germinación atribuible a los valores de pH probados (5.5, 6.5 y 7.5), así como tampoco se observó una relación entre el porcentaje de germinación y la contaminación de las esporas. El medio Murashige & Skoog, utilizado en la micropropagación, enraizamiento y micorrización de *Mammillaria huitzilopochtli*, resultó ser el menos adecuado para la germinación de las esporas (26 %). Esto se reflejó en la colonización *in vitro* de estas plantas, la cual fue poco profusa, pero con puntos de colonización claramente establecidos a lo largo de las raíces, después de un mes de incubación. En contraste, la micorrización de las plantas en el suelo tuvo un mejor desarrollo.

I. INTRODUCCION.

Los estudios realizados, hasta ahora sobre la germinación de esporas de hongos micorrízicos vesículo-arbusculares en medios axénicos, han aportado conocimientos importantes sobre su fisiología y posición taxonómica. Al respecto, sobresalen los trabajos enfocados a dilucidar los factores que favorecen o inhiben la germinación de las esporas. Así mismo, el cultivo en medios axénicos ha sido utilizado en ensayos para tratar de conseguir el desarrollo de micelio a partir de segmentos de raíces colonizadas. Por tanto, han sido implementados una serie de métodos para la desinfección de las esporas y los segmentos radicales.

Aún cuando, el crecimiento del micelio directamente en medios de cultivo, no se ha conseguido masivamente, es necesario señalar que se ha obtenido el recrecimiento del micelio intraradical en un medio axénico lográndose, además, la formación de numerosas vesículas. Con las técnicas de cultivo *in vitro*, otros autores han observado los cambios morfológicos que ocurren en el recrecimiento hifal, consiguiendo en algunos casos, un ciclo de vida vegetativo de hongos VA en asociación con raíces en medios axénicos.

Los objetivos planteados en este trabajo, se fundamentan en lo antes expuesto y en las experiencias exitosas que se han realizado en relación a la germinación de las esporas y colonización de las raíces en medios axénicos, que han culminado recientemente, en el surgimiento de nuevas metodologías con el propósito de lograr la propagación de los hongos endomicorrízicos vesículo-arbusculares y la colonización *in vitro* de plantas desarrolladas por cultivo de tejidos vegetales.

7.1. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.

Hipótesis de trabajo

* Los componentes de los medios de cultivo influyen en el proceso de germinación de las clamidosporas de *Glomus* sp.

* Dado que, teóricamente, todas las especies de cactáceas son susceptibles de ser micorrizadas, se espera lograr la colonización de las raíces de *Mammillaria huitzilopochtli*.

Objetivo general

* Encontrar el medio adecuado para propiciar, tanto la germinación de las esporas de *Glomus* sp., como las condiciones para obtener la colonización *in vitro* de las raíces de *Mammillaria huitzilopochtli*.

Objetivos particulares

* Probar la efectividad de los métodos de desinfección de propágulos micorrízicos.

* Evaluar los porcentajes de germinación de clamidosporas en distintos medios axénicos agarificados.

* Establecer cuál es el mejor propágulo para obtener la micorrización *in vitro*.

* Desarrollar una técnica que facilite la manipulación de los propágulos, en los ensayos para establecer la micorrización *in vitro* de raíces de *Mammillaria huitzilopochtli*.

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.

2. 1. Germinación y desarrollo de hongos micorrízicos vesículo-arbusculares en medios axénicos.

La germinación de clamidosporas de micorrizas vesículo-arbusculares, ha sido evaluada por muchos autores bajo muy distintas condiciones experimentales. Desde 1957 (b), Godfrey recalca la importancia del cultivo de estos hongos para elucidar su posición taxonómica. Los estudios hechos en medios axénicos, en los que el principal interés es el de analizar las características que favorecen la germinación (tiempo, fisiología, incubación, etc.), han sido analizados en la sección 2. 6. de este capítulo.

Del mismo modo, se han hecho ensayos con otro tipo de propágulos para desarrollar el cultivo de micorrizas VA en medios axénicos. Williams (1984) asevera que, según su experiencia en el trabajo con hongos nativos, la desinfección superficial de segmentos de tejidos colonizados que contienen micelio intraradical, es el mejor inóculo utilizado en cultivos axénicos, mejor aún que las esporas. Biermann & Linderman (1983) aseguran que este tipo de inóculo, así como las vesículas, tienen tan alto potencial como las esporas para producir una rápida micorrización. Strullu & Roman (1986) establecen un método de esterilización para segmentos de raíces de fresa, más no analizan el éxito en la desinfección.

Años después, Williams (1990) intenta establecer el crecimiento de micelio intraradical de *Glomus fasciculatum* en un medio de albúmina de bovino, a partir de segmentos de raíces de poro colonizadas. Obtiene recrecimiento de las hifas hacia el medio después de 1 ó 2 días de incubación a 23°C, además de la aparición de muchísimas vesículas en el tejido a los 5 días. Este desarrollo lo mantuvo hasta después de 5 ó 6 semanas. Posteriormente obtuvo resultados exitosos con *Acaulospora laevis*, *Gigaspora decipiens* y *Glomus mosseae*.

2. 2. Micorrización vesículo-arbuscular *in vitro*.

Existe poca bibliografía relacionada con la micorrización de plantas *in vitro* con hongos vesículo-arbusculares. Normalmente los estudios revisados tratan sobre la inoculación *in vitro* con hongos patógenos (Fereol, 1984; Diner & Mott, 1985) o ectomicorrízicos (Thoen *et al.*, 1990) que son relativamente fáciles de propagar en medios artificiales *v. gr.* la inoculación en gran escala de los pinos utilizados para la reforestación.

Los trabajos de Mosse & Hepper (1975) sobre la germinación de esporas y colonización de raíces crecidas en medios axénicos, abrieron la posibilidad para lograr la micorrización de plantas *in vitro*. No obstante, en estos años, este tipo de investigaciones cobraron poca atención en el ámbito internacional (Chabot *et al.*, 1992).

En 1979, Allen *et al.* establecen cultivos axénicos de *Bouteloua gracilis* con *Glomus fasciculatum*, modificando el medio dado por Mosse & Hepper (1975). Hepper (1981) muestra que hifas de *Glomus mosseae* y *G. caledonium* pueden colonizar una segunda planta introducida al medio agarificado, una vez que se removieron las raíces que permitieron el establecimiento del micelio. Miller & Watrud en 1984, logran la esporulación de *Gigaspora margarita* en un cultivo de raíces de tomate. Mugnier & Mosse (1987b) analizan la colonización micorrízica VA en raíces transformadas, cuyo requerimiento y exigencia nutricional son mínimos y les permite crecer en un medio que es accesible al hongo. En el mismo año, Strullu & Roman cultivan axénicamente endomicorrizas e inoculan posteriormente, raíces de tomate con vesículas.

Del mismo modo, las investigaciones realizadas por Mosse (1966, 1988), Crush & Hay (1981), Strullu & Roman (1986), Burggraaf (1990) y Diop (1990), entre otros; son de gran importancia en el establecimiento de metodologías para lograr la propagación de hongos endomicorrízicos VA y la colonización de plantas de manera axénica.

En otros trabajos prácticos, la micorrización de las plantas se lleva a cabo en el momento del trasplante, donde las condiciones del suelo aseguran la colonización, más no permiten el establecimiento de cultivos axénicos. Morandi *et al.* (1979), analizan el interés que tiene la endomicorrización en la recuperación y el crecimiento de la frambuesa propagada *in vitro*. Chávez & Ferrera (1990) micorrizan plantas de fresa micropropagadas, en el momento de ser transplantadas. Schellenbaum *et al.* (1991) resaltan la importancia de la micorrización vesículo-arbuscular de plantas de vid reproducidas por cultivo de tejidos, como una forma de asegurar un rápido y buen desarrollo radical después del trasplante; ayudando a las plantas en el estrés que sufren por el cambio. Estas investigaciones apoyan la idea de llevar a cabo la colonización de plantas como una manera de asegurar su supervivencia después del trasplante, sobre todo en la condición *in vitro-in vivo*.

Navatel (1982) estudia la problemática ligada a la falta de micorrización del material obtenido por multiplicación vegetativa *in vitro*. Pons *et al.* (1982) establecen la importancia de producir *in vitro* micorrizas vesículo-arbusculares

como un complemento de la micropropagación. Un año después, estos autores ensayan la micorrización *in vitro* en plantas de cereza micropropagadas, afirmando que puede contribuir en el éxito de esta técnica al hacer a las plantas más resistentes al trasplante, además de que juega un papel vital en la nutrición y supervivencia. En este trabajo, se analiza la relevancia que puede llegar a tener la pérdida de la microflora asociada a las raíces de las plantas, durante su propagación *in vitro*. Se enfatiza el poco interés que se ha tomado a la práctica de la colonización en plantas leñosas. Es interesante describir el método de micorrización *in vitro* que desarrollaron. Inicialmente, agregaron al medio de propagación de la planta ácido indol-butírico. Las plántulas de 3 cm con raíces de 1 a 2 cm, se transplantaron al medio de Crush & Hay con agar al 1.5 % y 184 mg/l de K_2HPO_4 ó 150 mg/l de fitato de calcio, al cual se le adicionó suelo arcilloso con pH de 7.2 y 20 ppm de fósforo disponible. Las esporas pregerminadas axénicamente, se situaron cerca de las raíces y se incubaron durante 9 semanas a 16-19 °C, 12 000 lux y un fotoperíodo 16-8. La colonización obtenida fue normal y típica, con el desarrollo de arbusculos, y restringida a las raíces laterales que no estaban suberizadas. Sin embargo, a pesar de que se obtuvo un magnífico sistema radical con los medios empleados, no se lograron altos niveles de colonización. Los autores argumentan que probablemente, el uso de esta especie de hongo, no fue el mejor para colonizar la planta; no obstante de que axénicamente se multiplica muy bien. Este trabajo demuestra que la micorrización *in vitro* con hongos VA, se puede llevar a cabo exitosamente también en plantas leñosas.

Es importante agregar que la obtención de un ciclo de vida vegetativo, completo, de un hongo endomicorrízico vesículo-arbuscular, fue logrado por Bécard & Fortin en 1988. En un medio mínimo, *Gigaspora margarita* completa su ciclo de vida al crecer en asociación con raíces de zanahoria transformadas. Chabot *et al.* en 1992, lograron igualmente la colonización con *Glomus intraradix* en raíces de tomate y zanahoria, obteniendo en primer lugar, la germinación de las esporas y posteriormente, la colonización *in vitro*. Estos autores pudieron observar el desarrollo de estadios de colonización y la formación de vesículas y esporas a partir de las hifas que crecían de los tubos de germinación. Estas esporas germinaron en un 70% (comprobando con esto su viabilidad) y produjeron una nueva colonización que presentó un patrón muy similar al primero. Bajo estas condiciones, lograron producir hasta 700 esporas que inicialmente eran blancas-hialinas, madurando durante dos meses y tornándose amarillas. La colonización de ambos tipos de raíces, desarrolló arbusculos típicos y vesículas hasta en un 10%. Con esta investigación, se establece que no es necesario realizar la pregerminación de las esporas en agar-agua (como Mosse & Hepper (1975) lo recomiendan), puesto que en el medio mínimo, varias especies de hongos VA germinan fácilmente: *Gigaspora gigantea*, *G. margarita*, *Glomus intraradix*. Esto disminuye considerablemente el riesgo de contaminación y el daño de los tubos germinativos.

Las experiencias antes mencionadas, constituyen uno de los más grandes avances logrados en esta materia, puesto que permitirá en un futuro cada vez más cercano, la obtención axénica de cultivos puros de micorrizas VA y la colonización *in vitro* de muy diversas plantas micropropagadas y potencialmente micorrízicas.

2. 3. Micorrizas en cactáceas.

Por lo general, los estudios descriptivos de la micorriza VA, se han limitado a plantas de interés agrícola o a especies que crecen en zonas templadas. Existen menos trabajos que describen la simbiosis en plantas silvestres. Los ecosistemas áridos han sido aún menos investigados (Rincón *et al.*, 1993), por lo que se han hecho muy pocas investigaciones acerca de la simbiosis micorrizica que se establece en las cactáceas.

Ecker (1989) y Rincón *et al.* (1993), han realizado algunos de los estudios sobre micorrizas en cactáceas de las zonas áridas mexicanas, estableciendo el papel fundamental que juega la simbiosis en este tipo de ecosistema. Por su parte, Rincón y colaboradores analizaron la influencia de la micorriza vesículo-arbuscular en la producción de biomasa de un cacto arborescente (*Pachycereus pecten-aboriginum*). Sus resultados observados en el crecimiento de las plántulas, denotan que la micorriza vesículo-arbuscular (*Acaulospora* spp. y *Glomus* spp.) incrementa el vigor del cacto, favoreciendo la absorción de agua y nutrimentos e influye en el establecimiento de las plántulas durante la estación de lluvias.

Por otro lado, Ecker establece la importancia de las asociaciones micorrizicas en la adaptación de las plantas del desierto analizando el papel que juega la micorriza vesículo-arbuscular en dos cactus de los desiertos de Sonora y Arizona: *Toumeyia papyracantha* y *Mammillaria thornheri*.

Concluyendo, podemos decir que, la trascendencia de las simbiosis micorrizicas en la reintroducción de plantas, es fundamental para conseguir el éxito en la adaptación y supervivencia de las plantas. Esto lo demuestran Zajicek *et al.* (1987) y Biermann & Linderman (1983) en plantas que han sido inoculadas previamente antes de ser transplantadas, incrementando su supervivencia, crecimiento e inclusive, su capacidad reproductiva.

2. 4. LAS MICORRIZAS VESICULO-ARBUSCULARES

2. 4. 1. Generalidades.

Las micorrizas son las asociaciones entre ciertos hongos y las raíces de la mayoría de las plantas superiores, en las que la planta suministra fuentes de carbono de la fotosíntesis, así como un nicho ecológico, y el hongo contribuye principalmente en la absorción de algunos nutrientes minerales y en su traslocación a la planta. Debido a que en un principio no se había esclarecido la naturaleza simbiótica de la relación, se utilizaba el término *infección* para denominar el proceso de establecimiento del hongo en las raíces. Recientemente se ha optado por el de *colonización*, debido a que no se presenta un deterioro en la planta como si el hongo fuera un patógeno. En este tipo de simbiosis, dos organismos fisiológicamente diferentes, constituyen un *superorganismo* con morfología y fisiología propias (Plenchette, 1982). Para Azcon-A. *et al.* (1991) las micorrizas son el *órgano* encargado de la captación de nutrientes. Por tanto, se dice que la condición natural de una planta micorrizada es la regla, y la no micorrizada es la excepción.

Las micorrizas vesículo-arbusculares tienen huéspedes muy diversos, por lo que son ubicuas y cosmopolitas. Gozan de una amplia distribución geográfica, razón por cual se les ha llamado *organismos sociales* (Harley & Smith, 1983). Están presentes en plantas con diferentes formas biológicas (hierbas, árboles y arbustos). A pesar de que se ha observado que tienen preferencia por la colonización de herbáceas, y los otros tipos de micorrizas para plantas leñosas; la incidencia de la micorriza VA en plantas leñosas también es alta (Alwis & Abeybayake, 1987; Baylis, 1961). Aunque algunas plantas responden mejor a la colonización por ciertas especies de hongos VA (Mosse, 1973) o bien, los hongos están más adaptados a especies forestales y agrícolas; estas características los diferencian enormemente de los hongos patógenos que son altamente específicos. Palacios *et al.* (1987) encuentran un beneficio diferencial para dos variedades de cebolla al utilizar distintas especies de hongos endomicorrízicos. Chávez & Ferrera-C. (1990) observan que la respuesta a la colonización en diferentes cultivares de fresa, depende de la combinación huésped/hospedero. A esto se le ha llamado *efectividad del endófito* (Palacios *et al.*, 1987).

Así mismo, se da el caso de que algunas plantas forman varios tipos de micorrizas, como sucede en *Prunus*, *Acacia*, *Casuarina*, etc. y plantas que desarrollan normalmente ectomicorrizas, presentan individuos con micorrizas VA como el eucalipto (Harley & Smith, 1983). El micotrofismo de una planta está dado por la dependencia que tiene de la simbiosis para producir su máximo crecimiento y desarrollo, existiendo algunas plantas como *Citrus* altamente micorrizo-dependientes. Gerdemann (1975) define la dependencia micorrízica como: *el grado en el que una planta requiere de la condición micorrízica para producir el máximo crecimiento a un nivel dado de fertilización del suelo.*

2. 4. 2. Relación endófito-hospedero: morfofisiología de las micorrizas VA.

En las raíces de las plantas existe una zona naturalmente constituida por la asociación y convivencia de microorganismos (bacterias, hongos, protozoarios), nemátodos y partículas del suelo, así como exudados radicales y otras estructuras de la raíz (pelos absorbentes). Todos éstos conforman un halo alrededor de la misma denominado *rizoplana*. Normalmente, las plantas que crecen en suelos naturales establecen un balance en la toma de nutrimentos, el pH del suelo, su forma de crecimiento y la convivencia con microorganismos rizosféricos, formando un nicho en el que el equilibrio permite la armonía conjunta de cada una de estas partes. Las enfermedades incidentes en las raíces por parte de patógenos del suelo, no forman parte de este equilibrio y confieren morfologías muchas veces típicas o anormales. En el caso de colonizaciones micorrízicas, la penetración de los tejidos por el hongo tiene una estructura muy bien caracterizada en patrones comunes a la planta y al hongo. La micorriza vesículo-arbuscular origina cambios fisiológicos en la raíz (Azcon-A. *et al.*, 1991), a diferencia de los otros tipos de micorrizas en donde los cambios ocurren a nivel fisiológico (Hardie & Leyton, 1981).

La micorriza vesículo-arbuscular tiene tres componentes principales: la raíz, el hongo y el micelio extramatricial en el suelo (Harley & Smith, 1983). Debido a que son simbioses obligados, no crecen sin el primer componente. En esta asociación, el hospedero es totalmente autotrófico en carbono y la micorriza presenta una cortísima fase saprofítica en la que germinan las esporas y las hifas crecen dirigiéndose a la raíz (Smith & Bowen, 1979).

a. Establecimiento de la colonización.

La colonización de las raíces por estos hongos requiere de una observación microscópica que preferentemente se evidencia mediante tinción. La colonización se desarrolla a partir de la germinación de las clamidosporas o del micelio de una raíz previamente colonizada. Las clamidosporas resisten el estrés por sequía y otras condiciones desfavorables del suelo, germinando cuando éstas son propicias. Los tubos de germinación producidos penetran en la raíz huésped a través de los apresorios, constituyendo los *puntos de colonización*. Posteriormente, se desarrollan las hifas que se ramifican intercelularmente sin invadir la endodermis, los tejidos vasculares ni los meristemos, y estableciéndose a cierta distancia del ápice o zona meristemática (Holley & Peterson, 1979). Las regiones suberizadas no son susceptibles a la penetración (Sanders & Sheikh, 1983) ni tampoco los tejidos con clorofila (Ocampo, 1980). Los puntos de colonización también se pueden establecer mediante hifas de otros propágulos, constituyendo a lo largo de la raíz, las *unidades de colonización*.

Posterior al contacto con las células epidérmicas de la raíz (o inclusive con los pelos absorbentes), se desarrollan los *arbuscúlos* que son estructuras que se invaginan hacia el interior de las células corticales rodeando el haz vascular. Los arbuscúlos se ramifican dicotómicamente (en forma similar a como lo hace un

arbusto) hasta la formación de hifas con diámetro menor de 2 micras, lo que aumenta enormemente el área de interfase entre los dos organismos (Harley & Smith, 1983).

Los arbuscúlos tienen un alto contenido vacuolar y en el momento en que se forman, el núcleo de la célula vegetal se alarga y divide, lo que indica un incremento en la actividad fisiológica del hospedero y en la cantidad de RNA y DNA sintetizados. Son las estructuras más importantes en la simbiosis puesto que es a través de ellos que se realiza la transferencia de fosfatos y otros nutrientes provenientes de las hifas. El tiempo de vida de los arbuscúlos varía entre los 4 y 15 días (Bevege & Bowen, 1975; Cox & Tinker, 1976) en los que la transferencia de metabolitos es bidireccional. La traslocación se hace por medio de los gránulos de polifosfato que se depositan en sus vacuolas y que son degradados por la célula vegetal al momento de digerir a los arbuscúlos con todo y su contenido (Azcon-G. & Barea, 1987). Este tipo de degeneración también ha sido observada en micorrizas orquídeas y ericáceas, no así en relaciones parasitarias (Pegg & Vessey, 1973) reflejando que la longevidad de las células vegetales no se ve afectada en la colonización por hongos VA (Harley & Smith, 1983) (Fig. 1).

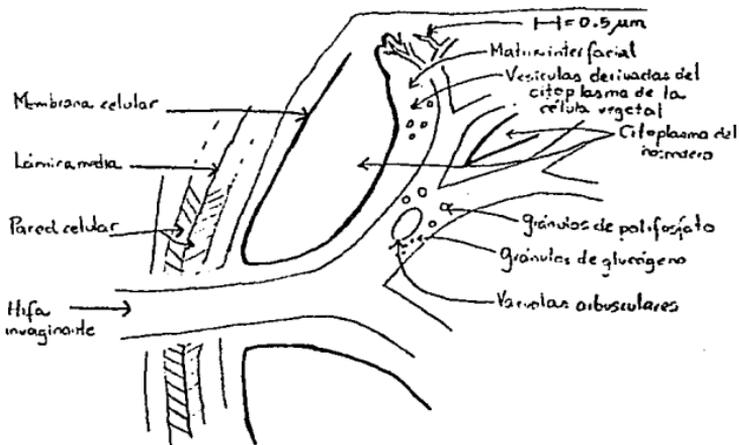


Fig. 1. Representación esquemática de la morfología de un arbuscúlo invadiendo una célula vegetal.

Simultáneamente al desarrollo arbuscular, se presentan las **vesículas** que son estructuras de reserva que contienen lípidos. Se forman inter e intracelularmente a la raíz en regiones de colonización maduras (Carling & Brown, 1982). Al mismo tiempo, el micelio externo crece y se extiende, constituyendo un sistema de

absorción de nutrimentos con clamidosporas y esporocarpos (Azcon-G. & Barea, 1987). Hepper (1981) confirma que el crecimiento micelial fuera de la raíz precede a la formación de algunos arbusculos en las células, ya que el requerimiento de nutrientes por el hospedero, necesita del micelio para la transferencia de los mismos a las células vegetales.

De esta manera, los arbusculos y las vesículas constituyen las estructuras fisiológicas más conspicuas en este tipo de micorriza, dándole origen a su nombre. A pesar de esto, Daft *et al.* (1975) observan que no todos los hongos vesículo-arbusculares desarrollan vesículas (o raramente las presentan), por lo que actualmente se les llama solamente *micorrizas arbusculares*.

Las colonizaciones micorrízicas secundarias se caracterizan por presentar apresorios típicos, hifas corticales y el desarrollo de micelio externo; aumentando las interconexiones entre la colonización intraradical y la extramicelial (Hepper & Smith, 1983). Las colonizaciones secundarias dependen de los compuestos de carbono trasladados por el hospedero; mientras que en las otras, los puntos iniciales de crecimiento se originan a expensas de las reservas de las esporas o propágulos (Sanders & Sheikh, 1983).

El término de la simbiosis no siempre sucede cuando la raíz es senescente o muere. Regiones seniles de colonización fúngica apuntan cambios citológicos como la progresiva vacuolización de las hifas y su seccionamiento (Harley & Smith, 1983).

b. Intensidad de la colonización.

La intensidad de la colonización micorrízica depende de varios factores, entre los que caben destacar:

- (1) El estado fisiológico de ambos simbiotes.
- (2) El número de propágulos viables en el suelo.
- (3) La tasa de crecimiento de las raíces.
- (4) Condiciones ambientales.
- (5) La dependencia micorrízica.

(6) La efectividad endófito/fotobionte o el grado de compatibilidad entre ambos.

La evaluación de la colonización de una raíz se mide en porcentajes, y puede ser estimada de diversas formas. Bethlenfalvay *et al.* (1982b) calculan la colonización a través de la masa de micelio extramatricial que refleja el incremento de micelio interno. Sanders & Sheikh (1983) construyen un modelo matemático

en el que se contempla la probabilidad que existe de que un propágulo cercano a la raíz la colonice y que está en relación al número de propágulos existentes en el suelo. De este modo, es posible estimar el número de puntos de colonización probables.

En un sistema de raíces dado en un volumen de suelo, la tasa de aparición de puntos de colonización depende de la densidad y viabilidad de los propágulos; de la tasa de germinación y crecimiento de los mismos; de la tasa de crecimiento de la raíz y del crecimiento radial de las hifas para encontrar la superficie de ésta.

2. 4. 3. Factores que determinan la colonización.

Entre los factores más importantes que determinan la colonización de las raíces por estos hongos, están las características del suelo, las cuales influyen en el potencial colonizador del hongo micorrízico. La estructura, textura, contenido de materia orgánica, pH, fertilización, humedad, estatus nutricional y evolución del suelo, afectan directamente su crecimiento así como la distribución y cantidad de esporas (que se encuentran en las capas menos profundas porque son muy susceptibles a la oxigenación).

Los hongos micorrízicos son muy sensibles al pH del suelo, el cual afecta directamente la disponibilidad de los nutrimentos (Furlan, 1981) y la propensión de las plantas a las enfermedades (Couch & Bloom, 1958). A pesar de que se han encontrado hongos micorrízicos vesículo-arbusculares a un pH de 2.7 (Daft *et al.*, 1975) y 9.2 (Bowen, 1980), un suelo ácido es un suelo fungistático para las esporas de estos hongos. En este caso, la adición de caliza incrementa la colonización de las raíces, el índice de germinación y el crecimiento de los tubos germinativos (Siqueira *et al.* 1984).

La micorriza vesículo-arbuscular, es muy sensible al fotoperiodo e intensidad luminosa a la que esté expuesta la planta (Boullard, 1959) puesto que, generalmente, un aumento en la fotosíntesis, trae consigo una mayor producción de fotosintatos y con ello un máximo desarrollo de la colonización (Harley, 1969). Esto se debe a que más del 10 % de los productos de la fotosíntesis elaborados por el hospedero que se traslocan bajo la tierra, se gastan en el crecimiento hifal y respiración (Pang & Paul, 1980; Paul & Kucey, 1981; Stribley *et al.*, 1980).

La idea de que las micorrizas rempazan la función que tienen los pelos absorbentes de las raíces, fue moldeada a finales del siglo pasado. Generalmente, se afirma que plantas con pocos pelos absorbentes, como la cebolla y el limón, son aparentemente más susceptibles a la colonización que las que desarrollan un buen sistema de pelos radicales (Crush, 1974; Harley & Smith, 1983). Baylis (1967) justifica de este modo, la ausencia de colonización en algunas familias (Cruciferae, Juncaceae). Chilvers & Daft (1981) manifiestan que hay una mutua exclusión entre los pelos absorbentes de las raíces y la micorriza. Sin embargo, otros tipos de micorrizas con una fisiología muy similar (ericoides), deberían desarrollar el mismo esquema, lo cual no ocurre. Actualmente, se piensa que esta es una ventaja adicional que otorga la micorriza, la cual es aprovechada más eficazmente por este tipo de plantas (Harley & Smith, 1983).

Por otro lado, el efecto del entorno nutritivo es muy importante. Daft & Nicolson (1966b, 1972) demuestran por vez primera que el desarrollo de raíces colonizadas y su efecto en la planta, es mayor en suelos con un bajo o no balanceado estatus nutricional, particularmente con poco fósforo. Altos niveles de fósforo y nitrógeno están asociados con una disminución en la colonización tal y como sucede en suelos altamente fertilizados (Mejstrik, 1965). Trinick (1977) y Daniels & Trappe (1980) demuestran que añadir pequeñas concentraciones de fósforo al suelo decremantan la colonización aunque la germinación de las esporas no se ve afectada. Sanders (1975), sugiere que no son los niveles altos en fósforo del suelo los que impiden el establecimiento en sí de la colonización micorrízica, sino el incremento del mismo en los tejidos de la planta por lo que ya no requiere del hongo. Palacios-M. *et al.* (1987) observan un incremento de fósforo mayor al 100 % en plantas de cebolla colonizadas por *Glomus fasciculatum*.

También se debe considerar que una pobre o nula colonización en suelos agrícolas, se puede deber a la adición de pesticidas y fumigantes que matan los propágulos del suelo (Menge, 1982). Esto podría provocar el enanismo observado por algunos investigadores en cultivos que se desarrollan sin micorrizas, lo cual no ha sido atribuido a una alteración en los nutrimentos del suelo (Kleinschmidt & Gerdemann, 1972; Plenchette, 1982). Así mismo, las auxinas, las citoquininas y giberelinas presentes en los tejidos de la planta, son otro factor importante en la colonización puesto que regulan la formación de raíces y repercuten en el número de arbusculos y vesículas en el momento en que se lleva a cabo la defoliación.

Otros factores que repercuten en el éxito de la colonización, están relacionados con el genotipo del huésped y el reconocimiento bioquímico, y la capacidad colonizadora del hongo.

2. 4. 4. Entidades de colonización: propágulos de micorrizas VA.

En algunos suelos cuyas plantas presentan una alta colonización con hongos vesículo-arbusculares, la cantidad de esporas en el mismo es ínfima, lo que sugiere que existen otras fuentes de inóculo (Harley & Smith, 1983). A continuación se describen las estructuras con las que se propagan los hongos micorrízicos vesículo-arbusculares.

Clamidosporas. Son las esporas de resistencia con las que se reproducen comúnmente las micorrizas vesículo-arbusculares. Hay que aclarar que no se conoce la reproducción sexual en estos hongos. Las paredes de las clamidosporas son gruesas, normalmente pigmentadas y se forman en los extremos terminales de las hifas vegetativas (Azcon-A. *et al.*, 1991). La taxonomía de estos hongos está basada en las características morfológicas de las esporas tales como: tamaño, coloración, forma, número de capas constituyentes (murología) y características germinativas (número y grosor de tubos de germinación). Los únicos géneros que forman este tipo de esporas son *Glomus* y *Sclerocystis* (Sieverding, 1983). Además,

el género *Glomus* produce esporas *ectocárpicas* (dispersas en el suelo) y/o *endocárpicas* (agrupadas en esporocarpos) (Azcon-A. *et al.*, 1991).

Las clamidosporas son el propágulo que más se utiliza en las investigaciones que se llevan a cabo con este tipo de micorrizas. Esto se debe a que: permiten asegurar su viabilidad, edad, uniformidad y especie (establecimiento de cultivos monospóricos) y a su factible manejo en condiciones de laboratorio siendo posible su desinfección sin dañar su fisiología (Fig. 2a).

Esporocarpos. Los esporocarpos son estructuras de resistencia que albergan un conjunto de clamidosporas organizadas en un esferoide compactado por micelio.

El trabajo con este tipo de propágulo nos permite la obtención de una buena cantidad de esporas vivas, sanas, uniformes y potencialmente colonizadoras. Algunas especies de *Glomus* forman esporocarpos tanto en campo, como en invernadero (Thaxter, 1922; Gerdemann & Trappe, 1974, Tandy, 1975, Hall, 1977). Los géneros *Acaulospora*, *Gigaspora* y *Entrophospora* no forman esporocarpos (Sieverding, 1983) (Fig. 2b).

Vesículas. Estas son estructuras de almacenamiento de reservas nutritivas en forma de lípidos. Las vesículas permanecen en *quiescencia*, que es un estado similar a la dormancia de las esporas y que no implica una maduración fisiológica. De este modo, persisten en raíces muertas y según Harley & Smith (1983) germinan similarmente a como lo hacen las esporas externas.

Si bien, Biermann & Linderman (1983) utilizan vesículas como inóculo y Strullu & Roman (1987) cultivan axénicamente vesículas observando su asociación con raíces de tomate; actualmente se duda de su naturaleza reproductiva por lo que no es el mejor propágulo para la inoculación experimental.

Micelio. El micelio de un hongo micorrízico VA está formado por hifas extramatriciales e intraradicales de muy diferentes diámetros. Dowding (1959) y Tommerup & Abbott (1981), detectan la supervivencia de las hifas vegetativas en raíces senescentes o muertas posterior a los seis meses, lo que habla de su enorme potencial colonizador en campo.

Sin embargo, para trabajos en laboratorio, si no se tiene una certeza del origen del material con el que se trabaja, o un perfecto conocimiento de las características del micelio de la especie en particular (grosor, ramificación coloración, etc), no se debe considerar como inóculo particularmente en trabajos taxonómicos.

Raíces colonizadas. Las raíces colonizadas contienen hifas, vesículas y esporas que son propágulos potenciales por lo que aumentan las posibilidades colonizadoras de este tipo de propágulo. En la práctica común, se usan extensamente para que las plantas adquieran la micorriza (Harley & Smith, 1983). Además permiten asegurarnos de la pureza del aislado de hongo con que se trabaja para establecer un cultivo monoespecífico. Tanto las raíces viejas como

las jóvenes, sirven como fuente de inóculo en trabajos experimentales (Biermann & Linderman, 1983; Williams, 1990) (Fig. 2c).



Figura 2. Microfotografías de propágulos de micorrizas VA: a. Racimos de clamidosporas de *Glomus* sp. b. Esporocarpio. c. Raíz senescente de poro (*Allium porrum* L.) colonizada por *Glomus* sp. Tomadas por A. Gamboa.

2. 4. 5. Beneficios que aportan a las plantas, las asociaciones micorrízicas del tipo V.R.

Normalmente, los beneficios que conlleva la micorriza vesículo-arbuscular a las plantas, no se presentan si las condiciones no son las adecuadas para que la planta hospedera se desarrolle. Si las condiciones ambientales son adversas, el beneficio de la micorrización se puede ver anulado. Contrariamente, este beneficio se manifiesta cuando la planta está favorecida (Varela, 1984).

Con la micorrización se espera:

- * Un incremento en la cantidad de fósforo en los tejidos.
- * Un verde intenso en el follaje y una mayor superficie foliar debido a que las plantas aumentan su tasa fotosintética (Dehne; 1978; Levy & Krikun, 1980).
- * Un mayor desarrollo radical y raíces con un tiempo de funcionalidad y actividad mayor debido a que tienen más energía metabólica. Esto refleja un incremento en la biomasa del tallo; un mejor desarrollo del sistema vascular; una mejora en la producción de flor y fruto *v. gr.* Daft & Okusanya (1973), Daft & El-Giahi (1975), Schoenbeck & Dehne (1979), Berthau *et al.* (1980).

Todos estos cambios se han atribuido a una mejora en la nutrición mineral de la planta, que no siempre resulta con la adición de fertilizantes (Harley & Smith, 1983).

El flujo de nutrimentos en un sistema micorrízico es de 2 a 5 veces mayor que en un sistema no micorrízico (Sanders & Sheikh, 1983), puesto que se deben considerar dos componentes: el hongo y la raíz por sí misma. La eficacia en la captación de fosfatos de una planta micorrizada es cuatro veces mayor que la de una que no lo está, ya que el micelio proporciona una superficie extra de absorción y un mayor volumen de suelo a explorar (*v. gr.* las hifas de *Glomus* pueden extender la zona de captación al menos 7 cm y cada centímetro puede tener hasta 80 cm de hifas externas (Azcon-G. & Barea, 1987; Gerdemann, 1975). Sanders *et al.* (1977) y más tarde Graham (1982), notan que, una vez que el hongo se ha establecido, la tasa de absorción de fosfato por las hifas está relacionada con el crecimiento del micelio externo. La velocidad de difusión de los iones de fosfato desde el suelo no rizosférico hacia la raíz, es inferior a la de absorción de los mismos por parte de la planta, por lo que se genera una *zona de agotamiento* (Azcon-G. & Barea, 1987; Nye & Tinker, 1977). Las micorrizas no hacen que el fósforo insoluble se solubilice puesto que también lo toman de la reserva soluble disponible, sino que aceleran el rompimiento del equilibrio que existe entre ambas formas de iones y, por lo mismo, más rápidamente se renueva la cantidad disponible para establecer nuevamente este equilibrio. Por lo que las plantas que tienen una alta demanda en fósforo (como las leguminosas) y las de sistema pobre

radical, se ven muy favorecidas por la micorrización. Prácticamente todos los géneros de leguminosas no fijadoras, presentan endomicorriza.

Además, la micorriza juega un papel importante en el control de enfermedades de la raíz, ya que produce sustancias antibióticas; ocupa un nicho ecológico y disminuye la probabilidad de que se establezca cualquier patógeno al competir mediante barreras mecánicas y químicas por un mismo habitat (Baradas & Halos, 1980). Como consecuencia se reducen en un 58% la severidad de las enfermedades de las plantas. Los exudados de las plantas micorrizadas, además de evitar la intervención de algunos microorganismos patógenos, favorecen la de las bacterias solubilizadoras de fosfatos (Azcon-G. & Barea, 1987).

En general, las plantas con micorriza soportan mejor el transplante, la sequía, la toxicidad y la salinidad. Por estos motivos, la inoculación artificial se realiza en horticultura, floricultura, silvicultura, agricultura y en plantas ornamentales. Rich & Bird (1974) enfatizan que la micorrización temprana en plantas de cultivo es importante para acelerar su crecimiento. Las normas de estandarización y producción del hongo deben perfeccionarse para que se lleve a cabo la inoculación masiva en ecosistemas agrícolas u hortícolas (Harley & Smith, 1983; Abbot & Robson, 1982; Cox & Robson, 1980).

Existen trabajos en donde se indica que la micorriza ayuda también en la absorción de otros elementos como Zn, S, Sr, K, Cu y en algunos casos de N (Guzman-P. & Ferrera-C., 1990; Possingham & Groot, 1971). Al respecto, Mosse en 1957 observa en semillas de manzana, un incremento por unidad de peso en la cantidad de potasio, hierro y cobre en de plantas micorrizadas.

2. 5. CULTIVO IN VITRO

2. 5. 1. Micropropagación de especies vulnerables.

Los conocimientos generados en biología vegetal a lo largo de este siglo, han permitido la implementación de técnicas biotecnológicas, que han contribuido a la resolución de problemas que acosan a las poblaciones humanas en el transcurso de los últimos años. La manipulación genética para lograr vegetales resistentes a plagas y condiciones ambientales desfavorables, la creación de variedades que aporten más elementos nutricionales a la dieta, la producción de clones de plantas transformadas, la producción de compuestos naturales, la criopreservación de genomas de especies en extinción, la obtención de líneas celulares de plantas comestibles o medicinales libres de alcaloides tóxicos, etc.; se han implementado con resultados a corto plazo.

Uno de los aspectos más interesantes y potencialmente aplicables de la biotecnología vegetal, es la micropropagación o cultivo de tejidos vegetales para el reestablecimiento de poblaciones naturales de plantas endémicas o en peligro de desaparecer (Raven, 1976; Wockock, 1981; Rubluo, 1992) o bien de especies difíciles de domesticar. Propagar una especie para salvarla de las garras de la extinción, es un asunto muy complejo y que debe considerar distintas problemáticas conjuntas a la desaparición. Ecker (1989) enfatiza la dificultad de la reintroducción de especies a sus hábitats naturales y analiza que es uno de los puntos más riesgosos en el éxito de la propagación de especies vulnerables. Propone un estudio completo de las condiciones ambientales de donde procede la especie, contempla aspectos relacionados con asociaciones simbióticas que no son consideradas al momento de llevar a cabo la reintroducción, *particularmente las de tipo micorrízico* que son tan extendidas mundialmente y tan necesarias para la mayoría de las plantas.

La reincorporación de la especie a su ambiente natural, es de las partes más importantes en la micropropagación así como la más vulnerable, puesto que de nada serviría en este caso, tener miles de individuos dentro de frascos en una cámara de crecimiento, si no se pueden reintroducir exitosamente a su hábitat natural.

En México, pocas son las especies amenazadas en las que se ha ensayado su recuperación a través de la micropropagación. Tal es el caso de *Mammillaria san-angelensis* (Martínez & Rubluo, 1989) y *Mammillaria huitzilopochtli* (Rubluo et al., 1990) que han sido rescatadas y que están dentro de los dos grupos de plantas más fuertemente amenazados en México como lo son cactáceas y las orquídeas. Para esto, Rubluo y colaboradores (1985, 1990, 1991, 1992) han diseñado toda una metodología de rescate de plantas en peligro a través del cultivo de tejidos, considerando además de los factores experimentales, el análisis sociológico de las principales causas de extinción de la especie y estudios de impacto ambiental referentes al costo, evaluación y legalidad necesarias en el proceso de rescate.

2. 5. 2. Cultivo *in vitro* de *Mammillaria*.

Carey (1980) analiza el problema de la amenaza de extinción para las cactáceas estableciendo que una de las principales causas se debe a la sobreexplotación de las poblaciones naturales con fines comerciales. La belleza extraordinaria de los individuos de esta familia ha sido motivo de brutales saqueos (aún en reservas y parques Nacionales en los Estados Unidos) para ser altamente cotizadas en el mercado Japonés y Alemán.

Debido a que son pocas las investigaciones realizadas en el cultivo *in vitro* de cactáceas, todavía son menores los estudios realizados en la propagación de especies del género *Mammillaria* (Johnson & Emino, 1979; Martínez-V. & Rubluo, 1989; Rubluo *et al.* 1990). Los trabajos realizados por estos últimos en la propagación de cactáceas *in vitro*, sugieren partir del uso del medio nutritivo Murashige & Skoog puesto que en él se ha obtenido una respuesta generalizada en esta familia. Un factor importante que debe estar presente en el medio son las citocininas que son indispensables para su crecimiento (Clayton *et al.*, 1990) ya que es posible que las cactáceas cultivadas *in vitro* sintetizen internamente auxinas (Rubluo & Flores, 1990). Rubluo *et al.* (1990) han logrado la micropropagación exitosa de *Mammillaria huitzilopochtli* (una especie en extinción) en el medio anteriormente citado, siendo uno de los pocos trabajos en donde se ha obtenido la micropropagación de una especie de este género.

Debido a que en este trabajo se tiene interés de llevar a cabo la colonización *in vitro* con hongos micorrízicos de las raíces de una especie de este grupo de plantas, se analizará brevemente las características del sistema radical de esta familia.

a. Morfología de las raíces

Las mamilarias, no alcanzan grandes alturas, creciendo en los primeros años rápidamente a lo largo contrayéndose en su parte basal y posteriormente acumulando peso hacia los lados, por lo que desarrollan de este modo, una forma corta globular (Buxbaum, 1950).

El sistema radical que presentan normalmente las cactáceas es muy similar al de las demás dicotiledóneas (Reiche s.f.). Su profundidad es menor a los 50 cm y se lignifica prontamente. Buxbaum (1950) hace una descripción general de las raíces: las que están maduras son similares al tejido del tallo que es más compacto y denso hacia el centro, por lo que el parénquima se reduce en este patrón siendo nulo en este punto. En tempranos estadios de crecimiento, una peridermis recubre las jóvenes raíces en una capa envolvente. En *Mammillaria*, los tubos laticíferos pueden establecerse en el parénquima cortical. Las especies de poca altura, presentan raíces laterales y/o profundas dependiendo del ambiente en el que se encuentren (Schumann, 1899): las cactáceas con un sistema de raíces laterales, están bien adaptadas para absorber rápidamente el agua en las lloviznas (Buxbaum, 1950). Las raíces napiformes de las cactáceas están modificadas para la preservación del agua, siendo muy comunes en regiones áridas o en plantas

con un tallo muy reducido. Algunas especies de *Mammillaria*, presentan este tipo de raíz. Otras especies de cactáceas epifitas, desarrollan raíces adventicias aéreas para absorber agua del aire y al ponerse en contacto con el suelo, crecen como las otras raíces. De otra forma, se lignifican rápidamente, rompiendo la estructura del xilema en las contorsiones que sufren y sirven únicamente como estructuras sustentoras (Buxbaum, 1950).

b. Morfología de las raíces de *M. hutzilpochtli* *in vitro*.

El enraizamiento de los individuos logrados *in vitro*, es uno de los objetivos más importantes en este tipo de cultivo puesto que esto les asegurará su supervivencia en un medio donde los nutrimentos necesitan ser adquiridos a través del desarrollo de un buen sistema radical. En algunas especies una vez que el individuo se ha diferenciado, se logra que se generen primordios de raíz y raicillas mediante la simple resiembra. Sin embargo, otras veces es necesario agregar al medio fitohormonas para inducir la generación de raíces.

En el caso de la propagación de *Mammillaria san-angelensis*, la obtención de un sistema radical *in vitro* se logró fácilmente, sin la necesidad de hormonas, no así en el caso de *M. hutzilpochtli* y *Aztequium ritteri*, especies en la que ha sido necesario el empleo de auxinas aún sin muy buenos resultados (Rubluo, 1992).

El sistema radical que desarrollan en el medio de cultivo está formado por raíces principales que se extienden lateralmente hasta alcanzar dos o tres veces el tamaño del ejemplar. Son delgadas y fibrosas con yemas de brotes alternos a lo largo del eje de las raíces primarias de las cuales emergen en el extremo, decenas de largos pelos absorbentes. La epidermis también está cubierta de múltiples y finos pelos absorbentes que no se logran percibir en el medio, dando la impresión de que existe una superficie lisa. Las raíces lignifican muy rápidamente y debido a que en los cultivos la luz incide en las raíces a través del medio translúcido, muchas de ellas eran clorofilicas.

Otra característica observada, es que a pesar de la humedad del aire (que suele llegar hasta el 100%), algunos individuos desarrollan raíces aéreas con múltiples vellosidades a lo largo del eje principal. Figura 3.

2. 5. 3. Manipulación de algunas plantas *in vitro* con microorganismos.

Uno de los aspectos relevantes en el trabajo *in vitro*, es la interacción con microorganismos bajo condiciones controladas. Estudios realizados con bacterias revelan la trascendencia de estas investigaciones. El aislamiento, cultivo y purificación de aislados de hongos y bacterias para su posterior trabajo en laboratorio, son de las prácticas que más se realizan en muchas investigaciones.

Los trabajos llevados a cabo con cultivos *in vitro*, han permitido estudiar fenómenos como embriogénesis somática, mutagénesis, fitopatología, producción de metabolitos secundarios, hibridación, organogénesis, etc. Este tipo de investigaciones han permitido observar el crecimiento indefinido de las plantas,

la totipotencialidad celular, la universalidad de la estructura de la membrana, la variación somaclonal y la producción de metabolitos secundarios (Constable, 1993).

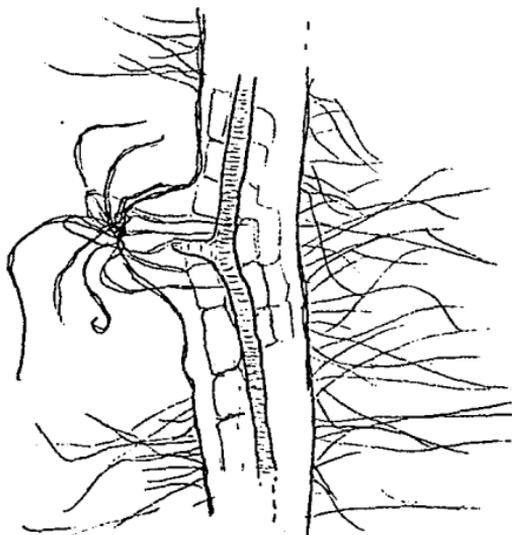


Figura 3. Representación esquemática de la raíz de *Mammillaria huitzilpochtli* observada por aclaración y tinción según técnica modificada de Phillips & Hayman (1970). Se observan los múltiples pelos absorbentes desarrollados en el extremo de los pequeños y numerosos brotes adventicios.

Los estudios de colonización con hongos endomicorrícicos *in vitro* podrían ayudar a investigar: (1) el estudio de cómo se da la colonización de las raíces sin la interacción de factores asociados; (2) la obtención de cultivos puros específicos de una especie de hongo particular para la colonización de plantas de interés comercial y agronómico; (3) el control en la inoculación de plantas axénicamente sin problemas de contaminación que son acarreados en el uso de las técnicas de inoculación tradicional con propágulos del suelo; (4) el papel que juega la micorriza en el control de enfermedades radicales; (5) la producción de antibióticos por el hongo que inhiben el crecimiento de cierto tipo de microorganismos; (6) en estudios de biología molecular y bioquímica que describan los mecanismos genéticos y químiotácticos por los que se regula esta importante asociación; etc.

Se han logrado grandes avances con la manipulación *in vitro* de microorganismos. Sin embargo, la interacción de dos especies en un sistema controlado es bastante complejo. La utilización de virus y bacterias de *E. coli* para el estudio y la manipulación del código genético, es uno de los ejemplos más conocidos. La inoculación de cepas puras de *Rhizobium* en cultivos *in vitro*, ha tenido gran importancia en el descubrimiento de las interacciones genéticas y moleculares que se llevan a cabo en la fijación de nitrógeno.

Sin embargo, el potencial práctico no ha sido explotado en todas sus posibilidades. Recientemente, se inoculan especies de pinos con cepas purificadas de hongos ectomicorrízicos, para llevar a cabo la reforestación de bosques. Estudios de este tipo con micorrizas VA, apenas se están estableciendo (Pons *et al.* 1982; Navalet, 1982, etc.) debido a que la eliminación total de los microorganismos en un sistema biológico, muchas veces ha propiciado el éxito o el fracaso. Es difícil lograr la interacción de dos o tres individuos de diferentes especies en un cultivo puro, puesto que son varios los factores que pueden favorecer a una especie y no a la otra. En este sentido, caben mencionar las ventajas y desventajas que puede tener la inoculación *in vitro* con micorriza vesículo-arbuscular.

Micorrización VA *in vitro*

Ventajas:

- * Se puede aplicar tanto en la micropropagación de cultivos ornamentales, comestibles o medicinales, como en plantas de difícil o lenta propagación y/o en extinción.
- * Incrementa la supervivencia de las plantas en el momento del trasplante.
- * Las plantas micorrizadas están más protegidas contra patógenos de la raíz.
- * Se puede realizar un seguimiento de la colonización, desde sus primeros estadios.
- * Se tiene un control de las condiciones ambientales y nutricionales.

Desventajas:

- * *In vitro*, se elimina la influencia de los microorganismos nativos del suelo y de la rizosfera.
- * Se suprime la influencia de las propiedades del suelo.
- * Se puede afectar la respuesta por la situación de estrés en el que se encuentran las plantas *in vitro*.
- * En estas condiciones, no es posible obtener el ciclo de vida completo de la planta (en el caso de estudios de seguimientos de colonización en plantas anuales).
- * Se requiere de mucho tiempo y trabajo en el manejo de las técnicas.

Finalmente, se pueden establecer algunas diferencias importantes entre el cultivo de células vegetales y los cultivos de microorganismos relacionadas con este trabajo:

- * La tasa de crecimiento de los microorganismos es rápida duplicándose en horas y para las plantas, el tiempo requerido es de días lo que conduce a la obtención de cultivos largos en los que se debe llevar a cabo la inoculación en el momento preciso para no correr el riesgo de que se contamine.

- * La aereación requerida en cultivos de microorganismos es más alta que en la de las plantas porque tienen un menor requerimiento, lo que es un problema importante en el establecimiento del hongo micorrízico que es muy sensible a la oxigenación.

- * El tamaño celular difiere de 1 a 10 micrómetros para los microorganismos y de 10 a 100 para las plantas, lo que repercutiría en la observación microscópica de las estructuras en el medio de cultivo.

2. 6. GERMINACION DE ESPORAS

2. 6. 1. Proceso de germinación de esporas.

Es un hecho que las esporas germinan fácilmente en agua, por lo que *no precisan de ningún estímulo proveniente de las plantas o microorganismos del suelo*. Entre Los factores que inducen o favorecen la germinación, están todos aquellos cambios en las condiciones fisicoquímicas del medio (Azcon-A. *et al.*, 1991). La germinación espontánea en ausencia de hospederos, resultaría paradójica si consideramos la naturaleza obligada del simbionte y podría traer como consecuencia, el agotamiento del inóculo en el suelo (Koske, 1981a).

El metabolismo de la germinación ha sido hipotetizado por Siqueira en 1987, quien sugiere que se dispara al activarse proteasas existentes en la membrana en el momento de imbibir a las esporas. Tommerup (1985) establece que la hidratación de las esporas es el principal proceso metabólico que precede a la incubación y germinación, y se da inmediatamente después de que éstas son lavadas. Al absorber el agua, aumentan su volumen de un 40 a 100%, alterando las propiedades biofísicas de la membrana y modificando la configuración espacial y la actividad de la enzima que se encuentra en ella. Las proteínas de reserva que están en el citoplasma, comienzan a ser hidrolizadas dejando aminoácidos libres que formarán nuevas proteínas. De este modo, se desencadena el metabolismo y se comienzan a degradar los lípidos de reserva (de triglicéridos a ácidos grasos) cuyo contenido varía entre un 45 y 70 %. A los 15 minutos, comienza la síntesis de RNA y entre los 35 y 45 minutos, la de proteínas, aminoácidos, carbohidratos, ácidos orgánicos y ATP. Pasadas de 5 a 14 horas, se sintetizan lípidos y polisacáridos (Azcon-A. *et al.*, 1991; Bellby & Kidby, 1982). Simultáneamente, ocurre la división de los núcleos (Sward, 1981). El tubo germinativo aparece normalmente entre los 3 y 7 días de incubación, o antes, dependiendo de la madurez y viabilidad de las esporas (Azcon-A. *et al.*, 1991). La germinación múltiple que ocurre con la aparición de varios tubos germinativos (Sanders & Sheikh, 1983), ha sido observada en *Glomus* por Daniels & Trappe (1980). Algunas esporas son capaces de producir sucesivamente hasta 10 tubos de germinación si se van cortando los anteriores (Koske, 1981b). Godfrey (1957b) observa el nacimiento del tubo germinativo a partir de la hifa sustentora. Esto también es observado por Mosse (1959) y Daniels & Trappe (1980). De hecho, en esporas jóvenes no ocurre una verdadera germinación, sino más bien, un recrecimiento de la hifa parental (Fig. 4).

Como resultado del proceso de germinación, la espora no agota sus reservas lipídicas y puede germinar nuevamente al ser transferida a un nuevo medio (Azcon-A. *et al.*, 1991). El (los) tubo (s) de germinación se comienzan a ramificar, y si en treinta días no encuentran raíces susceptibles de ser colonizadas, los extremos de las hifas se tabican y el citoplasma se retrae hacia la espora que entra en una fase de reposo para germinar de nuevo posteriormente (Hepper, 1984; Siqueira *et al.*, 1985). Las hifas que surgen de las esporas germinadas son septadas (particularmente en las ramificaciones) y su crecimiento en el suelo

depende del almacenamiento de reservas nutritivas de las esporas que provienen, a su vez, de los nutrientes derivados de las raíces (Harley & Smith, 1983).

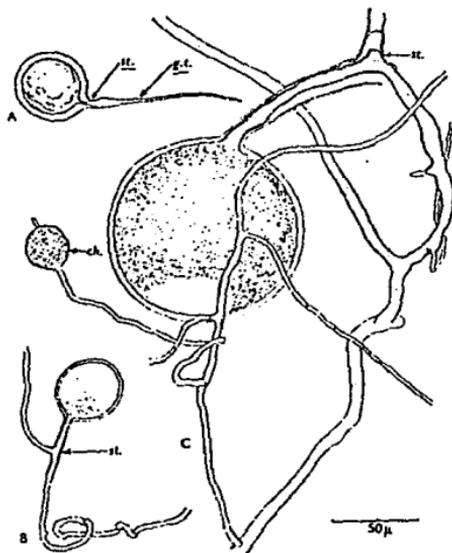


Figura 4. Germinación de una clamidospora en donde el tubo germinativo emerge a través de la hija parental. Tomado de Godfrey, 1957b.

2. 6. 2. Condiciones fisiológicas que afectan la germinación y el crecimiento hifal.

a. Tiempo de germinación.

El tiempo que tardan las esporas en germinar es muy variable (aún en la misma especie) y depende directamente de las condiciones ambientales y de su estado fisiológico (Sward *et al.*, 1978). Godfrey (1957b) y Mosse (1959) observan que la germinación puede ser lenta e inconsistente, extendiéndose de 2 a 3 semanas y alcanzando de un 5% a un 80-100 % de 2 a 4 días. Koske (1981a) observa la germinación y rápido crecimiento de los tubos germinativos de *Gigaspora gigantea* en 24 horas, y junto con Daniels & Graham (1976), cuantifican altos niveles de germinación en 7 días. La germinación, crecimiento de las hifas y colonización, para algunas especies de *Glomus*, ha sido observada en 21 días (Barkdod & Schenck, 1987). Wilson *et al.* (1989) determinan que 12 días de incubación es el tiempo óptimo para determinar si la germinación puede ocurrir o no en agar-agua. Tommerup (1985) establece un tiempo de 2 a 3 semanas para esporas quiescentes. La asincronía en la germinación de las esporas en estudios experimentales, es un problema importante ya que pueden modificar considerablemente los resultados que se esperan.

b. Edad fisiológica de las esporas y dormancia.

Se ha observado que esporas viejas germinan más rápido que esporas frescas (Mosse, 1959; Daniels & Graham, 1976; Hepper & Smith, 1976), lo cual sugiere una innata dormancia (Tommerup, 1983). Godfrey (1957b) encuentra una pobre germinación en esporas frescas de *Endogone microcarpa* a diferencia de las almacenadas de 1 a 6 meses, sugiriendo también que esto se debía a la dormancia. Clamidoporas frescas cosechadas de *G. fasciculatum* y *G. mosseae*, muestran tasas de germinación lentas y asincrónicas (Safir *et al.*, 1990). Por lo contrario, Koske (1981) observa que esporas de *Gigaspora gigantea* desarrollan un alto porcentaje de germinación inmediatamente después de ser colectadas, mientras que las almacenadas por más de dos años, no germinan bien en agar-agua (20-30%). Esto significa que pierden su viabilidad de 6 a 8 meses, por lo concluye que esta especie en particular, está adaptada de tal forma a su ambiente, que no requiere de un simulamiento de las condiciones naturales de invierno como sería el almacenamiento en frío. Esta habilidad de germinar o no, sugiere que en la dormancia suceden cambios en la estructura de la pared con la edad fisiológica. A pesar de ello, se necesita de la influencia de factores externos para modificar el contenido de las esporas hasta el final de la dormancia, ya que la madurez de una espóra está dada por el grosor de la endospora (Godfrey, 1957b).

La edad fisiológica de las esporas y la dormancia influyen en la probabilidad de colonización de una planta. Al respecto, Sward (1981) observa que las esporas jóvenes producen normalmente sólo un tubo germinativo, mientras que las viejas producen frecuentemente varios.

c. Viabilidad de las esporas.

El tiempo de sobrevivencia de las clamidosporas es muy variable y depende de la especie y de una multitud de factores. Villegas (1992) observa el aumento en la viabilidad de las esporas después de almacenarlas a 35C. Una manera de conocer la viabilidad de una muestra es hacer pruebas de pregerminación, debiéndose tener cuidado con el tiempo en el que las esporas encuentren una raíz, puesto que pueden perder la capacidad de generar estructuras de penetración (Tommerup, 1984a). Por ejemplo, Tommerup (1981) demuestra que la "infectividad" o potencial colonizador de las esporas de hongos endomicorrízicos VA, decrece en un 50% ocho semanas después de la germinación y hasta en un 0%, pasando las 16 semanas. Actualmente, la prueba de viabilidad de esporas se realiza con bromuro de tetrazolio, que es un reactivo que permite establecer por tinción en 72 horas, el porcentaje de esporas viables en una muestra (An & Hendrix, 1988).

d. Almacenamiento.

Los factores que limitan la supervivencia de las esporas son la temperatura, la humedad del suelo y el tiempo y condiciones de almacenamiento (Tommerup, 1983, 1987; Nemeč, 1987). Villegas (1992) observa que el porcentaje de colonización en plantas de almácigo (lechuga y jitomate) aumenta considerablemente cuando se ha almacenado el inóculo a 35C. La adaptación a distintos climas y poblaciones vegetales, son una de las causas de esta variación, y se ve reflejada en la viabilidad, en función del tiempo y condiciones de almacenamiento. Normalmente las cepas aisladas o colectadas, se almacenan en frío a 4C ya sea en suelo, agua o soluciones conservadoras (Sward *et al.*, 1978). Algunos investigadores afirman que ciertas condiciones de almacenamiento sirven para incrementar y sincronizar la germinación. El almacenamiento en frío a -10C induce altas y sincrónicas tasas de germinación que se incrementan todavía más, conforme aumenta el tiempo de almacenamiento. Los estudios realizados en *Glomus fasciculatum* y *G. mosseae* muestran que las esporas no almacenadas, declinaban sus tasas de germinación después de 5 y 15 días respectivamente (Safir *et al.*, 1990). El tiempo durante el cual se obtuvo la más alta tasa germinativa en estas especies fue a los 28 días de almacenamiento. Algo muy interesante es que las esporas colectadas en el campo durante la primavera, mostraban un comportamiento germinativo similar; lo que sugiere que los efectos del frío invernal juegan el mismo papel en la dormancia de las esporas, que el almacenamiento en frío.

Las condiciones de almacenamiento en laboratorio varían según el tiempo del mismo y la sofisticación en las técnicas empleadas. De este modo, las esporas se pueden almacenar: *secadas por frío* (Jackson, 1972; Crush & Pattison, 1975), *por secamiento llanado* (congeladas a -10 C) (Tommerup & Kidby, 1979), *por cryoconservación* (Tommerup & Bett, 1985), *a temperatura ambiente* (en soluciones específicas, en suelo, en bolsas, en papel filtro, etc.) (Mosse, 1961;

Sward *et al.* 1978), en húmedo o semi-húmedo en raíces (Howeler & Sieverding, 1982), etc.

El tiempo en que se pueden conservar almacenadas vivas varía según el método, pero se ha encontrado que pueden durar desde algunos meses hasta más de tres años (Rives *et al.*, 1980). Ferguson & Woodhead (1982) observan que esporas de *Glomus fasciculatum* permanecieron viables después de ser almacenadas en suelo durante 4 años. Sward (1978) encuentra que esporas germinadas de *Gigaspora* sp. pueden ser viables después de 6 meses de almacenamiento. Douds & Schenck (1991) mencionan que cada especie de hongo, responde de manera distinta a las condiciones de almacenamiento.

Así mismo, se dice que el mejor tipo de propágulo que se puede almacenar, son las raíces de las plantas cultivadas en maceta, una vez que han sido cosechadas (Siqueira *et al.*, 1985). Tommerup (1981) demuestra que éstas pueden ser potencialmente colonizadoras hasta dos años después.

2. 6. 3. Condiciones ecológicas que afectan la germinación de las esporas.

Pueden ser muchos y muy variados los factores ecológicos que afecten la germinación de las esporas en el suelo. A continuación, se hará referencia a algunos de ellos.

a. Características edáficas.

El suelo contiene los factores que previenen la germinación y que persisten de una estación a otra. Esto se debe a que en un perfil de suelo se dan temperaturas de 21 a 44°C, lo cual provoca una tolerancia a la desecación y al calor. Sanders & Sheikh (1983) observan en campo que la germinación ocurre rápidamente en respuesta a un incremento en la humedad del suelo en temporada de lluvias. Tommerup (1985) asevera que cuando la germinación no ocurre, no se debe relacionar a características físicas desfavorables del suelo, sino más bien, a su historia vegetativa. Esto se refiere a que se ve influenciada por la densidad de plantas y la edad del cultivo, así como por cambios climáticos y estacionales en los períodos de tiempo en los que el suelo está fresco. De cualquier forma, la *no germinación* es una manera de mantener a la población en el suelo hasta que el ambiente sea favorable a los ciclos de vida de las plantas y la reproducción del hongo para favorecer su sobrevivencia (Tommerup, 1985).

b. Estimulación por exudados radicales.

Los exudados radicales benefician el desarrollo del hongo (Elias & Safir, 1987; Graham, 1982), tanto en la cantidad como en la calidad, ya que no a todas las edades de la planta el exudado es efectivo (Azcon-A. *et al.*, 1991). Bécard & Piche (1989) afirman que el crecimiento del hongo se estimula por el CO₂ y los exudados radicales. Powell (1976) observa que la estimulación por las raíces se da sólo

cuando éstas crecen muy cercanamente a las hifas. Daniels & Trappe (1980) objetan que las raíces del hospedero *no* estimulan la germinación de las esporas. Estos autores demuestran que no germinan en suelos autoclaveados en presencia de raíces hospederas, por lo que sugieren que la respuesta a la germinación en presencia de raíces se debe más bien, a que existen las condiciones favorables para el crecimiento de la planta habiendo una máxima oportunidad para que se realice el contacto entre los tubos germinativos y las raíces.

Mosse & Hepper (1975) al ensayar la germinación y posterior colonización de raíces de trébol con *Glomus mosseae* en un medio de agar, no observan crecimiento direccional del micelio hacia los sitios en que se situaba la raíz, pero sí un patrón diferente de ramificación de las hifas. En realidad, no se ha podido generalizar si existen seguimientos pre-infectivos del hongo hacia la raíz, ya que se han observado diferencias en cuanto al tipo de propágulo. Según Harley & Smith (1983) las hifas de esporas color miel muestran un crecimiento direccional en seguimiento a la raíz a 3-4 mm de la misma; mientras que cuando la preinfección ocurre con hifas producidas de segmentos de raíz colonizada, no se observa ningún seguimiento. Hepper (1981) observa que raíces de trébol de 21 días de crecimiento en medios axénicos, no se colonizan con *Glomus mosseae* o *G. caledonius* hasta que se forman nuevas raíces. Powell (1976) tampoco notó ningún estímulo en la germinación por la presencia de raíces de cebolla o trébol.

c. Influencia de los microorganismos del suelo.

Se ha demostrado que los microorganismos del suelo favorecen la germinación de las esporas (Azcon-A. *et al.*, 1986; Mejstrik, 1965), la colonización de las raíces (Azcon-A. & Barea, 1985), la esporulación (Manjunath *et al.*, 1981) y el crecimiento de la planta micorrízica (Berthelin & Leyval, 1982; Meyer & Linderman, 1986).

El estímulo o bloqueo de la germinación también puede deberse a competición microbiana, la que repercute directamente en los cambios en la materia orgánica (Epstein & Lockwood, 1984) o en los compuestos inhibidores volátiles que remueven cuando no son lixiviados en el suelo rápidamente (Mugnier & Mosse, 1987; Siqueira *et al.*, 1984; Hora & Baker, 1974). Los microorganismos pueden consumir inhibidores producidos por el mismo hongo (Azcon-A. *et al.*, 1991). Daniels & Trappe (1980) proponen que las esporas probablemente contengan inhibidores propios que son removidos por la microflora del suelo y en ausencia de ésta, la germinación se puede llevar a cabo si se adsorben o inmovilizan estas sustancias con ayuda de una alta capacidad de intercambio catiónico del suelo. Tommerup (1985) sugiere que existen compuestos solubles que suprimen la germinación y que se eliminan con sucesivos lavados con agua, más que deberse a la remoción de los mismos por los microorganismos.

Para Azcon-A. & Barea (1985), el efecto que pueden tener los microorganismos del suelo no se sujeta particularmente a hongos o bacterias (Mayo *et al.*, 1986; Azcon-R., 1987), sino más bien a un efecto generalizado que permite aumentar el potencial colonizador del hongo para formar posteriormente la micorriza. Quizá el efecto benéfico sea debido a la excreción de fitohormonas, aminoácidos, ácidos

orgánicos y/o vitaminas (Lynch, 1976) o a una alteración en el ambiente nutricional del suelo (Daniels & Graham, 1976). Wilson *et al.* (1989) argumentan que la actividad microbiana en suelos no estériles, inmoviliza el fósforo disponible ya que esto no ocurre en los suelos pasteurizados por lo que se encuentran en mayor concentración. Del mismo modo, algunos investigadores han observado efectos deletéreos de los microorganismos en la actividad micorrizica del hongo (Mosse *et al.* 1969, Ross, 1980; Krishna *et al.*, 1982; Hetrick, *et al.*, 1986), sin que se hallan establecido las razones por las cuales esto sucede.

4. Influencia de agroquímicos.

Otro factor importante en los estudios de germinación de esporas, es el efecto que tienen los fumigantes. Son mucho menores los trabajos que se han escrito en relación a este tema pero son muy importantes debido a que alteran enormemente la micorrización en cultivos agrícolas. Por ejemplo, Daniel & Graham (1976), realizan experimentos con suelo esterilizado con cloropicrina (400 lb/acre), observando que destruye los factores que favorecen la germinación.

2. 6. 4. Germinación de esporas de hongos micorrizicos vesículo-arbusculares en medios axénicos.

Para establecer cultivos en agar, hay que tener en cuenta que las condiciones de éste son muy diferentes a las del suelo (Harley & Smith, 1983). Los métodos para obtener la germinación de las esporas en laboratorio, han alterado considerablemente las condiciones del campo (Koske, 1981). Sin embargo, el crecimiento en un medio estéril y definido es esencial para caracterizar los cambios fisiológicos específicos que ocurren en el hospedero, puesto que éstos se ven modificados por los organismos rizosféricos y por la variación del suelo (Allen & St-John, 1984). Para descubrir cuáles son los efectos específicos debidos a la micorriza, es necesario eliminar las variables asociadas al entorno del suelo (Allen *et al.*, 1979).

Si bien, el entendimiento de las asociaciones es esencial en estudios microecológicos, a nivel fisiológico y bioquímico, es necesario el conocimiento de las interacciones que se dan únicamente entre el hongo y la planta; por ejemplo, en el establecimiento de los mecanismos moleculares del reconocimiento, colonización, madurez y senescencia de la simbiosis. Azcon-A. *et al.* (1991) opinan que los conocimientos generados acerca de la fisiología de los hongos endomicorrizicos VA con este tipo de estudios, son *indispensables para poder aplicar una biotecnología apropiada, orientada a la movilización biológica de nutrientes en el ecosistema suelo-planta*. Sieverdig (1983) afirma que las pruebas de germinación de esporas en medios nutritivos, permiten estudiar en condiciones controladas, las adaptaciones del hongo a factores fisicoquímicos.

En general, los estudios de germinación de esporas se pueden realizar en suelo ya sea directamente o en papel filtro; en medios nutritivos o en agar-agua, dependiendo de los factores que se desean analizar. Un ejemplo claro de las

desventajas de emplear el cultivo en maceta para estudios puntuales, está en el costoso seguimiento del desarrollo de los puntos de colonización, los cuales fueron establecidos en cosechas secuenciales por Carling *et al.* (1979), Smith & Smith (1981), Smith & Bowen (1979) y Smit & Walker (1981).

Siqueira (1987) analiza los principales errores experimentales que son causantes del fracaso en las pruebas de germinación y que se pueden deber a: (1) dosis no adecuadas de los componentes; (2) a la intervención de dos o más factores interactuantes; (3) a que las condiciones experimentales no siempre funcionan igual para todas las especies y, (4) a la variabilidad genética que existe entre las esporas de una misma especie, la que provoca variabilidad en las respuestas a un mismo factor. En los primeros estudios de germinación en cultivos de *Endogone*, se aplicaban los métodos de estimulación empleados para otro tipo de hongos, dado que no se sabía la naturaleza estrictamente simbiótica de las micorrizas VA (Godfrey, 1957b). Normalmente, no se tenían resultados exitosos con estos métodos debido a que eran tan drásticos como para impedir que la germinación se realizara, por ejemplo, la ruptura de las endosporas, la remoción de la quitina para volver permeable la superficie mediante la acción de una quitinasa, la remoción de la exospora dejando los contenidos citoplásmicos en una membrana, etc. (Godfrey, 1957b).

Hirrel (1981) observa la germinación de *Gigaspora margarita* en agua destilada obteniendo una densa red hifal. Esto sugiere lo sencillo que puede ser la germinación y crecimiento de algunas especies. Sin embargo, otros estudios que analizan la influencia de los medios nutritivos, consideran que la fuente de fosfato es quizá, el factor más importante. Medios con fósforo orgánico (como el fitato de calcio o harina de huesos) han sido usados exitosamente para el crecimiento de hongos micorrízicos (Allen & St-John, 1984).

La solidificación de los medios se hace normalmente con agar, el cual debe cumplir con ciertos requisitos de pureza para que no afecte la germinación. Algunos estimulantes de crecimiento como extractos de suelo, carbón activado y extractos vegetales, han sido usados con buenos resultados (Watrud, 1984).

Por otra parte, Hirrel (1981) estudia el efecto de los iones en la germinación de *Gigaspora margarita* para comprobar si altas concentraciones de sales tienen consecuencias irreversibles en la germinación de las esporas. Encuentra que la concentración del ión Cl^- (más que los cationes Na^+ y K^+), pueden acortar el largo de los tubos germinativos, estimular las ramificaciones laterales y afectar la tasa de germinación. El hecho de que algunas especies de hongos micorrízicos VA puedan tener una tolerancia a elevadas concentraciones de iones, incrementa el éxito en el establecimiento de la micorriza en cultivos que crecen en suelos con estas características.

a. Germinación en suelo y en extractos de suelo.

Las esporas se incuban cierto tiempo en suelo y se analiza posteriormente la germinación mediante aislamiento y tinte. También se puede intentar la germinación en un par de filtros de papel en los que se colocan las esporas y se incuban entre

dos capas de suelo. Posteriormente, se tiñen las esporas observando su germinación.

Los extractos de suelo pueden incrementar el crecimiento del tubo de germinación (Azcon-A. *et al.*, 1991). Daniels & Graham (1976) estudian la difusión de sustancias del suelo que estimulan la germinación de *G. mosseae*, las cuales se obtuvieron de extractos de dializados de suelos agrícolas no tratados y mejorados con otros nutrientes. Recomiendan la preparación del extracto con 200 g/l de suelo de campo, secado al aire libre e incubado 5 días, resultando ideal para la germinación. Sward *et al.* (1978) modifican el mismo método y obtienen resultados positivos para otras especies.

Azcon-A. *et al.* (1991) opinan que tanto los extractos de suelo, como los exudados radicales, son aportes nutritivos complejos que pueden ser modificados según sea el método de obtención del extracto. Siqueira & Hubbell (1986), atribuyen el efecto benéfico del suelo a la fracción proteica. Daniels & Graham (1976), argumentan que el factor benéfico desconocido puede ser un aminoácido o vitamina, ya que un monosacárido, polisacárido, o péptido; tienen limitaciones de tamaño molecular para pasar por un filtro miliporo.

b. Germinación y crecimiento en agar-agua.

Es un hecho que las esporas de hongos micorrízicos vesículo-arbusculares germinan fácilmente en agar-agua. Por lo general, la gran mayoría de los estudios de germinación, toman como punto de partida sustratos de agar-agua que permiten obtener hasta un 100% de germinación según la viabilidad de las esporas. Los factores más importantes que condicionan la germinación en este medio, se analizan posteriormente dentro de los factores fisicoquímicos.

c. Germinación y crecimiento en medios nutritivos.

Mosse (1959) es la primera en hacer crecer micorrizas VA en condiciones axénicas en un medio nutritivo, adicionando filtrados bacterianos y compuestos impuros como fuente de nitrógeno. Posteriormente, McDonald (1981) logra establecer micorrizas en agar durante 4 meses, mantenidas en una cámara hidropónica y bañadas con una solución nutritiva diluida (para mantenerlas aereadas) que contenía 1 mg/l de fósforo y 4.2 mg/l de nitrógeno. Como se ha hecho notar, el fósforo es el nutriente más importante en el establecimiento de un medio nutritivo para el cultivo de hongos micorrízicos VA.

Phillips (1971) experimentó la variación en la fuente de fósforo en los medios, encontrando que la colonización y crecimiento hifal más intenso se daba en un medio con macronutrientes y fitato de calcio. A pesar de que el fitato de calcio tiene contaminantes de fósforo inorgánico y otros fosfatos de inositol, en un régimen de altos nutrientes, el uso de una fuente compleja de fósforo orgánico puede ser importante en el establecimiento de la colonización. Posteriormente, Mosse & Hepper (1975) utilizan un medio modificado de White para el crecimiento de raíces, adicionándolo con fitato de calcio como fuente de fósforo. Las plantas

que crecen con fitato de calcio logran una alta colonización con bajas concentraciones internas de fósforo, en relación a las plantas que crecen con fósforo inorgánico. Hepper (1981) logra (en condiciones constantes de aereación) un alto porcentaje de colonización, usando como fuente de fósforo, harina de huesos con macro y micronutrientes a un pH de 6.8. Baylis (1967), Mosse (1973) y Sanders & Tinker (1973), describen cambios anatómicos en la colonización con altos contenidos de $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ que repercute en el número de arbusculos formados. Numerosas investigaciones indican el fracaso en la formación de las unidades de colonización en presencia de altas cantidades de fosfato soluble (Harley & Smith, 1983). Wilson *et al.* (1989) observan que al agregar al suelo esterilizado 15, 30 o 60 ppm de fósforo, se reducía la germinación de *Glomus etunicatum* y *G. mosseae* por lo que deducen que debe existir una gama de concentraciones de fósforo por arriba y por debajo de las cuales, la germinación se suprime. Koske (1981a) había mostrado que concentraciones de fósforo menores de 5 ppm y hasta 500 ppm, no tienen efectos significativos en las tasas de germinación. Daniels & Trappe (1980) concluyen que la reducción en la colonización observada en suelos altamente fertilizados, se debe a una imposibilidad de las hifas de las esporas recién germinadas para colonizar, sin que esto implique propiamente una inhibición en la germinación. Sanders (1975) opina que los efectos del fósforo en la reducción de la colonización, están mediados a través de la raíz y no necesariamente involucran factores de crecimiento hifal en el suelo. Por otra parte, Jasper *et al.* (1979) determinan que las altas concentraciones de fósforo están asociadas a una disminución en la concentración de los carbohidratos solubles en las raíces, lo que es muy importante en el establecimiento del endófito. Ratnayake *et al.* (1978) argumentan que bajas concentraciones de fósforo provocan, a su vez, bajas concentraciones de fosfolípidos y esto se refleja en la permeabilidad de las membranas celulares. Harley & Smith (1983) notan que existe una relación inversa entre la cantidad de KH_2PO_4 soluble, la colonización de las raíces y la formación de clamidosporas en el suelo. Mosse (1973) reduce los efectos inhibitorios del fósforo con la adición de nitrógeno.

Cabe añadir que la presencia de metales pesados, también tienen una influencia en la germinación, siendo inhibida por el zinc, cobre, aluminio y manganeso (Hepper & Smith, 1976; Barkdoll & Schenck, 1986; Siqueira *et al.*, 1984). Esto está en relación a la cantidad que exista de estos minerales, puesto que también son microelementos indispensables para los procesos metabólicos. McIlveen & Cole (1979) notan que trazas de zinc incrementan la germinación en agar, aunque también existe la posibilidad de que se deba a las diferencias en la sensibilidad de las esporas a los metales pesados, como un reflejo de su adaptación a diferentes condiciones del suelo (Hepper & Smith, 1976).

La disposición química de otros elementos también afecta el desarrollo de la colonización como lo es el sulfato de sodio (Harley & Smith, 1983). Los ácidos orgánicos estimulan el crecimiento de *Glomus mosseae*, contrariamente a lo que sucede con ciertas concentraciones de carbohidratos (maltosa, celulosa, sacarosa, glucosa) que lo inhiben (Koske, 1981a; Mosse, 1970; Siqueira & Hubbell, 1986). Por ejemplo, el tubo germinativo de *Gigaspora margarita*, se ve estimulado en

presencia de sacarosa (Siqueira *et al.*, 1985). Mosse (1970) observa que los azúcares que están presentes normalmente en los hongos como el manitol y la trehalosa, no ejercen ningún efecto. Los aminoácidos (cistina, glicina, y lisina sobre todo) estimulan el crecimiento de las hifas de *Glomus caledonium* (Hepper & Jakobsen, 1983). Hepper (1979) y Siqueira *et al.* (1985) encuentran que la tiamina favorece el desarrollo micelial y García-G. (1989) observa lo mismo en *G. caledonium* y *G. mosseae* con la cisteína.

Los extractos de planta, carbón activado y caolín, han sido considerados como estimulantes en algunos aislados del hongo (Watrud, 1984; Daniels & Trappe, 1980). La adición de extracto de levadura y peptona favorecen la germinación, pero sólo en concentraciones mínimas (1.5% y 0.01 a 0.04 % en peso/volumen, respectivamente) (Watrud, 1984).

2. 6. 5. Condiciones físico-químicas que regulan la germinación y el crecimiento en medios axénicos.

Debido a que la germinación en un medio agarificado, sin que contenga algún tipo de nutrimento, ha sido observada por varios investigadores; es prueba de que son las condiciones de incubación las que inducen propiamente la germinación, más no el subsecuente desarrollo del hongo. Al respecto, Tanaka (1981) opina que aún trabajando con los mismos medios y plantas en un mismo laboratorio, los resultados no son siempre los mismos, quizá debido a que cambios drásticos en el estado de gel, son ocasionados por pequeños cambios ambientales.

a. Temperatura.

La germinación de las esporas *in vitro* se ve afectada directamente por la temperatura (Daniels & Trappe, 1980). El óptimo de temperatura para la germinación de las esporas en agar-agua varía dependiendo de la especie (Harley & Smith, 1983). Shenck & Schroeder (1974) observan una reducción en el porcentaje de colonización pasando los 30C y la inhibición total a 41C. Únicamente las especies de climas tropicales como las del género *Gigaspora*, aceptan condiciones de incubación de 30C (Nadarajah & Newman, 1986; Schenck *et al.*, 1975). Safir *et al.* (1990) encuentran el óptimo de germinación para *Glomus fasciculatum* en 25C. Safir (1990) observa que las esporas que germinan en el punto óptimo de temperatura, muestran un extenso crecimiento hifal. Watrud (1984) sugiere simular la temperatura de las condiciones experimentales de acuerdo a la variación de la temperatura del ambiente. Es importante recalcar que Schenck *et al.* (1975) notan que 25C también es la temperatura óptima para el crecimiento de hongos y bacterias asociadas a esporas esterilizadas superficialmente.

b. Humedad.

Las esporas pueden germinar en suelos con potenciales hídricos tan bajos como los toleran las plantas (Daniels & Trappe, 1980; Tommerup, 1984b). Según Koske (1981b) el mejor potencial hídrico para la germinación es de 0 bars, y está en relación con los potenciales hídricos de las raíces de las plantas (que son menores de 10 bars) (Baker & Cook, 1974; Cook, 1973). Un bajo potencial hídrico en campo produce dormancia (valores cercanos a 0 bars se encuentran frecuentemente en arena (Koske, 1981a). El contenido y disponibilidad de agua de los medios agarificados varía dependiendo de la concentración del agar. Normalmente se prepara el agar al 1%, pero esto depende de la turgencia con que se necesite el medio, variando de 0.7 a 2 %.

c. PH.

La germinación de la micorriza vesículo-arbuscular en medios agarificados o en el suelo, se ve afectada también por el pH (Green *et al.*, 1976).

Según Watrud (1984) los hongos micorrízicos aceptan condiciones de pH en una escala de 5 a 8, lo que permitiría el establecimiento de la micorriza en medios usados normalmente para propagar plantas *in vitro*. Algunas especies del género *Glomus* crecen en condiciones ligeramente alcalinas (Daniels & Trappe, 1980) puesto que las esporas de este género difieren en su habilidad para formar micorrizas a bajos valores de pH (Siqueira *et al.* 1984). El género *Gigaspora* se ve favorecido por condiciones ligeramente ácidas (Watrud, 1984, Green *et al.*, 1976). Esto demuestra que existe una adaptación de las especies a diferentes hábitats (Harley & Smith, 1983).

El valor del pH en el medio es importante ya que afecta directamente la disponibilidad de nutrientes o toxinas, además de influenciar el crecimiento de los tubos de germinación (Harley & Smith, 1983). Watrud (1984) recomienda ajustar el pH del medio al mismo del suelo donde está dada naturalmente la asociación micorrízica, o en su defecto, experimentar con valores entre 5.5. y 6.8. Green *et al.* (1976) establecen que en el ajuste del pH se puede utilizar hidróxido de potasio o sodio sin que afecte la germinación.

d. Oxigenación.

Como se ha dicho, las micorrizas VA son muy sensibles a la oxigenación, creciendo mejor en condiciones aeróbicas con una concentración de O₂ mayor al 3 % (Azcon-A. *et al.*, 1991). Le Tacon *et al.* (1983) observan que concentraciones altas de CO₂ (5%), inhiben el crecimiento.

e. Iluminación.

La incubación se debe realizar en la oscuridad puesto que la luz directa en los medios de cultivo inhibe la germinación de las esporas (Schenck *et al.*, 1975). Para

lograr la colonización *in vitro*, se deben manejar condiciones de mínima iluminación (500-700 microEm²/s) (Watrud, 1984). Hayman (1974) establece que una elevada colonización se da en altas intensidades luminosas para la planta puesto que la luz repercute directamente en las concentraciones de azúcar que se transfieren a las raíces.

f. Efectos del tipo, calidad y concentración del agar.

Otro factor muy importante es la calidad del agar. Daniels & Graham (1976) encuentran que con el agar Difco-Bacto se obtenía la mejor germinación en oposición a la obtenida con el agar purificado Noble, por lo que proponen que existe en el agar algún factor nutricional presente como contaminante que estimula la germinación. Aguilar-F. *et al.* (1993) prueban dos tipos de agar recomendando también la utilización de Difco-Bacto. Hepper & Smith (1976) analizan la composición de las impurezas del agar Difco-Bacto, encontrando 4 ppm de zinc y 0.2 ppm de manganeso. Otros agares con un bajo contenido de metales, pueden contener sustancias que ayuden a la germinación de las esporas.

Debergh (1983) desarrolló un estudio del tipo y concentración de agar para la preparación de los medios en el cultivo de tejidos vegetales. Encontró que la concentración y origen del agar afectan las características fisicoquímicas del medio, puesto que las impurezas pueden alterar significativamente las concentraciones de los nutrientes. Inclusive, la escala de solidificación del agar varían dependiendo de la concentración y de la marca: entre mayor sea el grado de pureza de un agar, mayor es su solidificación (el agar Difco-Bacto es de los más blandos). La disponibilidad del agua y la conductividad se incrementan al disminuir la concentración de agar.

Otro efecto importante es que el aumento en la concentración del agar, disminuye la vitrificación o acumulación de agua en los tejidos, así como el radio de propagación de las plantas (Brown *et al.* 1979; Debergh *et al.* 1981; Kusumoto, 1980). En 1981, Debergh *et al.* (1981), encuentran que la concentración del agar tiene un drástico efecto en el potencial mátrico del medio de cultivo, disminuyendo la disponibilidad de los componentes del medio. Hay que resaltar que la calidad del agua es otro factor importante ya que puede contener ciertos tipos de inhibidores (Romberger & Tabor (1971), Wernicke & Kohlenbach (1976), Kohlenbach & Wernicke (1978).

g. Efectos de la esterilización de los medios.

El medio de cultivo debe cumplir con ciertas características para lograr, por lo menos, la germinación de las esporas. Se ha comprobado que factores metodológicos como la esterilización de los nutrientes en autoclave, pueden modificar el medio (por ejemplo, la mineralización del fósforo y el pH) (Allen & John, 1984). Allen *et al.* (1981a) observan que la colonización se incrementa cuando se esterilizaba el medio por filtrado a diferencia de cuando éste se autoclaveaba. Palacios-M. *et al.* (1987) encontraron que los niveles de colonización

en plantas de cebolla disminuían al esterilizar el suelo. La esterilización del suelo revela que además de eliminar microorganismos nativos, se cambia la disponibilidad de nutrimentos minerales y se modifican los componentes orgánicos (Skipper & Westermann, 1973; Warcup, 1975). En la elaboración de los medios, esto se evita si la parte inorgánica se esteriliza por autoclaveo y la orgánica por filtrado.

Se ha comprobado que la dilución del suelo, o su pasteurización, provoca micotaxis o fungistasis, definida como una forma de dormancia exógena asociada a las propiedades biológicas del suelo. La fungistasis provoca que se inhiba la germinación de las esporas cuando se alteran las propiedades fisicoquímicas que conducen a ésta (Lockwood, 1977 y Mangeot & Diem, 1979). Daniels & Trappe (1980) opinan que la sensibilidad a la fungistasis predomina en hongos vesículo-arbusculares que tienen hospederos específicos. Estos autores encuentran altos niveles de germinación (65-80 %) en suelos no estériles, en comparación a los sustratos esterilizados por autoclaveo, por vaporización o gamma irradiados que inhibían completamente la germinación. Observan que el caolín y carbón activado autoclaveado, sí permitían la germinación, por lo que concluyen que éstos no generan toxinas al ser esterilizados. Wilson *et al.* (1989) corroboran que el efecto inhibitorio se debe al tipo de esterilización. Por ejemplo, Hetrick *et al.*, (1988) muestra que el crecimiento micorrízico en una planta nativa se reduce significativamente en suelos no estériles, en comparación con los suelos pasteurizados.

h. Esterilización superficial de las esporas.

La esterilización de las esporas actúa a nivel de la *esporosfera*, capa donde se encuentran adheridas una gran cantidad de bacterias e incluso, esporas de otros hongos. Si bien estos microorganismos son cohabitantes de los hongos micorrízicos, pueden influir en la germinación (quizá por la producción de reguladores (Allen & John, 1984); en un medio de cultivo axénico desencadenan una tasa metabólica mucho más rápida que la del hongo micorrízico y se convierten en contaminantes del medio, alterando el estatus nutricional por el consumo de nutrimentos (Daniels & Graham, 1976).

Schenck *et al.* (1975) analizan el efecto de la temperatura y la iluminación en la germinación y contaminación de clamidosporas de varias especies, encontrando que aún las esporas esterilizadas superficialmente con hipoclorito de sodio 0.5% (3') y enjuagadas en agua estéril, presentan una gama de contaminación que disminuye hacia los 15°C y 35°C y que aumenta hacia los 25°C. Además, se presentó un mayor grado de contaminación en las esporas expuestas a la luz.

Por otra parte, se había observado que la germinación no ocurría cuando eran removidos de la esporosfera los microorganismos asociados (Daniels & Trappe, 1980; Mayo *et al.*, 1986). Wilson *et al.* (1989) cuantifican que la germinación se reduce en un 45% cuando las esporas se esterilizan superficialmente. A pesar de esto, los trabajos experimentales de germinación en medios axénicos, están sustentados en la esterilización de las esporas, sin que existan diferencias entre

la tasa y apariencia de la germinación entre esporas esterilizadas y no superficialmente (Koske, 1981).

Los agentes germicidas más empleados, que no afectan la viabilidad de las esporas, son antibióticos como la cloramina-T, estreptomina y gentamicina, además del hipoclorito de sodio que es empleado comúnmente (Watrud, 1984). Mertz *et al.* (1979) utilizan el surfactante acuoso Tween 20, que permite obtener altos niveles de germinación y esterilización y, añaden antibióticos al medio notando que no inhiben el crecimiento y se disminuyen mucho más los riesgos de una posterior contaminación.

De cualquier modo, la esterilización superficial raramente es 100 % efectiva (Wilson *et al.*, 1989).

III. MATERIALES Y METODOS

3. 1. Origen, control y multiplicación del aislado micorrízico.

El aislado es originario de la Estación Experimental de Rothamsted, U. K. y fue donado por la Dra. Bárbara Mosse. Ha sido reproducido y adaptado a varios edafosistemas mexicanos por el personal académico del Dpto. de Edafología del Inst. de Geología UNAM. y se ha conservado vivo en el Laboratorio de Biología de Suelos del Instituto de Geología. Para su multiplicación, se han utilizado plantas de poro (*Allium porrum* L.) como hospedero, empleando suelo de origen volcánico en macetas de 3 kg de capacidad. El tiempo del cultivar es de dos años y medio.

Se llevó a cabo el control de calidad en 15 plantas hospedero, con la finalidad de evaluar las condiciones en las que se encontraba el inóculo, cuantificar el grado de colonización de las raicillas y el número de esporas por gramo de peso seco y porcentaje de viabilidad (los resultados de este control se muestran en el anexo 1).

3. 1. 1. Aislamiento de propágulos del suelo.

Con ninguna de las técnicas de aislamiento, hasta ahora conocidas, se logra recuperar la totalidad de los propágulos existentes en una muestra de suelo.

1. *Muestreo aleatorio de raíces.* Colecta de 30 g de suelo y 3 g de raicillas, tomados al azar, en distintos puntos de la maceta (ya que la colonización puede no ser homogénea).

2. *Remoción de los agregados de suelo* con 500 ml de agua corriente. Se colocan dentro de un matraz Erlenmeyer con un agitador mecánico a baja velocidad (para no dañar el micelio) de 2 a 24 horas según la compactación del suelo.

3. *Lavado de las raicillas* con agua corriente dentro de un juego de tamices de distinta abertura (según Gerdemann & Nicolson, 1963) Los tamices permitirán la recuperación de los propágulos que se desprenden en el lavado (esporas y micelio). Se dejan remojando las raicillas en un poco de agua corriente para su posterior tinción.

La abertura de cada tamiz nos ha permitido observar la recuperación de las siguientes estructuras:

TAMIZ A

Raíces, agregados de suelo sin disolver 0.8 mm

cristales y arenas.

TAMIZ B

Micelio, racimos de esporas, pequeños 0.250 mm
agregados, cristales y arenas menores.

TAMIZ C

Esporas, restos de esporas, limo. 0.074 mm

4. *Filtrado y tamizado de la suspensión de suelo en los mismos tamices, y lavado con agua corriente.*

5. *Recuperación de los tamizados B y C en vasos de precipitados con un poco de agua corriente y conservación a 4°C mientras se elabora cada cuantificación. Lo que se recupera en el tamiz A, se incorpora a las raicillas en remojo.*

3. 1. 2 Control de calidad del aislado

a. Tinción de raíces.

La tinción de raíces y cuantificación directa al microscopio nos permiten conocer el estado de la colonización, cuantificar el tiempo que lleva de establecida y observar diversas estructuras. En el laboratorio de Biología de Suelos, González y Palacios han realizado algunas modificaciones a la técnica de Phillips & Hayman (1970) como son; el calentamiento en estufa que evita el burbujeo interno en las raíces y el rompimiento de los tejidos que produce el tradicional tratamiento a baño María; la disminución del tiempo y temperatura en la tinción para evitar la sobretinción, así como el establecimiento de los tiempos de aclaración y tinción según la especie analizada (debido a que éstos varían según el grado de lignificación y edad de las raíces).

6. De las raíces remojadas en agua (paso 3), se cortan segmentos de 2 cm, aproximadamente. Se escurren y se aclaran durante 30 min. en KOH 10% dentro de una estufa a 50°C. El tiempo óptimo de aclaramiento se determina mediante la observación de las raíces, cada 10 minutos, en el microscopio estereoscópico.

7. Lavado con agua corriente en un tamiz, neutralización de la potasa con HCl 10% (hasta observarlas blancuzcas), lo que actúa como mordente para la tinción durante 30 min.

8. Tinción en la estufa a 65°C, con azul de tripano 0.1% diluido en lactoglicerol durante 1' 15", que es el tiempo óptimo para las raíces de poro.

En campana de extracción:

9. Se escurren en un tamiz, recuperando el colorante, y se colocan en lactoglicerol de nuevo en la estufa a 50°C con la finalidad de sacar el exceso de colorante y las burbujas. Finalmente se conservan, en frascos con lactoglicerol para su posterior observación. Es recomendable prescindir de la utilización del lactofenol, debido a que es altamente cancerígeno, a pesar de que es un excelente conservador.

10. El material del tamiz B, se centrifuga por fracciones (1.5 min. a 1 500 rpm) para separar los cristales, las arenas del micelio, así como las esporas que quedan como sobrenadante. Este se recupera de todas las centrifugaciones, se tamiza y colecta para posteriormente evaluar viabilidad, conservándose nuevamente a 4°C.

b. Aislamiento de esporas por centrifugación (Jenkins, 1964).

11. El material recuperado del tamiz C se centrifuga por fracciones (durante 2 min. a 1500 r. p. m.) tres veces, y en cada una los tubos son agitados vigorosamente 15'. La primera centrifugación se hace con agua corriente, para eliminar restos de materia orgánica flotante y de raíces en descomposición. Con el precipitado recuperado, se realizan las dos últimas centrifugaciones con sacarosa al 50 % (Ohms, 1957) para hacer que las esporas queden suspendidas en el azúcar. Estas se recuperan rápidamente del sobrenadante obtenido, con la ayuda de un tamiz y enjuagando inmediatamente en agua corriente para evitar la lisis (la sacarosa puede substituirse por azúcar). Se conservan en un frasco limpio con el mínimo de agua.

c. Metodo cuantitativo para estimar la población de esporas.

12. Con el material obtenido de las centrifugaciones, se realiza la prueba de viabilidad y conteo de esporas. Se toma la mitad del total obtenido en cada tamiz y se filtra por porciones en un matraz Kitasato al vacío, para eliminar el agua y repartir homogéneamente las esporas en un disco de papel filtro. Este deberá estar previamente rayado cada 0.5 mm de distancia, formando filas paralelas enumeradas en la parte superior. También se puede utilizar el papel filtro cuadrículado (Khan, 1971) o cajas con círculos concéntricos realzados (Doncaster, 1962).

13. Cada filtro húmedo se coloca en una caja Petri y se revisa al microscopio estereoscópico cuantificando (con la ayuda de un contador mecánico manual), hilera por hilera, las esporas que se encuentren en buen estado y las que no lo estén. Con esto se obtiene el número total de esporas encontradas en 15 g de suelo.

d. Prueba de viabilidad de las esporas

14. Con la otra mitad del material obtenido de las centrifugaciones, se realizará la prueba de bromuro de tetrazolio, que es un reactivo que tiñe color magenta-vino las esporas viables y que deja sin teñir aquellas que, aunque parezcan sanas y en buen estado, no lo son. Para esto, se colocan en tubos de ensaye pequeñas porciones del material con 1 ml de agua destilada y 1 ml de bromuro de tetrazolio (An & Hendrix, 1988). Se agitan bien y se dejan en la oscuridad durante 72 horas, exactamente para evitar una sobretinción. La manipulación con este reactivo debe hacerse con gran cuidado puesto que es altamente cancerígeno.

15. Cumplido el tiempo de reacción, se enjuagan las muestras con agua (con la ayuda de un tamiz) de la misma forma que en los pasos 12 y 13, pero ahora se contarán las esporas viables (que estarán teñidas de rosa-magenta a rojo-vino) y las que no lo estén.

16. Porcentaje de viabilidad de la muestra. Finalmente, una vez que se ha obtenido el número total de esporas viables, se saca un porcentaje respecto al total, y se compara con el obtenido por la evaluación cualitativa del paso 13, con lo que se tendrá, el número de esporas y el porcentaje de viabilidad en 30 g de suelo.

3. 1. 2. 1. Evaluación de la colonización.

La estimación de la colonización en las raíces se determina por el método de rejillas intersectas, desarrollado por Newman en 1966.

17. Las raíces teñidas (paso 9) se observan al microscopio estereoscópico, en cajas Petri de plástico previamente cuadrículadas (1 cm²). Se acomodan los segmentos de una parte de la muestra, repartidos en toda la caja (evitando que se amontonen o intersecten). Se hace el conteo de la colonización tomando como positivo toda raíz que presente alguna estructura del hongo y que intersecte las cuadrículas de la caja Petri y, como negativo, toda raíz no colonizada que intersecte de la misma forma. Al finalizar el conteo, se gira la caja 180 grados y se comienza de nuevo.

18. El porcentaje de colonización se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ colonización} = \frac{\text{no. campos colonizados}}{\text{no. total intersecciones}} \times 100$$

3. 1. 2. Selección del inóculo.

a. Valoración del inóculo.

19. Con los datos obtenidos para cada maceta revisada (inciso 3.1.2.), se tiene el control de calidad del inóculo, y se puede saber el estado que guarda cada una de ellas para seleccionar la mejor como fuente de inóculo, que se multiplicará mediante resiembra. Una vez que se ha estimado el num. de esporas que podemos encontrar por gramo de suelo, su viabilidad y el porcentaje de colonización de las raíces, se sabe cuánto propágulo debemos tomar para inocular las semillas en la multiplicación del inóculo.

b. Multiplicación del aislado micorrizico.

Resiembra del inóculo

20. Con la finalidad de obtener inóculo fresco para posteriores experimentos, la maceta seleccionada se ocupará totalmente para su multiplicación. De este modo, se sembrarán los hospederos que son plantas micótrofas, conocidas en las que el hongo se establece rápidamente, como son el pasto *Rhodes grass* y el maíz (Poza Rica 90A Bulk 2224-2).

21. La pregerminación de las semillas de maíz se lleva a cabo asépticamente, esterilizándolas con hipoclorito de calcio al 7.5 % durante 10' y enjuagándolas de 3 a 5 veces con agua corriente, esterilizada en campana de flujo laminar. Una vez conocido el porcentaje de germinación de los hospederos, se colocan las semillas en una caja Petri, sobre una cama de arena y suelo (1:1) estériles, de 4 mm de espesor, y se cubren con otra capa (2 mm) de arena estéril, humedeciendo con agua corriente estéril. El suelo utilizado para la multiplicación de la cepa es el mismo en donde crece la planta madre. Se incuba el material en la oscuridad a 25 C durante tres a cinco días hasta obtener la germinación (evitando la etiolación).

c. Técnicas de inoculación.

22. La inoculación de las plántulas pregerminadas se lleva a cabo con los propágulos obtenidos en los tres tamices de la maceta seleccionada, según los pasos 2, 3, y 4.

23. En macetas autoclaveables de 250 g de capacidad, se esterilizan 200 g de suelo y arena (1:1) a 15 lb de presión durante 30'. En la campana de flujo laminar, se coloca, en cada maceta, una capa fina de esporas del tamiz C (aprox. de 1 mm de grosor), seguida de una capa (de 3 mm de grosor) de arena con suelo. Esto se repite con el aislado del tamiz B. Las semillas de cada hospedero (tres semillas de maíz pregerminadas y 3 g de semillas de pasto esterilizadas, según paso 21) se sitúan encima de la última capa envolviendo las raíces con el aislado del tamiz A.

Finalmente, se tapan con una capa de suelo:arena, de 1 cm de grosor y se humedecen a capacidad de campo con agua destilada estéril.

En el trasplante de las plántulas de maíz, se recomienda evitar la desecación del sustrato y mantenerlas en obscuridad durante 24 horas (Allen & John, 1984).

24. Los hospederos crecen en condiciones de invernadero (22-27 C, fotoperiodo 18-6) y se riegan cada tercer día con 50 ml de agua corriente o a capacidad de campo (Daniels & Trappe, 1980). Una vez a la semana, se regarán con la solución nutritiva Long Ashton (Hewitt, 1966). Anexo 3.

3. 2. Conteo, separación y siembra de propagulos en medios nutritivos.

Según Saif, 1977.

Esta técnica difiere de las utilizadas para el control de calidad, en que el material debe ser seleccionado y aislado vivo.

i. Suspender 30 g de suelo (del inóculo multiplicado) en 250 ml de agua corriente, y dejar en plataforma de agitación durante una hora.

ii. Vaciar a tamices (A, B y C) y lavar directamente bajo el chorro de agua corriente hasta que éste salga limpio por debajo de los tamices.

iii. Obtener el material de los tamices A y B y suspenderlo por fracciones de cada uno en una probeta con 100 ml de agua corriente estéril. A partir de este momento, se deben tomar las medidas de asepsia que sean necesarias para ir eliminando microorganismos asociados a la esporosfera. Se agitan 3 minutos y se dejan sedimentar 15 segundos, colectando los sobrenadantes en tamices. Repetir tres veces por muestra.

iv. Para el tamiz C, se prepara una solución de sacarosa al 50 % que será utilizada en lugar del agua indicada en el paso anterior y se procede de la misma forma pero lavando los sobrenadantes durante 2 min. en agua corriente y dejándolos, finalmente, en agua corriente estéril.

v. Vaciar a cajas Petri los aislados de cada tamiz con un poco de agua estéril y comenzar a escoger el material por submuestras. Los propágulos seleccionados se colectan en tubos de ensayo de 10 ml (numerados, con 5 ml de agua destilada estéril) con la ayuda de agujas de disección y pipetas Pasteur. Se aíslan las esporas turgentes, vacuoladas, de colores claros (blanco, amarillo, café claro) provenientes de racimos con hifas sustentoras. Las raíces blancas de buena apariencia, jóvenes, con una evidente y establecida colonización. Se conserva el resto del material con el mínimo de agua a 4°C hasta terminar la selección.

a. Desinfección superficial de esporas.

Según St. John *et al.*, 1981.

En campana de flujo laminar:

vi. Las esporas seleccionadas se esterilizan con cloramina-T al 2% durante 20 min. y posteriormente con estreptomycin/gentamicina al 0.025 % 20 min. Se enjuagan tres veces en agua destilada estéril. Con la ayuda de pipetas Pasteur estériles, se eliminan sucesivamente los desinfectantes y los lavados con agua de cada tubo de ensaye.

b. Desinfección de segmentos de raíces colonizadas.

Según Williams, 1990.

En campana de flujo laminar:

vii. Los segmentos de raíces colonizadas se desinfectan con una solución de hipoclorito de calcio al 7.5% durante 5' (agitando constantemente). Después se enjuagan tres veces en agua destilada estéril y se limpian con una solución de estreptomycin-gentamicina al 0.02 % durante 20 minutos.

3. 2. 1. Pruebas de germinación de esporas de *Glomus sp.* en distintos medios agarificados.

viii. Se lleva a cabo la elaboración de los medios nutritivos y testigo, según anexos 4, 5, 6 y 7.

En campana de flujo laminar:

ix. A los grupos de clamidosporas desinfectados que están en los tubos de ensaye (paso 6), se les elimina la mayor cantidad de agua posible (dejándolas sedimentadas en una cuenca) con ayuda de una pipeta Pasteur estéril. En caso de no poder eliminar más agua con la pipeta y para no correr el riesgo de que se lleve a las esporas, se puede eliminar el exceso de líquido con ayuda de tiras de papel filtro, previamente esterilizadas, pegándolas a la pared del tubo para que absorban el agua por capilaridad.

x. Las cajas Petri previamente limpias y con los medios agarificados se introducen en la campana, junto con el mismo número de pipetas Pasteur estériles. Cada caja se abre junto al mechero y se flamea la tapa y se coloca boca arriba

sobre la mesa. Se dejan remojando en alcohol, previamente algunos bulbos de pipetas.

Siembra de esporas en los medios:

xi. Con la pipeta Pasteur, se absorben de una sola vez las esporas que están sedimentadas en el fondo de la cuenca. Rápidamente se llevan a la caja Petri y se inyectan. Estos dos pasos deben realizarse rápida y firmemente porque se corre el riesgo de que queden esporas adheridas a la pared del tubo o de que se caigan en el transecto al agar. La siembra de las esporas en los medios, se asignó previamente a cada uno de ellos, según el número de los tubos de ensaye en los que se encontraban y que está, en relación al diseño experimental en el que los tratamientos (medios) se asignan aleatoriamente a las unidades experimentales (esporas).

xii. Se cierra la caja Petri flameando ligeramente los bordes. Posteriormente se sella con egapack y se le anotan los datos pertinentes.

xiii. Se incuba el material en oscuridad a 25 C. Diariamente se lleva a cabo la cuantificación del material.

xiv. Cuando la germinación halla cesado y se estacione el crecimiento de los tubos germinativos, se tiñen las muestras. Para esto se colocan las cajas Petri en la estufa a 60 C, hasta que se ablande el agar. Se vacía éste en un tamiz fino y se enjuaga delicadamente con una piceta con agua destilada hasta eliminarlo completamente. Las esporas se juntan en una orilla del tamiz y se les añaden unas gotas de colorante durante 3 min. Se enjuagan con lactoglicerol y se vacían a una caja Petri.

3. 2. 2. Pruebas de crecimiento micelial de *Glomus* sp. a partir de segmentos de raíces de poro colonizadas (*Allium porrum* L.) en medios agarificados.

Siembra de raíces colonizadas.

En campana de flujo laminar:

xv. Con ayuda de unas pinzas largas de punta fina (previamente flameadas y enfriadas), se sacan los segmentos de raíces de los tubos. Estos se siembran en el agar, paralelamente. Se colocan 5 raíces en cada caja introduciéndolas totalmente en el agar con ayuda de la pinza.

xvi. Se incuba el material en oscuridad a 25 C. Se cuantifica cada tercer día el crecimiento micelial y la contaminación al microscopio estereoscópico.

xvii. En caso de crecimiento micelial, se espera un tiempo pertinente para que se lleve a cabo su desarrollo (establecido por continua observación) y se sacrifica el material para ser teñido. Para esto, se calienta en la estufa la caja Petri a 60 C hasta que se licue el agar. Se rescatan las raíces en un tamiz y se enjuagan delicadamente con una piceta, con agua destilada. Se vacían en una caja Petri y se tiñen según metodología ya descrita.

3.3. Micorrización *in vitro* de *Mammillaria huitzilopochtli* con esporas de *Glomus sp.*

Se procedió a inocular con este tipo de propágulo, según pruebas preliminares de contaminación de esporas y segmentos de raíces en agar-agua.

a. Inoculación de lotes experimentales.

En campana de flujo laminar:

xviii. Se aislan los individuos de *M. huitzilopochtli* y se siembran en frascos de vidrio con el medio Murashige & Skoog. Se seleccionan aquellos cuyas raíces estén blancas y desarrolladas y sin pigmentación clorofílica (Pons *et al.*, 1983). Al ser resembrados los individuos, las raicillas se aproximan al introducirse nuevamente en el agar formando un ovillo que facilita grandemente la inoculación.

xix. Se inoculan de la misma forma en que se sembraron las esporas en los medios agarificados (paso x), con la diferencia de que éstas se "inyectan" directamente en la raíz de la planta.

Inoculación de plantas *in vivo*:

xx. El número de plantas que fueron inoculadas *in vitro*, se inoculan directamente en suelo como se hizo con las plantas hospederas (pasos 22 y 23). Se mantienen dentro de un microambiente (para evitar la desecación del sustrato y el impacto por el trasplante) a temperatura e iluminación ambiental. Se realiza el riego a capacidad de campo, una vez a la semana.

b. Cultivo del material inoculado.

xxi. El material inoculado se incuba durante 20 días a 25 C en oscuridad, para permitir el desarrollo del hongo. El material se revisa diariamente y en caso de haber individuos contaminados, se transplantan directamente a suelo en envases rotulados con tierra estéril. Se lava la planta y las raíces al chorro de agua y se transplantan, como en el paso anterior, enjuagándolas previamente con hipoclorito de sodio casero al 10% durante 15' y lavadas tres veces en agua destilada estéril. Se efectúa la revisión microscópica con contraste de luces para observar la germinación y el crecimiento de las hifas.

xxii. Puesto que el desarrollo de la micorriza se inhibe con la luz directa, y debido a que en las raicillas puede formarse clorofila, se incuba el material en oscuridad. Las observaciones de colonización se realizan en la misma forma.

xxiii. Pasado un mes, se sacrifican los primeros lotes al azar y se procede a teñir las raíces. En campana de flujo laminar, se saca la planta en una caja Petri con ayuda de unas pinzas. Previamente, con un bisturí flameado, se corta un cubo de agar dentro del frasco que contenga las raíces. Se diseccionan del resto de la planta y se resiembró nuevamente en un medio con enraizador.

xxiv. El cubo de agar conteniendo las raíces, se introduce en una estufa a 60 C para que se ablande. En un tamiz fino, se lavan suavemente las raíces con una piceta con agua destilada. Se procede a teñir normalmente.

xxv. Se realizan observaciones microscópicas del estado de colonización. Si se observa un patrón común, se realiza la cuantificación por los métodos antes descritos. En caso de no observar resultados en ningún individuo; se espera un mes más y se sacrifica el siguiente lote de plantas, repitiendo los pasos anteriores.

xxvi. En el caso de los individuos inoculados en suelo, se realiza la observación de las raicillas de un lote seleccionado al azar (previamente teñidas).

3.4. Procedimientos para evaluar la germinación de esporas, desarrollo micelial y colonización de las plantas in vitro.

xxvii. Para el cálculo del porcentaje de germinación se considera la viabilidad de las esporas según la prueba de bromuro de tetrazolio. La evaluación de los efectos de los medios se hará mediante la prueba estadística de análisis de varianza. Una espóra se considera germinada cuando se vislumbra la aparición del tubo de germinación.

xxviii. La evaluación del crecimiento micelial se hace mediante la medición al microscopio estereoscópico del radio micelial y del número de segmentos, a partir de los cuales se desarrolla micelio.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Selección del propágulo para la micorización *in vitro*.

Para este propósito, se realizó un ensayo preliminar tomando en cuenta: (1) el grado de contaminación sistémica inducida por los propágulos; (2) la factibilidad de manipulación de los propágulos durante la siembra y (3) la respuesta obtenida con cada uno de ellos en el medio de cultivo.

Con base en las características analizadas en los antecedentes, se eligieron como propágulos únicamente esporas y raíces colonizadas.

a. Resultados preliminares de germinación de clamidosporas y selección del agar adecuado para la elaboración de los medios.

La prueba preliminar de germinación de esporas se realizó para verificar la efectividad del tratamiento de desinfección seleccionado, así como para observar si había un efecto en la germinación debido a la marca de agar empleado.

El agar más utilizado en la elaboración de los medios para la germinación de esporas de hongos micorrízicos VA es el Difco-Bacto. Este es un agar cuyas características permiten una excelente germinación (Daniels & Graham, 1976). A pesar de esto, tanto por su costo como por su difícil adquisición, fue necesario sustituirlo por el uso de un agar alternativo que no repercutiera en el desarrollo del hongo. Para tal efecto, se probaron 3 agares con distinto grado de pureza, seleccionando dos valores de pH (los óptimos para el desarrollo de este género) (Cuadro 1).

Características de los agares utilizados:

1. Agar-agar Merck. Este agar tiene un muy alto grado de purificación y control de calidad, exento de inhibidores y gérmenes termoresistentes.

2. Agar granular Sigma. Agar de menor control de calidad y mucho menor grado de purificación.

3. Agar bacteriológico Bioxon. Agar cuyo contenido de impurezas varía en una escala aceptable de purificación.

4. Agar Difco-Bacto. Agar libre de materiales extraños, pigmentos y un contenido mínimo de sales (este agar se utilizó, en este trabajo, únicamente en las pruebas de germinación).

Cuadro 1. Efecto de la calidad del agar y del método de esterilización superficial, en la germinación de clamidosporas de *Glomus sp.* en agar-agua.

Agar	pH	Porcentaje de germinación	Porcentaje de esporas contaminadas con hongos
1	6.5	*	100
1	7.5	12	0
2	6.5	*	100
2	7.5	6	0
3	6.5	25	0
3	7.5	20	0

* No cuantificado debido a la contaminación por hongos.

La contaminación bacteriana, debido a que fue esporádica, no se consideró en estas pruebas.

El porcentaje de germinación total se cuantificó en una población de 75 esporas (con 25 esporas por repetición) después de un mes de incubación en oscuridad a 25°C.

Como se puede observar en este cuadro, tanto el agar (1), de más alto grado de purificación, como el agar (2) de menor grado de purificación, no favorecieron el desarrollo de la germinación en ninguno de los valores de pH, ya que a ellos corresponden los valores más bajos en el porcentaje de germinación. Esto contrasta con la germinación obtenida en el agar (3) correspondiente a un grado intermedio de purificación. Estos resultados concuerdan con los trabajos de Daniels & Graham (1976) quienes indican que el grado de purificación de un gel influyen en la germinación de la esporas, debido a que ciertas impurezas del agar pueden constituirse en factores que estimulen la germinación. Aunque las trazas de ciertos metales pesados (Zn, Al y Mn), que se encuentran como impurezas en algunos agares, pueden estimular la germinación (Hepper & Smith, 1976; McIlveen & Cole, 1979); ocurre, también que, en concentraciones mayores, pueden inhibirla (Hepper & Smith, 1976; Siqueira *et al.*, 1984; Schenck, 1986)

El grado de contaminación observado en los agares 1 y 2, no se relaciona con el tipo de agar ni con la manipulación del material, sino con la efectividad del método de esterilización superficial. Estos resultados concuerdan con lo considerado por Wilson *et al.* (1989) en lo relativo a que la esterilización superficialmente es el 100 % efectiva.

b. Crecimiento y desarrollo del micelio a partir de raíces de poro (*Allium porrum* L.) colonizadas por *Glomus sp.*

Los resultados del desarrollo micelial (cuadro 2), no pudieron ser evaluados en la mayoría de los casos, debido al grado de contaminación sistémica presentada (aún después de repetir varias veces el tratamiento de esterilización superficial) por lo que se eliminó este tipo de propágulo para la micorrización *in vitro*. Probablemente, un tratamiento más drástico (mayor tiempo de desinfección o mayor concentración de los desinfectantes, así como el uso selectivo de fungicidas), hubiera podido combatir este tipo de contaminación. Sin embargo, las causas pueden ser, también, atribuidas a la contaminación natural proveniente

de las macetas donde se propagó el aislado micorrízico, por lo que se sugiere tener un estricto control en la esterilización del suelo y mantenimiento de las macetas, cuando se requiera utilizar los propágulos para llevar a cabo estudios *in vitro*. (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto del método de esterilización superficial en el desarrollo micelial de *Glomus sp.* a partir de segmentos de raíces de poro (*Allium porrum L.*) colonizados, en diferentes medios axénicos.

Medio	pH	Número de puntos de crecimiento micelial	Porcentaje de segmentos contaminados con hongos
1. Agar DifcoBacto	5.5		100
2. Agar DifcoBacto	6.5	•	100
3. Agar DifcoBacto	7.5	12.5	50
4. Agar Bacteriol.	5.5	12.5	50
5. Agar Bacteriol.	6.5	•	100
6. Agar Bacteriol.	7.5	12.5	50
7. Murashige-Skoog	5.6	•	100
8. MS/IBA	5.6	•	100
9. Hepper & Smith	7.0	•	100
10. Allen <i>et al.</i>	5.5	•	100
11. Extracto I	6.8	•	100
12. Extracto II	6.8	12.5	50

* No se cuantificó debido a la contaminación sistémica por hongos. En vista de que la contaminación bacteriana se presentó esporádicamente, no se consideró en estas pruebas. Resultados obtenidos después de 15 días de incubación en oscuridad a 25°C.

Los segmentos de raíces colonizadas, son propágulos muy efectivos para producir micorrización de plantas en suelos y sustratos similares. No obstante, bajo condiciones axénicas, a pesar de ser fácilmente manipulables, desarrollan un alto grado de contaminación fúngica sistémica, que no se erradica fácilmente con los métodos comunes de esterilización superficial. Esto ha sido corroborado por Mosse (1988) y Chabot *et al.* (1992).

Los resultados mostrados en los cuadros 1 y 2, permitieron considerar a las esporas, como los propágulos más convenientes para llevar a cabo el ensayo de micorrización de *Mammillaria hutzilpochtli in vitro*.

4. 2. Germinación de esporas de *Glomus sp.* en medios axénicos.

En la elaboración de los medios agarificados para la germinación de las clamidosporas se eligieron algunos de los medios probados para *G. mosseae* (Allen *et al.*, 1979; Hepper & Smith, 1983) (incisos 9 y 10 del cuadro 3). Se consideró, además, el medio en el que se llevó a cabo la micropropagación de *Mammillaria* (incisos 7 y 8 del mismo cuadro). Se incluyeron, también, dos medios elaborados con extractos de dos suelos diferentes: extracto I, preparado con el

suelo en donde crece el hospedero que multiplicó el aislado micorrízico, y extracto II, elaborado con el suelo utilizado para realizar el trasplante de la cactácea del medio de cultivo (incisos 11 y 12 del cuadro 3). Los medios testigo (agar-agua) fueron hechos con dos marcas distintas agar y a tres valores de pH (incisos 1-6, cuadro 3 y anexos 3, 4, 5, y 6).

Los resultados de germinación de las esporas en los medios axénicos se resumen en el cuadro 3 y gráfica 1.

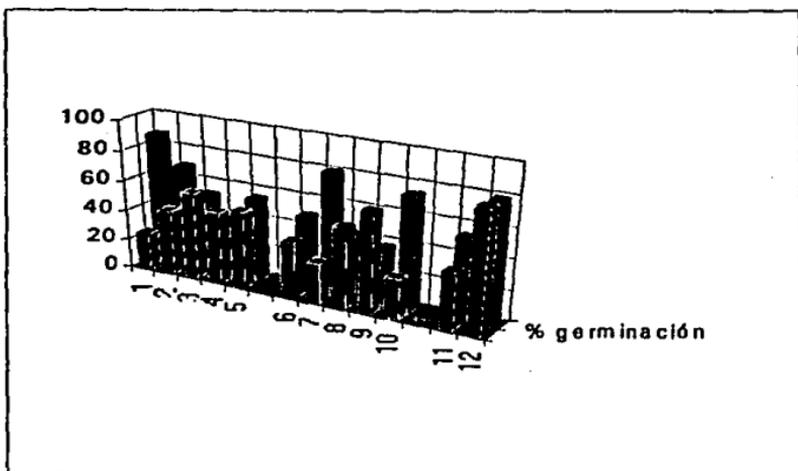
Cuadro 3. Germinación de clamidosporas de *Glomus sp.* en medios axénicos agarificados.

Medios	No. total esporas germinadas	Porcentaje germinación	Porcentaje de esporas contaminadas
Testigos agar-agua:			
1. Agar bacteriol. pH 5.5	37	25.5	88.0
2. Agar bacteriol. pH 6.5	63	43.4	69.0
3. Agar bacteriol. pH 7.5	85	58.6	52.7
4. Agar DifcoBacto pH 5.5	70	48.3	33.3
5. Agar DifcoBacto pH 6.5	75	51.7	54.7
6. Agar DifcoBacto pH 7.5	5	37.2	49.3
Para micropropagación de plantas:			
7. Murashige-Skoog pH 5.7	38	26.2	80.0
8. MS-IBA (1 mg) pH 5.7	77	53.1	42.0
Para germinación de hongos VA:			
9. Hepper & Smith pH 7.0	97	66.9	37.3
10. Allen <i>et al.</i> pH 5.5	39	26.9	74.0
Extractos de suelo:			
11. Extracto I pH 6.8	54	37.2	52.7
12. Extracto II pH 6.8	116	80.0	78.7

La concentración del agar, en todos los medios, se homogeneizó a 8 g/l.

La población fue de 150 esporas (con tres repeticiones de 50 esporas cada una); los resultados se obtuvieron después de un mes de incubación en oscuridad a 25°C.

* El porcentaje de germinación se calculó con base en el no. de esporas potencialmente viables de acuerdo a la prueba de bromuro de tetrazollo.



Gráfica 1. Porcentaje de germinación y contaminación de esporas de *Glomus* sp. en diferentes medios axénicos agarificados.

a. Características germinativas de *Glomus* sp. *in vitro*.

La germinación de las esporas fue lenta e irregular; esta apreciación coincide con lo observado por Godfrey (1957b) y Mosse (1959). Ocurrió a partir del quinto día, prolongándose hasta el vigésimo séptimo. El comienzo de la germinación se observó por la aparición de uno o varios tubos germinativos (Fig. 5 a).

La mayoría de las esporas presentaron múltiples tubos germinativos; este tipo de germinación fue denominado por Sanders & Sheikh, (1983) como *germinación múltiple*. Por otra parte, Koske (1981b) notó la aparición sucesiva de hasta 10 tubos germinativos cuando se cortaban los anteriores. Daniels & Trappe (1980), también observan múltiples tubos en esporas de *Glomus* sp. En este caso, se registraron hasta 10 tubos germinativos debido, quizá, a que las esporas estaban bastante maduras o senescentes (Sward, 1981). Posiblemente, descargaron todos sus esfuerzos en la producción de múltiples tubos germinativos y ramificaciones para asegurar la colonización agotando, de este modo, todas sus reservas lipídicas (Azcon-A. *et al.*, 1991) (Fig. 5 b-d).

Las hifas son septadas en el comienzo de la ramificación. No se observa la aparición de tubos germinativos a partir de la hifa sustentora (Fig. 5 c).

Debido a la dificultad por la torsión de las hifas y el medio de observación, no se hicieron mediciones de la extensión de los tubos germinativos. Sin embargo, su crecimiento fue extenso, superando más de cuatro veces el diámetro de la espora (Fig. 5 d).

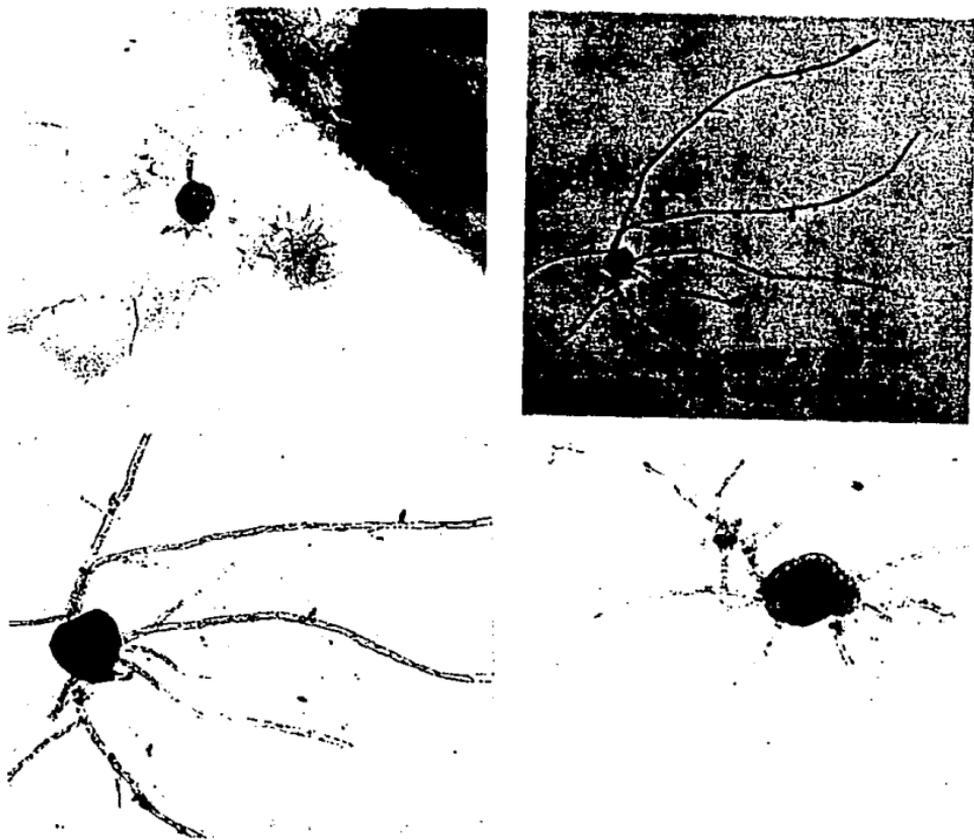


Figura 5. Germinación de esporas de *Glomus* sp. en medios axénicos. a. Inicio de la germinación; se observa la hifa sustentora en la parte superior de la espora y el desarrollo de 4 tubos germinativos en la parte inferior (40x). b. Vista de una espora germinada; se aprecia la extensión de los múltiples tubos germinativos y la ramificación hifal (4x). c. Acercamiento de la espora anterior, en donde se aprecia el surgimiento de los múltiples tubos germinativos y la tabicación de las hifas (40x). d. Vista de la germinación de una espora donde se observan las reservas lipídicas como estructuras globulares dentro de la misma, el crecimiento de múltiples tubos germinativos en ambos extremos de su superficie y la tabicación de las hifas (40x) (fotomicrografías tomadas por A. Hernández).

b. Evaluación de los resultados de germinación de clamidosporas.

Para este diseño experimental, la prueba estadística aplicada fue el análisis de varianza, con el propósito de conocer si las medias de germinación, obtenidas en cada uno de los medios, presentaban diferencias significativas. El diseño experimental fue completamente aleatorizado, con tres repeticiones (50 esporas por repetición) con 12 tratamientos (medios axénicos) asignados al azar, con las siguientes hipótesis estadísticas:

Ho: Las medias muestrales son similares por lo que se infiere que no hay diferencias significativas entre los tratamientos.

Ha: La medias muestrales no son similares por lo que se infiere que sí hay diferencias significativas entre los tratamientos.

Los resultados de la prueba estadística permiten rechazar la hipótesis nula (H_0), con una confiabilidad del 95% ($F=2.216 < 2.24$) por lo que se establece que *sí hubo diferencias significativas atribuibles a los tratamientos en la germinación in vitro de las esporas.*

Medios testigo

En los tratamientos testigo (medios de agar-agua con distintos valores de pH), los resultados del análisis de varianza ($F_{0.05}=3.1 > 1.02$) indican que no hay diferencias en la germinación debidas al tipo de agar usado en la elaboración de los medios.

El total de esporas germinadas en el agar bacteriológico Bioxón (197 esporas), fue similar al obtenido en el agar Difco-Bacto (187 esporas). De este modo, se puede hacer una substitución, de éste último sin temor de que se afecte la germinación y con la ventaja de que corresponde al mismo agar que se emplea en la preparación de los medios para micropropagación de plantas.

El análisis de varianza para conocer el efecto del pH en la germinación de las esporas, nos indica que no hubo un efecto en la germinación atribuible a los valores de pH en la escala considerada, por lo que se puede afirmar que *la germinación de esta especie no se ve afectada por valores de pH de 5.5 a 7.5*. Si bien no hubo diferencias significativas, sí se pudo observar un ligero favorecimiento de la germinación al disminuir la acidez. En el cuadro 3, se puede apreciar que, en total, 100 esporas germinaron en pH 5.5, 155 a pH 6.5 y 129 a pH 7.5, lo que coincide con lo encontrado por otros autores en relación a las preferencias del género *Glomus* (Siqueira *et al.*, 1984; Daniels & Trappe, 1980).

Con base en el análisis de los resultados de los medios testigo, se infiere que las diferencias más importantes encontradas en los porcentajes de germinación, ocurren en los medios nutritivos.

Medios nutritivos.

Se presentaron diferencias significativas ($F_{0.05}=4.07 < 6.16$) en la germinación debidas al efecto de los componentes de los medios, por lo que se realizó una comparación múltiple de medias con los siguientes resultados:

Existen diferencias ($F=0.1$) en la germinación de *Glomus* sp. entre los siguientes medios:

- * Murashige & Skoog vs. Murashige & Skoog/IBA
- * Murashige & Skoog vs. Hepper & Smith
- * Murashige & Skoog/IBA vs. Allen *et al.*
- * Hepper & Smith vs. Allen *et al.*

No existen diferencias ($F=0.1$) en la germinación de las calmidosporas de *Glomus* sp. entre los siguientes medios:

- * Murashige & Skoog vs. Allen *et al.*
- * Murashige & Skoog/IBA vs. Hepper & Smith

El mejor medio nutritivo para la germinación fue el desarrollado por Hepper & Smith, seguido por el medio Murashige & Skoog, adicionado con 1 mg de ácido indol-butírico, regulador sintético del crecimiento utilizado, frecuentemente, en la inducción de raíces. El empleo de este regulador mejoró notablemente la germinación de las esporas, en relación al medio al que careció de esta sustancia, el cual correspondió al que menos favoreció la germinación. El medio Hepper & Smith, casi idéntico al sugerido por Bécard & Fortin (1988) (anexo 7), considerado como un medio muy favorable para el crecimiento axénico de micorrizas VA, resultó ser el mejor para la germinación de las esporas. Esto se puede atribuir al contenido nutricional de los medios. El medio de Bécard & Fortin está basado en el medio modificado de White, propuesto originalmente para el cultivo de raíces y que contiene los macro y micronutrientes, en cantidades considerablemente menores al medio Murashige & Skoog. En el medio Bécard & Fortin, la fuente y concentración de fósforo es distinta, así como la cantidad de sacarosa, lo que permite aseverar que, un medio adecuado para el crecimiento de raíces, es el que tiene, también, un balance nutritivo óptimo en concentraciones y componentes para el cultivo del hongo. La aplicación de ácido indol-butírico corrobora que los componentes que favorecen el crecimiento de raíces, también favorecen la germinación de las esporas y el crecimiento hifal. El medio Bécard & Fortin no se probó debido a que su hallazgo en la literatura fue posterior a la elaboración de la fase experimental de este trabajo.

El medio Allen *et al.* también indujo una baja germinación, debido, probablemente, a que no tiene vitaminas, glicina ni sacarosa, necesarias para el desarrollo del hongo (Hepper, 1979; Siqueira *et al.*, 1985; García-G., 1989).

Extractos de suelo

El resultado de la germinación de esporas en los extractos de suelo, permite aseverar que hubo un efecto debido a los componentes presentes en ambos suelos.

El análisis de las características de los dos suelos, refleja algunas diferencias importantes (anexo 8). Si bien, el pH es óptimo en los dos casos (6.8), el contenido de materia orgánica es menor en el suelo con el que se elaboró el extracto I (1.65 vs. 2.34%, respectivamente). El contenido de fósforo asimilable (9.62 y 8.92) es medianamente pobre (de 5 a 10 ppm). No obstante, es mayor a la concentración recomendada en el medio para el cultivo axénico de micorrizas VA establecido por Bécard & Fortin (1988), en el cual se adicionan solamente 4.8 ppm de fósforo. Sin embargo, el contenido de fósforo de estos medios, no influyó, aparentemente, en la germinación de las esporas, por lo que se corrobora lo precisado por Wilson *et al.* (1989) quienes opinan que existe una gama de concentraciones de fósforo por arriba y por debajo de las cuales la germinación se suprime.

En relación a la germinación obtenida con ambos extractos, se observan diferencias estadísticamente significativas. El medio preparado con el extracto de suelo II, dió el mayor porcentaje de germinación (80 %), en comparación con el obtenido en el medio preparado con el extracto de suelo I (37.2%). Esta diferencia, se puede deber a las características fisicoquímicas de los suelos utilizados para la preparación de los extractos (anexo 8). El suelo II, en comparación al I, presentó una baja capacidad de intercambio catiónico total (notablemente menor a la del suelo I); entre los cationes intercambiables, el calcio y magnesio fueron también, más bajos en el suelo II. Además, el contenido de materia orgánica y el nitrógeno total (considerados como medianamente pobres) fueron, también, menores en este suelo.

Por lo antes expuesto, el suelo II puede considerarse como el más pobre en nutrimentos. Es probable que esta menor riqueza haya influido positivamente en la germinación de las esporas, como lo establecen Bécard & Fortin (1988), en su medio mínimo y Daft & Nicolson (1966, 1969, 1972).

Por otra parte, el que el extracto de suelo II haya tenido el mayor porcentaje de germinación de esporas, confirma que los nutrimentos y los factores contenidos en el suelo, que aún no se precisan, son los que favorecen la colonización de las plantas por estos hongos (Azcon-a. *et al.*, 1991; Daniels & Graham, 1976; Sward *et al.*, 1978; Siqueira & Hubell, 1986). Al respecto, Green *et al.* (1976) ya habían notado una mayor germinación de las esporas en extractos de suelo agarificados, en relación a los medios nutritivos agarificados, a distintos valores de pH. Daniels & Graham (1976) obtienen la mejor germinación en extractos de suelo (obtenidos a partir de 200 g/l) que fueron esterilizados por miliporo, lo que contribuyó a conservar sus características nutricionales.

b. Comparación múltiple de medias entre los medios nutritivos y extractos de suelo.

La prueba estadística ($F=0.1$) indicó diferencias en la germinación de las esporas entre los siguientes medios nutritivos y extractos de suelo:

- * Murashige & Skoog vs. extracto II
- * Murashige & Skoog/IBA vs. extracto II
- * Hepper & Smith vs. extracto I
- * Allen *et al.* vs. extracto II

No se observaron diferencias en la germinación de las esporas entre los siguientes medios:

- * Murashige & Skoog vs. extracto I
- * Murashige & Skoog/IBA vs. extracto I
- * Hepper & Smith vs. extracto II
- * Allen *et al.* vs. extracto I

Estos resultados nos pueden dar una idea acerca de que los medios nutritivos pueden ser, substituidos o equiparados, a los medios preparados con extractos de suelo. Como se aprecia en el cuadro 3, el medio Hepper & Smith permitió una germinación, aritméticamente menor, a la del medio elaborado con el extracto de suelo II, aunque estadísticamente, ambos resultados son iguales. Por otra parte, en los medios MS, MS-IBA y Allen *et al.* la germinación fue similar a la del extracto de suelo I.

Es importante considerar que, en la determinación del porcentaje de germinación *in vitro*, no sólo puede influir la naturaleza del medio y las condiciones de incubación, sino que, además, puede influir la edad fisiológica de las esporas, viabilidad y efecto de dormancia. Por estas razones, resulta difícil alcanzar el 100 % de germinación. El porcentaje de germinación obtenido en el medio de agar-extracto de suelo II (80 %), está dentro de los valores de germinación obtenidos por otros autores (Mosse, 1959; Hepper & Smith, 1976; Mertz *et al.*, 1979; St. John *et al.*, 1981 y otros). Esto significa que este medio puede ser igual o mejor a otros medios anteriormente descritos, elaborados con una formulación conocida. (Daniels & Graham, 1976; Sward *et al.*, 1978; Siqueira & Hubbell, 1986 y Azcon-A. *et al.*, 1991, entre otros).

Acerca del efecto de la contaminación sistémica desarrollada por las clamidosporas, no se encontró ninguna relación entre el porcentaje de germinación y el grado de contaminación (cuadro 3).

4. 3. Micorrización *in vitro* de *Mammillaria huitzilopochtli* con *Glomus* sp.

a. Caracterización de la colonización de las raíces de *Mammillaria huitzilopochtli* *in vitro*.

En el establecimiento de la colonización *in vitro* de esta planta, es importante hacer notar que, la germinación de las esporas en este medio, fue la más baja (ver resultados de germinación en el medio 7 en el cuadro 3). Por lo que este hecho, probablemente, repercutió en la colonización.

En vista del crecimiento irregular de las raíces de esta especie *in vitro*, no se pudo determinar el porcentaje de colonización. La micorrización, por tanto, se evaluó de manera individual, considerando todas las estructura micorrízicas desarradas. Las estructuras más frecuentemente observadas, fueron puntos incipientes de colonización a lo largo de las raíces (Fig. 6 a-c). También se observó la presencia de hifas intraradicales y algunas vesículas (Fig. 6 c).

No obstante haberse hecho una selección de los individuos de *Mammillaria* con raíces jóvenes y blancas, algunas de ellas se encontraban ligeramente pigmentadas, debido a que los cultivos cuyas raíces se encuentran expuestas a la luz, promueven el desarrollo de cloroplastos no funcionales. Esto constituye un impedimento para la colonización (Ocampo, *et al.*, 1980).

Por otro lado, durante el tratamiento para transparentar las raíces, se pudo observar que, a pesar de su corto tamaño y edad, estaban lo suficientemente lignificadas. Esta característica, propia de esta familia (Buxbaum, 1950), constituye, también, una barrera para la micorrización (Sanders & Sheikh, 1983; Pons *et al.*, 1983).

b. Caracterización de la colonización de las raíces de *Mammillaria huitzilopochtli* *in vivo*.

La colonización de las raíces en el suelo se desarrolló, más rápida e intensamente, que bajo condiciones axénicas. Normalmente, los puntos de colonización se generaron a partir de esporas provenientes de esporocarpos del suelo (Fig. 7 a). En estas condiciones, hubo un 18% más de individuos que se micorrizaron aunque, en general, la colonización también fue poco profusa. No obstante, se pudo encontrar una raíz con una colonización madura (Fig. 7b).

En el cuadro 4, se comparan los resultados obtenidos de la colonización de las raíces de *Mammillaria huitzilopochtli* tanto en condiciones axénicas (*in vitro*), como en suelo (*in vivo*).

Cuadro 4. Ensayo de colonización de raíces de *Mammillaria huitzilpochtli* por *Glomus* sp.

Elementos de evaluación	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
No. de plantas:	50	50
No. de esporas por planta:	50	--
Porcentaje de contaminación:	46%	--
No. de plantas colonizadas:	6	15
Porcentaje de plantas micorrizadas:	12	30
Evolución de la colonización:	primaria	secundaria

Las plantas *in vitro* se mantuvieron en obscuridad para evitar que la luz incidiera directamente sobre las esporas. Las plantas *in vivo* se colocaron en un ambiente parcialmente iluminado con luz natural. La cosecha se realizó después de un mes de haber aplicado los propágulos.

Si bien el número de esporas no está relacionado con la intensidad de la colonización (Hayman & Stovold, 1979; Porter, 1979), en este experimento, se aplicaron 50 esporas por planta, el cual es un número mayor al convencionalmente usado en los estudios de micorrización VA *in vitro* (de 2 a 10 esporas). De este modo, se trató de asegurar la germinación de algunas de ellas, a pesar de aumentar los riesgos por contaminación. Al respecto, Allen & John (1984) considera que, una sola espóra, por planta logra una buena colonización y que, aumentando el número de esporas, se incrementa la posibilidad de una buena infección pero, también, el riesgo de contaminación, tiempo de manipuleo y desecación del material.

Por otro lado, Pons *et al.* (1983) logran obtener un excelente sistema radical en plantas micropropagadas a pesar de lo cual, se desarrolla una baja colonización *in vitro*. Estos autores lo atribuyen a que la especie del hongo que utilizaron para la inoculación pudo no ser la más adecuada. Lo anterior, también ha sido establecido por Palacios-M. *et al.* (1987), referente a la existencia de una cierta preferencia entre endófitos y hospederos. Este es quizá, otro de los factores por los cuales probablemente no se obtuvieron niveles más elevados de colonización de esta especie de cactácea *in vivo*.



Fig. 6. Desarrollo de la colonización de *Mammillaria huiltzilopochtli* con *Glomus* sp. in vitro. a. Germinación y penetración hifal de una espora en una raíz (4x). b. Varios puntos de colonización a lo largo de la raíz (4x). c. Punto de entrada de una hifa en la epidermis de la raíz. Se observa una alta densidad de pelos absorbentes (40x). d. Desarrollo inicial de vesículas del hongo en el interior de la raíz (40x). Microfotografías tomadas por A. Hernández.



Fig. 7. Colonización de Mammillaria huitzilopochtli por Glomus sp. in vivo. a. Germinación de esporas a partir de un esporocarpo cercano a la raíz (10x). b. Colonización madura con el desarrollo de esporas intraradicales (40x) (Fotomicrografías tomadas por A. Hernández).

V. CONCLUSIONES

1. Los ensayos para la selección de propágulos micorrízicos VA *in vitro*, nos permitieron concluir que las esporas, resultaron ser las más convenientes en vista de que en ellas, fue más efectivo el método de esterilización superficial; lo que significó un menor índice de contaminación sistémica.

2. De las pruebas realizadas para evaluar el efecto de la calidad del agar en la germinación de las esporas, se concluye que, tanto en los agares con un bajo grado de purificación, como en los de alto grado de purificación, los porcentajes de germinación tienden a ser más bajos.

3. Sobre el efecto del pH en la germinación de las esporas, las pruebas realizadas nos indican que, en una escala de 5.5 a 7.5, no se detectó ninguna interacción.

4. En relación a las pruebas de germinación de esporas, en diferentes medios axénicos agarificados, se encontró que el medio elaborado con el extracto de suelo más pobre en nutrimentos, permitió obtener el más alto porcentaje equiparado, estadísticamente, al medio de Hepper & Smith.

5. Acerca del efecto de la contaminación sistémica desarrollada por las esporas, no se encontró ninguna relación entre el porcentaje de germinación y el grado de contaminación.

6. Las pruebas realizadas con *Mammillaria huitzilpochtli* tanto *in vitro* como en suelo (*in vivo*), mostraron claramente la susceptibilidad de esta planta a la micorrización vesículo-arbuscular.

7. Los ensayos realizados nos permiten concluir que el medio más conveniente para realizar futuras investigaciones de micorrización con esta planta, es el elaborado con extracto de suelo en vista de que, en este medio, se reúnen las condiciones adecuadas para la germinación de las esporas, y constituiría, además, el inicio de un mecanismo de readaptación de la planta a sus condiciones naturales.

ANEXO 1. RESULTADOS DEL CONTROL DE CALIDAD DEL AISLADO MICORRÍZICO ORIGINAL Y DE LA SEPARACIÓN Y CONTEO DEL PROPÁGULO.

Control de calidad del aislado micorrízico.

Glomus sp., generador de esporas intraradicales.

* <i>Hospedero:</i>	<i>Allium porrum</i> L.
* <i>Porcentaje de colonización:</i>	75%
* <i>No. de esporas por g de suelo:</i>	201
* <i>Porcentaje de viabilidad de las esporas según la prueba de bromuro de tetrazolio:</i>	65.2%

Separación y conteo de los propágulos.

Las esporas fueron colectadas a partir de racimos intraradicales, con lo que se garantizó su edad fisiológica.

* *De una muestra de 0.13 g de raíces colonizadas se obtuvieron:*

136 racimos de esporas "aparentemente vivas".

41 racimos de esporas "aparentemente muertas" y

4 939 esporas con una viabilidad de 96.77 % según la prueba de bromuro de tetrazolio.

ANEXO 2. SOLUCION NUTRITIVA LONG ASHTON (1952)

Esta solución se emplea comúnmente en el riego de plantas con deficiencias nutricionales, en experimentos controlados y, para mantener el vigor y estimular el crecimiento de muchas especies vegetales. Desde 1952, se usó en una gran variedad de condiciones ambientales en sustratos de arena o medios hidropónicos de numerosas cosechas de vegetales y árboles de climas templados y tropicales (Hewitt, 1962).

En el caso del riego de plantas hospederas, es necesario modificar la concentración de fósforo para que se pueda establecer una elevada colonización.

Macronutrientes	mg/l
KNO ₃	404
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	944
MgSO ₄ ·7H ₂ O	368
Na ₂ H ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	89*

Oligoelementos

MnSO ₄ ·4H ₂ O	1.69
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.29
H ₃ BO ₃	3.1
NaCl	5.9
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1.8 g/l
EDTA-Fe	1.4 ml/l

* Originalmente se usan 278 mg/l, lo que resulta en una concentración de fósforo de 41 ppm. En este caso la concentración se requiere minimizar para que se pueda llevar a cabo el desarrollo del hongo.

ANEXO 3. ELABORACION DE MEDIOS AGARIFICADOS: TESTIGOS Y EXTRACTOS DE SUELO

A. TESTIGOS:

AGAR BACTERIOLOGICO BIOXON (8 g/l)

- A tres vasos de precipitados con 250 ml de agua destilada se les ajusta pH a 5.5, 6.5 y 7.5 respectivamente con KOH 0.1 N.
- Se disuelven en cada uno, 2 g de agar bacteriológico Bioxon y se calientan con ayuda de un agitador magnético hasta que estén translúcidos.
- Se vacían 20 ml de cada uno en 10 cajas Petri de 10 cm de diámetro y 50 ml de capacidad. El resto se vacía a un matraz Erlenmeyer de 100 ml.
- Se autoclavean a 15 libras de presión durante 15 minutos.
- Los otros 50 ml se vacían (en campana de flujo laminar) a 10 cajas Petri estériles de 10 ml y 5 cm de diámetro (5 ml por caja).
- Se sellan las cajas con egapack y se les anotan los datos pertinentes.
- Se guardan invertidas a 4°C.

DIFCO BACTO AGAR

La preparación de este medio es idéntica al anterior, sustituyendo el agar bacteriológico por 2 g de agar Difco-Bacto.

B. EXTRACTOS DE SUELO:

Extracto I: Suelo donde crece hospedero.

- Se pesan 500 g de suelo semi-húmedo y se colocan en un vaso de precipitados de 1 l con 600 ml de agua destilada. Se instalan en una plataforma de agitación durante 24 horas.
- Se deja sedimentar y se decanta el sobrenadante filtrándolo en un embudo.
- Se mide pH.
- El extracto de suelo obtenido se esteriliza dos veces por miliporo (0.25 mm).
- Se diluyen 2 g de agar bacteriológico Bioxon, en 50 ml de agua destilada. Se agita con agitador magnético calentando hasta que el agar esté translúcido. Se autoclavea en un matraz Erlenmeyer de 250 ml durante 15 minutos a 15 libras de presión.
- En campana de flujo laminar, se deja templar y se le agrega el extracto de suelo. Se homogeniza y vacía en cajas Petri estériles (20 ml por caja).

Extracto II: Suelo donde se propagan las catáceas.

Se realizan los mismos pasos antes mencionados, pero utilizando el suelo donde se transplantan las cactáceas de los medios *in vitro*.

ANEXO 4. MEDIO MURASHIGE & SKOOG (1962)

Sol. macronutrientes mg/l

$(\text{NH}_4)\text{NO}_3$	1650
KNO_3	1900
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170

Sol. calcio

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
---	-----

Sol. micronutrientes

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
H_3BO_3	6.2
KI	0.83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025

Sol. fierro

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
Na_2EDTA	37.8

Sol. vitaminas

Tiamina HCl	0.1
Ac. nicotínico	0.5
Piridoxina	0.5

Sol. mio-Inositol

M-Inositol	100
------------	-----

Sol. de Glicina

Glicina	2
Sacarosa	30 g/l
Agar	8 g/l
PH	5.7-5.8

Elaboración del medio

- Se preparan stocks para 20 litros de medio, lo que permite disminuir el error en el peso de los micronutrientes y preparar rápidamente la cantidad deseada de medio. Para cada solución, se pesan los reactivos y se van agregando uno a uno en un volumen de 150 ml de agua destilada. Se homogeniza con un agitador magnético y se afora a 200 ml. Almacenar a 4°C.

- Para elaborar el medio, se sacan previamente los stocks del refrigerador y se dejan templar. Se prepara un vaso de precipitados con la mitad del volumen de agua destilada de la cantidad de medio que se desee elaborar. Se van agregando los mililitros correspondientes de cada stock en el orden descrito, esperando que cada uno se vaya disolviendo. Se agrega la sacarosa y se ajusta pH.

- Posteriormente se afora y agrega el agar disolviendo en caliente hasta que se torne translúcido.

- Se vacían 20 ml en cajas Petri y se autoclavea 15 minutos a 15 libras de presión.

- Cuando se solidifica el agar, se sellan las cajas Petri con egapack y se guardan invertidas a 4°C.

MEDIO MS CON 1 mg DE ACIDO INDOL-BUTIRICO

- Se elaboran los mismos pasos anteriormente descritos, aforando 5 ml menos del volumen total y esterilizando el medio en un matraz Erlenmeyer.

- Se disuelve 1 mg de IBA en 4 ml de agua destilada y se afora en una probeta graduada de 10 ml.

- Se vacía en una jeringa miliporo y se inyecta suavemente al medio (en campana de flujo laminar), cuando éste haya entibiado.

- Se homogeniza y se vacían 20 ml en cajas Petri esterilizadas.

- Se deja solidificar, se sella con egapack y se conservan invertidas a 4°C.

ANEXO 5. MEDIO HEPPEL & SMITH (1976)

Medio modificado de White, 1936.

SoL. macronutrientesmg/l

KCl	65
KNO ₃	80
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	300
MgSO ₄ ·7H ₂ O	720

SoL. fósforo

NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	10.7
---	------

SoL. micronutrientes

FeNaEDTA	4.6
MnCl ₂ ·4H ₂ O	4.9
KI	0.75
H ₃ BO ₃	1.5
ZnSO ₄ ·H ₂ O	1.92
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1 microgramo
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.168 microgramos
Glicina	3

SoL. vitaminas

Tiamina	0.1
Ac. Nicotínico	0.5
Piridoxina	0.1
Sacarosa	20 g
Agar	8 g
PH	7

- Se elaboran stocks para 10 litros, agregando los reactivos uno a uno y disolviendo continuamente en 150 ml de agua destilada. Se almacenan a 4°C.

- Para elaborar el medio, se toman los mililitros pertinentes de cada stock y se disuelven en un volumen de agua destilada menor al final, homogenizando con un agitador magnético.

- Se agrega la sacarosa y se ajusta pH. Se afora al volumen final menos el número de mililitros de la sol. de fósforo.

- Se agrega el agar bacteriológico y se disuelve en caliente hasta que esté translúcido.

- Se autoclavea 15 minutos a 15 libras de presión en un matraz Erlenmeyer.

- Se deja templar en campana de flujo laminar y se le inyectan los mililitros de la solución de fósforo esterilizados por miliporo.

-Se homogeneiza y se vacían 20 ml a cajas Petri previamente esterilizadas.

- Se conservan invertidas a 4°C.

ANEXO 6. MEDIO ALLEN et al. (1979)

Sol. macronutrientes	mg/l
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	341
KNO ₃	80
Na ₂ SO ₄ ·10H ₂ O	200
MgSO ₄ ·7H ₂ O	738
Ca-Phytato	230*

Sol. micronutrientes

MnCl ₃ ·4H ₂ O	7.07
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.68
KI	0.75
H ₃ BO ₃	1.5
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.00254
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0201
FeCl ₃ ·6H ₂ O	4.16
Agar	8 g/l**
PH	5.5

* Sustituído por harina de hueso molido (8.836 mg/l), según Hepper (1981).

** Originalmente es 10 g por litro pero se homogeneizó la concentración de agar para la elaboración de todos los medios a 0.8%.

- Se elaboran stocks de soluciones, agregando los reactivos uno a uno en 150 ml de agua destilada. Se afora a 200 ml y se conservan a 4°C.

- Se elabora el medio agregando los mililitros correspondientes al volumen que se desee preparar.

- Se homogeniza con agitador magnético, se agrega sacarosa y se ajusta pH.

- Se afora al volumen final y se agrega el agar, calentando hasta que esté translúcido.

- Se vacían 20 ml a cajas Petri y se autoclavian 15 minutos a 15 libras de presión.

- Se conservan invertidas a 4°C.

ANEXO 7. MEDIO PARA CRECIMIENTO DE HONGOS MICORRIZICOS VA POR BECARD & FORTIN, 1988

Este medio se basa en un medio modificado de White (1936), usado para mantener rutinariamente cultivos de raíces y un medio mínimo para lograr la colonización *in vitro* con el hongo VA.

	Medio mínimo mg / l	Medio modificado de White mg / l
MgSO ₄ .7H ₂ O	731	731
Na ₂ SO ₄ .10H ₂ O		453
KNO ₃	80	80
KCl	65	65
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	--	21.5
KH ₂ PO ₄	4.8	--
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	266	288
NaFeEDTA	0.75	8
KI	--	0.75
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.0024	2.65
MnCl ₂ .4H ₂ O	6	6
H ₃ BO ₃	--	1.5
CuSO ₄ .5H ₂ O	--	0.13
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	--	0.0024
Myo-Inositol	50	50
Glicina	3	3
Tiamina	0.1	0.1
Piridoxina	0.1	0.1
Ac. nicotínico	0.5	0.5
Sacarosa	10 g/l	30 g/l
pH*	5.5	5.5
Goma gelatinosa**	0.3 %	0.4 %

* El valor de pH de este medio fue bueno para el desarrollo de especies de *Gigaspora*, género adaptado a condiciones ligeramente ácidas. Para el cultivo de *Glomus*, se sugiere modificarlo a un pH de 6.5.

** Gel-Gro. ICN Biochemical Co. reemplazando al agar Difco-Bacto.

ANEXO 8. ALGUNAS PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LOS SUELOS UTILIZADOS.

Propiedad	Suelo I	Suelo II	Referencia.
PH	6.84	6.80	
Materia orgánica	2.34 %	1.65 %	Walkey & Black Jackson
C.I.C.T.	23	10	
Ca+ meq/100 g	11.2	5.0	
Mg+ meq/100 g	9.0	4.5	
Na+ meq/100 g	0.13217	0.2391	
K+ meq/100 g	0.42307	0.6538	
P disponible ppm	9.62	8.92	Bray & Kurtz
N total	0.156%	0.063%	Kjeldahl

Interpretación de resultados según Vázquez & Bautista, 1993.

BIBLIOGRAFIA

- ABBOT L. K., A. D. ROBSON, 1979.
A quantitative study of the sori and anatomy of mycorrhizas formed by a species of *Glomus*, with reference to its taxonomy. *Aus. J. Bot.* 27: 363-375.
- AGUILAR-FERNANDEZ M., L. VARELA, N. FELIX, 1991.
Germinación de esporas del hongo micorrizico arbuscular *Scutellispora pellucida*. En: *Memorias del IV Congreso Nacional de Micología*, pp. 139. Tlaxcala, Tlaxcala. México.
- AGUILAR-FERNANDEZ M., L. VARELA, N. FELIZ, 1993.
Germinación y viabilidad del hongo micorrizico arbuscular *Scutellispora pellucida*. En: *Memorias del XII Congreso Mexicano de Botánica*, pp. 11. Mérida, Yucatán. México.
- ALLEN M. F., T. S. MOORE, M., CHRISTENSEN, N. STANTON, 1979.
Growth of vesicular-arbuscular-mycorrhizal and nonmycorrhizal *Bouteloua gracilis* in a defined medium. *Mycologia* 71: 666-669.
- ALLEN M. F., T. S. MOORE, M. CHRISTENSEN, 1980.
Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae. I. Cytokinin increases in the host plant. *Can. J. Bot.* 58: 371-374.
- ALLEN M. F., J. C. SEXTON, T. S. MOORE, M. CHRISTENSEN, 1981a.
Influence of phosphate source on vesicular-arbuscular mycorrhizae of *Bouteloua gracilis*. *New Phytol.* 87: 678-694.
- ALLEN M. F., W. K. SMITH, T. S. MOORE, M. CHRISTENSEN, 1981b.
Comparative water relations and photosynthesis of mycorrhizal and non-mycorrhizal *Bouteloua gracilis*. *New Phytol.* 88: 683-689.
- ALLEN M. F., T. V. ST. JOHN, 1984.
Spore germination and axenic culture of endomycorrhizae. B. Dual culture of endomycorrhizae. En: *Methods and principles in mycorrhizal research*, (Ed. S. Schenk), pp. 85-89. American Phytopathological Society, St. Paul.
- ALWIS D. P., K. ABEYBAYAKE, 1980.
A survey of mycorrhizae in some forest trees of Sri Lanka. En: *Tropical Mycorrhiza Research* (Ed. P. Mikolaj) pp. 135-155. Cambridge University Press, Cambridge.
- AN Z. Q., J. W. HENDRIX, 1988.
Determining viability of endogonaceus spores with a vital strain. *Mycologia* 80: 259-261.
- AZCON-AGUILAR C., J. M. BAREA, 1985.
Effect of soil microorganisms on formation of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 84: 536-537.
- AZCON-AGUILAR C., R. M. DIAZ, J. M. BAREA, 1986a.
Effect of soil micro-organisms on spore germination and growth of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Trans. Br. mycol. Soc.* 86 (2): 337-340.
- AZCON-AGUILAR C., R. M. DIAZ, J. M. BAREA, 1986b.
Effect of free-living fungi on the germination of *G. mosseae* on soil extract. En: *Physiological and genetical aspects of Mycorrhizae* (Eds. Gianinazzi-Pearson V., S. Gianinazzi), pp. 515-520. INRA, Paris.
- AZCON-AGUILAR C., F. GARCIA, J. M. BAREA, 1991.
Germinación y crecimiento axénico de los hongos formadores de micorrizas vesículo-arbusculares. En: *Fijación y movilización biológica de nutrientes*. Vol. II. Fijación de N y

micorrizas, (Coords. J. Olivares & J. M. Barea), pp. 129-147. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid.

AZCON-GUZMAN C., J. M. BAREA, 1980.
Micorrizas. *Investigación y Ciencia* 47: 8-16.

AZCON-R., J. M. BAREA, D. S. HAYMAN, 1976.
Utilization of rock phosphate in alkaline soils by plants inoculated with mycorrhizal fungi and phosphate and solubilizing bacteria. *Soil Biol. Biochem.* 8: 135-138.

AZCON-R., 1987.
Germination and hyphal growth of *Glomus mosseae* *in vitro*: Effects of rhizosphere bacteria and cell-free culture media. *Soil Biol. Biochem.* 19: 417-419.

BAKER K. F., R. J. COOK, 1974.
Biological control of plant pathogens. W. H. Freeman, San Francisco. 433 p.

BARADAS S. N., P. M. HALOS, 1980.
Selection of mycorrhizal isolates for biological control of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* on *Vigna unguiculata*. En: *Tropical Mycorrhizal Research* (Mikola Ed.), pp. . Clarendon Press, Oxford.

BARKDOLL A. W., N. C. SCHENCK, 1986.
Effects of aluminum on spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and hyphal penetration of bean roots. *Phytopathol.* 76: 1063-1064.

BAYLIS G. T., 1961.
The significance of mycorrhizas and root nodules in New Zealand vegetation. *Proc. R. Soc. N. Z.* 89: 45-50.

BAYLIS G. T., 1967.
Experiments on the ecological significance of phycomycetous mycorrhizas. *New Phytol.* 66: 231-243.

BAYLIS G. T., 1972.
Minimum levels of available phosphorus for nonmycorrhizal roots. *Phytopath.* 72: 1108-1114.

BECARD G., J. A. FORTIN, 1988.
Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on RI T-DNA transformed roots. *New Phytol.* 108: 211-218.

BECARD G., Y. PICHE, 1989.
New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *New Phytol.* 112: 77-83.

BECARD G., Y. PICHE, 1989.
Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Appl. Env. Microbiol.* 55: 2320-2325.

BEILBY J. P., D. K. KIDBY, 1982.
The early synthesis of RNA, protein and some associated metabolic events in germinating vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores of *Glomus caledonium*. *Can. J. Microbiol.* 28: 623-628.

BERTHAU Y., V. GIANINAZZI, S. GIANINAZZI, 1980.
Développement et expression d'association endomycorhizienne chez le Blé. I. Mise en évidence d'un effet variétale. *Annales Amélioration des Plantes* 30: 67-68.

- BERTHELIN J., C. LEYVAL, 1982.
Ability of symbiotic and non-symbiotic rhizospheric microflora of maize (*Zea mays*) to weather micas and to promote plant growth and plant nutrition. *Plant Soil* 68: 369-377.
- BETHLENFALVAY G. J., H. G. BAYNE, R. S. PACOVSKY, 1983.
Parasitic and mutualistic associations between a mycorrhizal fungus and soybean: The effect of phosphorus on host plant-endophyte interactions. *Physiol. Plant* 57: 543-548.
- BEVEGE D. I., G. D. BOWEN, M. F. SKINNER, 1975.
Comparative carbohydrate physiology of ecto and endo-mycorrhizas. En: *Endomycorrhizas* (Eds. F. E. Sanders, B. Mosse & P. B. Tinker), pp. 149-174. Academic Press, London & New York.
- BEVEGE D. I., G. D. BOWEN, 1975.
Endogone strain and host plant differences in development of vesicular-arbuscular mycorrhizas. En: *Endomycorrhizas* (Eds. F. E. Sanders, B. Mosse & P. B. Tinker), pp. 77-86. Academic Press, London & New York.
- BIERMANN B., R. G. LINDERMAN, 1983.
Use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. *New Phytol.* 95: 97-105.
- BOULLARD B., 1959.
Relations entre la photopériode et l'abondance des mycorhizes chez l'*Aster tripolium* L. (Composés). *Bull. Soc. Bot. Fr.* 106: 131-134.
- BOWEN G. D., 1980.
Mycorrhizal roles in tropical plants and ecosystems. En: *Tropical Mycorrhizal Research* (Ed. P. M. Kola), pp. 165-190. Oxford University Press, Oxford.
- BROWN D. C., D. W. LEUNG, T. A. THORPE, 1979.
Osmotic requirement for shoot formation in tobacco callus. *Physiol. Plant.* 46: 36-41.
- BRUNDRETT M., S. JUNIPER, 1993.
Non-destructive assessment of spore germination and single-spore culture isolation of VAM fungi. Poster presentado en el 9th. NACOM, Guelph.
- BURDON J. J., 1978.
Mechanisms of disease control in heterogeneous plant populations: an ecologist's view. En: *Plant disease epidemiology* (Eds. P. R. Scott and A. Balndridge), pp. 193-200. Blackwell's Scientific Publications, Oxford.
- BURGGRAAF A., 1990.
Cell cycle completion and its relation to *In-vivo* and *In-vitro* development of VAM fungi. En: *Abstracts of the 4th International Mycological Congress* (Eds. A. Relsinger & A. Brezinsky), pp. 71. Regensburg, Alemania.
- BUXBAUM, F., 1950.
Morphology of cacti. Section I. Roots and stems. Ed. B. Kurtz. Abbey Garden Press, California. 87 p.
- CAREY R. H., 1980.
Safeguarding the cacti. *Garden* : 4-31.
- CARLING D. E., M. F. BROWN, R. A. BROWN, 1979.
Colonization rates and growth responses of soybean plants infected by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Can. J. Bot.* 57: 1769-1771.
- CARLING D. E., M. F. BROWN, 1982.
Anatomy and Physiology of vesicular-arbuscular and nonmycorrhizal roots. *Phytopath.* 72: 1108-1114.

- CHABOT S., G. BECARD, Y. PICHE, 1992.
Life cycle of *Glomus intraradix* in root organ culture. *Mycologia* 84 (3): 315-321.
- CHAVEZ M. C., R. FERRERA-CERRATO, 1990.
Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae on tissue culture derived plantlets of strawberry. *HortScience* 25 (8): 903-905.
- CHILVERS M. T., M. F. DAFT, 1981.
Mycorrhizas of the Liliiflorae. II. Mycorrhiza formation and incidence of root hairs in field grown *Narcissus L.*, *Tulipa L.* and *Crocus L.* cultivars. *New Phytol.* 89: 247-261.
- CLAYTON P. W., J. F. HUBSTENBERG, G. C. PHILLIPS, 1990.
Micropropagation of members of the Cactaceae subtribe Cactinae. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115 (2): 337-343.
- CONSTABLE, F., 1993.
Biotechnology for production of secondary metabolites. A plant cell technology course at Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM, México, Nov. 16-26.
- COOK R. J., 1973.
Influence of low plant and soil water potentials on diseases caused by soilborne fungi. *Phytopathology* 63: 451-458.
- COOKE J. C., J. N. GEMMA, R. E. KOSKE, 1987.
Observations of nuclei in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia* 79: 331-333.
- COUCH H. B., J. R. BLOOM, 1958.
Influences of soil moisture and nutrition on the alteration of disease proneness in plants. *Trans. New York Acad. Sci.* 20: 432-437.
- COX G. C., F. E. SANDERS, P. B. TINKER, 1975.
Ultrastructural evidence relating to host-endophyte transfer in a vesicular-arbuscular mycorrhiza. En: *Endomycorrhizas* (Eds. F. E. Sanders, B. Mosse & P. B. Tinker), pp. 297-312. Academic Press, London & New York.
- COX G., A. D. ROBSON, 1980.
The optimization of plant nutrition-improving the efficiency of fertiliser utilisation. *Proc. Aust. Agron. Conf.*: 157-176.
- COX G., F. E. SANDERS, 1974.
Ultrastructure of the host-fungus interface in a vesicular-arbuscular mycorrhiza. *New Phytol.* 73: 901-912.
- COX G., P. B. TINKER, 1976.
Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. I. The arbuscule and phosphorus transfer: a quantitative ultrastructural study. *New Phytol.* 77: 371-378.
- CRUSH J. R., 1974.
Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. VII. Growth and nodulation of some herbage legumes. *New Phytol.* 77: 371-378.
- CRUSH J. R., M. J. HAY, 1981.
A technique for growing mycorrhizal clover in solution culture. *N. Z. J. Agric. Res.* 24: 371-372.
- CRUSH J. R., A. C. PATTISON, 1975.
Preliminary results on the production of vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculum by freeze drying. En: *Endomycorrhizas* (Eds. F. E. Sanders, B. Mosse & P. B. Tinker), pp. 485-495. Academic Press, London & New York.

- DAFT M. J., A. A. EL-GIAHMI, 1974.
Effect of *Endogone mycorrhiza* on plant growth. VII. Influence of infection on the growth and nodulation in french bean (*Phaseolus vulgaris*). *New Phytol.* 73: 1139-1147.
- DAFT M. J., A. A. EL-GIAHMI, 1975.
Effect of *Glomus* infection on three legumes. En: *Endomycorrhizas* (Eds. F. E. Sanders, B. Mosse & P. B. Tinker), pp. 581-582. Academic Press, New York.
- DAFT M. J., T. H. NICOLSON, 1966a.
Effect of *Endogone mycorrhiza* on plant growth. *New Phytol.* 65: 343-350.
- DAFT M. J., T. H. NICOLSON, 1966b.
Effect of *Endogone mycorrhiza* on plant growth. II. Influence of soluble phosphate on endophyte and host maize. *New Phytol.* 68: 945-952.
- DAFT M. J., T. H. NICOLSON, 1972.
Effect of *Endogone mycorrhiza* on plant growth. IV. Quantitative relationship between the growth of the host and the development of the endophyte in tomato and maize. *New Phytol.* 71: 287-295.
- DAFT M. J., B. O. OKUSANYA, 1973.
Effect of *Endogone mycorrhiza* on plant growth. VI. Influence of infection on the anatomy and reproductive development in four hosts. *New Phytol.* 72: 1333-1339.
- DAFT M. J., E. HACSKAYLO, T. M. NICOLSON, 1975.
Arbuscular mycorrhizas in plants colonising coal spoils in Scotland and Pennsylvania. En: *Endomycorrhizas* (Eds. F. E. Sanders, B. Mosse & P. B. Tinker), pp. 581-592. Academic Press, London & New York.
- DANGEARD P. A., 1896.
Une maladie du peuplier dans l'ouest de la France. *Le Botaniste* 5: 38-43.
- DANIELS B. A., D. M. DUFF, 1978.
Variation in germination and spore morphology among four isolates of *Glomus mosseae*. *Mycologia* 70: 1261-1267.
- DANIELS B. A., S. D. GRAHAM, 1976.
Effects of nutrition and soil extracts on germination of *Glomus mosseae* spores. *Mycologia* 68: 108-116.
- DANIELS B. A., J. M. TRAPPE, 1980.
Factors affecting sporium, *Glomus epigaeus*. *Mycologia* 72: 457-471.
- DANIELS B. A., J. M. TRAPPE, 1980.
Factors affecting spore germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus epigaeus*. *Mycologia* 72: 457-471.
- DANIELSON R. M., 1982.
Taxonomic affinities and criteria for the identification of the common ectendomycorrhizal symbiont of pines. *Can. J. Bot.* 60: 7-18.
- DEBERGH, P., Y. HARBAOUI, R. LAMEUR, 1981.
Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): Evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiol. Plant.* 53: 181-187.
- DEHNE H. W., 1982.
Interaction between vesicular arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. *Phytopathology* 72: 1115-1118.

DIOP T., 1990.

Méthodes axéniques de production d'inocula endomycorrhiziens à vésicules et arbuscules: étude avec le *Gigaspora margarita*. Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Laval, Québec.

DOBBS C. G., W. H. HINSON, 1953.

A widespread fungistasis in soils. *Nature London* 172: 197-199.

DONCASTER C. C., 1962.

A counting dish for nematodes. *Nematologia* 7: 334-337.

DOUDS D. D., N. C. SCHENCK, 1991.

Germination and hyphal growth of VAM fungi during and after storage in soil at five matrix potentials. *Soil Biol. Biochem.* 23 (2): 177-183.

DOWDING E. S., 1959.

Ecology of *Endogone*. *Trans. Br. mycol. Soc.* 42: 449-457.

ECKER L., 1989.

Long term maintenance of desert diversity: Rare plant reintroductions. *Agave* 3 (3): 6-8.

EL-ATRACH F., H. VIERHEILIG, J. A. OCAMPO, 1989.

Influence of non-host plants on vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of host plants and on spore germination. *Soil Biol. Biochem.* 21 (1): 161-163.

ELIAS S. S., G. R. SAFIR, 1987.

Hyphal elongation of *Glomus fasciculatum* in response to root exudates. *Appl. Environm. Microbiol.* 53: 1928-1933.

EPSTEIN L., J. L. LOCKWOOD, 1984.

Suppression of conidial germination for *Helminthosporium victoriae* in soil and in model fungistatic systems. *Phytopathol.* 74: 90-94.

FERGUSON J. J., S. H. WOODHEAD, 1982.

Production of endomycorrhizal inoculum. A. Increase and maintenance of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. En: *Methods and principles of Mycorrhizal Research* (Ed. N. S. Schenck), pp. 47-54. American Phytopathological Society, St. Paul.

FEREOL L., 1984.

Inoculation of *In vitro* cultivated sugarcane with smut (*Ustilago scitaminea*). *Can. J. Bot.* 62 (10): 2043-2046.

FRANK A. B., 1885.

Über die auf Wurzelymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Ber. dt. bot. Ges.* 3: 128-145.

FRIES N., 1977.

Germination of *Laccaria laccata* spores *in vitro*. *Mycologia* 69: 848-850.

FURLAN V., 1981.

Les endomycorrhizes à vésicules et arbuscules (VA). Université Laval, Québec.

FURLAN V., J. A. FORTIN, 1975.

A flotation-bubbling method for collection Endogonaceae spores from sieved soil. *Naturaliste Can.* 102: 663-667.

GAMBORG O. L., R. A. MILLER, K. OJIMA, 1986.

Nutrient requirements of suppression culture of soybean roots cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.

- GARCIA-GARCIA F., 1989.
Estudio de la nutrición azufrada del hongo foadador de micorrizas VA *Glomus mosseae*. Mem. Licenciatura. Universidad de Granada.
- GEMMAJ. N., R. E. KOSKE, 1988.
Pre-infection interactions between roots and the mycorrhizal fungus *Gigaspora gigantea*: chemotropism of germ tubes and root growth response. *Trans. Br. mycol. Soc.* 91: 123-132.
- GERDEMANN J. W., 1975.
Vesicular-arbuscular mycorrhizae. En: *The development and function of roots* (Eds. J. G. Torrey & D. T. Clarkson), pp. 491-575. Academic Press, London & New York.
- GERDEMANN J. W., T. H. NICOLSON, 1963.
Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving. *Trans. Br. mycol. Soc.* 46: 234-235.
- GERDEMANN J. W., J. M. TRAPPE, 1974.
The Endogonaceae in the Pacific Northwest. *Mycologia Memoir* 5.
- GLENN M. G., F. S. CHEW, P. H. WILLIAMS, 1985.
Hyphal penetration of *Brassica* (Cruciferae) roots by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol.* 99: 403-472.
- GODFREY R. M., 1957a.
Studies of British species of *Endogone*. I. Morphology and taxonomy. *Trans. Br. mycol. Soc.* 40 (1): 117-135.
- GODFREY R. M., 1957b.
Studies on British species of *Endogone*. III. Germination of spores. *Trans. Br. mycol. Soc.* 40(2): 203-210.
- GRAHAM J. H., 1982.
Effects of *Citrus* root exudates on germination of chlamidospores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus epigaeus*. *Mycologia* 74: 831-835.
- GRAHAM J. H., R. G. LINDERMAN, Z. A. MENGE, 1982.
Development of external hyphae by different isolates of mycorrhizal *Glomus* spp. in relation to root colonization and growth of Troyer Citrange. *New Phytol.* 91: 183-189.
- GREEN N. E., S. O. GRAHAM, N. C. SCHENCK, 1976.
The influence of pH on the germination of a vesicular-arbuscular mycorrhizal spores. *Mycologia* 68: 929-934.
- HABERLANDT G., 1902.
Kulturversuche mit isolierten pflanzenzellen stützungsber. *Akad. Wiss. Wien* 111: 62-69.
- HALL I. R., 1977.
Species and mycorrhizal infections of New Zealand Endogonaceae. *Trans. Br. mycol. Soc.* 68: 371-356.
- HALL I. R., FISH B. J., 1978.
A key to the Endogonaceae. *Trans. Br. mycol. Soc.* 73: 261-270.
- HARDIE K., L. LEYTON, 1981.
The influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on growth and water relations of red clover. I. In phosphorus deficient soil. *New Phytol.* 89: 599-608.
- HARLEY J. L., 1948.
Mycorrhiza and soil ecology. *Biol. Rev.* 23: 127-158.

- HARLEY J. L. 1959, 1969.
The biology of Mycorrhiza. Leonard Hill, London.
- HARLEY J. L., E. L. HARLEY, 1987.
 A check-list of mycorrhiza in the British flora. *New Phytol.* 105: 1-102.
- HARLEY J. L., S. E. SMITH, 1983.
 Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, London. 101 p.
- HAYMAN D. S., 1974.
 Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. VI. Effect of light and temperature. *New Phytol* 73: 71-80.
- HAYMAN D. S., A. M. JOHNSON, I. RUDDLES DIN, 1975.
 The influence of phosphate and crop species of *Endogone* spores and vesicular-arbuscular mycorrhiza under field conditions. *Plant and Soil* 43: 489-495.
- HAYMAN D.S., G. E. STOVOLD, 1979.
 Spore populations and infectivity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in New South Wales. *Aust. J. Bot.* 27: 227-233.
- HEPPER C. M., 1977.
 A colorimetric method for estimating vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *Soil Biol. Biochem.* 9: 15-18.
- HEPPER C. M., 1979.
 Germination and growth of *Glomus caledonius* spores: the effects of inhibitors and nutrients. *Soil Biol. Biochem.* 9: 15-18.
- HEPPER C. M., 1981.
 Techniques for studying the infection of plants by vesicular-arbuscular fungi under axenic conditions. *New Phytol.* 88: 641-647.
- HEPPER C. M., 1984.
 Isolation and cell culture of VA mycorrhizal (VAM) fungi. En: *VA Mycorrhizae* (Eds. Powell C. L. & D. J. Bagyaraj), pp. 95-112. CRC Press, Florida.
- HEPPER C. M., 1987.
 VAM spore germination and hyphal growth *in vitro* - prospects for axenic culture. En *7th North American Conference on Mycorrhizae* (Eds. D. M. Sylvia, L. L. Hung & J. H. Graham), pp. 172-174. Institute of Food & Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville.
- HEPPER C. M., I. JAKOBSEN, 1983.
 Hyphal growth from spores of the mycorrhizal fungus *Glomus caledonius*: effects of aminoacids. *Soil Biol. Biochem.* 15: 55-58.
- HEPPER C. M., G. A. SMITH, 1976.
 Observations on the germination of *Endogone* spores. *Trans. Br. mycol Soc.* 66 (2): 189-194.
- HETRICK B. A., A. D. KITT, D. G. WILSON, 1986.
 The influence of phosphorus fertilization, drought, fungal species, and nonsterile soil on mycorrhizal growth response in tallgrass prairie plants. *Can. J. Bot.* 64: 1199-1203.
- HEWITT, 1966.
 Sand and water culture methods in the study of plant nutrition. Commonwealth Agriculture Bureau. Communication 22. Farnham Royal, Buckinghamshire, England.
- HIRREL M. C., 1981.
 The effect of sodium and chloride salts on the germination of *Gigaspora margarita*. *Mycologia* 73: 610-617.

- HIRRELL M. C., H. MEHRAVARAN, J. W. GERDEMANN, 1978.
Vesicular-arbuscular mycorrhiza in Chenopodiaceae and Cruciferae, do they occur? *Can. J. Bot.* 56: 2813-2817.
- HIRRELL M. C., J. W. GERDEMANN, 1979.
Enhanced carbon transfer between onions infected with a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol.* 83: 731-738.
- HIRRELL M. C., J. W. GERDEMANN, 1980.
Improved growth of onion and bell pepper in saline soils by two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Proc. Soil Sci. Soc. Amer.* 44: 654-655.
- HOLLEY J. D., R. D. PETERSON, 1979.
Development of vesicular-arbuscular mycorrhiza in bean roots. *Can. J. Bot.* 57: 1960-1978.
- HORA T. S., R. BAKER, 1974.
Abiotic generation of volatile fungistatic factor in soil by liming. *Phytopathology* 74: 624-629.
- IQBAL S. H., R. S. QURESHI, 1976.
The influence of mixed sowing (cereals and crucifers) and crop rotation on the development of mycorrhiza and subsequent growth of crop under field conditions. *Biologia (Pakistan)* 22: 287-298.
- JANSE J. M., 1987.
Les endophytes radicaux de quelques plantes Javanaises. *Annales du Jardin Botanique Buitenzorg* 14: 53-201.
- JASPER D. A., A. D. ROBSON, L. K. ABBOTT, 1979.
Phosphorus and the formation of vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Soil Biol. Biochem.* 11: 501-515.
- JENKINS W. R., 1964.
A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant disease reporter* 48: 692.
- JOHNSON J. L., E. R. EMINO, 1979.
In vitro propagation of *Mammillaria elongata*. *Hortscience* 14: 605-606.
- JONES F. R., 1924.
A mycorrhizal fungus in the roots of legumes. *Journal of Agricultural Research* 29: 459-470.
- KANOUE B. B., 1936.
Studies of two species of *Endogone* in culture. *Mycologia* 28: 47-62.
- KAMIENSKI F., 1881.
Die Vegetationsorgane der *Monotropa hypopitys* L. *Bot. Ztg.* 29: 458.
- KHAN A. G., 1971.
Occurrence of *Endogone* spores in West Pakistan soils. *Trans. Br. mycol. Soc.* 56: 217-224.
- KLEINSCHMIDT G. D., J. W. GERDEMANN, 1972.
Stunting of *Citrus* seedlings in fumigated nursery soils relates to the absence of endomycorrhizae. *Phytopath.* 62: 1447-1453.
- KOHLLENBACH H. W., W. WERNICKE, 1978.
Investigations on the inhibitory effect of agar and the function of active carbon in anther culture. *Z. Pflanzenphysiol.* 86: 463-472.

- KOSKE R. E., 1981a.
Glasporea gigantea: observations on spore germination of a VA-mycorrhizal fungus. *Mycologia* 73: 288-300.
- KOSKE R. E., 1981b.
 Multiple germination of spores of *Glasporea gigantea*. *Trans. Br. mycol. Soc.* 76: 328-330.
- KOSKE R. E., 1982.
 Evidence for a volatile attractant from plant roots affecting germ tubes of a VA mycorrhizal fungus. *Trans. Br. mycol. Soc.* 79: 305-310.
- KRISHNA K. R., A. N. BALAKRISHNA, D. J. BAGYARAJ, 1982.
 Interaction between a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and *Streptomyces cinnamomeus* and their effects on finger millet. *New Phytol.* 92: 401-405.
- KUSUMOTO M., 1980.
 Effects of coconut milk, agar and sucrose concentrations and media pH on the proliferation of Cymbidium protocorm-like bodies cultured *in vitro*. *J. Jap. Soc. Hortic. Sci.* 48 (8): 503-509.
- Le TACON F., F. A. SKINNER, B. MOSSE, 1983.
 Spore germination and hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Gerdemann and Trappe), under decreased oxygen and increased carbon dioxide concentrations. *Can. J. Microbiol.* 29: 1280-1285.
- LEVY Y., J. KRIKUN, 1980.
 Effect of vesicular-arbuscular mycorrhiza on *Citrus jambhiri* water relations. *New Phytol.* 85: 25-31.
- LINK H. C., 1809.
 Observations in Ordines Plantarum naturaelles. *Ges. Naturf. Freunde zu berlin. Magazin f. d. neuesten Entdeckungen in der gesammten Naturkunde* 3: 33.
- LYNCH J. M., 1976.
 Products of soil microorganisms in relation to plant growth. En: *CRC Critical Reviews in Microbiology* 5: 67-104.
- LOCKWOOD J. L., 1977.
 Fungistasis in soils. *Biol. Rev.* 5: 21-43.
- MACDONALD R. M., 1981.
 Routine production of axenic vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytol.* 89: 87-94.
- MAGROU J., 1936.
 Culture et inoculation du champignon symbiotique di l'*Arum maculatum*. *C. r. hebdom. Séanc. Acad. Sci., Paris* 203: 887-888.
- MAGROU J., 1937.
 Sur la culture des champignons de mycorrhizes. *Annales de Sciences Naturelles, Botanique* 19: 359-370.
- MANGENOT F., H. G. DIEM, 1979.
 Fundamentals of biological control. En: *Ecology of root pathogens* (Ed. S. V. Krupa & Y. R. Domergues), pp. 207-265. Amsterdam, Elsevier.
- MANJUNATH A., R. MOHAN, D. J. BAGYARAJ, 1981.
 Interaction between *Beijerinckia mobilis*, *Aspergillus niger*, and *Glomus fasciculatus* and their effects on growth of onion. *New Phytol.* 87: 723-727.

- MARTINEZ-VAZQUEZ O., A. RUBLUO, 1989.
In vitro mass propagation of the near-extinct *Mamillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada. *J. Hort. Sci.* 64 (1): 99-105.
- MAYO K., R. E. DAVIS, J. MOTTA, 1986.
 Stimulation of germination of spores of *Glomus versiforme* by spore associated bacteria. *Mycologia* 78: 426-431.
- MCILVEEN W. E., H. COLE, 1979.
 Influence of zinc on development of the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and its mediation of phosphorus uptake by *Glicine max* "Amsoy 71". *Agriculture and Environment* 4: 245-256.
- MEJSTRIK J., 1965.
 Study of the development of endotrophic mycorrhiza in the association of *Cladieu marisci*. En: *Plant Microbe relationships* (Eds. J. Macura & V. Vancura), pp. 283-290. Prague, Czechoslovak Academy of Science.
- MENGE J. A., E. L. JOHNSON, R. G. PLATT, 1978.
 Mycorrhizal dependency of several citrus cultivars under tree nutrient regimes. *New Phytol.* 81: 553-559.
- MENGE J. A., 1982.
 Effect of soil fumigants and fungicides on vesicular-arbuscular fungi. *Phytopath.* 72: 1125-1132.
- MERTZ S. M., J. J. HEITHAUS, R. L. BUSH, 1979.
 Mass production of axenic spores of the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Trans. Br. mycol. Soc.* 72 (1): 167-169.
- MEYER J. R., R. G. LINDERMANN, 1986.
 Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and a plant growth-promoting bacterium, *Pseudomonas putida*. *Soil Biol. Biochem.* 18: 185-190.
- MIKOLA P., 1980.
 Tropical mycorrhiza research. Clarendon Press, Oxford.
- MILLER-WIDEMAN M. A., L. S. WATRUD, 1984.
 Sporulation of *Gigaspora margarita* on root cultures of tomato. *Can. J. Bot.* 30: 642-646.
- MORANDI D., S. GIANINAZZI, V. GIANINAZZI, 1979.
 Intérêt de l'endomycorrhization dans la reprise et la croissance du Framboisier issu de multiplication végétative *in vitro*. *Ann. Amélior. Plantes* 29: 623-630.
- MOSSE B., 1953.
 Fructifications associated with mycorrhizal strawberry root. *Nature London* 171: 974.
- MOSSE B., 1957.
 Growth and chemical composition of mycorrhizal and non-mycorrhizal apples. *Nature (London)* 179: 922-924.
- MOSSE B., 1959.
 The regular germination of resting spores and some observations on the growth requirements of an *Endogone* sp. causing vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Trans. Br. mycol. Soc.* 42: 273-286.
- MOSSE B., 1961.
 Experimental techniques for obtaining pure inoculum of *Endogone* sp. and some observations on vesicular-arbuscular infestations caused by it and other fungi. *Recent Adv. Bot.* 2: 1728-1732.

- MOSSE B., 1962.
The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. *J. Gen. Microbiol.* 27: 509-520.
- MOSSE B., 1970.
Honey-coloured, sessile *Endogone* spores. I. Life history. *Archives of microbiology* 70: 167-175.
- MOSSE B., 1972.
The influence of soil type and *Endogone* strain on the growth of mycorrhizal plants in phosphorus deficient soils. *Rev. Ecol. Biol. Sol.* 9: 529-537.
- MOSSE B., 1973.
Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. IV. In soil given additional phosphate. *New Phytol.* 72: 127-136.
- MOSSE B., 1975.
Specificity of VA Mycorrhizas. En: *Endomycorrhizas* (Eds. F. E. Sanders, B. Mosse and P. B. Tinker), pp. 469-484. Academic Press, London & New York.
- MOSSE B., 1988.
Some studies relating to "Independent" growth of vesicular-arbuscular endophytes. *Can. J. Bot.* 66: 2533-2540.
- MOSSE B., G. D. BOWEN, 1968.
A key to the recognition of some *Endogone* spore types. *Trans. Br. mycol. Soc.* 51: 469-483.
- MOSSE B., G. W. JONES, 1968.
Separation of *Endogone* spores from organic soil debris by differential sedimentation on gelatine columns. *Trans Br. mycol. Soc.* 51: 604-608.
- MOSSE B., D. S. HAYMAN, G. I. IDE, 1969.
Growth responses of plants in unsterilized soil to inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Nature* (London) 224: 1031-1032.
- MOSSE B., D. S. HAYMAN, 1971.
Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. II. In unsterilised field soils. *New Phytol.* 70: 29-34.
- MOSSE B., C. M. HEPPER, 1975.
Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organs cultures. *Physiol. Pl. Path.* 5: 215-223.
- MUGNIER J., B. MOSSE, 1987a.
Spore germination and viability of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus mosseae*. *Trans. Br. mycol. Soc.* 88 (3): 411-413.
- MUGNIER J., B. MOSSE, 1987b.
Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in transformed root inducing T-DNA roots grown axenically. *Phytopathology* 77: 1045-1050.
- MURASHIGE T., F. SKOOG, 1962.
A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 5: 473-497.
- NADARAJAH P., A. NAWAWI, 1986.
Effect of temperature on germination and growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. En: *Mycorrhizae in the next decade* (Eds. D. M. Silvey, L. L. Hung, & J. H. Graham), pp. 214. University of Florida, Gainesville, Florida.
- NADARAJAH P., NEWMAN, 1986.

NAVATEL J. C., 1982.

Multiplication végétative *in vitro*: Intérêt et problèmes liés peut-être au défaut de mycorrhization du matériel obtenu. *Les Colloques de l'I. N. R. A.* 13: 339-343.

NEMEC S., 1987.

Effect of storage temperature and moisture on *Glomus* species and their subsequent effect on *Citrus* rootstock seedling growth and mycorrhiza development. *Trans Br. mycol Soc.* 89: 205-212.

NEWMAN E. I., 1966.

A method estimating the total length of root in a sample. *J. appl. Ecol.* 3: 139-145.

NEWMAN E. I., P. REDDELL, 1987.

The distribution of mycorrhizas among families of vascular plants. *New Phytol.* 106: 745-751.

NICOLSON T. H., 1960.

Mycorrhiza in the gramineae. II. Development in different habitats particularly sand dunes. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 43: 132-145.

NIELL J. C., 1944.

Rhizophagus in *Citrus*. *New Zealand Journal of Science and Technology* 25 A: 191-201.

NYE P. H., P. B. TINKER, 1977.

Soluble movement in the soil-root system. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

OCAMPO J. A., J. MARTIN, D. S. HAYMAN, 1980.

Influence of plant interactions on vesicular-arbuscular mycorrhizal infections. I. Host and non host plants grown together. *New Phytol.* 84: 27-35.

OHMS R. E., 1957.

A flotation method for collecting spores for organic soils debris by differential sedimentation on gelatine columns. *Trans. Br. mycol Soc.* 51: 604-608.

PALACIOS-M. S., K. SHIMADA, C. SALINAS, 1987.

Efecto de la inoculación de dos variedades de cebolla (*Allium cepa* L.) con cuatro hongos endomicorrícicos en un suelo muy deficiente en fósforo. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 29: 329-336.

PANG P. C., E. A. PAUL, 1980.

Effects of vesicular-arbuscular mycorrhiza on ^{14}C and ^{15}N distribution in nodulated fababeans. *Can. J. Soil Sci.* 60: 241-250.

PAUL E. A., R. M. KUCEY, 1981.

Carbon flow in plant microbial associations. *Science* 213: 473-474.

PEGG G. F., J. C. VESSEY, 1973.

Chitinase activity in *Lycopersicon esculentum* and its relationship to the *in vivo* lysis of *Verticillium albo-atrum* mycelium. *Physiol. Pl. Path.* 3: 207-222.

PEYRONEL B., 1923.

Fructification de l'endophyte à arbuscules et à vesicules des mycorhizes endotropes. *Bull. Soc. Mycol. France* 39: 119-126.

PHILLIPS, 1971.

PHILLIPS J. M., D. S. HAYMAN, 1970.

Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. mycol. Soc.* 55: 158-161.

- PONS F., V. GIANINAZZI, S. GIANINAZZI, J. C. NAVALET, 1982.
Synthèse *in vitro* des endomycorrhizes ericoïdes et VA: complément à la micropropagation. *Les Colloques de l'I.N.R.A.* 13: 345-349.
- PORTER W. M., 1979.
The "most probable number" method for enumerating infective propagules of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Aus. J. Soil Res.* 17: 515-519.
- PYROZYNSKI K. A., 1981.
Interactions between fungi and plants through the ages. *Can. J. Bot.* 59: 1824-1827.
- PLENCHETTE C., 1982.
Recherches sur les Endomycorrhizas à vésicules et arbuscules. Influence de la plante hôte du champignon et du phosphore sur l'expression de la symbiose endomycorrhizienne. Thèse Doct. Québec.
- POSSINGHAM J. V., J. GROOT-OBINK, 1971.
Endotropic mycorrhiza and the nutrition of grape vines. *Vitis* 10: 120-130.
- POWELL C. L., 1976.
Development of mycorrhizal infections from *Endogone* spores and infected root segments. *Trans. Br. mycol. Soc.* 66: 439-445.
- RANGEL L. M., L. P. OLGUIN (Comp.), 1991.
Manual de Cultivo de Tejidos Vegetales. Jardín Botánico, IBUNAM; Depto. de Educación y Enseñanza. México, 33 p.
- RATNAYAKE M., R. T. LEONARD, J. A. MENGE, 1978.
Root exudation in relation to supply of phosphorus and its possible relevance to mycorrhizal formation. *New Phytol.* 81: 543-552.
- RAVEN P. H., 1976.
Ethics and attitudes in conservation of threatened plant. En: *NATO Conference Series, 1. Ecology*, pp. 155-180. Plenum Press, New York.
- RAYNER M. C., 1927.
Mycorrhiza. *New Phytol. Reprint* 15: 246 pp.
- RAYNER M. C., W. NIELSON-JONES, 1944.
Problems in tree nutrition. Faber & Faber, London.
- REEVE N. G., M. E. SUMMER, 1970.
Lime requirements of Natal Oxisols based on exchangeable aluminium. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 34: 595-598.
- REICHE, S. f.
Naturwiss. *Wochenschrift N. F. Bd.* 21: 34.
- RICHJ. R., G. W. BIRD, 1974.
Association of early season vesicular-arbuscular mycorrhizae with increased growth and development of cotton. *Phytopathology* 64: 1421-1425.
- RINCON E., P. HUANTE, Y. RAMIREZ, 1993.
Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae on biomass production by the cactus *Pachycereus pecten-aboriginum*. *Mycorrhiza* 3: 79-81.
- RIVES C. S., M. I. BAJWA, A. E. LIBERTA, R. M. MILLER, 1980.
Effects of topsoil storage during surface mining on the viability of VA mycorrhiza. *Soil Science* 129: 253-257.

- ROMBERGER J. A., C. A. TABOR, 1971.
The *Picea abies* shoot apical meristem in culture. I. Agar and autoclaving effects. *Am. J. Bot.* 58 (2): 131-140.
- ROSS J. P., 1980.
Effect of nontreated field soil on sporulation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with soybean. *Phytopathology* 70: 1200-1205.
- RUBLUO A., 1985.
Estrategias para la preservación del germoplasma vegetal *in vitro*. En: *El cultivo de tejidos vegetales en México* (Eds. M. L. Robert & V. M. Loyola), pp. 35-53. Conacyt, México.
- RUBLUO A., 1990.
Aplicaciones biotecnológicas para el rescate de cactáceas en peligro de extinción. *Biotam* 1 (4): 13-19.
- RUBLUO A., E. ARRIAGA, S. ARIAS, C. PEREZ-AMADOR, D. AMOR, E. SANTOS, E. ROJAS, P. ELIZALDE, 1990.
Tissue culture applications in the endangered *Mammillaria huitzilopochtli* (Cactaceae). En: *Abstracts VII International Congress on Plant Tissue and Cell Culture*, p. 130. Amsterdam, The Netherlands.
- RUBLUO A., B. RODRIGUEZ, G. FLORES, 1991.
In favour of Mexican Cacti. *Cact. Succ. J.* 63.
- RUBLUO-ISLAS A., 1992
Logros y perspectivas del cultivo de tejidos vegetales en especies mexicanas amenazadas de extinción. En: *Resúmenes de Etnobotánica'92*, pp. 372. Córdoba, España. Septiembre 20-26.
- RUBLUO A., A. FLORES, 1992.
Hacia un modelo de micropropagación en cactáceas. En: A. Rubluo, B. Rodríguez-G. & E. Pimienta (Eds.). En prensa.
- RUBLUO A., V. CHAVEZ, A. P. MARTINEZ, O. MARTINEZ., 1993.
Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture. *Biol. Cons.* 63: 163-169.
- SAFIR G. R., J. S. BOYER, J. W. GERDEMANN, 1972.
Nutrient status at mycorrhizal enhancement of water transport in soybean. *Plant Physiol.* 49: 700-703.
- SAFIR G. R., S. C. COLEY, J. O. SIQUEIRA, P. S. CARLSON, 1990.
Improvement and synchronization of VA mycorrhiza fungal spore germination by short-term cold storage. *Soil Biol. Biochem.* 22 (1) 109-111.
- SAIF S. R., 1977.
The influence of stage of host development on vesicular-arbuscular mycorrhizas and endogonaceous spore population in field-grown vegetable crops. I. Summer-grown crops. *New Phytol.* 79: 341-348.
- SANDERS F. E., 1975.
The effect of foliar-applied phosphate on the mycorrhizal interactions of onions and roots. En: *Endomycorrhizas* (Eds. F. E. Sanders and P. B. Tinker), pp. 261-267. Academic Press, London and New York.
- SANDERS F. E., P. B. TINKER, 1973.
Phosphate flow into mycorrhizal roots. *Peste. Sci.* 4: 385-395.
- SANDERS F. E., P. B. TINKER, R. L. BLACK, S. M. PALMERLEY, 1977.
The development of endomycorrhizal root systems. I. Spread of infection and growth promoting effects with four species of vesicular-arbuscular endophyte. *New Phytol.* 78: 257-268.

- SANDERS F. E., N. A. SHEIKH, 1983.
The development of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in plant root systems. *Plant and Soil* 71: 223-246.
- SHELLENBAUM L., G. BERTA, F. RAVOLANIRINA, B. TISSERANT, S. GIANINAZZI, A. H. FITTER, 1991.
Influence of endomycorrhizal infection on root morphology in a micropropagated woody plant species (*Vitis vinifera* L.). *Annals of Botany* 68: 135-141.
- SCHENCK N. C., S. O. GRAHAM, N. E. GREEN, 1975.
Temperature and light effect on contamination and spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia* 67: 1189-1192.
- SCHENCK N. C., V. N. SCHROEDER, 1974.
Temperature response of *Endogone* mycorrhiza on soybeans roots. *Mycologia* 66: 600-605.
- SCHOENBECK F., H. W. DEHNE, 1979.
The influence of endotrophic mycorrhiza on plant diseases. IV. Fungal parasitism on arterial plant parts. *Z. PflKrankh. PflPath. PflSchutz* 86: 103-112.
- SCHUMANN K., 1899.
Gesamtbeschreibung der kakteen. *Nachtrag*. Pp. 2.
- SKIPPER H. R., D. T. WESTERMANN, 1973.
Comparative effects of propylene oxides sodium azide and autoclaving on selected soil properties. *Soil Biol. & Biochem. S.* 409-414.
- SIEVERDING E., 1983.
Manual de métodos para la investigación de la micorriza vesículo-arbuscular en el laboratorio. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia. 121 p.
- SIQUEIRA J. O., 1987.
Cultura axênica e monoaxênica dos fungos micorrízicos vesículo-arbusculares. II Reuniao Brasileira sobre micorrizas, pp. 44-70. Sao Paulo.
- SIQUEIRA J. O., D. H. HUBBELL, W. MAHMUD, 1984.
Effect of liming on spore germination, germ tube growth and root colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant & Soil* 76: 115-124.
- SIQUEIRA J. O., D. M. SYLVIA, J. GIBSON, D. H. HUBBELL, 1985.
Spores, germination, and germ tubes of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Canad. J. Microbiol.* 31: 965-972.
- SIQUEIRA J. O., D. H. HUBELL, 1986.
Effect of organic substrates on germination and germ tube growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus spores *In vitro*. *Pesq. Agrop. Bras.* 21: 523-527.
- SMITH S. E., D. J. NICHOLAS, F. A. SMITH, 1979.
The effect of early mycorrhizal infection on nodulation and nitrogen fixation in *Trifolium subterraneum* L. *Aust. J. PLANT Physiol.* 6: 305-311.
- SMITH S. E., G. D. BOWEN, 1979.
Soil temperature mycorrhizal infection and nodulation of *Medicago truncatula* and *Trifolium subterraneum*. *Soil Biol. Biochem.* 11: 469-473.
- SMITH F. A., S. E. SMITH, 1981.
Mycorrhizal infection and growth of *Trifolium subterraneum*; comparison of natural and artificial inocula. *New Phytol.* 88: 311-325.

- SMITH G. W., H. D. SKIPPER, 1979.
Comparison of methods to extract spores of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *J. Soil Sci. Am.* 43: 722-725.
- SMITH S. E., N. A. WALKER, 1981.
A quantitative study of mycorrhizal infection in *Trifolium*: separate determination of the rates of infection and of mycelial growth. *New Phytol.* 89: 225-240.
- SREENIVASA M. N., D. J. BAGYARAJ, 1988.
Selection of a suitable substrate for mass multiplication of *Glomus fasciculatum*. *Plant and Soil* 109: 125-127.
- STAHL M., 1949.
Die Mykorrhiza de Lebermoose mit besonderer Berücksichtigung der thallosen Formen. *Planta* 37: 103-148.
- ST. JOHN T. V. et al., 1981.
A new method for producing pure VAM-host cultures without specialized media. *New Phytol.* 89: 81-86.
- STRIBLEY D. P., P. B. TINKER, J. H. RAYNER, 1980.
Relation of internal phosphorus concentration and plant weight in plants infected by vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytol.* 86: 261-266.
- STRULLU D. G., C. ROMAND, 1986.
Méthode d'obtention d'endomycorhizes à vésicules et arbuscules en conditions axéniques. *Compt. Rend. Hebd. Séance Acad. Sci.* 303: 245-250.
- STRULLU D. G., C. ROMAND, 1987.
Culture axénique de vésicules isolées à partir d'endomycorhizes et ré-association *in vitro* à des racines de tomate. *Compt. Rend. Hebd. Séance Acad. Sci.* 305: 15-19.
- SWARD R. J., N. D. HALLAM, A. A. HOLLAND, 1978.
Endogone spores in a heathland area of South Eastern Australia. *Aus. J. Bot.* 26: 29-43.
- SWARD R. J., 1978.
Infection of Australian heathland plants by *Gigaspora margarita* (a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus). *Austral. J. Bot.* 26: 253-264.
- SWARD R. J., 1981.
The structure of the spores of *Gigaspora margarita*. II. Changes accompanying germination. *New Phytol.* 88: 661-666.
- TANAKA T., 1981.
Gels. Sci. Am. 245 (1): 110-123.
- TANDY P. A., 1975.
Sporocarpic species of the *Endogonaceae* in Australia. *Austral. J. Bot.* 23: 849-866.
- THAXTER R., 1922.
A revision of *Endogonaceae*. *Proc. Amer. Acad. Arts. Sci.* 57: 291-250.
- THOEN D., B. SOUGOUFARA, Y. DOMMERGUES, 1990.
In vitro mycorrhization of *Casuarina* and *Allocasuarina* species by *Psilotus* isolates. *Can. J. Bot.* 68 (12): 2537-2542.
- TOMMERUP I. C., 1985.
Inhibition of spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Trans. Br. mycol. Soc.* 85 (2): 267-278.

- TOMMERUP I. C., 1981.
Survival mechanisms of VA mycorrhizal fungi. En: *Program and Abstracts of the 5th North American Conference on Mycorrhizae*. Quebec, Canada P. 16.
- TOMMERUP I. C., 1983.
Spore dormancy in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Trans. Br. mycol. Soc.* 81: 37-45.
- TOMMERUP I. C., 1984a.
Persistence of infectivity by germinated spores of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Trans. Br. mycol. Soc.* 82: 275-282.
- TOMMERUP I. C., 1984b.
Effect of soil water potential on spore germination by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Trans. Br. mycol. Soc.* 83: 193-202.
- TOMMERUP I. C., 1987.
Inhibition of spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Trans. Br. mycol. Soc.* 85: 267-278.
- TOMMERUP I. C., L. K. ABBOT, 1981.
Prolonged survival and viability of VA mycorrhizal hyphae after root death. *Soil Biol. Biochem.* 13: 431-433.
- TOMMERUP I. C., K. B. BETT, 1985.
Cryopreservation of genotypes of VA mycorrhizal fungi. En: *Proceedings of the 6th North American Conference on Mycorrhizae*, pp. 25-29. Bend, Oregon, USA. Junio.
- TOMMERUP I. C., D. K. KIDBY, 1979.
Preservation of spores of vesicular-arbuscular endophytes by L-drying. *Applied & Environm. Microbiol.* 37: 831-835.
- TRAPPE J. M., 1987.
Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary stand point. En: *Ecophysiology of VA mycorrhizal plants* (Ed. G. R. Safir), pp. 5-25. CRC Press, Florida.
- TRINICK M. J., 1977.
Vesicular-arbuscular infection and soil phosphorus utilization in *Lapinus* spp. *New Phytol.* 78: 297-304.
- VARELA F. L., 1984.
La endomicorriza vesículo-arbuscular y el crecimiento de las plantas. Examen predoctoral. Depto. de Biología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. 60 p.
- VAZQUEZ-A. A., N. BAUTISTA, 1993.
Guía para interpretar el análisis químico de suelo y agua. Departamento de suelos, Universidad Autónoma de Chapingo. 29 pp.
- VILLEGAS M. H., 1992.
Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre el comportamiento del inóculo de *Glomus fasciculatum* en asociación con hortalizas de almácigo *Allium cepa* L. y *Latuca sativa* L. Tesis de Maestría, Instituto de Geología, UNAM. 110 p.
- WARCUP J. H., 1975.
A culturable *Endogone* associated with Eucalypts. En: *Endomycorrhizas* (Eds. F. E. Sanders, B. Mosse & P. B. Tinker), pp. 53-63. Academic Press, London & New York.

WATRUD L. S., 1984.

Spore germination and axenic culture of endomycorrhizae. A. Spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. En: *Methods and principles of mycorrhizal research* (Ed. S. Schenck), pp. 81-83. American Phytopathological Society, St. Paul.

WATRUD L. S., J. J. HEITHAUS, E. G. JAWORSKI, 1978.

Evidence for production of inhibitor by vesicular-arbuscular-mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Mycologia* 70: 821-828.

WERNICKE W., H. W. KOHLENBACH, 1976.

Investigations on liquid culture medium as a means of anther culture in *Nicotiana*. *Z. Pflanzenphysiol.* 79: 189-198.

WHITE, 1934.

Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiol.* 9: 585-600.

WILLIAMS P. G., 1984.

Obligate parasitism and axenic culture. En: *The cereal rusts 1* (Eds. W. R. Bushnell & A. P. Roelfs), pp. 399-430. Academic Press, New York, USA.

WILLIAMS P. G., 1990.

Desinfecting vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Mycological Research* 94 (7): 995-997.

WILSON G. W., B. A. DANIELS, D. GERSCHEFSKE, 1989.

Suppression of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus spore germination by nonsteril soil. *Can. J. Bot.* 67: 18-23.

WOCHOK Z. S., 1981.

The role of tissue culture in preserving threatened and endangered plant species. *Biol. Conserv.* 20: 83-89.

ZAJICEK J. M., M. L. ALBERT, B. A. HETRICK, 1987.

Growth of three native prairie perennials as influenced by phosphorus fertilization, potting media and mycorrhizae. *J. Amer. Soc. Hort-Sci.* 12: 277-281.