



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Comparación de la producción de micelio de hongos formadores de micorriza
arbuscular (HFMA) en medio de cultivo con raíces y medio ausente de raíces**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

B. Sc. Microbiólogo Industrial y Ambiental

Jaime Andrés Uribe López

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

DR. MAURICIO ALBERTO TRUJILLO ROLDÁN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. ROBERTO GARIBAY ORIJEL
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM
DR. OCTAVIO LOERA CORRAL
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA, UAM

México, Cd. Mx., Abril 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Comparación de la producción de micelio de hongos formadores de micorriza
arbuscular (HFMA) en medio de cultivo con raíces y medio ausente de raíces**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

B. Sc. Microbiólogo Industrial y Ambiental

Jaime Andrés Uribe López

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

DR. MAURICIO ALBERTO TRUJILLO ROLDÁN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. ROBERTO GARIBAY ORIJEL
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM
DR. OCTAVIO LOERA CORRAL
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA, UAM

México, Cd. Mx., Abril 2016

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM.
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 15 de febrero del 2016, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **URIBE LÓPEZ JAIME ANDRÉS** con número de cuenta **514353070** con la tesis titulada "**Comparación de la producción de micelio de Hongos Formadores de Micorriza Arbuscular (HFMA) en medio de cultivo con raíces y medio ausente de raíces**", realizada bajo la dirección del **Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán**.

Presidente: DR. SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL
Vocal: DR. ALEJANDRO ALARCÓN
Secretario: DR. OCTAVIO LOERA CORRAL
Suplente: DRA. GLORIA SOBERÓN CHÁVEZ
Suplente: DRA. ESPERANZA MARÍA MARTÍNEZ ROMERO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., 28 de marzo del 2016.

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos

⊗ *Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.*

⊗ *Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y el apoyo económico brindado Becario (CVU): 631381. Asimismo, los apoyos del CONACYT 230042, 247473 y 178528; y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT)-UNAM IN-210013 y IN-209113. Particularmente recibí apoyo del fondo PAEP para la realización del curso Internacional Training on in vitro Culture of Arbuscular Mycorrhizal Fungi.*

⊗ *A mi tutor:*

Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán

Por su constante apoyo, motivación, consejos y tiempo dedicado a la formación y realización de mi proyecto de tesis. Me llevo las mejores enseñanzas de su parte, porque más que una formación profesional, fue una formación personal.

⊗ *A los miembros del Comité Tutoral:*

Dr. Roberto Garibay Orijel

Por sus acertados aportes, excelentes comentarios y oportunas asesorías brindadas en cada momento de mi formación, las cuales ayudaron a estructurar y encaminar la culminación de este proyecto.

Dr. Octavio Loera Corral

Por su tiempo, apoyo y observaciones realizadas para orientar la formación y culminación de este proyecto.

Agradecimientos Personales

- ⊗ *El presente trabajo se realizó en la Unidad de Bioprocesos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, en el Departamento de Biotecnología y Biología Molecular, bajo la dirección del Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán. Se agradece el apoyo técnico del Ing. Abel Blancas Cabrera, técnico académico de la Unidad de Bioprocesos.*
- ⊗ *Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número (CVU/Becario): 631381, así como de los proyectos CONACYT 230042, 247473 y 178528; y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT)-UNAM IN-210013 y IN-209113. Se agradece también al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo económico para la asistencia a congresos.*
- ⊗ *A los miembros del Jurado: Dr. Sergio Sánchez Esquivel, Dr. Alejandro Alarcón, Dr. Octavio Loera Corral, Dra. Gloria Soberón Chávez y Dra. Esperanza María Martínez Romero por su tiempo y disposición para evaluar mi tesis y titulación.*
- ⊗ *Dra. Ana Tzitzqui Chávez Bárcenas por la capacitación que me brindó en su laboratorio y proveer amablemente las cepas de *Agrobacterium rhizogenes* A4PC y A4RS.*
- ⊗ *A la Dra. Adriana Valdez por su seguimiento y aportes al desarrollo del proyecto.*
- ⊗ *A el M. en C. Daniel Díaz Espinoza de los Monteros por su trascendente instrucción en la elaboración y desarrollo de mi proyecto experimental.*
- ⊗ *A el Dr. Miguel Tapia Rodríguez por su asesoría y recomendaciones para el análisis de imágenes.*
- ⊗ *A la M. en C. Monserrat García por su amistad, consejos, confianza y apoyo a mi desarrollo personal y profesional.*

- ⊗ *A la M. en C. Greta Isabel Reynoso Cereceda por brindarme su compañía, palabras alentadoras, apoyo y cariño durante todo mi proceso de formación personal y profesional.*
- ⊗ *A la Dra. Marta López Guerrero por su acompañamiento, enseñanza y consejos en mi formación profesional.*
- ⊗ *A el M. en C. Ramsés Gamboa por su amistad, fortaleza y compañerismo, que llenaron cada espacio de mi convivencia en el laboratorio.*
- ⊗ *A toda la colonia colombiana que me hizo sentir como en casa: Deisy, Diana, Andrés Vásquez, Laura, Sara Restrepo, Andrea Bedoya, Sara Ramírez, Wilman, y David.*
- ⊗ *Dado que este camino está lleno de mucho aprendizaje como grupo de trabajo, quiero agradecer con mucho cariño a los demás compañeros de laboratorio, el Ingeniero Abel Blancas, Ramsés García, Giroshí, Mafer, Andrea Castellanos, Saumel, Mariana, Jesús Guerra, Jesús Santana, Jessica, Carlos, Mario, Rosa, Daniel, Alberto Daniel, Alberto Campos, Viridiana, Diego, Manuel, Javier, Sandra, Jesús, Gerardo y Osmar.*
- ⊗ *A mi tío Héctor Jairo Uribe Uribe por creer en mí y darme todo su apoyo.*
- ⊗ *A la Dra. Paula Andrea Muñoz Uribe (mi prima), por que desde muy joven me enseñó a enamorarme de la ciencia, y ha sido y será siempre para mí un ejemplo a seguir a lo largo de la vida, te quiero.*

Dedicatoria

Esta tesis y sus frutos los dedico con todo mi corazón a mi familia, Jaime Alberto Uribe Uribe, María Teresa López Gaviria, Diana María Uribe López y Lilibeth Hoyos Rosario, porque en la distancia me brindaron su compañía, apoyo y la fortaleza que me hacía falta para incorporarme y seguir adelante en mi camino, los amo.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Contexto ecológico de la micorriza.....	3
1.2. La asociación micorrízica arbuscular	4
1.3. Germinación de esporas	5
1.4. Generación del micelio presimbiótico	7
1.5. Moléculas señal del HFMA y los receptores de la planta.....	9
1.6. Colonización de la célula cortical: La formación del Aparato Pre-Penetración (PPA).....	9
1.7. La nutrición del HFMA y su comunicación con la planta.....	12
1.8. Producción de micorriza	14
2. HIPÓTESIS.....	17
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivo General.....	17
3.2. Objetivos Particulares	17
4. ANTECEDENTES.....	18
5. METODOLOGÍA.....	21
5.1. Procedencia del material biológico	21
5.2. Esporas de HFMA.....	21
5.3. Raíces de <i>Cichorium intybus</i>	21
5.4. Desinfección y criopreservación de esporas	22
5.4.1. Desinfección de esporas	22
5.4.2. Criopreservación de esporas.....	23
5.5. Multiplicación y mantenimiento de raíces de <i>C. intybus</i>	23
5.6. Prueba de germinación de esporas en 12 medios de cultivo	24
5.6.1. Diseño del medio de cultivo	24
5.6.2. Obtención del licuado de raíz	25
5.6.3. Evaluación de la germinación y la longitud hifal de esporas de HFMA	25

5.7.	Prueba de desarrollo micelial en presencia/ausencia de raíces de <i>Cichorium intybus</i>	27
5.8.	Análisis estadístico	29
6.	RESULTADOS.....	30
6.1.	Efecto de los 12 medios de cultivo planteados sobre la germinación y longitud hifal de esporas de las 5 especies HFMA.....	30
6.2.	Porcentaje de contaminación en los medios de cultivo planteados..	30
6.3.	Desarrollo micelial de esporas de <i>G. margarita</i> WV205A en presencia/ausencia de raíz	31
6.4.	Elongación del tubo germinativo de esporas de <i>G. margarita</i> WV205A 33	
6.5.	Germinación de las esporas de <i>G. margarita</i> WV205A.....	33
6.6.	Ramificación de las esporas de <i>G. margarita</i> WV205A	34
6.7.	Generación de células auxiliares a partir de las esporas de <i>G. margarita</i> WV205A	34
7.	DISCUSIÓN.....	39
7.1.	Efecto de los 12 medios de cultivo en la germinación y longitud hifal de las 5 especies de HFMA	39
7.2.	Efecto de los tratamientos en la longitud hifal de <i>G. margarita</i> WV205A.....	40
7.3.	Efecto de los tratamientos en el porcentaje de germinación de <i>G. margarita</i> WV205A	43
7.4.	Efecto de los tratamientos en el número de ramificaciones hifales de <i>G. margarita</i> WV205A	45
7.5.	Efecto de los tratamientos en el número de agrupaciones de células auxiliares de <i>G. margarita</i> WV205A.....	46
8.	CONCLUSIONES.....	49
9.	PERSPECTIVAS.....	50
10.	LITERATURA CITADA	51
11.	ANEXOS.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de colonización del HFMA. Myc-LCO = Myc-Lipo-Chito-Oligosaccharides, CO4/5 = Chitin Oligomer 4/5 (ilustración Uribe-López, 2016).	8
Figura 2. Establecimiento de la colonización y formación del arbúsculo (ilustración Uribe-López, 2016).	11
Figura 3 Foto representativa del paso de una raíz de achicoria a un nuevo medio de cultivo MSR.	24
Tabla 1. Composición de los medios de cultivo planteados. M = medio. Se evaluaron 12 medios. Se usó como control positivo el medio MSR y como un segundo control el medio Phytigel agua (no mostrado en la tabla, composición: 3 g/L de Phytigel)	25
Figura 4. Esquema del diseño experimental de la fase 1 a. En cada pozo se sembró 1 mL de medio. Cada color indica un medio de cultivo diferente y los círculos que presentan rayas diagonales indican un cambio en la concentración del flavonol o de la estrigolactona (ver tabla 1). b. Fotografía del estado de las esporas de <i>G. margarita</i> WV205A para el montaje experimental. ...	27
Tabla 2. Planteamiento de tratamientos para la evaluación del efecto en el desarrollo miceliar. M1= medio 1 (Medio MSR + quercetina 5 µM + metil oxindole 2.5 nM + glucosa 8.2 g/L), MSR=medio Modificado Strullu-Romand, MSRSS= medio MSR sin sacarosa, M1SS= medio M1 sin sacarosa. Tratamientos I,II,III y C+ (control positivo) se realizaron en presencia de raíz. Tratamientos I',II',III', C-1 y C-2 (control 1 y 2) se realizaron en ausencia de raíz.	28
Figura 5. Esquema del experimento de la fase 2.	29
Figura 6. Porcentaje de contaminación de <i>F. mosseae</i> UK 115, <i>C. etunicatum</i> NE 102, <i>R. intraradices</i> UT126, <i>G. rosea</i> FL 105 y <i>G. margarita</i> WV205A.	31
Tabla 3. Valores de longitud y germinación de esporas de <i>G. rosea</i> FL105, <i>G. margarita</i> WV205A, <i>R. intraradices</i> UT126, <i>F. mosseae</i> UK115 y <i>C. etunicatum</i> NE102. DS = desviación estándar. M1 = Medio 1, M2 = Medio 2, M3 = Medio 3, M4 = Medio 4, M5 = Medio 5, M6 = Medio 6, M7 = Medio 7, M8 = Medio 8, M9 = Medio 9, M10 = Medio 10, M11 = Medio 11, M12 = Medio 12. Incubación durante 30 días a 28 °C con CO ₂ al 2%.	32
Figura 7. Longitudes hifales de <i>G. margarita</i> usando el medio M1 (a) y M2 (b). Tratamiento CONTROL POSITIVO (C+) = MSR/MSRSS, Tratamiento I = M1/MSRSS, Tratamiento II = M1/MSR, Tratamiento III = M1SS/MSRSS, Tratamiento C-1 = MSR/MSRSS, Tratamiento C-2 = MSRSS/MSRSS Tratamiento I' = M1/MSRSS, Tratamiento II' = M1/MSR, Tratamiento III' = M1SS/MSRSS. Columnas negras = presencia de raíz, columnas blancas y grises = ausencia de raíz. El análisis estadístico se realizó con prueba de Tukey (p<0.05).	35
Figura 8. Cinética del porcentaje de germinación (a) de <i>G. margarita</i> con respecto a cada tratamiento durante 71 días de incubación. La gráfica del comportamiento cinético ilustra la evolución en el porcentaje de germinación en una réplica experimental. El porcentaje de germinación de <i>G. margarita</i> usando el medio M1 (b) y M2 (c). Tratamiento CONTROL POSITIVO	

(C+) = MSR/MSRSS, Tratamiento I = M1/MSRSS, Tratamiento II = M1/MSR, Tratamiento III = M1SS/MSRSS, Tratamiento C-1 = MSR/MSRSS, Tratamiento C-2 = MSRSS/MSRSS Tratamiento I' = M1/MSRSS, Tratamiento II' = M1/MSR, Tratamiento III' = M1SS/MSRSS. Columnas negras = presencia de raíz, columnas blancas y grises = ausencia de raíz. El análisis estadístico se realizó con prueba de Tukey ($p < 0.05$).....**36**

Figura 9. Número de Ramificaciones Hifales de *G. margarita* usando el medio M1 (a) y M2 (b). Tratamiento CONTROL POSITIVO (C+) = MSR/MSRSS, Tratamiento I = M1/MSRSS, Tratamiento II = M1/MSR, Tratamiento III = M1SS/MSRSS, Tratamiento C-1 = MSR/MSRSS, Tratamiento C-2 = MSRSS/MSRSS Tratamiento I' = M1/MSRSS, Tratamiento II' = M1/MSR, Tratamiento III' = M1SS/MSRSS. Columnas negras = presencia de raíz, columnas blancas y grises = ausencia de raíz. El análisis estadístico se realizó con prueba de Tukey ($p < 0.05$).**37**

Figura 10. Número de Agrupaciones de Células Auxiliares de *G. margarita* usando el medio M1 (a) y M2 (b). Tratamiento CONTROL POSITIVO (C+) = MSR/MSRSS, Tratamiento I = M1/MSRSS, Tratamiento II = M1/MSR, Tratamiento III = M1SS/MSRSS, Tratamiento C-1 = MSR/MSRSS, Tratamiento C-2 = MSRSS/MSRSS Tratamiento I' = M1/MSRSS, Tratamiento II' = M1/MSR, Tratamiento III' = M1SS/MSRSS. Columnas negras = presencia de raíz, columnas blancas y grises = ausencia de raíz. El análisis estadístico se realizó con prueba de Tukey ($p < 0.05$).....**38**

Figura 11. Espora de *G. margarita* en el tratamiento I usando medio M1. La flecha señala los septos en uno de los tubos germinativos.**42**

Figura 12. Hifa germinativa *G. margarita* en el tratamiento MSRFEG/ MSRSS. La flecha señala los septos en la punta de la hifa y la retracción del citoplasma.**42**

Figura 13. Célula auxiliar de *G. margarita* WV205A en tratamiento I, usando medio M1. 200x**47**

Figura 14. Célula auxiliar de *G. margarita* WV205A en tratamiento. II, usando medio M1. Aumento 100x**47**

Figura 15. Célula auxiliar de *G. margarita* WV205A en tratamiento I', usando medio M1. Aumento 100x**48**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo planteados. M = medio. Se evaluaron 12 medios. Se usó como control positivo el medio MSR y como un segundo control el medio Phytigel agua (no mostrado en la tabla, composición: 3 g/L de Phytigel).	25
Tabla 2. Planteamiento de tratamientos para la evaluación del efecto en el desarrollo miceliar. M1= medio 1 (Medio MSR + quercetina 5 µM + metil oxindole 2.5 nM + glucosa 8.2 g/L), MSR=medio Modificado Strullu-Romand, MSRSS= medio MSR sin sacarosa, M1SS= medio M1 sin sacarosa. Tratamientos I,II,III y C+ (control positivo) se realizaron en presencia de raíz. Tratamientos I',II',III', C-1 y C-2 (control 1 y 2) se realizaron en ausencia de raíz.	28
Tabla 3. Valores de longitud y germinación de esporas de <i>G. rosea</i> FL105, <i>G. margarita</i> WV205A, <i>R. intraradices</i> UT126, <i>F. mosseae</i> UK115 y <i>C. etunicatum</i> NE102. DS = desviación estándar. M1 = Medio 1, M2 = Medio 2, M3 = Medio 3, M4 = Medio 4, M5 = Medio 5, M6 = Medio 6, M7 = Medio 7, M8 = Medio 8, M9 = Medio 9, M10 = Medio 10, M11 = Medio 11, M12 = Medio 12. Incubación durante 30 días a 28 °C con CO ₂ al 2%.....	32

RESUMEN

La micorriza arbuscular (MA) es una asociación simbiótica entre las raíces de la mayoría de las plantas y hongos del filo Glomeromycota. Uno de los métodos de producción de los hongos micorrízicos arbusculares es mediante el cultivo *in vitro*, el cual permite obtener inóculos libres de contaminantes. Esta estrategia brinda las condiciones adecuadas al hongo en su etapa pre-simbiótica permitiéndole su posterior establecimiento con raíces transformadas. En este trabajo se evaluaron los parámetros de desarrollo micelial de cinco hongos formadores de micorriza arbuscular (HFMA), *Funneliformis mosseae* UK115, *Claroideoglomus etunicatum* NE102, *Gigaspora rosea* FL105, *Gigaspora margarita* WV205A y *Rhizophagus intraradices* UT126; empleando el medio basal Strullu-Romand (MSR) enriquecido con el flavonol quercetina, el análogo de la estrigolactona 1-metil-2-oxindol y glucosa. Se realizó un diseño experimental unifactorial, donde se consideraron 9 tratamientos y 6 repeticiones para cada uno de los tratamientos. Las fuentes de variación resultantes se sometieron a una prueba de Tukey (P-valor < 0.05). Inicialmente, *G. margarita* WV205A fue el género que presentó diferencias estadísticamente significativas en la longitud hifal frente a las demás especies. Luego de 71 días de incubación el tratamiento I' (caja Petri = compartimento proximal: medio M1 sin raíz/ compartimento distal: medio MSRSS -sin sacarosa- con 5 esporas), de 8 tratamientos más (C+, C-1, C-2, I, II, III, II' y III'), presentó un efecto positivo estadísticamente significativo en el desarrollo micelial de *G. margarita* WV205A con respecto al control positivo (caja Petri = compartimento proximal: medio MSR con raíz/ compartimento distal: medio MSRSS -sin sacarosa- con 5 esporas), obteniendo valores totales (Media \pm desviación estándar, n = 6) de germinación de $93 \pm 10\%$, presencia de 14 ± 2 grupos de células auxiliares, presencia de 55 ± 7 agrupaciones de células auxiliares y de 84.3 ± 3 mm de longitud hifal. La composición del medio M1 propuesto (Medio MSR + quercetina $5 \mu\text{M}$ + 1-metil-2-oxindol 2.5 nM + glucosa 8.2 g/L) permite un aumento en los parámetros de desarrollo micelial en estado presimbiótico en comparación con los valores obtenidos en el control positivo con medio MSR.

ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizal (AM) are a symbiotic association between the plant roots and fungi of the phylum *Glomeromycota*. The *in vitro* cultivation method for arbuscular mycorrhizal fungi production allows the generation of an inoculum free contamination. The aim of this strategy is to find the conditions for the fungus development in its pre-symbiotic stage, allowing subsequent establishment with transformed roots. In this work several mycelial growth parameters were evaluated including percentage of germination, number of hyphal branches, number of clusters of auxiliary cells and hyphal length of five spore forming arbuscular mycorrhizal fungi (AMF): *Funneliformis mosseae* UK115, *Claroideoglossum etunicatum* NE102, *Gigaspora rosea* FL105, *Gigaspora margarita* WV205A y *Rhizophagus intraradices* UT126; using Strullu-Romand medium (MSR) as basal medium enriched with flavonol quercetin, the analog strigolactone 1-methyl-2-oxindole and glucose. Single factor experimental design was performed, considering 9 treatments of 6 replicates each. The resultant sources of variation, was analyzed using Tukey test (P-value <0.05). Initially *G. margarita* WV205A was the gender with significant differences in the hyphal length compared with the others. After 71 days of incubation treatment I' (with M1 medium and root absent) compared with the other 8 treatments analyzed (C +, C-1, C-2, I, II, III, II' and III'). The results obtained to *G. margarita* WV205A with the treatment I' are the following: germination values (mean \pm standar deviation, n = 6) of $93\pm 10\%$, clusters of auxiliary cells presence of 14 ± 2 , number of hyphal branches of 55 ± 7 and hyphal length of 84.3 ± 3 . In addition we found that the proposed M1 medium composition (MSR médium + 5 μ M quercetin + 2.5 nM metil oxindole + 8.2 g/L glucose) allowed an increase in mycelial development parameters in the pre-symbiotic state in comparison with the values obtained with the MSR medium.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Contexto ecológico de la micorriza

La microbiota del suelo está constituida por una amplia diversidad de microorganismos que influyen en el crecimiento de las plantas. Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés) (Zhang, *et al.*, 2004), las bacterias fijadoras de nitrógeno (Franche *et al.*, 2009) y los hongos formadores de micorriza arbuscular (HFMA) (Alarcón *et al.*, 1999), son algunos de los microorganismos que desempeñan roles importantes en la rizosfera de cada planta (Manoharachary, *et al.*, 2006). La rizosfera se considera un ambiente dinámico en el cual se presenta una acumulación de microorganismos, los cuales son influenciados por exudados radicales tales como aminoácidos y amidas, enzimas, esteroides, azúcares, vitaminas, taninos, entre otros (Pinton *et al.*, 2007). Estos exudados influyen en el crecimiento y la actividad de la rizosfera, traduciéndose en interacciones positivas o negativas para el desarrollo de la planta (Atlas y Bartha, 2001).

En la rizosfera, algunos hongos establecen asociaciones con las raíces de las plantas. Estas simbiosis mutualistas se denominan micorrizas. El micelio del hongo, sirve a la planta como puente entre la raíz y los nutrientes del suelo que son poco accesibles para ésta (Sánchez y Velásquez, 2008). La micorriza incrementa la absorción de nutrientes de la planta, debido a que el micelio puede explorar un mayor volumen de suelo alcanzando micrositios edáficos poco accesibles para las raíces (Johnson y Gehring, 2007). Asimismo, la planta recibe otros beneficios de esta simbiosis como tolerancia al estrés hídrico (Ruiz Lozano, 2003), tolerancia a la toxicidad por metales pesados (Gohre y Paszkowski, 2006) y exclusión de patógenos edáficos (Vierheilig *et al.*, 2008). Existen siete tipos de micorriza que han sido descritos hasta ahora: arbuscular, ectomicorriza, ectendomicorriza, arbutoide, monotropoide, ericoide y las micorrizas de las orquídeas. De estos tipos, la micorriza arbuscular y la ectomicorriza son las más abundantes y diseminadas en los suelos (Siddiqui *et al.*, 2008).

No obstante, son los hongos formadores de micorriza arbuscular (HFMA) los que presentan mayor abundancia en los ecosistemas edáficos del planeta, dando como hecho que, alrededor del 90% de las plantas terrestres presenten este tipo de asociación simbiótica (Montaño *et al.*, 2007). Las características biológicas de los HFMA han originado su implementación en la agricultura como biofertilizantes para mejorar la productividad y los rendimientos en cultivos agrícolas (Janos, 1980; Diederichs, y Moawad, 1993; Azcón Aguilar y Barea, 1997). El principal beneficio que la planta recibe es el aumento en la captación de nutrientes inmóviles en el suelo, especialmente el fósforo (P) (Jakobsen, 1999). De igual forma, los HFMA aumentan la acumulación de nitrógeno (N) en los tejidos de las plantas como resultado de la mineralización del N orgánico del suelo (Ibijbijen *et al.*, 1996). También, su interacción con otros organismos del suelo mejora el ciclaje de nutrientes y su obtención por la planta. Un ejemplo de esto es la fijación biológica de nitrógeno, efectuada por *Rhizobium*, la cual se ve aumentada cuando la planta está co-colonizada con HFMA (Xavier y Germida, 2002). Su rol ecológico es de vital importancia y constituye un componente integral en los ecosistemas; actualmente tiene aplicaciones significativas en sistemas de agricultura sostenible (Schreiner y Bethlenfalvay, 1995).

1.2. La asociación micorrízica arbuscular

Dentro del 90% de la plantas terrestres que forman la asociación micorrízica arbuscular se incluye muchas especies de importancia agrícola (trigo, maíz, arroz, cultivos forrajeros, árboles frutales, algodón) y hortícola (rosas, petunias, lirios, claveles) (Smith y Read, 1997). La micorriza arbuscular representa una de la simbiosis más antiguas, reportando su presencia, hifas y arbuscúlos en fósiles de *Aglaophyton* provenientes del periodo Devónico (Pirozynski y Dalpe, 1989; Remy *et al.*, 1994). Igualmente, trabajos moleculares basados en los genes que codifican para el RNA ribosomal 18S (rADN) realizados por Simon y colaboradores (1993) sugieren que los Glomeromycetes surgieron hace 450 millones de años atrás, siendo clave esta simbiosis para la colonización terrestre de las plantas. Se ha estimado que los HFMA son los hongos más abundantes y ubicuos en los suelos

agrícolas, con una biomasa total entre 4.4 a 51.8% de la biomasa total de los microorganismos del suelo (Olsson *et al.*, 1999).

Debido a su naturaleza biotrófica de los HFMA, la culminación de su ciclo de vida depende de la habilidad para colonizar una planta hospedera, cesando su crecimiento después de un periodo de alrededor de 4 semanas de cultivarlos en ausencia de la planta, siendo variable en cada especie de HFMA, la edad de la espora y el tipo de medio de cultivo (Mosse, 1962; Bécard y Pfeffer, 1993; Hepper 1983; Mosse, 1988; Bonfante y Perotto 1995; Bonfante y Bianciotto 1995). Actualmente, su cultivo en ausencia de planta hospedera, no se ha logrado, lo que ha dificultado su producción en masa e implementación en sistemas de cultivo a gran escala (Jarstfer y Sylvia, 1992). No obstante, se han podido crecer en cultivos monoxénicos (cultivo de dos organismos en simbiosis, en este caso: HFMA y hospedero) con explantes de raíz (Diop *et al.*, 1994) y con raíces transformadas (Pawlowska *et al.*, 1999). Las raíces transformadas son obtenidas mediante la infección de *Agrobacterium rhizogenes*, el cual posee un plásmido Ri T-DNA (Root-inducing Transfer-DNA) que induce la proliferación de raíces *in vitro* sin necesidad de aplicar fito-hormonas al medio de cultivo (Bécard y Fortin, 1988).

El proceso de colonización fúngica que lleva a cabo el HFMA en las raíces de la planta, se caracteriza por tener distintos estados que contienen una serie de cambios morfológicos y genéticos complejos en la totalidad del hongo (que se discutirán más adelante en detalle): germinación de esporas, diferenciación hifal, formación del apresorio, penetración de la raíz, crecimiento intercelular, formación del arbúsculo y el transporte de nutrientes. Con base en esto, es importante hablar de los cambios celulares estructurales y metabólicos que lleva a cabo el HFMA, para efectuar la colonización de una planta.

1.3. Germinación de esporas

Generalmente, las esporas que se encuentran en el suelo están en formas latentes o activas. Si éstas se encuentran activas, las condiciones fisicoquímicas del ambiente, pueden desencadenar su germinación; pero si se encuentran

latentes, aunque las condiciones ambientales sean adecuadas, éstas no desencadenan una subsecuente germinación. Este suceso aún no es claro, pero algunos autores sugieren que se debe a las reservas de nutrientes en el citoplasma (Maia y Kimbrough, 1998). Asimismo, se ha sugerido que factores como el pH, la temperatura, los nutrientes orgánicos e inorgánicos, algunos microorganismos y los exudados radicales, desempeñan un papel importante en la germinación de las esporas.

La germinación de la espora inicia con la formación del tubo germinativo, el cual puede variar, dependiendo del género. Para el caso de *Glomus*, su germinación se da por recrecimiento al final de las hifas más viejas (Mosse, 1959; Walker *et al.*, 1995). En contraste, para los géneros *Scutellospora*, *Gigaspora* y *Acaulospora*, el tubo germinativo emerge directamente desde la pared de la espora. Las estructuras germinativas se han descrito como compartimentos periféricos densos que contienen citoplasma y muchos núcleos, que surgen a partir de tubos germinales que presionan a través de las capas externas de la pared de la espora (Mosse, 1970a; 1970b). También, las esporas pueden tener otra estrategia para incrementar la probabilidad de colonización en el hospedero, esta estrategia es la germinación múltiple, la cual se define como la habilidad de la espora para germinar varias veces y producir tubos germinativos sucesivos, cuando los tubos germinativos iniciales han sido rotos (Koske, 1981).

Los tamaños de las esporas de HFMA pueden llegar a variar entre 22 μm y 1050 μm de diámetro (Oehl *et al.*, 2008). Para la familia Gigasporaceae se han reportado valores que superan los 200 μm , lo que las convierte en unas de las esporas más grandes que existen. En su interior se almacena una abundante cantidad de lípidos, carbohidratos y una pared que contiene quitina y en algunos casos β 1,3-glucano (Lemoine *et al.*, 1995). Se han estimado intervalos entre 800 a 35000 núcleos, dependiendo de la especie (Hosny *et al.*, 1998). Experimentos realizados por Sanders (2004, 2005), demostraron que los núcleos de *Glomus intraradices*, *G. etunicatum* y probablemente también los de *Scutellospora*

castanea, son haploides, lo que indica que no existe variación en la ploidía, lo que hace suponer que es un caso frecuente en todos los HFMA.

1.4. Generación del micelio presimbiótico

Cuando están en el suelo, las esporas del micelio extra-celular (MEC) germinan creciendo desde las hifas involucrando la división nuclear (Bianciotto *et al.*, 1995), el uso de glucógeno, el uso de lípidos de reserva (Bago *et al.*, 1999) y la producción de una limitada cantidad de ramificación de micelio cenocítico (sin septos). En ese evento de germinación, los núcleos que se encuentran en la espора, migran a lo largo de la hifa hasta la zona apical del tubo germinativo (Bécard y Pfeffer, 1993), e inician la replicación del ADN y la división celular para iniciar la síntesis de nuevo micelio (Bianciotto *et al.*, 1995). Es en esta parte donde las reservas de lípidos, proteínas y glucógeno son empleadas para el crecimiento del hongo y la búsqueda de un nuevo hospedero (Bonfante *et al.*, 1994).

En ausencia de hospedero, el crecimiento de la hifa cesa, debido a la falta de moléculas señal producidas por la raíz, las cuales estimulan el crecimiento y la ramificación hifal (Besserer *et al.*, 2006). Se sabe que cuando la espора germina cerca de la raíz, el ácido graso 2-hidroxitetradecanoico (2OH-C14:0) induce la elongación de ramificaciones hifales laterales (Nagahashi y Douds, 2011). A una distancia más cercana a la raíz, pero sin contacto directo, la percepción de estrigolactonas radicales por parte del HFMA, desencadena una ramificación más compleja, generando un mayor número de eventos de ramificación.

A raíz de esto, el HFMA libera unas moléculas señal características, como los Myc-lipo-quito-oligosacaridos (Myc-LCOs, Myc-Lipo-Chito-Oligosaccharides) y los oligómeros de quitina (CO4/5, Chitin Oligomers), las cuales inducen en la planta una serie de respuestas encaminadas a la preparación para la simbiosis. La raíz produce monómeros de cutina, los cuales inducen la diferenciación de la hifa a hifopodio, el cual le permite al HFMA aferrarse con firmeza a la pared de la célula epidermal vegetal y penetrarla (**Figura 1**). Cuando el hifopodio inicia la

penetración de la epidermis, éste atraviesa el cortex (células corticales), intercelularmente y continua produciendo moléculas señales hasta penetrar las células corticales y formar los arbusculos (Schmitz y Harrison, 2014).

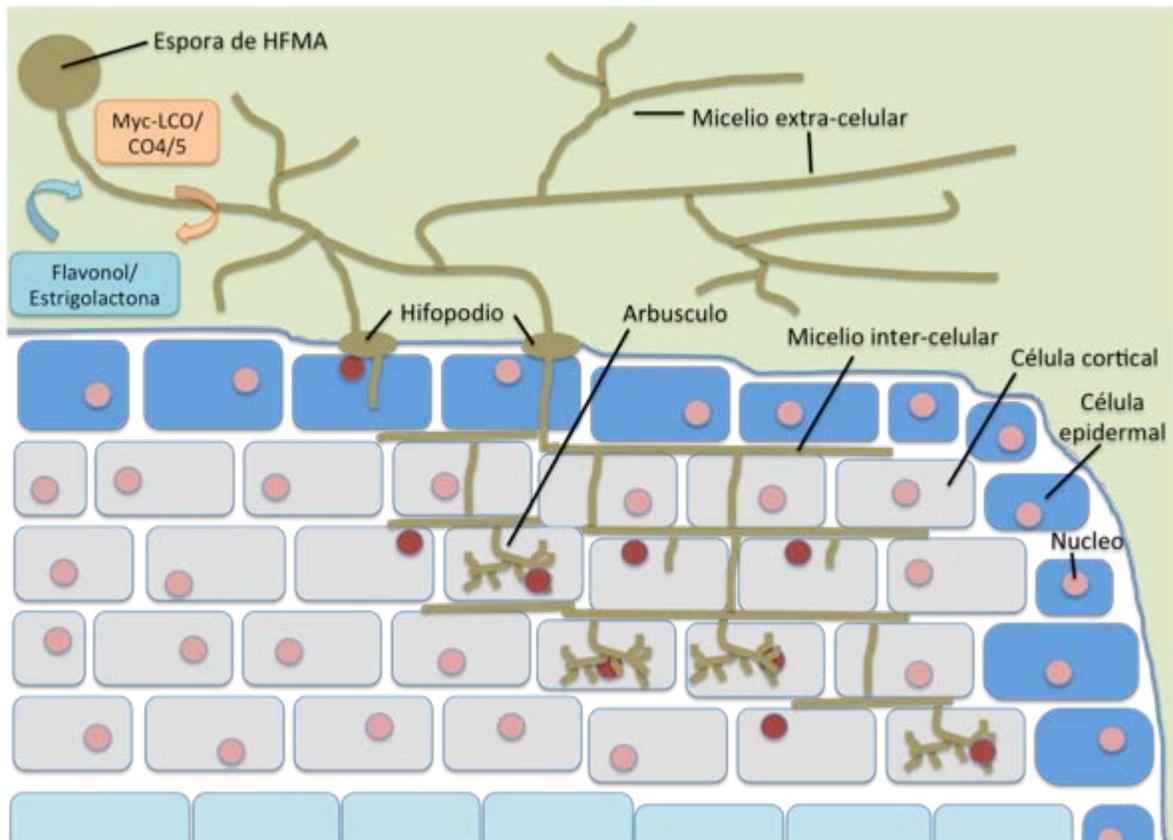


Figura 1. Proceso de colonización del HFMA. Myc-LCO = Myc-Lipo-Chito-Oligosaccharides, CO4/5 = Chitin Oligomer 4/5 (ilustración Uribe-López, 2016).

Con respecto a la síntesis de lípidos, se ha observado que durante la germinación y crecimiento del tubo germinativo de esporas de *G. caledonium*, se genera una acumulación de lípidos, con incremento de ácidos grasos libres y lípidos polares, y una disminución de lípidos neutros (Beilby y Kidby, 1980). El contenido total de lípidos incrementa desde 45% de peso seco, en esporas no germinadas a 55% y 75% de peso seco, en esporas germinadas, en 7 y 14 días respectivamente (Beilby y Kidby, 1980). En el metabolismo de carbohidratos se ha visto la actividad de enzimas de las vías metabólicas centrales, tales como la glicólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la vía de las pentosas fosfato y la gluconeogénesis

(Hepper *et al.*, 1986; Saito, 1995). Asimismo, se ha visto un rápido incremento en la concentración de ATP, evidenciando la presencia de actividad en la cadena respiratoria en *G. caledonium* (Beilby y Kidby, 1982).

1.5. Moléculas señal del HFMA y los receptores de la planta

Como se mencionó, se sabe qué tipo de moléculas son producidas por el HFMA para inducir la respuesta específica de la simbiosis en el hospedero: Myc-LOCs y CO4/5, estas moléculas son llamadas colectivamente factores Myc, los cuales, son compuestos basados en quitina que son reconocidos por la planta para iniciar la simbiosis (Maillet *et al.*, 2011). Los Myc-LOCs son compuestos con estructura muy relacionada a los factores Nod presentes en la nodulación de *Rhizobium* y tienen un efecto positivo en la inducción de raíces laterales y su colonización (Maillet *et al.*, 2011). Asimismo, los CO4/5 han sido identificados como moléculas señal que inducen las oscilaciones de Ca^{2+} de las células corticales y su producción es estimulada por compuestos radicales como las estrigolactonas.

Este tipo de respuesta por parte de la planta, es muy interesante e incluso se ha comparado con el rápido flujo de entrada de Ca^{2+} , que ocurre en la respuesta a hongos fitopatógenos debido a la inmunidad desencadenante de MAMPs (microbe associated molecular patterns) o MIT (MAMPs triggered immunity), en respuesta a la quitina presente en la pared celular del hongo (Navazio *et al.*, 2007). Incluso en el proceso de acomodación del HFMA en la célula cortical, las plantas deben prepararse constantemente para hacer frente a las interacciones dañinas que un microorganismo dado pueda desencadenar; ésto lo efectúa mediante el reconocimiento de las MAMPs. No obstante, la planta y el HFMA han desarrollado estrategias conjuntas para favorecer la simbiosis, sin poner en peligro la respuesta innata contra los fitopatógenos (Jones y Dangl, 2006).

1.6. Colonización de la célula cortical: La formación del Aparato Pre-Penetración (PPA)

La célula cortical es muy activa cuando la hifa del HFMA ha ingresado al apoplasto (espacio intercelular) de las células corticales y empieza a preparar el ambiente

para el paso del micelio intracelularmente (Genre *et al.*, 2005). Como consecuencia de la estimulación bioquímica y mecánica de la hifa, las células corticales dan origen a la formación de un aparato de prepenetración (pre-penetration apparatus, PPA). Este PPA es una estructura subcelular formada por un ensamblaje denso de retículo endoplasmático, microtúbulos, actina y organelos como el aparato de Golgi. El PPA predetermina el paso subsecuente de la hifa en crecimiento, a través de la planta y se forma después de la formación del hifopodio (Harrison, 2012).

La formación del PPA es precedida por la migración del núcleo de la célula epidérmica vegetal hacia el punto de ingreso de la hifa. Luego de esto, el núcleo lidera el desarrollo del PPA a través del citoplasma de la célula cortical generando una invaginación. Alrededor de la invaginación, se reacomodan los microtúbulos y microfilamentos del citoesqueleto, que junto con densos depósitos del retículo endoplasmático, forman un tubo hueco dentro del PPA, el cual conecta el sitio terminal de dirección del núcleo, con el sitio de contacto del apresorio (Siciliano *et al.*, 2007; Genre *et al.*, 2008). Una vez que el “túnel transcelular” está completo, la hifa del hongo penetra la célula hospedera. Sin embargo, las moléculas señal que desencadenan la formación del PPA aún se desconocen (**Figura 2**).

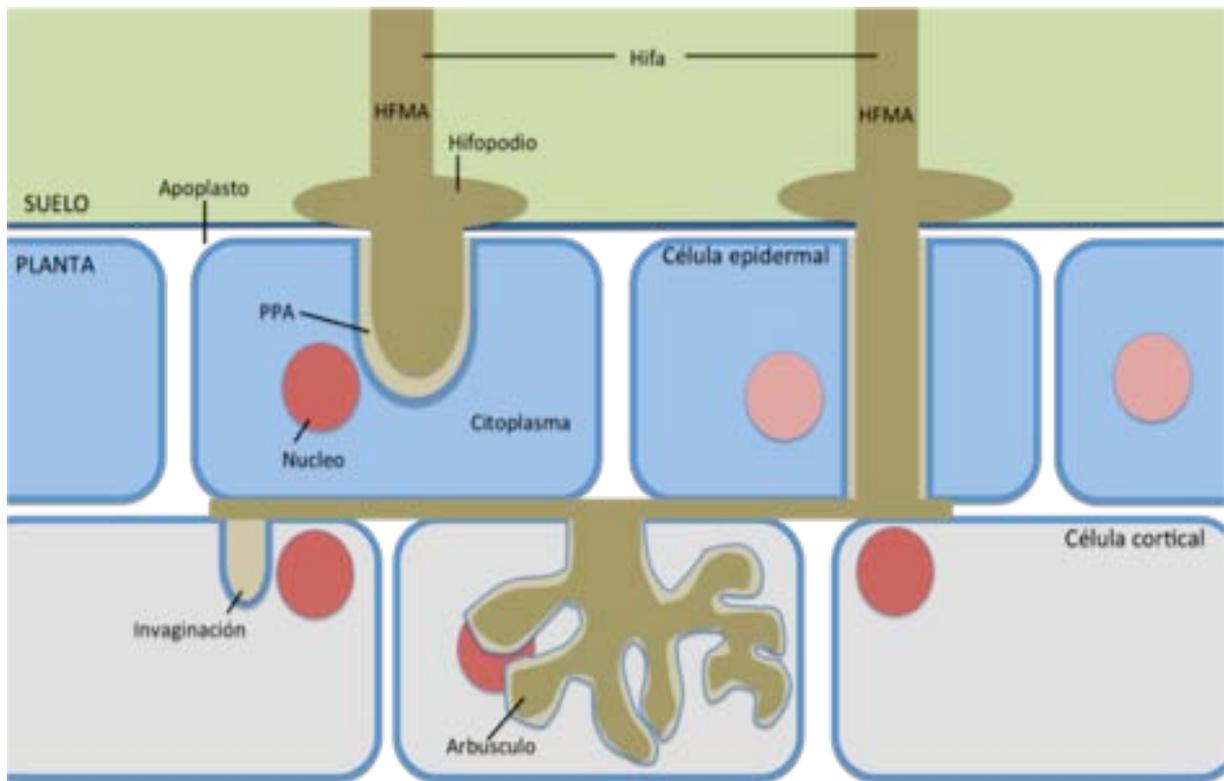


Figura 2. Establecimiento de la colonización y formación del arbusculo (ilustración Uribe-López, 2016).

Al contacto directo de la pared del hongo con la membrana de la célula vegetal, se le llama membrana perifúngica. Ya cuando las hifas han alcanzado las células del córtex, las hifas empiezan a diferenciarse en estructuras altamente ramificadas llamadas arbusculos, los cuales son el principal sitio de translocación de nutrientes entre el HFMA y la raíz de la planta (Harrison, 2012). La membrana de la planta circunda el arbusculo, esta interacción se denomina membrana periarbuscular (periarbuscular membrane, PAM) y contiene transportadores de fósforo inorgánico (Pi), que transportan el Pi que libera el HFMA a la célula vegetal (Kobae y Hata, 2010). Trabajos realizados por Helber y colaboradores (2011) localizaron un transportador de hexosa fúngico en el arbusculo, pero también fue hallado en la hifa intercelular, lo que sugiere que la recepción de fuente de carbono del hongo no ocurre específicamente vía PAM. Después de 4 o 5 días, el arbusculo comienza a degenerarse y debido a la desaparición intercelular del hongo, la célula vegetal retorna a su estado pre-fúngico (Brown y King, 1991). Esto da la

oportunidad a la célula vegetal de ser, eventualmente, viable para una nueva colonización (Pumplin y Harrison, 2009). Debido a que la hifa continúa su crecimiento a través del córtex radical, la generación de arbusculos en las células corticales no cesa, llegando a crear una matriz de células colonizadas con arbusculos en una variedad de estados de desarrollo. Por otro lado, en el exterior de la raíz el HFMA genera una red de micelio extrarradical, el cual capta los nutrientes desde la rizosfera y sirve de puente para trasladar dichos nutrientes a la planta hospedera (Javot *et al.*, 2007).

La evidencia que se tiene hasta ahora sobre la interacción del HFMA y la planta ha sido muy relacionada con la asociación simbiótica que lleva a cabo *Rhizobium* al generar los nódulos en la raíz de las leguminosas (Oláh *et al.*, 2005). No obstante, la información sobre la respuesta inicial y como el HFMA amortigua la respuesta a la defensa de la planta aún son poco claras. Algunos trabajos que se han publicado en los últimos 3 años pueden llegar a marcar un punto de partida para un mejor entendimiento de esta relación. La identificación de la posible proteína efectora secretada por el HFMA que actúa en el núcleo (Kloppholz *et al.*, 2011) es especialmente importante y marca el camino para estudios futuros potenciales. Asimismo, la explotación del efector fúngico de HFMA es una molécula prospecto a investigar a raíz de la reciente publicación del genoma de *Rhizophagus irregularis* (Tisserant *et al.*, 2013).

1.7. La nutrición del HFMA y su comunicación con la planta

A partir del genoma fúngico del HFMA *R. irregularis* (DAOM 197198) publicado en mayo de 2013 por Tisserant y colaboradores (2013) se ha abierto un nuevo período de estudio de los HFMA's. Para el caso de *R. irregularis*, se conocen alrededor de 445 genes implicados en el metabolismo del carbono y el flujo de este elemento, desde la planta hacia el hongo. Estos genes incluyen transportadores de monosacáridos presentes en el micelio intra-radical y la maquinaria enzimática para convertir el carbono en forma asimilable para el micelio extra-radical (Pfeffer *et al.*, 1999). La forma en que la planta le provee el

carbono al HFMA es en forma de hexosas y principalmente como glucosa (Solaiman y Saito, 1997).

La base de la nutrición del hongo en la asociación micorrízica se encuentra en el flujo del carbono y el HFMA lo debe obtener de la planta al ser incapaz de obtenerlo del suelo (Daza *et al.*, 2006). El estudio realizado por Schaarschmidt y colaboradores (2006), sugiere que la planta envía sacarosa al apoplasto donde es convertida a hexosa por una invertasa ácida secretada por la planta. Esta hipótesis ha sido confirmada para *G. intraradices* (DAOM 197198) por Tisserant y colaboradores (2012) al reportar que no secreta este tipo de invertasa. Este modelo de transporte de hexosas vía transportadores fúngicos, también se ha reportado en hongos ectomicorrízicos (Plett y Martin, 2011). Luego los transportadores de monosacáridos (MTS) importan la hexosa al HFMA para luego ser convertida a trehalosa, glucógeno y lípidos (Bago *et al.*, 2000).

Los compuestos que son producidos por la raíz, son sustancias análogas a las presentes en las interacciones Planta-*Rhizobium* y Planta-*Agrobacterium*. Estos son compuestos fenólicos, como los flavonoides y los ácidos fenólicos, y han sido evaluados en esporas germinadas axénicamente (Nagahashi *et al.*, 1996; Douds *et al.*, 1996). Un ejemplo de esto son los isoflavonoides formononetina y la biochanina A, que estimulan el desarrollo micelial en algunas especies de *Glomus* (Nair *et al.*, 1991). Otro tipo de compuestos evaluados son las estrigolactonas, las cuales, son responsables de la ramificación hifal (Akiyama *et al.*, 2005) la germinación de la espora (Parniske, 2005), las modulaciones en la fisiología fúngica y la actividad mitocondrial (Besserer *et al.*, 2006).

Las estrigolactonas son lactonas terpenoides derivadas de los carotenoides, las cuales actúan como moléculas señal en la comunicación que lleva a cabo la planta con el HFMA en la rizosfera (Akiyama y Hayashi, 2006). En concentraciones de μM y nM , las estrigolactonas inducen la ramificación del micelio, estimulan la germinación de la espora y activan respuestas celulares relacionadas con el metabolismo energético de las mitocondrias del HFMA (Besserer *et al.*, 2008).

Este hecho ha llevado a sugerir que existe un sistema de percepción sensible a las estrigolactonas, presente en los HFMA.

Trabajos realizados por Akiyama y colaboradores (2010) han demostrado que la unión del anillo C de la lactona tricíclica con el anillo D butenolido-metilo mediante enlace enol-eter, es esencial para desencadenar la ramificación hifal. No obstante, se encontró que este enlace no necesariamente tiene que ser enol-eter, pudiendo ser reemplazado por otros enlaces como son el imino-eter o el alcoxi. A partir de *Lotus japonicus* se han obtenido fracciones de exudados de raíz y de los cuales se ha aislado e identificado como un inductor de la ramificación del micelio la estrigolactona (+)-5-desoxistrigol (Akiyama *et al.*, 2005).

Asimismo, Foo y colaboradores (2013) demostraron que al mutar los genes para la biosíntesis de estrigolactonas *CCD8* y *CCD7* (carotenoid cleavage dioxygenases, CCDs) en la arveja, se perdía la capacidad de desarrollar la simbiosis con el HFMA. Este resultado evidencia la importancia que tienen las estrigolactonas como señal mediadora de la asociación micorrízica. Por otro lado, se ha encontrado que en *Petunia hybrida* está presente un transportador ABC denominado PDR1, el cual refleja ser necesario para la colonización del HFMA en la raíz (Kretschmar *et al.*, 2012). Esta conclusión se obtuvo al realizar análisis de expresión y mutación de PDR1, resultando como un exportador de estrigolactonas específico para las raíces (Kretschmar *et al.*, 2012).

1.8. Producción de micorriza

La producción de HFMA a gran escala tiene sus limitantes, debido a que las condiciones biotróficas obligadas de los HFMA hacen difícil el desarrollo de metodologías de producción a gran escala que sean eficientes en costo y que originen un inóculo de HFMA de alta calidad, homogéneo entre lotes y sin contaminantes (Budi *et al.*, 1999). Existen tres diferentes técnicas de producción de HFMA a escala comercial que se pueden clasificar como sigue: la clásica, en la que se utiliza una mezcla de sustrato constituida por arena/suelo a diferentes

proporciones (Gryndler *et al.*, 2003; Douds *et al.*, 2005). La segunda son aquellos sistemas de cultivo libres de sustrato (suelo) o hidropónicos y aeropónicos (Mohammad *et al.*, 2000; Tajini *et al.*, 2009). Y finalmente los sistemas de cultivo *in vitro*, que se basan en el uso de plántulas o cultivo de raíces transformadas (Voets *et al.*, 2005;). De los tres, el primero es de bajo costo, pero la calidad de los propágulos (es decir espora, raíz micorrizada y/o hifas) es baja y los otros dos generan inóculos limpios pero su costo de producción es mucho más alto, limitándose a ser implementados, generalmente, solo en investigación (Ijdo *et al.*, 2010).

La búsqueda de alternativas para la producción en masa de HFMA ha llevado a explorar otras metodologías en bioprocesos. Es así como Nuutila y colaboradores (1995) implementaron el uso de cultivos sumergidos en un biorreactor a pequeña escala para la producción de HFMA. En este trabajo, se utilizaron raíces de fresa (*Fragaria ananassa*) para el crecimiento de *Glomus fistulosum*, obteniendo 3.07 gL^{-1} en peso seco de raíz micorrizada. De igual forma, la investigación realizada por Jolicoeur y colaboradores (1999) demostró que *G. intraradices* puede ser producido tanto en caja de Petri, como en un biorreactor de columna de burbujeo tipo airlift; asociándolo con raíces transformadas de zanahoria (*Daucus carota*). Los resultados revelaron que la máxima producción de esporas en el biorreactor airlift, fue menor que la producida en cajas de Petri; obteniendo $12,400 \pm 800$ esporas/planta, en contraste con $30,000 \pm 11,500$ esporas/planta en un periodo experimental de 12 semanas. No obstante, a pesar de que la producción en biorreactor fue más baja, la posibilidad de escalar el proceso de cultivo de HFMA en cajas de Petri sería compleja.

Hasta ahora, el cultivo de HFMA en cultivo monoxénico ha sido extensamente estudiado, no obstante, los intentos por producir un cultivo axénico (es decir, el HFMA en ausencia de raíz), han sido transitorios, debido a que se logra un crecimiento de la hifa germinal a un grado muy limitado (Hepper y Smith, 1976; Hepper 1979, 1981, 1987) y se hace necesaria la presencia de la raíz para la culminación del ciclo de vida del HFMA (Bago y Bécard, 2002). Este reto

experimental, ha terminado por generar conclusiones acerca de las condiciones saprofitas del hongo; definiéndolo como un organismo de condiciones saprofitas escasas (Bago y Bécard, 2002). Por lo tanto, solo entendiendo la naturaleza de la relación biotrófica que establece el HFMA con la raíz de la planta, se podría llegar a obtener un cultivo axénico. En este sentido, abordando el suministro de distintos nutrientes al medio de cultivo, puede dar indicios de los requerimientos nutricionales para obtener un desarrollo miceliar y una subsecuente esporulación del hongo.

2. HIPÓTESIS

Un medio de cultivo basal ausente de raíces y enriquecido con glucosa, un flavonol y un análogo de estrigolactona, mejora los parámetros de desarrollo micelial a partir de esporas de hongos formadores de micorriza arbuscular (HFMA), en comparación con un medio de cultivo basal con presencia de raíz.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Comparar la producción de micelio de hongos formadores de micorriza arbuscular (HFMA) en un medio de cultivo basal ausente de raíces y enriquecido con glucosa, flavonoles y estrigolactonas, con respecto a un medio de cultivo basal con presencia de raíz.

3.2. Objetivos Particulares

- Diseñar un medio de cultivo enriquecido basado en distintas concentraciones de glucosa, flavonoles y estrigolactonas para el desarrollo micelial de esporas de HFMA.
- Evaluar el efecto de diferentes medios de cultivo enriquecidos con distintas concentraciones glucosa, flavonoles y estrigolactonas en el porcentaje de germinación y la longitud hifal de esporas de HFMA en ausencia de raíces.
- Evaluar el efecto de dos medios de cultivo enriquecidos con distintas concentraciones de glucosa, flavonoles y estrigolactonas en ausencia de raíces, sobre el crecimiento y desarrollo micelial de esporas de HFMA, con respecto a un medio basal con presencia de raíces.

4. ANTECEDENTES

El primer trabajo relacionado con el cultivo *in vitro* de HFMA fue publicado en 1962 (Mosse, 1962). Sus resultados probaron como el cultivo dual (monoxénico) de esporas de *Endogone* sp. cultivado con raíces de *Trifolium pratense* var. *parviflorum* (trébol rojo) permitía un mayor desarrollo de las plántulas, en contraste con las raíces no micorrizadas. Luego Mosse y Hepper (1975) establecieron la asociación de *Glomus mosseae* con cultivos de segmentos de raíz de *Lycopersicon esculentum* (tomate) y *T. pratense*. Este trabajo fue pionero al demostrar, por primera vez, que esporas de HFMA podían colonizar segmentos de raíz en un medio de cultivo basado en nutrientes minerales. Asimismo, en la década de los 80's, Strullu y Romand (1986, 1987) consiguieron restablecer la asociación de segmentos de raíces micorrizadas, de varias especies de micorriza con cortes de raíces de *Fragaria ananassa* (fresa), *Allium cepa* L. (cebolla) y tomate. Sus resultados demostraron que no solo se podían emplear las esporas de los HFMA para asociarlas a raíces, sino, también, otro tipo de propágulos infectivos como las raíces colonizadas por micelio.

La implementación de técnicas *in vitro* para el estudio de la asociación micorrízica entre el HFMA y la raíz hospedera y la producción de un cultivo axénico, han llevado a optimizar la transformación genética natural de *Agrobacterium rhizogenes* (Riker *et al.*, 1930), para generar cultivos de raíces que permitan el desarrollo del micelio y la subsecuente esporulación. Ensayos llevados a cabo por Mugnier y Mosse (1987) para colonizar raíces de *Convolvulus sepium*, transformadas con Ri T-DNA (Raíz-inductor, DNA de Transferencia), expusieron un nuevo método de generación de raíces colonizadas a partir de esporas del HFMA *Glomus mosseae*. No obstante, a pesar de haber logrado una total colonización de las raíces, la esporulación del hongo no ocurrió. No fue sino hasta 1988 (Bécard y Fortin, 1988) que se logró una esporulación *in vitro* usando raíces de zanahoria (*D. carota*) colonizadas con *Glomus intraradices*. Subsecuentemente, Bécard y Piché (1989a, 1992) demostraron que la esporulación se ve correlacionada con la reducción de ciertos nutrientes presentes

en el medio de cultivo, como son el CO₂ y los flavonoles. Asimismo, la adición de aminoácidos, compuestos de azufre, ácidos orgánicos, vitaminas y exudados radicales, pueden llegar a intensificar el desarrollo de la hifa germinativa (Hepper, 1984; Strullu y Romand, 1986).

Este tipo de trabajos han conducido a la producción del HFMA en condiciones monoxénicas con óptimos resultados de crecimiento y producción de biomasa fúngica. Un particular ejemplo es el de Diop y colaboradores, el cual reportó por primera vez una producción significativa de esporas (10² y 10³ esporas/caja de Petri) *Glomus* sp. (Diop *et al.*, 1994). No obstante, y aún con los resultados que se han obtenido hasta ahora, el cultivo axénico de un HFMA completando su ciclo de vida no se ha logrado (Douds 2002; Gadkar *et al.*, 2006). Estudios empleando medios de cultivo con extracto y exudados radicales han mostrado estimular al hongo en el desarrollo de su micelio (Hepper, 1984). Sin embargo, los medios de cultivos implementados para realizar cultivos monoxénicos como el medio mineral mínimo (M) (Chabot *et al.*, 1992a) o el medio Strullu-Romand (MSR) (Declerck *et al.*, 1996), han dado indicios del desarrollo del micelio en sus primeras horas en caja de Petri, al igual de sus requerimientos nutricionales para su desarrollo. Se sabe que, es posible obtener cerca del 90% de germinación de las esporas de HFMA en cultivo axénico, incluso en un medio de cultivo como el agar agua, el cual no posee ningún nutriente mineral u orgánico (Azcón-Aguilar *et al.*, 1986).

Basado en los resultados que se han visto en el estudio de cultivos monoxénicos, se ha recolectado información que da una vía para el planteamiento del cultivo axénico de HFMA. Durante la formación del micelio no simbiótico (hifa germinativa) se forman unas estructuras denominadas “estructuras absorbentes ramificadas” (BAS, por sus siglas en inglés branched absorbing structures), estas estructuras son transitorias, con un rango de vida entre 5 y 7 días (Bago *et al.*, 1998), tiempo tras el cual el citoplasma se retrae y el micelio se septa. En contraste con el micelio simbiótico, las BAS pueden absorber nutrientes del medio rápidamente (Strullu *et al.*, 1997), tales como fósforo y nitrógeno (Bago *et al.*, 1996), incrementando la supervivencia de la espora y dándole un potencial

crecimiento saprofito Esta característica de las BAS, han llevado a compararlas, tanto en su desarrollo, como en su morfología, con los arbusculos presentes en el micelio simbiótico, lo que plantea una homología entre ambas estructuras (Bago y Cano, 2005). Esta idea respalda el hecho de que las esporas, no necesitan la presencia, ni el contacto directo con la raíz hospedera para germinar. Asimismo, como se planteó anteriormente, los exudados radicales y concentraciones de CO₂ cercanas al 2% estimulan la germinación y crecimiento del micelio (Poulin *et al.*, 1993; Buée, 2000).

Teniendo como fundamento estas evidencias experimentales, se plantea comparar la producción de micelio de HFMA en un medio de cultivo ausente de raíces con respecto a un medio de cultivo con presencia de raíces transformadas, el cual esta suplementado con los nutrientes minerales y/o los exudados radicales necesarios para llegar a obtener un cultivo axénico con desarrollo miceliar.

5. METODOLOGÍA

5.1. Procedencia del material biológico

5.2. Esporas de HFMA

Se adquirieron esporas de las especies *Funneliformis mosseae* (UK115), *Claroideoglossum etunicatum* (NE102), *Gigaspora rosea* (FL105), *Gigaspora margarita* (WV205A) y *Rhizophagus intraradices* (UT126) del INVAM (International Collection of Arbuscular and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Morgantown, USA; <http://invam.caf.wvu.edu/>). Las esporas venían almacenadas en crioviales con agua (4°C). Las esporas fueron inmediatamente desinfectadas según la metodología de desinfección citada por Bentivenga y colaboradores (2013), con algunas modificaciones (detalles en sección 5. Metodología, apartado 1.15) en los tiempos de desinfección y la concentración de antibióticos. Al final, las esporas fueron almacenadas en tubos Eppendorf conteniendo agua destilada estéril a 4 °C.

5.3. Raíces de *Cichorium intybus*

Las raíces de achicoria común (ChicoreyA4NH, *Cichorium intybus*) transformadas con *Agrobacterium rhizogenes* fueron adquiridas en el GINCO (Glomeromycota *in vitro* Collection, <http://www.mycorrhiza.be/ginco-bel/index.php>). Este material fue proporcionado en cajas de Petri (90 mm de diámetro) conteniendo medio de cultivo MSR (Modified Strullu-Romand, Declerck *et al.*, 1998). La composición del medio MSR en mg/L de agua destilada es la siguiente: MgSO₄ · 7H₂O, 739; KNO₃, 76; KH₂PO₄, 4.1; Ca(NO₃)₂ · 4H₂O, 359; NaFeEDTA, 8; KCl, 65; MnSO₄ · 4H₂O, 2.45; ZnSO₄ · 7H₂O, 0.29; H₃BO₃, 1.86; CuSO₄ · 5H₂O, 0.24; (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O, 0.035; Na₂MoO₄ · 2H₂O, 0.0024; vitaminas (clorhidrato de tiamina, 1; clorhidrato de piridoxina, 0.9; ácido nicotínico, 1; pantotenato de calcio, 0.9; cianocobalamina, 0.4; biotina, 0.9); sacarosa, 10,000 y phytigel 3000. El pH fue ajustado a 5.5 y luego se esterilizó sin la solución de vitaminas a 121 °C, por 15 minutos. Después de la esterilización del medio, la solución de vitaminas fue esterilizada por filtración y se adicionó al medio de cultivo a 40°C en cámara de flujo laminar. Hecho esto, el medio se sirvió en cajas de Petri llenándolas con 35 mL por caja.

Las raíces fueron sub-cultivadas cada 3 semanas en medio MSR de la siguiente forma: desde una caja de Petri madre, se cortó una sección de 2 x 2 cm de medio conteniendo raíces saludables, ramificadas y turgentes. Luego, se puso la sección de agar cortada en la superficie de una nueva caja de Petri conteniendo medio MSR. Finalmente, se cubrió la caja de Petri y se selló con rollo de envoltura de plástico transparente. Las cajas de Petri conteniendo los cortes de la caja madre, se incubaron a 27 °C en oscuridad.

5.4. Desinfección y criopreservación de esporas

5.4.1. Desinfección de esporas

La desinfección de esporas (para las 5 especies de HFMA) se llevó a cabo en cámara de flujo laminar. Las esporas fueron transferidas a un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL. Inicialmente, se realizó un enjuague con 1 mL de agua destilada estéril y se mezcló suavemente por un minuto, pasado este tiempo el tubo fue centrifugado (centrifuga 5804 R- Eppendorf, USA) por 1 min a 2000 g y 4°C. Posteriormente, se descartó el sobrenadante con una micropipeta estéril de 1000 µL. Este paso se realizó por triplicado ^a. La desinfección fue llevada a cabo con dos soluciones. Primero, se desinfecto depositando una alícuota de 1 mL de Cloramina T ^b (cloramina T 2% + 2 gotas de Tween 20, esterilizada por filtración) con agitación suave durante 15 min ^c. Luego de esto los tubos fueron centrifugados por 3 min, a 2000 g y 4°C, y el sobrenadante fue descartado. Después, las esporas se lavaron con 1 mL de agua destilada estéril, se centrifugaron por 1 min a 2000 g a 4°C (centrifuga 5804 R- Eppendorf, USA) y se descartó el sobrenadante una micropipeta estéril. Este proceso de enjuague se realizó por triplicado ^d. La segunda desinfección se realizó, de la misma forma, con 1 mL de solución de antibióticos (estreptomicina 0.4% y Kanamicina 0.2% ^e, esterilizada por filtración) durante 15 min ^f y con 3 enjuagues sucesivos de 1 mL de agua destilada estéril ^g. Las esporas se almacenaron a 4°C en agua destilada estéril.

Observación: las modificaciones realizadas de la metodología de Bentivenga y colaboradores (2013) para la desinfección de esporas son las siguientes: **a.** Se

usaron 3 enjuagues en lugar de 2 enjuagues, **b.** Se usó una solución conteniendo cloramina T 2% + 2 gotas de Tween 20, en lugar de dos soluciones separadas Tween 20 0.05% y cloramina T 2%, **c.** Se cronometraron 15 min de agitación en lugar de 20 min, **d.** Este paso no se hace en la metodología base, **e.** Se usaron los antibióticos estreptomycinina 0.4% y kanamicina 0.2% en lugar de estreptomycinina 0,2% y gentamicina 0.1%, **f.** Se cronometraron 15 min de agitación en lugar de 20 min, **g.** Este paso no se hace en la metodología base.

5.4.2. Criopreservación de esporas

Se seleccionaron entre 400 y 500 esporas de cada especie HFMA para la criopreservación. La metodología se basó en la reportada por Declerck y Angelo-Van Coppenolle (2000) con modificaciones. En cámara de flujo laminar, se tomaron las esporas desde el tubo Eppendorf con una micropipeta de 1000 μ L y se colocaron en una caja de Petri estéril. Luego, se adicionó alrededor de 10 mL de alginato de sodio (20 g/L) estéril (121 °C, 15 min) para sumergir las esporas. Mediante estereomicroscopio se realizó la separación de las esporas en grupos de 10, 20 ó 30. Con pipeta de 1000 μ L, se tomaron los grupos individuales de esporas y se realizó el goteo de éstas en una solución de CaCl₂ estéril a una distancia de 10 cm. Luego de realizar el goteo, las perlas de alginato se mantuvieron en la solución de CaCl₂ en agitación suave durante 30 min. Pasado este tiempo, las perlas de alginato se dejaron secar en una caja Petri con papel filtro estéril a 15 °C, toda la noche. Ya secas las perlas, fueron transferidas a una solución de trehalosa 0.5 M y se incubaron durante 24 h a 4°C. Como último paso, las perlas de alginato se transfirieron a crioviales y se almacenaron a -70 °C.

5.5. Multiplicación y mantenimiento de raíces de *C. intybus*

El traspaso de las raíces se realizó en medio de cultivo MSR según Strullu y Romand (1986). En cámara de flujo laminar se hizo la limpieza de todas las superficies con etanol al 70%, así como de todo el material que ingresó a la cámara y los medios de cultivo. Todo dentro de la cámara se sometió a esterilización bajo luz UV por 20 min. Luego de esto, se flameó el escalpelo y las pinzas, estando enjuagados con etanol al 95% y de una de las cajas se cortó la

sección de raíces que estuvieran finas, ramificadas y de color blanco. El fragmento de raíz que se tomó fue puesto en el centro de la caja de Petri presionando suavemente la raíz, tratando de que quedara en íntimo contacto con el medio y con cuidado de no maltratar el tejido meristemático (**Figura 3**). De cada caja de Petri se iniciaron 4 nuevos cultivos de raíces y cada 3 semanas se realizó la transferencia a nuevo medio de cultivo.



Figura 3 Foto representativa del paso de una raíz de achicoria a un nuevo medio de cultivo MSR.

5.6. Prueba de germinación de esporas en 12 medios de cultivo

5.6.1. Diseño del medio de cultivo

Se planteó como medio de cultivo basal el medio MSR, el cual es un medio ampliamente usado para el cultivo *in vitro* de HFMA (Fortin *et al.*, 2002). A partir de los componentes y concentraciones iniciales del medio MSR, se propuso adicionar dos componentes (compuestos secundarios de plantas) al medio de cultivo, una fuente de flavonol (quercetina o biochanin A) y un análogo de estrigolactona (1-metil-2-oxindol o ácido indol propiónico), y adicionar glucosa como otra fuente de

carbono (inicialmente el medio usa sacarosa). Además, se evaluó un licuado de raíz de zanahoria (*D. carota*) en lugar de los compuestos secundarios. Basado en esto, se idearon 12 medios de cultivo con variación en las concentraciones de los anteriores componentes (**Tabla 1**).

Reactivo	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
Medio base	MSR											
Glucosa (g)	8.28										4.14	12.43
Quercetina (µM)	5	1	-	-	2.5	2.5	2.5	2.5	-	-	2.5	2.5
Biochanin A (µM)	-	-	5	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Metil oxindol (nM)	2.5	2.5	2.5	2.5	5	1	-	-	-	-	2.5	2.5
Ác. indol propiónico (nM)	-	-	-	-	-	-	5	1	-	-	-	-
Licuado de raíz (zanahoria)	-	-	-	-	-	-	-	-	1%	0.60%	-	-

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo planteados. M = medio. Se evaluaron 12 medios. Se usó como control positivo el medio MSR y como un segundo control el medio Phytigel agua (no mostrado en la tabla, composición: 3 g/L de Phytigel).

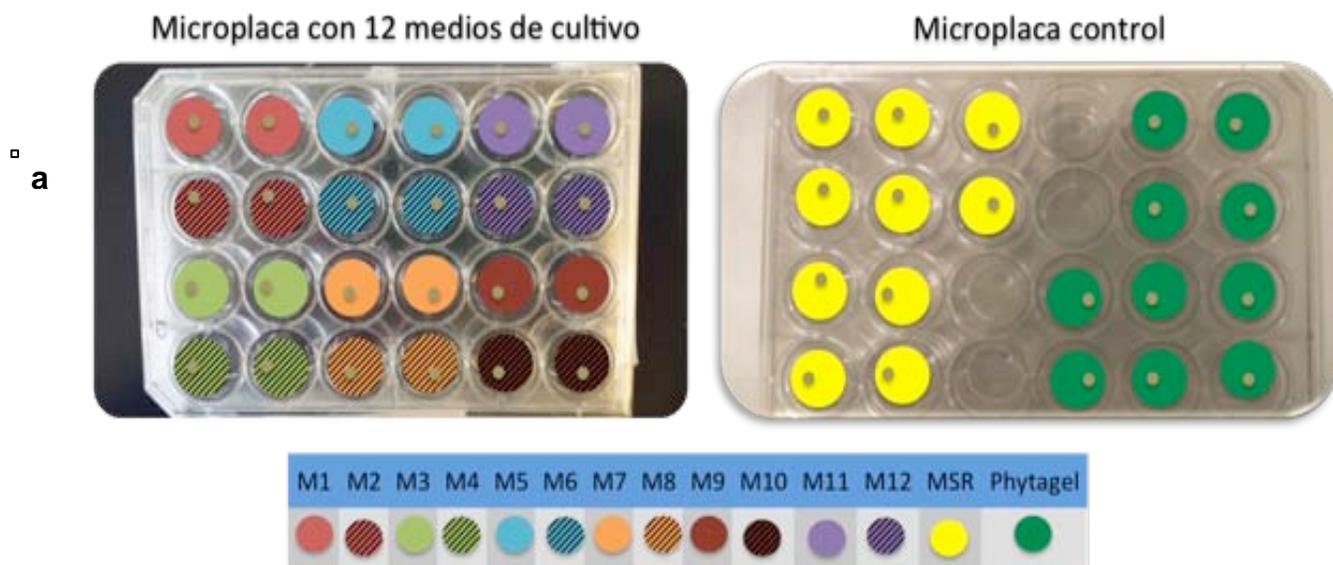
5.6.2. Obtención del licuado de raíz

Se licuaron tres zanahorias (*D. carota*) en 300 mL de agua destilada estéril. Luego de esto, se distribuyó el licuado en tubos de 30 mL y se centrifugó a 15,000 revoluciones (Centrifuga refrigerada de súper alta velocidad Thermo Scientific™ Sorvall™ LYNX 6000, rotor de ángulo fijo Fiberlite™ F21-8 x 50y, USA) por 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se pasó por varios filtros de 100 µm, 50 µm y 25 µm, finalmente se esterilizó con un filtro de 0.22 µm. El extracto se almacenó a -20 °C en alícuotas de 10 mL en Falcon de 15 mL.

5.6.3. Evaluación de la germinación y la longitud hifal de esporas de HFMA

Se evaluó el porcentaje de germinación y la longitud hifal, de 5 especies de HFMA (*F. mosseae* UK115, *C. etunicatum* NE102, *G. rosea* FL105, *G. margarita* WV205A y *R. intraradices* UT126) en 12 medios de cultivo diferentes (tratamientos). Empleando una microplaca de 24 pozos (Multiwell Tissue Culture Plate FALCON

3047), se evaluaron los 12 medios de cultivo. Se colocó 1 mL de cada medio de cultivo por pozo, de tal forma que cada microplaca tenía dos pozos por medio de cultivo (ver **Figura 4a**). Cada tratamiento tuvo 10 repeticiones (5 microplacas). Se sembró una espora de HFMA por pozo. Las esporas se seleccionaron bajo el estéreo-microscopio procurando que fueran de color blanco, crema o amarillas, sin colapso aparente de la pared y que su tamaño fuera similar (Ver **Figura 4b**). Como control se utilizó una microplaca adicional con 10 pozos conteniendo medio MSR (Medio 13, ausente de flavonoles, análogos de estrigolactonas y glucosa) y 10 pozos conteniendo Phytigel-agua, (Medio 14 -M14-, Sigma-Aldrich, USA). La Incubación se realizó a 27°C, a una concentración constante de CO₂ al 2%; en ambiente oscuro. El periodo experimental fue de 30 días. Las variables respuesta fueron la longitud hifal y el porcentaje germinación. La toma de datos se realizó mediante análisis de imágenes bajo un microscopio invertido Olympus IX51 y el programa de análisis de imágenes FIJI (basado en ImageJ).



□
b

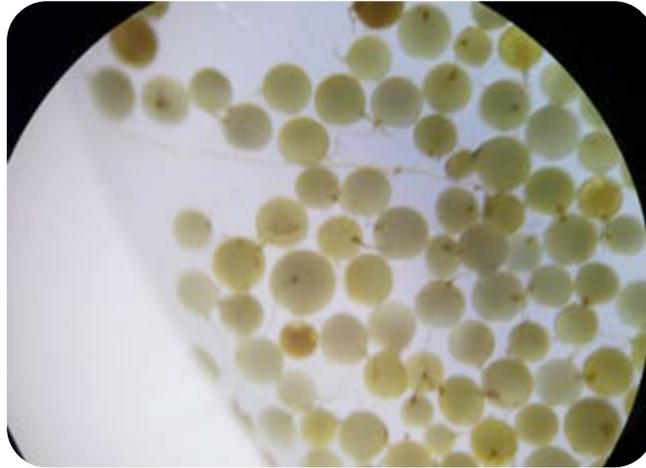


Figura 4. Esquema del diseño experimental de la fase 1 **a.** En cada pozo se sembró 1 mL de medio. Cada color indica un medio de cultivo diferente y los círculos que presentan rayas diagonales indican un cambio en la concentración del flavonol o de la estrigolactona (**ver tabla 1**). **b.** Fotografía del estado de las esporas de *G. margarita* WV205A para el montaje experimental.

5.7. Prueba de desarrollo micelial en presencia/ausencia de raíces de *Cichorium intybus*

Se seleccionaron los dos medios de cultivo que presentaron una mayor longitud hifal para *G. margarita* WV205A (medios M1 y M2 como se explicará en resultados y discusión). A partir de estos se llevó a cabo la evaluación del desarrollo micelial empleando cajas de Petri de dos compartimentos y se usaron 9 tratamientos. (ver **Tabla 2**).

Para el tratamiento I (usando el medio M1) el compartimento proximal se llenó con 25 mL del medio de cultivo enriquecido M1 mientras que el otro compartimento distal se llenó con 15 mL de medio de cultivo basal MSR sin sacarosa (MSRSS) (**Tabla 2**). Luego de la solidificación de los medios, se inclinó la caja de Petri con el fin de generar una pendiente hacia el compartimento proximal y se puso 1 mL de medio MSRSS en el compartimento distal (basado en St-Arnaud *et al.*, 1996; Pfeffer *et al.*, 1999). En el compartimento distal se depositaron 5 esporas de *G. margarita* WV205A a una distancia de 1 cm entre ellas y en el proximal se ubicó la raíz de *C. intybus*, tratando de que tuviera 4 cm \pm 1 de longitud. Para los demás tratamientos los medios se adicionaron de la misma forma (**Figura 4**).

Presencia de raíz			Ausencia de raíz		
Tratamiento	Proximal (25 mL)	Distal (15 mL)	Tratamiento	Proximal (25 mL)	Distal (15 mL)
I	M1	MSRSS	I'	M1	MSRSS
II	M1	MSR	II'	M1	MSR
III	M1SS	MSRSS	III'	M1SS	MSRSS
C+	MSR	MSRSS	C-1	MSR	MSRSS
			C-2	MSRSS	MSRSS

Tabla 2. Planteamiento de tratamientos para la evaluación del efecto en el desarrollo micelar. M1= medio 1 (Medio MSR + quercetina 5 μ M + metil oxindole 2.5 nM + glucosa 8.2 g/L), MSR=medio Modificado Strullu-Romand, MSRSS= medio MSR sin sacarosa, M1SS= medio M1 sin sacarosa. Tratamientos I,II,III y C+ (control positivo) se realizaron en presencia de raíz. Tratamientos I',II',III', C-1 y C-2 (control 1 y 2) se realizaron en ausencia de raíz.

Las cajas de Petri se incubaron en posición invertida a una concentración constante de CO₂ al 2% en oscuridad, con 27 °C. El periodo experimental fue de 71 días (los datos se tomaron los días 3, 6, 10, 13, 17, 30 y 71). Las variables respuesta fueron longitud hifal, número de agrupaciones de células auxiliares, porcentaje de germinación y número de ramificaciones hifales. Cada caja de Petri tuvo seis replicas, considerando cada caja de Petri como una unidad experimental. Este procedimiento se realizó de igual forma para el medio de cultivo el M2. El experimento completo se realizó por duplicado con dos lotes diferentes de esporas provenientes del INVAM.

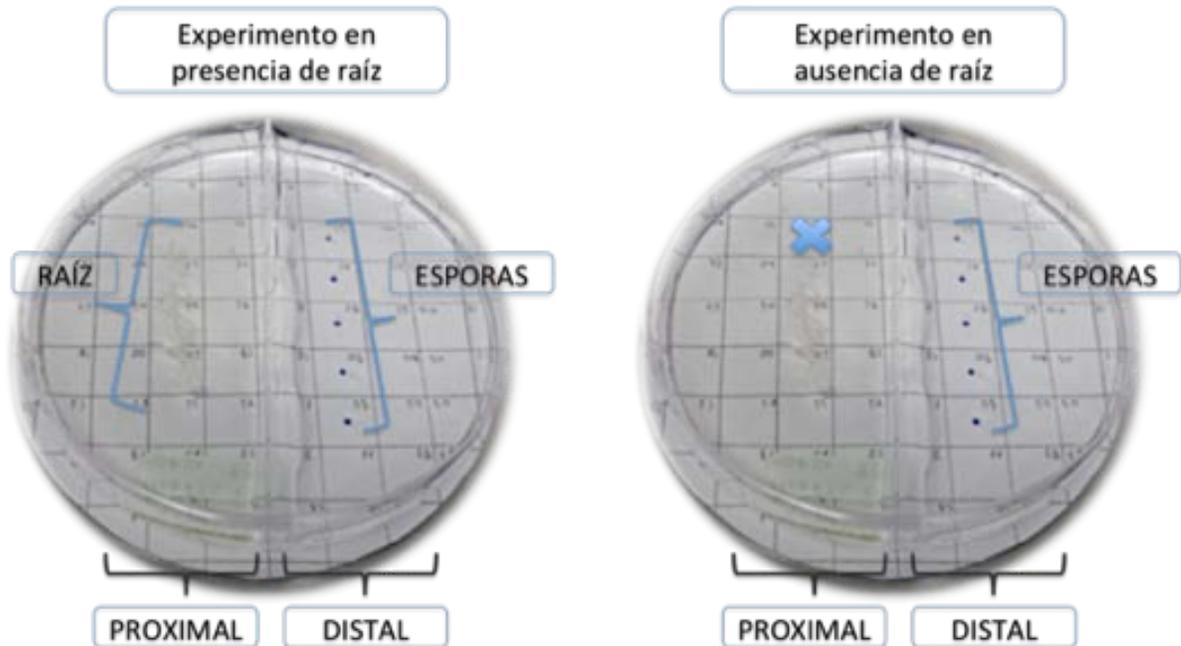


Figura 5. Esquema del experimento de la fase 2.

5.8. Análisis estadístico

El experimento de la fase 1 tuvo un diseño experimental unifactorial (medio de cultivo), donde se consideraron 14 tratamientos y 10 repeticiones para cada uno de los tratamientos. Las variables respuesta fueron el porcentaje de germinación de las esporas y la longitud hifal del tubo germinativo. Los datos obtenidos se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA, distribución F) y una prueba de Tukey (P -valor < 0.05). Los datos recolectados se analizaron mediante el paquete estadístico GraphPad Prism 6.0 y se expresan como media \pm desviación estándar.

El experimento de la fase 2 tuvo un diseño experimental unifactorial (presencia/ausencia de raíz de *C. intybus*), donde se consideraron 9 tratamientos y 6 repeticiones para cada uno de los tratamientos. Las variables respuesta fueron el porcentaje de germinación de las esporas, la longitud hifal del tubo germinativo, el número de eventos de ramificación y el número de agrupaciones de células auxiliares. Los datos resultantes se evaluaron mediante un análisis de varianza

(ANOVA, distribución F) y una prueba de Tukey (P-valor < 0.05). Este experimento completo se realizó dos veces (dos réplicas) y con esporas de lotes diferentes provenientes del INVAM. Los datos recolectados se analizaron mediante el paquete estadístico GraphPad Prism versión 6.0 y se expresan como Media \pm Desviación Estándar. Los valores expresados en este texto para la discusión, hacen referencia al primer experimento de la fase 2, no a su réplica (fase 2 Rep.). Los resultados obtenidos en la réplica no presentaron variación con respecto al primer experimento (**Anexos**).

6. RESULTADOS

6.1. Efecto de los 12 medios de cultivo planteados sobre la germinación y longitud hifal de esporas de las 5 especies HFMA

Durante el experimento de la fase 1 (**Sección 5.8**), el porcentaje de germinación de las esporas fue significativamente mayor ($F = 41.84$, $P < 0.0001$) en *G. margarita* WV205A, con respecto a *F. mosseae* UK115, *C. etunicatum* NE102, *G. rosea* FL105 y *R. intraradices* UT126. Los medios en los que *G. margarita* WV205A presentó un mayor porcentaje de germinación fueron el medio M1 y M2 ($88.9 \pm 0.33\%$ y $87.5 \pm 0.35\%$, respectivamente) (**Tabla 3**). Además de esto, se encontró que las esporas que crecían en estos dos medios (M1 y M2) presentaban mayores longitudes hifales con respecto a los otros medios (**Tabla 3**).

6.2. Porcentaje de contaminación en los medios de cultivo planteados

Durante el experimento de la fase 1 (**Sección 5.8**), el proceso de descontaminación empleado permitió obtener valores bajos de porcentaje de contaminación de esporas de *C. etunicatum* NE102, *R. intraradices* UT126, *G. rosea* FL105, y *G. margarita* WV205A ($0 \pm 0\%$, $0.7 \pm 1.7\%$, $4.2 \pm 4.5\%$ y $2.8 \pm 3.4\%$, respectivamente). El máximo porcentaje de contaminación se presentó en las esporas de *F. mosseae* UK115 con un valor de 22.2% (**Figura 6**).

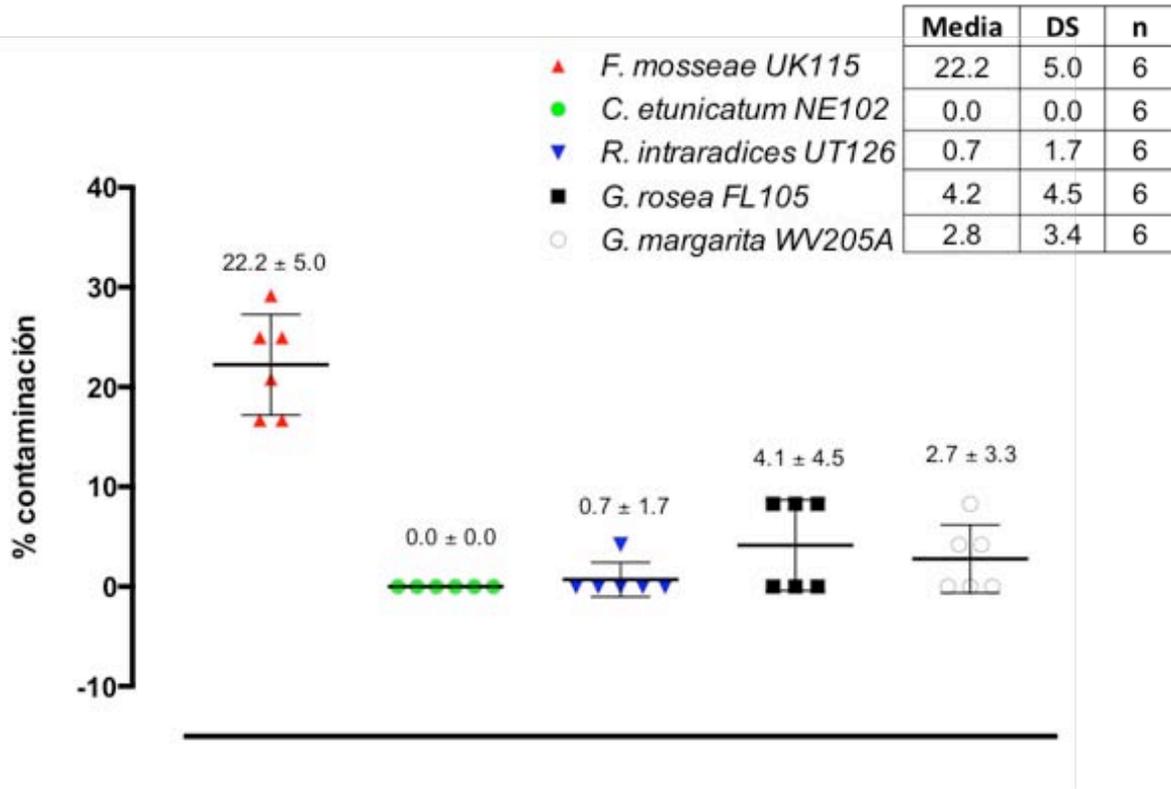


Figura 6. Porcentaje de contaminación de *F. mosseae* UK 115, *C. etunicatum* NE 102, *R. intraradices* UT126, *G. rosea* FL 105 y *G. margarita* WV205A. DS = Desviación estándar, n = unidad experimental.

6.3. Desarrollo micelial de esporas de *G. margarita* WV205A en presencia/ausencia de raíz

Durante el experimento de la fase 2 (**sección 5.12**), se determinó el desarrollo micelial de *G. margarita* WV205A mediante la evaluación de las variables respuesta longitud hifal, porcentaje de germinación, número de agrupaciones de células auxiliares y número de agrupaciones de células auxiliares. Asimismo, el experimento se realizó por duplicado sin tener diferencias en los resultados de cada experimento (**anexos**).

Medio de cultivo	Germinación (%)										Longitud del tubo germinativo (mm)				
	G. rosea		G. margarita		F. mosseae		C. etunicatum		R. intraradices		G. rosea	G. margarita	F. mosseae	C. etunicatum	R. intraradices
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS					
M1	12.50	0.35	88.89	0.33	60.00	0.55	12.50	0.35	16.67	0.41	4.6	425.6	1.3	1.6	0.3
M2	22.22	0.44	87.50	0.35	25.00	0.50	22.22	0.44	14.29	0.38	3.1	376.8	1.3	0.2	0.2
M3	14.29	0.38	77.78	0.44	40.00	0.55	11.11	0.33	16.67	0.41	3.1	97.4	1.0	1.2	0.3
M4	25.00	0.46	77.78	0.44	75.00	0.50	10.00	0.32	14.29	0.38	5.7	71.0	0.4	1.3	0.4
M5	12.50	0.35	80.00	0.30	0.00	0.00	14.29	0.38	11.11	0.33	3.5	108.4	0.0	0.3	0.2
M6	11.11	0.33	70.00	0.48	40.00	0.55	16.67	0.41	11.11	0.33	3.4	136.8	0.3	0.4	0.3
M7	22.22	0.44	66.67	0.50	75.00	0.50	0.00	0.00	16.67	0.41	3.0	130.2	1.4	0.0	0.1
M8	11.11	0.33	66.67	0.50	20.00	0.45	0.00	0.00	11.11	0.33	3.6	121.0	0.7	0.0	0.1
M9	25.00	0.46	80.00	0.42	50.00	0.58	22.22	0.44	0.00	0.00	2.7	133.0	0.4	0.5	0.0
M10	11.11	0.33	80.00	0.42	33.33	0.52	0.00	0.00	0.00	0.00	2.4	133.0	1.3	0.0	0.0
M11	11.11	0.33	55.56	0.53	50.00	0.58	11.11	0.33	0.00	0.00	0.1	106.8	1.0	0.8	0.0
M12	11.11	0.33	33.33	0.50	66.67	0.58	0.00	0.00	22.22	0.44	1.5	102.4	1.2	0.0	1.4
Control	16.67	0.41	40.00	0.52	66.67	0.58	0.00	0.00	16.67	0.41	3.4	198.1	0.9	0.0	0.5
Phytigel	14.29	0.38	30.00	0.48	66.67	0.58	12.50	0.35	16.67	0.41	3.7	166.5	0.7	0.7	0.6

Tabla 3. Valores de longitud y germinación de esporas de *G. rosea* FL105, *G. margarita* WV205A, *R. intraradices* UT126, *F. mosseae* UK115 y *C. etunicatum* NE102. DS = desviación estándar. M1 = Medio 1, M2 = Medio 2, M3 = Medio 3, M4 = Medio 4, M5 = Medio 5, M6 = Medio 6, M7 = Medio 7, M8 = Medio 8, M9 = Medio 9, M10 = Medio 10, M11 = Medio 11, M12 = Medio 12. Incubación durante 30 días a 28 °C con CO₂ al 2%.

6.4. Elongación del tubo germinativo de esporas de *G. margarita* WV205A

Durante el experimento de la fase 2 (**sección 5.12**), para los tratamientos que emplearon el medio M1 ($n = 6$ cajas de Petri = 6 unidades experimentales), se evidenció que no hay diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la longitud hifal entre las esporas del tratamiento I' y I ($F = 1.77$, $P < 0.1$), 84.3 ± 3 mm y 84.6 ± 2 mm, respectivamente (**Figura 7a**). Asimismo su comparación con el CONTROL POSITIVO no mostró diferencias significativas ($F = 1.77$, $P < 0.1$) (87 ± 1 mm), equiparando las longitudes hifales en los tratamientos (**Figura 7a**). Por otro lado, la longitud hifal lograda usando el medio M2 tuvo diferencias significativas ($F = 71.9$, $P < 0.0001$), siendo más baja la desarrollada en I (67.3 ± 13 mm) contrastado con el CONTROL POSITIVO (87 ± 1 mm). Igualmente, los demás tratamientos presentaron valores de longitud hifal significativamente más bajos ($F = 71.9$, $P < 0.0001$) en comparación al CONTROL POSITIVO (**Figura 7b**).

6.5. Germinación de las esporas de *G. margarita* WV205A

Durante el experimento de la fase 2 (**sección 5.1.22**), en presencia del medio M1, para los tratamientos I y I', los valores del porcentaje de germinación de esporas ($n = 6$ cajas de Petri = 6 unidades experimentales) fueron de 70 ± 10 % y 93 ± 10 %, respectivamente. El porcentaje de germinación generado en I' fue superior a todos los demás tratamientos, evidenciando diferencias estadísticamente significativas ($F = 10.48$, $P < 0.0002$) con respecto al CONTROL POSITIVO (63 ± 15 %). Cabe destacar que la implementación del tratamiento I, a pesar de no tener diferencias con el CONTROL POSITIVO, reveló un porcentaje de germinación ligeramente mayor (**Figura 8b**). En comparación con los valores obtenidos en los tratamientos usando el medio M2, ninguno de los tratamientos presentó diferencias estadísticamente significativas ($F = 1.8$, $P < 0.13$) con respecto al CONTROL POSITIVO (**Figura 8c**).

Por otro lado, al realizar la cinética de germinación en el medio M1 durante los 71 días de cultivo, se evidenció una germinación del 20% a partir del tercer día de incubación, caracterizada por una fase de crecimiento rápida, seguida de una fase estacionaria hasta el día 71 (**Figura 8a**).

6.6. Ramificación de las esporas de *G. margarita* WV205A

Durante el experimento de la fase 2 (**sección 5.1.22**), el número de ramificaciones hifales ($n = 6$ cajas de Petri = 6 unidades experimentales) fue significativamente superior ($F = 48.5$, $P < 0.0001$) en el tratamiento I' (55 ± 7) empleando el medio de cultivo M1. Asimismo, se evidenció el efecto del incremento en la ramificación, por parte de los componentes de este medio en el tratamiento I (32 ± 8) con respecto al CONTROL POSITIVO (16 ± 4) (**Figura 9a**). Con respecto al medio M2, ninguno de los tratamientos presentó diferencias estadísticamente significativas ($F = 1.7$, $P < 0.15$) comparados con el CONTROL POSITIVO, alcanzando valores de ramificación cercanos a este tratamiento (**Figura 9b**).

6.7. Generación de células auxiliares a partir de las esporas de *G. margarita* WV205A

Durante el experimento de la fase 2 (**sección 5.1.22**), se determinó el número de agrupaciones de células auxiliares presentes en cada caja de Petri (unidad experimental). De acuerdo a los valores obtenidos usando el medio M1 con el tratamiento I', se evidenció un aumento estadísticamente significativo ($F = 126.8$, $P < 0.0001$) en la generación de este tipo de estructuras (14 ± 2) con respecto al mismo tratamiento en presencia de raíz I (9 ± 1) y el CONTROL POSITIVO (8 ± 1) (**Figura 10a**). Caso contrario se vio en los valores de los tratamientos evaluados con el medio M2, donde no se presentaron valores superiores al control, teniendo diferencias estadísticamente significativas ($F = 30.7$, $P < 0.0001$) (**Figura 10b**).

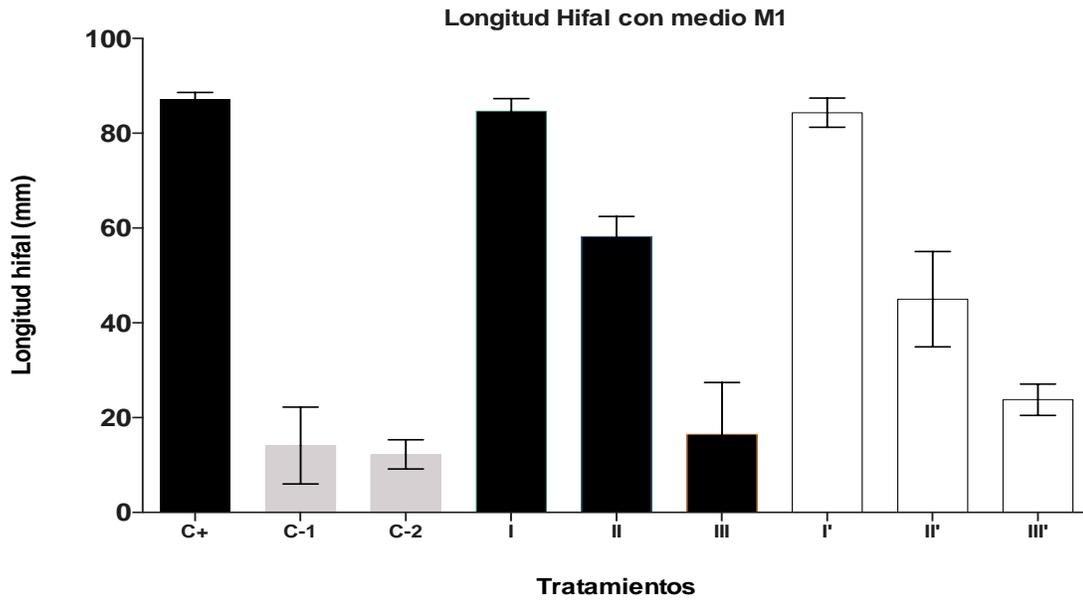
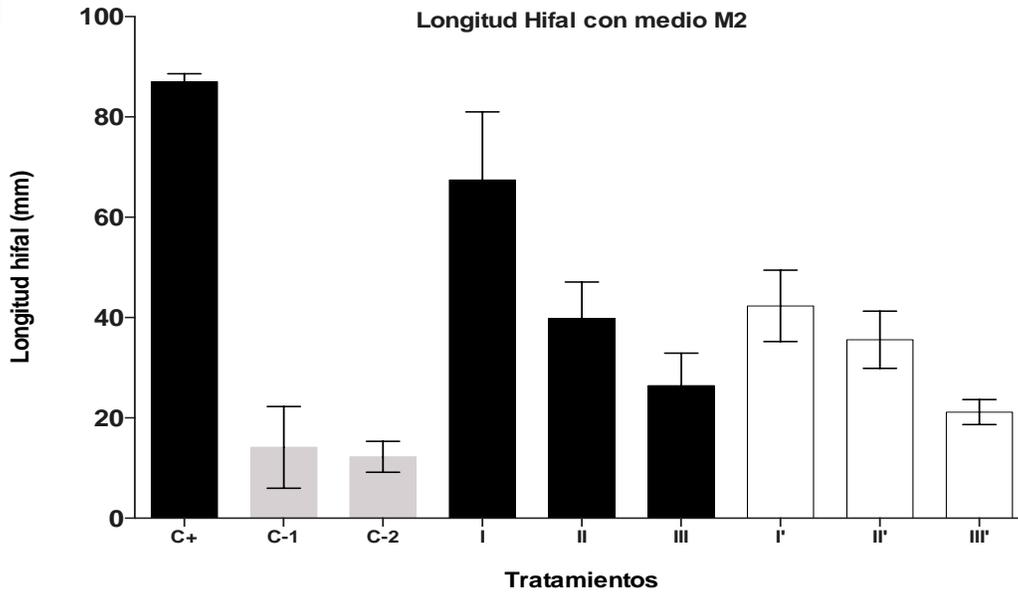
a**b**

Figura 7. Longitudes hifales de *G. margarita* usando el medio M1 (a) y M2 (b). Tratamiento CONTROL POSITIVO (C+) = MSR/MSRSS, Tratamiento I = M1/MSRSS, Tratamiento II = M1/MSR, Tratamiento III = M1SS/MSRSS, Tratamiento C-1 = MSR/MSRSS, Tratamiento C-2 = MSRSS/MSRSS Tratamiento I' = M1/MSRSS, Tratamiento II' = M1/MSR, Tratamiento III' = M1SS/MSRSS. Columnas negras = presencia de raíz, columnas blancas y grises = ausencia de raíz. El análisis estadístico se realizó con prueba de Tukey ($p < 0.05$).

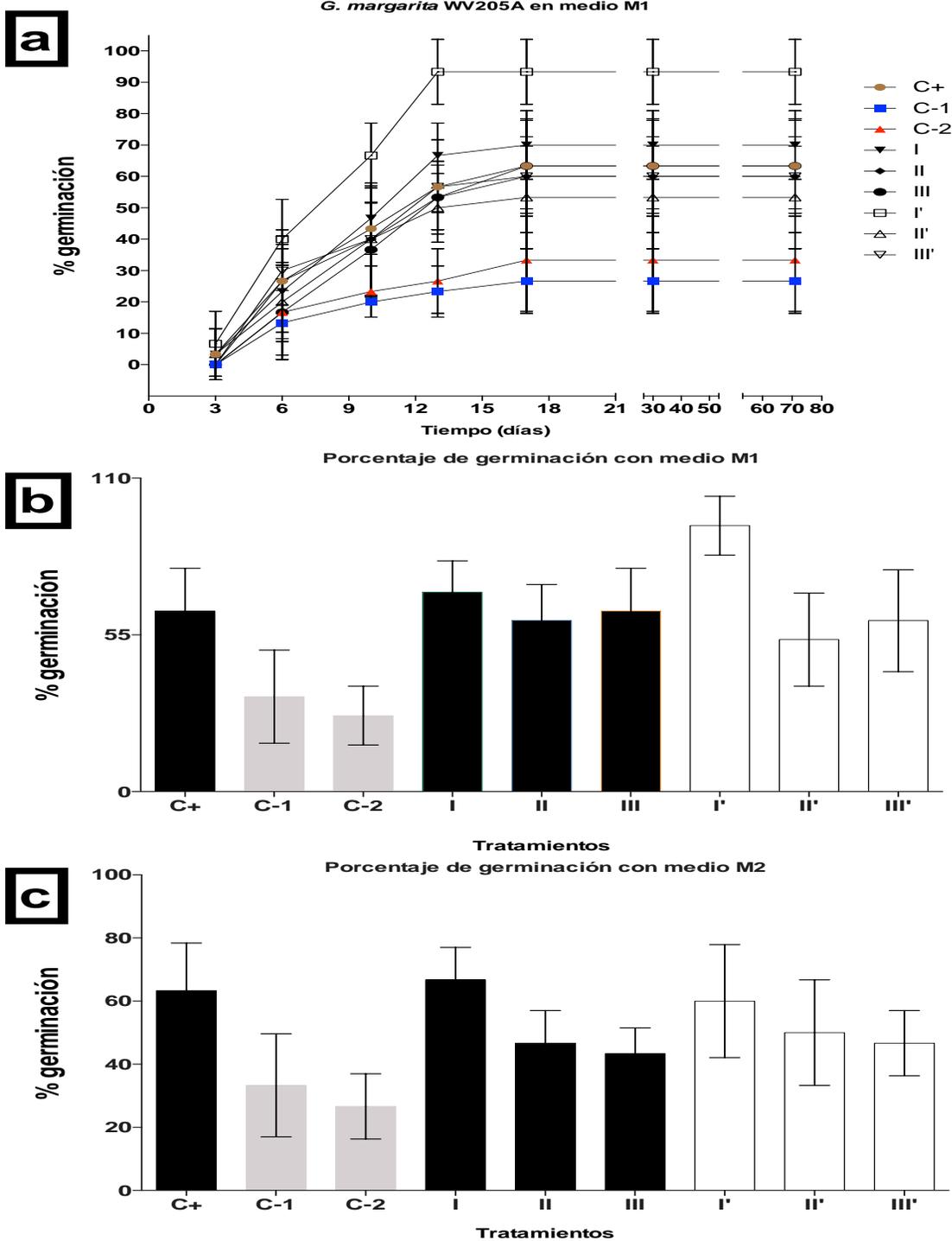


Figura 8. Cinética del porcentaje de germinación (a) de *G. margarita* con respecto a cada tratamiento durante 71 días de incubación. La gráfica del comportamiento cinético ilustra la evolución en el porcentaje de germinación en una réplica experimental. El porcentaje de germinación de *G. margarita* usando el medio M1 (b) y M2 (c). Tratamiento CONTROL POSITIVO (C+) = MSR/MSRSS, Tratamiento I = M1/MSRSS, Tratamiento II = M1/MSR, Tratamiento III = M1SS/MSRSS, Tratamiento C-1 = MSR/MSRSS, Tratamiento C-2 = MSRSS/MSRSS Tratamiento I' = M1/MSRSS, Tratamiento II' = M1/MSR, Tratamiento III' = M1SS/MSRSS. Columnas negras = presencia de raíz, columnas blancas y grises = ausencia de raíz. El análisis estadístico se realizó con prueba de Tukey ($p < 0.05$).

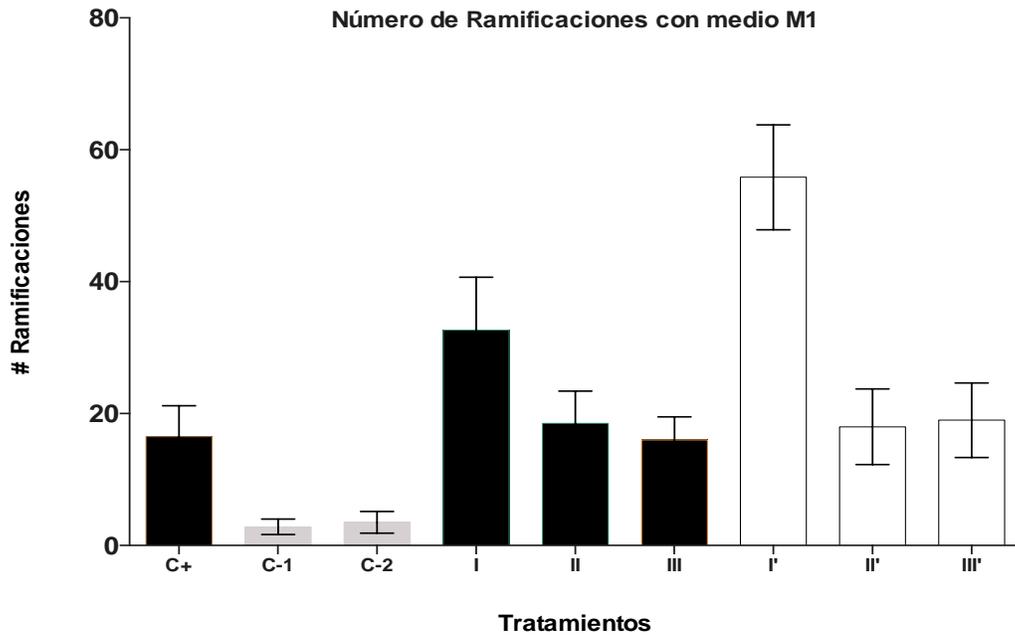
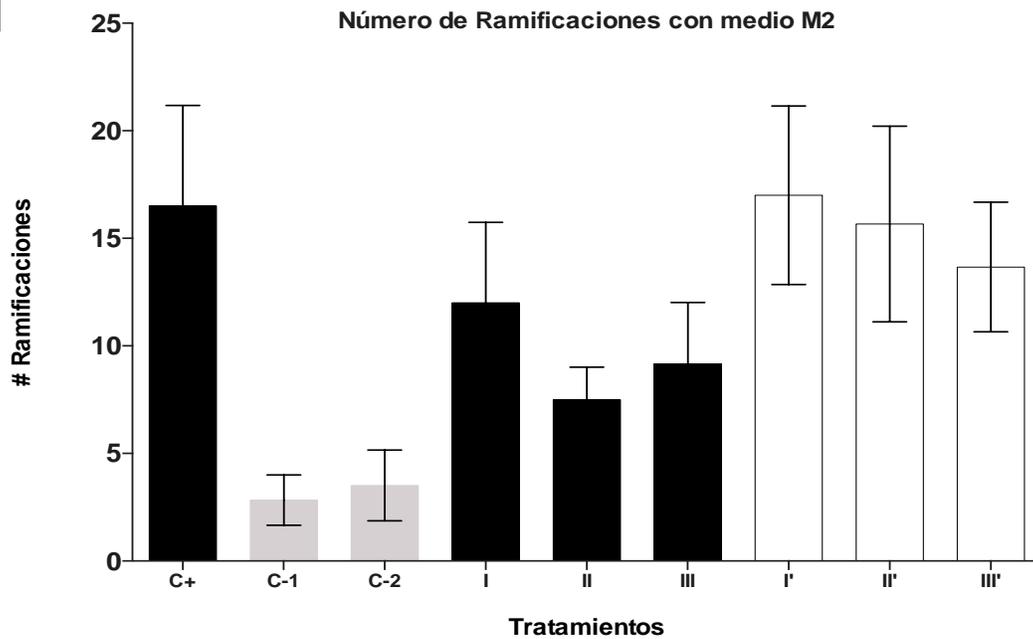
a**b**

Figura 9. Número de Ramificaciones Hifales de *G. margarita* usando el medio M1 (a) y M2 (b). Tratamiento CONTROL POSITIVO (C+) = MSR/MSRSS, Tratamiento I = M1/MSRSS, Tratamiento II = M1/MSR, Tratamiento III = M1SS/MSRSS, Tratamiento C-1 = MSR/MSRSS, Tratamiento C-2 = MSRSS/MSRSS Tratamiento I' = M1/MSRSS, Tratamiento II' = M1/MSR, Tratamiento III' = M1SS/MSRSS. Columnas negras = presencia de raíz, columnas blancas y grises = ausencia de raíz. El análisis estadístico se realizó con prueba de Tukey ($p < 0.05$).

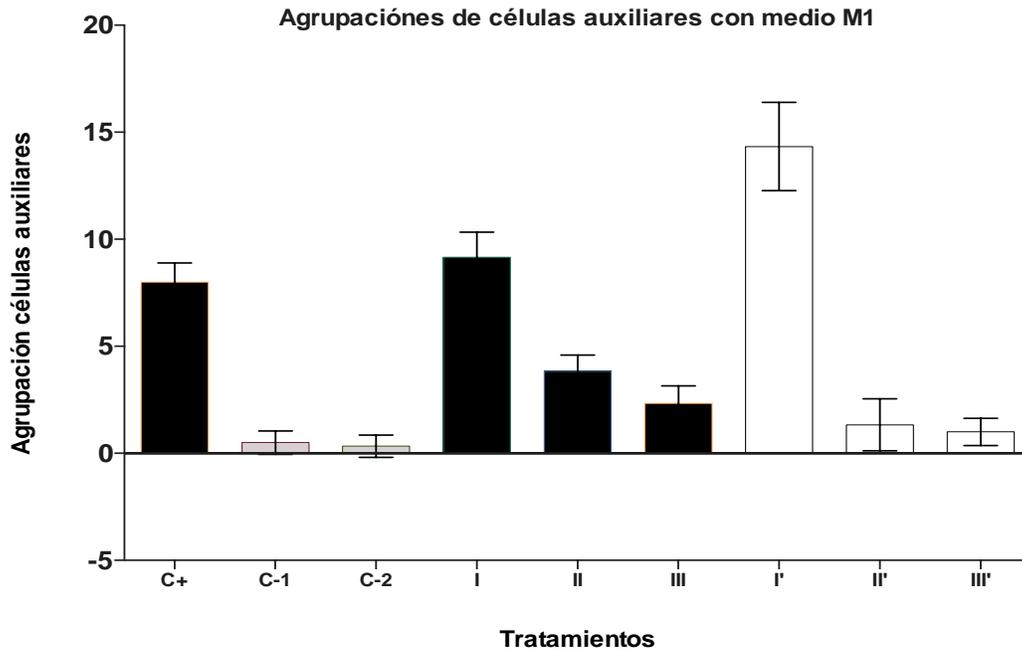
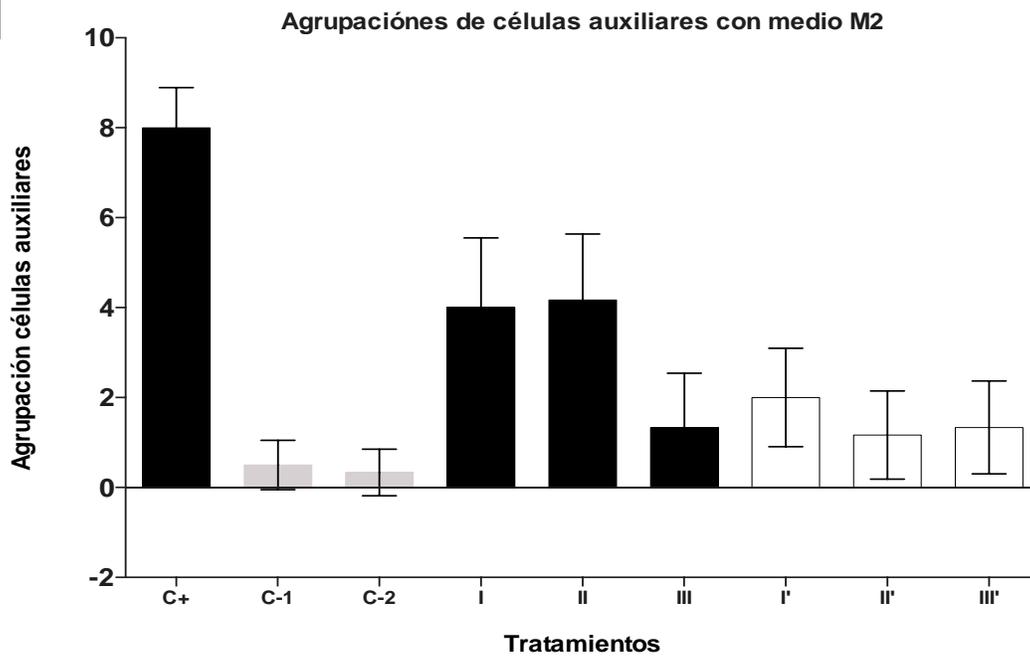
a**b**

Figura 10. Número de Agrupaciones de Células Auxiliares de *G. margarita* usando el medio M1 (a) y M2 (b). Tratamiento CONTROL POSITIVO (c+) = MSR/MSRSS, Tratamiento I = M1/MSRSS, Tratamiento II = M1/MSR, Tratamiento III = M1SS/MSRSS, Tratamiento C-1 = MSR/MSRSS, Tratamiento C-2 = MSRSS/MSRSS Tratamiento I' = M1/MSRSS, Tratamiento II' = M1/MSR, Tratamiento III' = M1SS/MSRSS. Columnas negras = presencia de raíz, columnas blancas y grises = ausencia de raíz. El análisis estadístico se realizó con prueba de Tukey ($p < 0.05$).

7. DISCUSIÓN

7.1. Efecto de los 12 medios de cultivo en la germinación y longitud hifal de las 5 especies de HFMA

En el experimento de la fase 1 (**Sección 5.8**), la germinación de las esporas se vio afectada por los medios de cultivo, siendo *G. margarita* WV205A el HFMA que tuvo una mayor germinación en comparación con los demás HFMA (**Tabla 3**). Se ha visto que *G. margarita* puede germinar en condiciones ambientales adversas, esto debido a la gran cantidad de energía que puede acumular la espora en su interior y que le permite tener múltiples germinaciones y mayor desarrollo micelial en el momento en que se encuentra buscando un hospedero (Souza *et al.*, 2005). Dado que, cultivar a los HFMA a nivel *in vitro* es retarlos a un ambiente al que no están acostumbrados, su desarrollo en el medio de cultivo se va a ver limitado tanto por la composición de medio (Hepper y Jakobsen, 1983; Hepper, 1984, 1987; Azcón-Aguilar *et al.*, 1999), como por la especie de HFMA (Fortin *et al.*, 2002). Para el caso de las otras 4 especies evaluadas su germinación fue inferior a la de *G. margarita* WV205A.

Asimismo, aunque se sabe que la exposición de las esporas de HFMA a exudados provenientes de raíces hospederas estimulan cambios morfológicos del micelio como la germinación, la elongación y la ramificación; no siempre se tiene el mismo efecto, dependiendo de la especie de HFMA, y de la concentración y tipo de compuesto evaluado (Nagahashi y Douds, 1999, 2000; Akiyama *et al.*, 2005, 2010). Para el caso de *C. etunicatum* y *G. rosea* flavonoles como el Miricetin y la quercetina tienen un efecto positivo en el desarrollo hifal, no obstante en *Gigaspora gigantea* presenta un efecto negativo. Para el caso de *F. mosseae* Giovannetti y colaboradores (1996) reportaron una fuerte ramificación hifal de las esporas por influencia de los exudados de albahaca dulce (*Ocimum basilicum*) a bajas concentraciones. No obstante, también se ha observado la inhibición de la germinación de esporas de *G. etunicatum* y *G. macrocarpum* en presencia de la isoflavona Formononetin a concentración de 2.5 μM y un efecto positivo de la quercetina a 2.5 μM (Tsai y Phillips, 1991). Aunque en estos trabajos se han tenido

resultados positivos y algunos negativos con estas especies, en nuestra evaluación experimental el porcentaje de germinación y la longitud hifal de *G. margarita* WV205A fue superior sobre las demás especies presentando diferencias estadísticamente significativa (Tabla 3). A raíz de esto, se optó por evaluar en la fase 2 a *G. margarita* WV205A.

7.2. Efecto de los tratamientos en la longitud hifal de *G. margarita* WV205A

En el experimento de la fase 2 (**sección 5.12**), la longitud hifal de *G. margarita* WV205A en su estado presimbiótico mostró un efecto comparable con el CONTROL POSITIVO en los tratamientos I (Proximal:M1 con raíz/Distal:MSRSS) y I' (Proximal: M1 sin raíz/Distal: MSRSS) (**Figura 7a**). Las concentraciones de los tipos de compuestos implementados en el medio M1 (flavonol: quercetina y un análogo de estrigolactona: metiloxindol) han sido reportadas como compuestos que estimulan el desarrollo del tubo germinativo e incrementan la longitud hifal de las esporas de micorriza arbuscular (Nagahashi y Douds, 1999; Buée *et al.*, 2000, Besserer *et al.*, 2006; Besserer *et al.*, 2008). No obstante, se ha sugerido que a bajas concentraciones su efecto es más importante en el desarrollo hifal del hongo (Baptista y Siqueira, 1994; Akiyama *et al.*, 2010). Para el caso de los flavonoles, el efecto puede ser variable teniendo resultados negativos en el desarrollo hifal (Vierheilig *et al.*, 1998). Datos reportados por Scervino y colaboradores (2009) han mostrado que ciertas flavonas incrementan la longitud hifal en *G. margarita* y la inhiben en *G. rosea*.

La respuesta frente a estos compuestos establece que el aumento en la longitud hifal es estimulado por la presencia de ambos compuestos (flavonol y análogo estrigolactona) no obstante, no es un fenómeno general, ya que depende de la concentración utilizada y de la especie de hongo evaluado (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1989; Tsai y Phillips, 1991; Nair *et al.*, 1991; Chabot *et al.*, 1992; Kape *et al.*, 1992; Poulin *et al.*, 1993; Baptista y Siqueira, 1994; Vierheilig *et al.*, 1998). En nuestro caso, a pesar de la ausencia de raíz en el tratamiento I' usando el medio M1, la longitud hifal que alcanzaron las esporas germinadas fue comparable con el

CONTROL POSITIVO y el tratamiento I (**Figura 7a**). Se han reportado longitudes hifales entre 10 y 26 mm de longitud para especies de *G. margarita* y *G. rosea* después de 14 días de incubación en experimentos llevados a cabo por Scervino y colaboradores (2005), donde las esporas fueron evaluadas con diferentes flavonoides y su efecto en el desarrollo miceliar. Estos resultados contrastan con los nuestros, ya que en ausencia de la raíz el micelio de la espora germinada se desarrolla logrando valores comparables a los tratamientos en presencia de raíz (**figura 7a**). Particularmente tres de los flavonoides (luteolina, crisina y morin) que evaluaron también tuvieron efecto en el número de ramificaciones (10 eventos de ramificación) y la formación de células auxiliares (5 grupos de células auxiliares) en las esporas de *G. margarita* (Scervino *et al.*, 2005).

Por otro lado, y aun cuando las esporas alcanzaron estas longitudes (tratamiento I: 84 ± 2.6 mm, II: 58 ± 4.2 mm, III: 16 ± 10 mm, I': 84 ± 3 mm, II': 45 ± 10 mm, III': 23 ± 3.3 mm, CONTROL POSITIVO: 87 ± 1.5 mm, C-1: 14 ± 8 mm y C-2: 12 ± 3 mm) usando el medio M1, la septación del micelio se observó en algunas partes usando el tratamiento I', teniendo solo algunas zonas de su micelio con actividad citoplasmática. Esto fue evidente al observarse movimiento del transporte celular, luego del periodo de incubación. Esta actividad indicaría un estado latente con retracción gradual del citoplasma, diferente a lo ocurrido en los otros tratamientos donde la septación del micelio fue generalizada aun en los tratamientos donde estaba presente la raíz (**Figura 11 y 12**). Dado que la raíz necesita de la presencia de sacarosa para su metabolismo, ésta se convierte en otro factor que afecta la longitud hifal del HFMA. Estudios realizados por D'Souza y colaboradores (2013) corroboran esta hipótesis al reportar que altas concentraciones de sacarosa (10 g/L), pueden inhibir el desarrollo de la hifa resultando en una disminución de la longitud hifal en *R. irregularis*. Esto se debe a que la sacarosa actúa prolongando el evento de formación del apresorio, conduciendo a una baja tasa de germinación (Bécard y Fortin, 1988) y reduciendo el desarrollo de la hifa (Carr *et al.*, 1985). Lo que puede estar influenciando la baja tasa de desarrollo miceliar en los tratamientos II (Proximal: M1 con raíz/Distal: MSR) y II' (Proximal: M1 sin

raíz/Distal: MSR), los cuales presentan concentraciones de sacarosa de 10 g/L (sección 5.3 y Tabla 1).

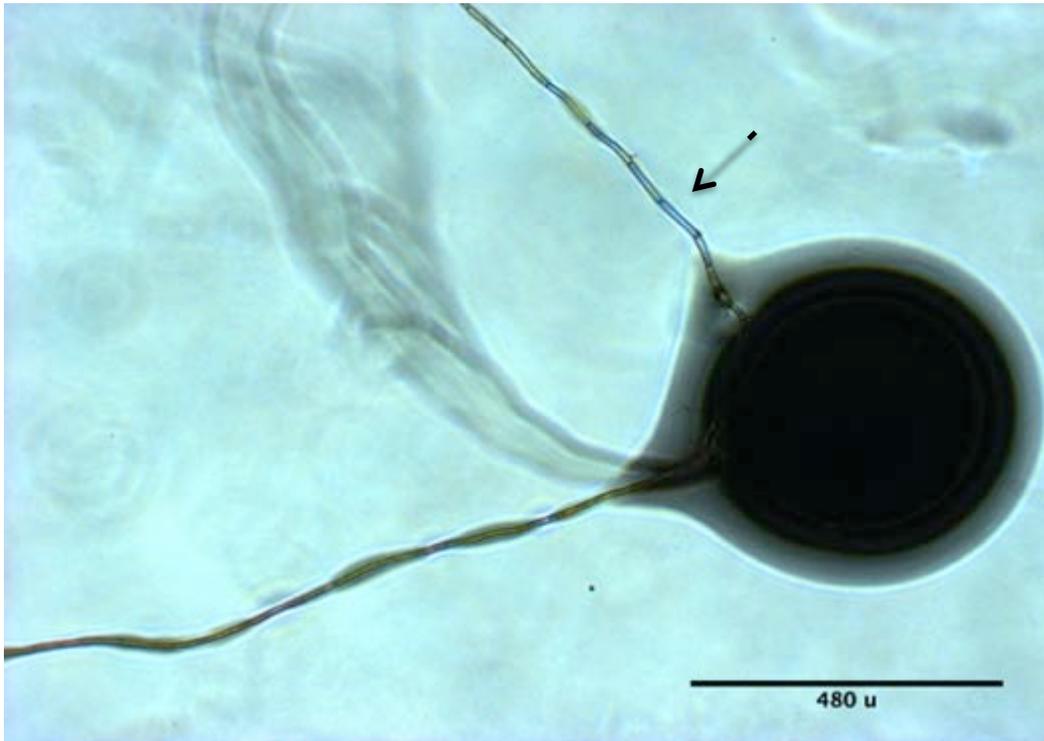


Figura 11. Espora de *G. margarita* en el tratamiento I usando medio M1. La flecha señala los septos en uno de los tubos germinativos.



Figura 12. Hifa germinativa *G. margarita* en el tratamiento MSRFEG/ MSRSS. La flecha señala los septos en la punta de la hifa y la retracción del citoplasma.

En el experimento de la fase 2 (**sección 5.12**), la evaluación del medio de cultivo M2 (Medio MSR + quercetina 2.5 μM + 1-metil-2-oxindol 2.5 nM + glucosa 8.2 g/L) evidenció que existen diferencias estadísticamente significativas de todos los tratamientos con respecto al CONTROL POSITIVO (tratamiento I: 67 ± 13 mm, II: 39 ± 7 mm, III: 26 ± 6 mm, I': 42 ± 7 mm, II': 35 ± 5 mm, III': 21 ± 2.4 mm, CONTROL POSITIVO: 87 ± 1.5 mm, C-1: 14 ± 8 mm y C-2: 12 ± 3 mm), debido a que ninguno alcanzó longitudes hifales cercanas al valor del CONTROL POSITIVO, siendo el valor más alto de longitud el del tratamiento I (**Figura 7b**). Dado que la única diferencia entre el medio M1 y el M2 es la concentración de quercetina suministrada (5 μM y 1 μM , respectivamente), es posible que al ser más baja, no esté teniendo efecto en el estado presimbiótico del hongo. Se ha reportado que la concentración de flavonoles a la que es expuesta una espora, también puede acarrear efectos menos estimulantes en su desarrollo (Souza *et al.*, 2005). Para el caso de la quercetina, se han publicado trabajos que muestran diferentes efectos en el crecimiento hifal, donde algunos autores reportan estímulo positivo en la germinación y desarrollo hifal de esporas de HFMA (Becard *et al.*, 1992; Kape *et al.*, 1992; Bel-Rhlid *et al.*, 1993; Vierheilig *et al.*, 1998), siendo más estimulante en especies de *Gigaspora* que en especies de *Glomus*. Estudios previos han evaluado el efecto de exponer esporas de *G. margarita* a concentraciones de quercetina de 10 μM (Poulin *et al.*, 1993, 1997) con efectos positivos en el desarrollo hifal y con efectos negativos a concentraciones de 50 μM (Baptista y Siqueira, 1994). Para *Glomus etunicatum* y *Glomus macrocarpum* se ha evaluado el efecto de la quercetina en intervalos de concentración entre 1 y 2.5 μM con efectos positivos, no obstante experimentos *in vitro* con *R. intraradices* han demostrado que el crecimiento hifal no se ve afectado por este flavonol (Manthey y Buslig, 1998). Dado esto, la concentración de 5 μM probablemente genera mejor efecto que a bajas concentraciones para nuestras condiciones experimentales.

7.3. Efecto de los tratamientos en el porcentaje de germinación de *G. margarita* WV205A

En el experimento de la fase 2 (**sección 5.12**), el porcentaje de germinación alcanzado por las esporas evaluadas en el medio M1 ($93\pm 10\%$) con el tratamiento

l' (proximal:M1 sin raíz/distal: MSRSS) presentó un valor mayor con respecto a los demás tratamientos (tratamiento I: $70\pm 10\%$, II: $60\pm 12\%$, III: $63\pm 115\%$, II': $53\pm 16\%$, III': $60\pm 17\%$, CONTROL POSITIVO: $63\pm 15\%$, C-1: $33\pm 16\%$ y C-2: $26\pm 10\%$), e incluso con respecto a los tratamientos evaluados con el medio M2 (**Figura 8b y 8c**). Los exudados radicales que genera la raíz se encuentran estrechamente ligados al desarrollo del hongo en estado presimbiótico (Giovannetti *et al.*, 1993; Pinior *et al.*, 1999) y la ramificación hifal es considerada como el evento previo a la colonización de la raíz por parte del HFMA (Giovannetti y Sbrana, 1998). No obstante, algunos compuestos volátiles producidos por la raíz pueden inhibir la germinación y desarrollo hifal del tubo germinativo de la espora bajo condiciones axénicas (El Atrach *et al.*, 1989; Schreiner y Koide, 1993). Un ejemplo de esto es el reportado por Oba y colaboradores (2002) donde habla sobre la inhibición del desarrollo presimbiótico de *G. margarita* generado por exudados radicales de plantas del género *Lupinus*. Esto da una evidencia de la posible inhibición en la germinación debido a la generación de exudados y compuestos volátiles por parte de la raíz, resultado en un efecto variable. Así mismo, la composición del medio puede estar generando un ambiente donde la raíz no esté sintetizando compuestos que estimulen la germinación, de tal forma que ejerza un efecto negativo (Pawlowska *et al.*, 1999).

Con respecto a la cinética del porcentaje de germinación, se evidenció que *G. margarita* WV205A presenta una tasa de germinación acelerada en los primeros 13 días de incubación, siendo estadísticamente significativa en el tratamiento l' en contraste con los demás tratamientos y alcanzando una fase estacionaria de germinación pasados 30 días de incubación. Resultados similares han sido reportados por De Souza y Declerck (2003) para otro miembro de la familia Gigasporaceae, como lo es *Scutellospora reticulata*. En esta especie, la germinación de esporas inició al tercer día de la incubación del cultivo, obteniendo después de un mes un 59% de germinación en medio de cultivo agar-agua. En nuestro caso, transcurrido un mes de cultivo, el porcentaje de germinación obtenido es del $33\pm 16\%$, $63\pm 15\%$ y $93\pm 10\%$, al usar medio MSRSS (MSR sin sacarosa), medio MSR y medio M1, respectivamente. En contraste, nuestros

resultados evidencian un efecto positivo estadísticamente significativo a lo largo de la cinética de crecimiento usando el tratamiento I', con respecto a los demás tratamientos.

7.4. Efecto de los tratamientos en el número de ramificaciones hifales de *G. margarita* WV205A

La ramificación hifal es un proceso que se ha descrito como un evento de reconocimiento ante las señales bioquímicas de la raíz de la planta generadas en forma de exudados (Giovannetti *et al.*, 1996). Nuestros resultados muestran que el número de ramificaciones hifales en el tratamiento I' (usando el medio M1), es significativamente superior a los demás tratamientos e incluso con respecto al CONTROL POSITIVO (**Figura 9a**) cuando se usan concentraciones de quercetina 5 μ M y 1-Metil-2-oxindol 2.5 nM. Esto contrasta con la bibliografía que cita que cuando la espora percibe compuestos como las estrigolactonas o los flavonoles, comienza a generar su hifa germinativa consumiendo una parte de su energía interna para formar pequeñas ramificaciones, induciendo la mitosis en las hifas, aumentando la ramificación y el área de exploración (Nagahashi y Douds, 1999, Buée *et al.*, 2000). No obstante al no tener un contacto directo con la planta, a las pocas semanas la hifa retrae su citoplasma, septando el micelio para iniciar un periodo de latencia y reservar energía para una posterior germinación (Koske, 1981; Beilby y Kidby, 1980).

En nuestro caso, al adicionarle estos compuestos al medio, se estimula la ramificación de la hifa del hongo permitiéndole explorar una mayor superficie en el tratamiento I' y manteniendo esta exploración, sin retraer completamente el citoplasma de todo el micelio, durante 71 días. Este resultado se presentó de igual forma en la réplica de la fase 2 (experimento fase 2 Rep.) Asimismo, esto concuerda con el resultado obtenido en el tratamiento I, usando el medio M1, donde la hifa genera un mayor número de ramificaciones hifales estadísticamente significativas con respecto al CONTROL POSITIVO (**Figura 9a**). Esto hace pensar que en lugar de ocurrir un efecto sinérgico significativo entre los exudados de la raíz y los compuestos adicionados al medio de cultivo, la hifa gastaría energía solo

en crecer y ramificarse escasamente en dirección a la raíz. De esta forma, los compuestos funcionarían como un interruptor metabólico: aumentando la tasa respiración y la actividad mitocondrial, antes de la ramificación (Akiyama *et al.*, 2005; Tamasloukht *et al.*, 2003)

7.5. Efecto de los tratamientos en el número de agrupaciones de células auxiliares de *G. margarita* WV205A

Es de notar que la ocurrencia de eventos de diferenciación fúngica como la formación de células auxiliares (**Figura 13, 14 y 15**) solo se observó en algunos tratamientos tanto del medio M1 como del medio M2, siendo más abundantes en los tratamientos I' (proximal:M1 sin raíz/distal: MSRSS) y I del medio M1 (proximal:M1 con raíz/distal: MSRSS) (**Figura 10a y 10b**). Esto indicaría que bajo las condiciones de cultivo de estos 2 tratamientos, la actividad de diferenciación fúngica se vio más estimulada. La aparición de células auxiliares se ha relacionado con el almacenaje de lípidos, ya que suponen un rol como estructura de reserva de estos compuestos (Pearson y Schweiger, 1993) y una fuente de almacenaje de carbono, el cual es usado para la iniciación y desarrollo de la espora (Pearson y Schweiger, 1994; de Souza y Declerck, 2003, 2005). También se ha hipotetizado sobre su función reproductiva (Pons y Gianinazzi-Pearson, 1985), pero su función celular aún no es muy clara (Bonfante y Bianciotto, 1995).

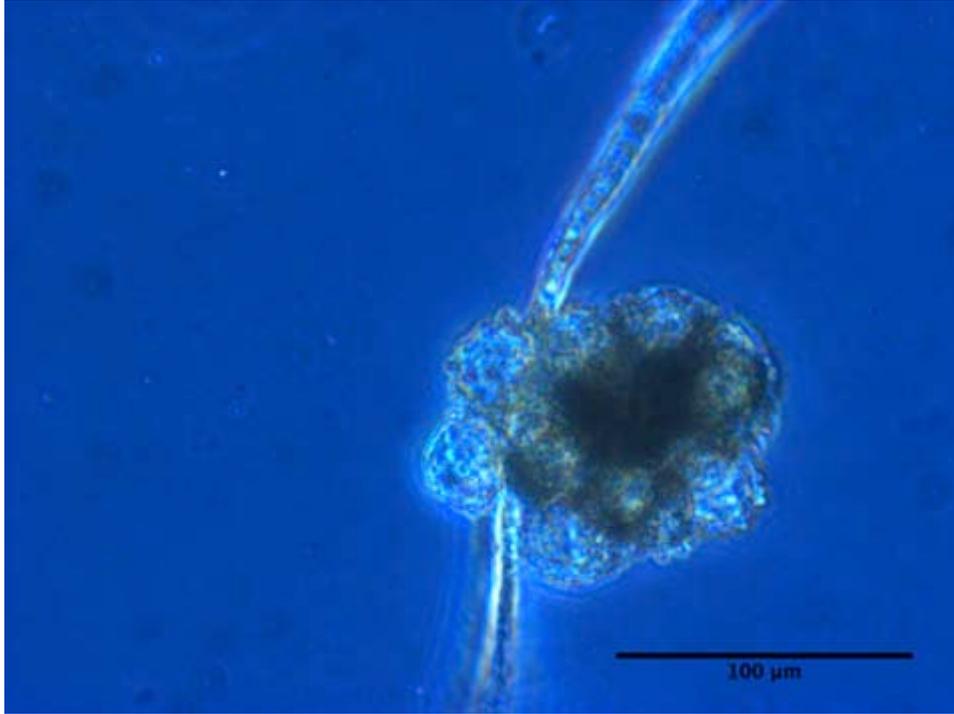


Figura 13. Célula auxiliar de *G. margarita* WV205A en tratamiento I, usando medio M1. 200x

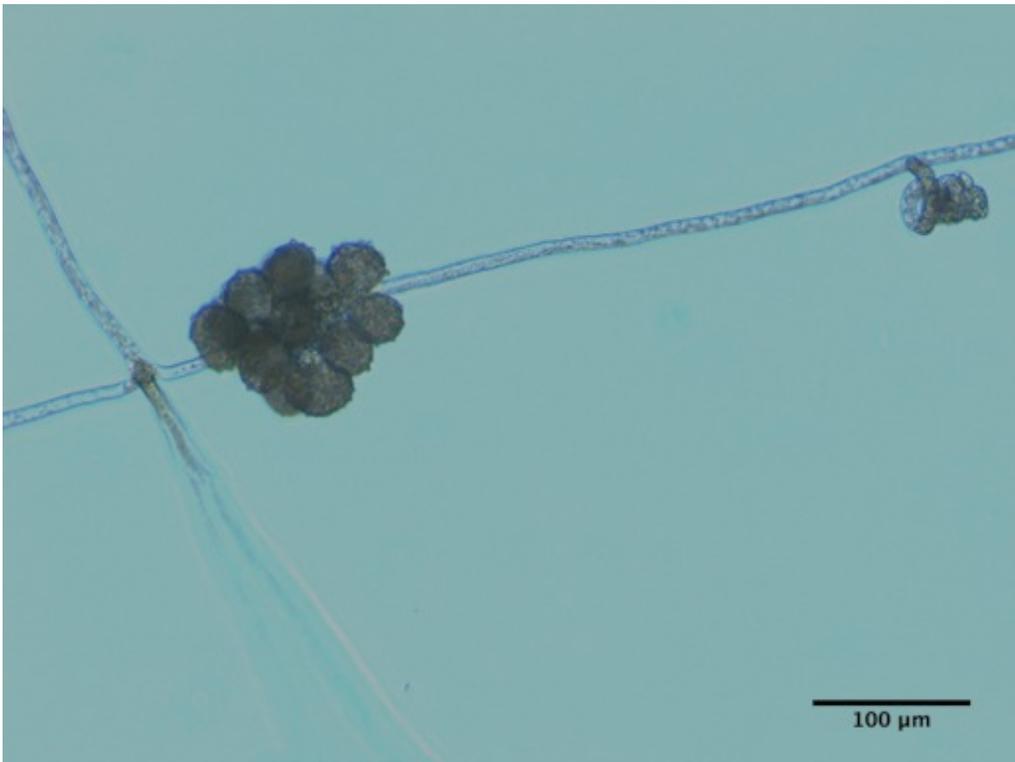


Figura 14. Célula auxiliar de *G. margarita* WV205A en tratamiento. II, usando medio M1. Aumento 100x



Figura 15. Célula auxiliar de *G. margarita* WV205A en tratamiento I', usando medio M1. Aumento 100x

Este tipo de estructuras solo se presentan en los géneros *Scutellospora* y *Gigaspora* y cuando se forman estas estructuras en cultivo *in vitro* generalmente se da la subsecuente formación de BAS (branched absorbing structure). Asimismo, es interesante resaltar que al principio de la germinación (3 días) y a lo largo del tiempo de incubación del cultivo (50 días) las células auxiliares se mantienen activas con un constante movimiento del material citoplasmático indicando actividad metabólica. Dado que estas estructuras se consideran estructuras de reserva, se hipotetizaría un almacenaje de carbono por parte del hongo, no obstante queda la incógnita si es carbono propio o del medio de cultivo. Recientes estudios acerca del flujo del carbono en el micelio externo de *Glomus* sp. (DAOM 197198) han llevado a dilucidar que es capaz de tomar azúcares del medio de cultivo mediante el transportador de monosacáridos MST2 (high-affinity monosaccharide transporter2) (Helber *et al.*, 2011), el cual también tiene afinidad por la xilosa, constituyente de las paredes celulares de las plantas.

8. CONCLUSIONES

- Se establecieron 12 medios de cultivo modificados, de los cuales los medios M1 (composición: MSR + quercetin **5 μ M** + 1-metil-2-oxindol 2.5 nM + glucosa 8.2 g/L) y M2 (composición: MSR + quercetin **2.5 μ M** + 1-metil-2-oxindol 2.5 nM + glucosa 8.2 g/L) mejoraron el porcentaje de germinación y la longitud hifal de las esporas de *G. margarita* WV205A en su estado pre-simbiótico. Las otras cuatro especies, *F. mosseae* UK115, *C. etunicatum* NE102, *G. rosea* FL105 y *R. intraradices* UT126 no presentaron un desarrollo hifal estadísticamente significativo. Este resultado permitió verificar cual especie de HFMA presentaba un mejor estímulo en el desarrollo del tubo germinativo en un periodo experimental de 31 días. Asimismo, permitió seleccionar dos medios de cultivo apropiados para el cultivo de las esporas de *G. margarita* WV205A. De esta forma, se evidenció que la composición del medio de cultivo estimuló la germinación de esporas de *G. margarita* WV205A.
- El tratamiento I' (Proximal: M1 sin raíz/Distal: MSRSS) usando el medio M1 mejoró el porcentaje de germinación, la longitud hifal, el número de ramificaciones y el número de células auxiliares de *G. margarita* WV205A en su estado pre-simbiótico, en comparación con los valores obtenidos en el control positivo en presencia de raíz. Los resultados experimentales confirman un efecto positivo de la composición del medio de cultivo (M1) en el desarrollo del micelio de *G. margarita* WV205A. Aún en ausencia de raíz, el micelio de *G. margarita* WV205A migró al compartimento proximal y exploró durante un periodo experimental de 71 días de cultivo sin retracción citoplasmática, siendo replicable en dos experimentos completamente independientes. No obstante, pasado este periodo las hifas empezaron a septarse y a retraer su citoplasma.
- Es destacable que empleando el tratamiento I', se formó un mayor número de agrupaciones de células auxiliares (estructuras de almacenamiento de carbono) en el micelio de *G. margarita* WV205A, en comparación con el control positivo (presencia de raíz). Esto evidencia una actividad citoplasmática y metabólica presente en las hifas cercanas a las células auxiliares.

9. PERSPECTIVAS

- Dado que el tratamiento I' (proximal: M1 sin raíz/distal: MSRSS) empleando el medio M1 está estimulando la producción de células auxiliares y la función biológica y capacidad de infectividad de éstas no es clara; es pertinente determinar por qué se está dando la formación de células auxiliares en ausencia de simbiosis y si el carbono almacenado dentro de ellas proviene de la energía propia de la espora o del medio de cultivo.
- Implementar el medio de cultivo M1 en cultivos monoxénicos (HFMA-Raíz) para evaluar la producción y el subcultivo de la simbiosis, con el fin de comparar el ciclo de vida del hongo con respecto a su crecimiento en medio cultivo MSR
- Implementar el medio de cultivo M1 en cultivos monoxénicos (HFMA-Raíz) líquidos para evaluar producción y subcultivo de la simbiosis, comparada con el crecimiento en medio cultivo MSR líquido.
- Implementar una metodología de cultivo *in vitro* mediante el uso de plantas autotróficas de *Medicago truncatula* usando el medio M1 y compararla con su cultivo en medio MSR, con el fin de optimizar la producción de esporas.

10. LITERATURA CITADA

- Akiyama, K., Matsuoka, H., y Hayashi, H. (2002). Isolation and identification of a phosphate deficiency-induced C-glycosyl flavonoid that stimulates arbuscular mycorrhiza formation in melon roots. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15:334-40, PMID:12026171.
- Akiyama, K., Matsuzaki, K., y Hayashi, H. (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435:824-827.
- Akiyama, K., Ogasawara, S., Ito, S., y Hayashi, H. (2010). Structural requirements of strigolactones for hyphal branching in AM fungi. *Plant Cell Physiol.* 51 (7):1104-1117.
- Akiyama, K., y Hayashi, H. (2006). Strigolactones: chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots. *Ann. Bot.* 97:925-931.
- Alarcón, A., y Ferrera Cerrato, R. (1999). Manejo de la micorriza arbuscular en sistemas de propagación de plantas frutícolas. *Terra Latinoamer.* 17(3):179-191.
- Atlas, R. M., y Bartha, R. (2001). Ecología microbiana y microbiología ambiental. Addison Wesley, Madrid.
- Azcón-Aguilar, C., Bago, B., y Barea, J. M. (1999). Saprophytic growth of arbuscular mycorrhizal fungi. In: Varma, A., y Hock, B. (Eds). *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology.* Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 391-407.
- Azcón-Aguilar, C., Díaz-Rodríguez, R. M., y Barea, J. M. (1986). Effect of soil microorganisms on spore germination and growth of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Trans. Br. Mycologia Soc.* 86:337-340.
- Azcón-Aguilar, C., y Barea, J. M. (1997). Applying mycorrhizal biotechnology to horticulture: significance and potentials. *Sci. Hortic.* 68:1-24.
- Bago B., Pfeffer, P. E., Douds, D. D. J., Brouillette, J., Bécard, G., y Shachar-Hill, Y. (1999). Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiol.* 121:263-271.
- Bago, B., Azcón-Aguilar, C., Goulet, A., y Piché, Y. (1998). Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 139:375-388.
- Bago, B., Pfeffer, P. E., y Shachar-Hill, Y. (2000). Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiol.*, 124:949-958.

- Bago, B., Vierheilig, H., Piche, Y., Azcón-Aguilar, C. (1996). Nitrate depletion and pH changes induced by the extraradical mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown in monoxenic culture. *New Phytol.* 133:273-280.
- Bago, B., y Bécard, G. (2002). Bases of the obligate biotrophy of arbuscular mycorrhizal fungi. En: Gianinazzi, S., Schüepp, H., Barea, J. M., y Haselwandter, K. (Eds.), *Mycorrhizal Technology in Agriculture*. Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland. Pp. 33-48.
- Bago, B., y Cano, C., (2005). Breaking Myths on Arbuscular Mycorrhizas *in Vitro* Biology. In: *In vitro* culture of mycorrhizas. Ed. By Declerck, S., Strullu, D., Fortin, A., pp. 119-124 Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Baptista, M. J., y Siqueira, J. O. (1994). Efeito de flavonóides na germinação de esporos e no crescimento assimbiótico do fungo micorrízico arbuscular *Gigaspora gigantea*. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 6:127-134.
- Bécard, G., Douds, D. D., y Pfeffer, P. E. (1992). Extensive *in vitro* hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO₂ and flavonols. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (3), 821-825.
- Bécard, G., y Fortin, J. A. (1988). Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* 108 (2):211-218.
- Bécard, G., y Pfeffer, P. E. (1993). Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi *in vitro* development. *Protoplasma* 174:62-68.
- Bécard, G., y Piché, Y. (1989). Fungal Growth Stimulation by CO₂ and Root Exudates in Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (9):2320-2325.
- Beilby, J. P., y Kidby, D. K. (1980). Biochemistry of ungerminated and germinated spores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus caledonium*: changes in neutral and polar lipids. *J. Lipid Res.* 21:739-750.
- Beilby, J. P., y Kidby, D. K. (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.
- Bel-Rhliid, R., Chabot, S., Piché, Y., y Chenevert, R. (1993). Isolation and identification of flavonoids from Ri T-DNA-transformed roots (*Daucus carota*) and their significance in vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Phytochem.* 33:1369-71.
- Bentivenga, S. P., Kumar, T. K. A., Kumar, L., Roberson, R. W., y McLaughlin, D. J. (2013). Cellular organization in germ tube tips of *Gigaspora* and its phylogenetic implications. *Mycologia* 105(5):1087-99.

- Besserer, A., Bécard, G., Jauneau, A., Roux, C. y Séjalon-Delmas, N. (2008). GR24, a synthetic analog of strigolactones, stimulates the mitosis and growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* by boosting its energy metabolism. *Plant Physiol.* 148:402-413.
- Besserer, A., Puech-Pagès, V., Kiefer, P., Gómez-Roldan, V., Jauneau, A., Roy, S., Portais, J. C., Roux, C., Bécard, G., y Séjalon-Delmas, N. (2006). Strigolactones Stimulate Arbuscular Mycorrhizal Fungi by Activating Mitochondria. *PLoS Biol.* 4(7):e226.
- Bhattacharya, C., Bonfante, P., Deagostino, A., Kapulnik, Y., Larini, P., Occhiato, E. G., y Venturello, P. (2009). A new class of conjugated strigolactone analogues with fluorescent properties: synthesis and biological activity. *Org. Biomol. Chem.*, 7(17):3413-3420.
- Bianciotto, V., Barbiero, G., y Bonfante, P. (1995). Analysis of the cell-cycle in an arbuscular mycorrhizal fungus by flow-cytometry and bromodeoxyuridine labeling. *Protoplasma* 188:161-169.
- Bianciotto, V., Lumini, E., Lanfranco, L., Minerdi, D., Bonfante, P., y Perotto, S. (2000). Detection and identification of bacterial endosymbionts in arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the family Gigasporaceae. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(10):4503-9.
- Blanco, M., Valverde, R., y Gómez, L. (2003). Optimización de la transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes*. *Agron. Costarricense.* 27:19-28.
- Bonfante, P., Balestrini, R., y Mendgen, K. (1994) Storage and secretion processes in the spore of *Gigaspora margarita* Becker & Hall as revealed by high-pressure freezing and freeze substitution. *New Phytol.* 128:93-101.
- Bonfante, P., y Bianciotto, V. (1995). Presymbiotic versus symbiotic phase in arbuscular endomycorrhizal fungi: morphology and cytology. En: Varma, A., y Hock, B., (Eds.), *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology*. Springer-Verlag. pp 228-248.
- Bonfante, P., y Perotto, S. (1995). Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytol.* 130:3-21.
- Brown, M. F., y King, E. J. (1991). Morphology and histology of vesicular arbuscular mycorrhizae. In NC Schenk, ed, *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. APS Press, St. Paul, pp 15-21
- Budi, S. W., Blal, B., y Gianinazzi, S. (1999). Surface-sterilization of *Glomus mosseae* sporocarps for studying endomycorrhization *in vitro*. *Mycorrhiza* 9:65-68.
- Buée, M., Rossignol, M., Jauneau, A., Ranjeva, R., y Bécard, G. (2000). The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a

branching factor partially purified from plant root exudates. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 693-698.

- Carr, G. R., Hinkley, F., Le-Tacon, F., Hepper, C. M., Jones, M. G. K., y Thomas, E. (1985). Improved hyphal growth of two species of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of suspension cultured plants cells. *New phytol.* 101: 417-426.
- Chabot, S., Bécard, G., y Piché, Y. (1992) a. Life cycle of *Glomus intraradix* in root organ culture. *Mycologia*, 84:315-321.
- Chabot, S., Bel-Rhliid, R., Chênnevert, R., y Piché, Y. (1992) b. Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker and Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO₂- enriched conditions. *New Phytol.* 122:461-467.
- Crowe, L. M., Womersley, C., Crowe, J. H., Reid, D., Appel, L., y Rudolph, A. (1986). Prevention of fusion and leakage in freeze dried liposomes by carbohydrates. *Biochim. Biophys. Acta* 861:131-140.
- D'Souza, J., Rodrigues, K. M., y Rodrigues, B.F. (2013). Modified Strullu and Romand (MSR) medium devoid of sucrose promotes higher *in vitro* germination in *Rhizophagus irregularis*. *J. Mycol. Plant Pathol.* 43(2):240-242.
- Daza, A., Manjón, J. L., Camacho, M., Romero de la Osa, L., Aguilar, A., y Santamaría, C. (2006). Effect of carbon and nitrogen sources, pH and temperature on *in vitro* culture of several isolates of *A. muscaria caesarea* (Scop.:Fr.) Pers. *Mycorrhiza*.16:133-136.
- De Souza, F. A. de, y Declerck, S. (2003). Mycelium development and architecture, and spore production of *Scutellospora reticulata* in monoxenic culture with Ri T-DNA transformed carrot roots. *Mycologia.* 95(6):1004-12.
- De Souza, F. A., Dalpé, Y., Declerck, S., de la Providencia, I., Séjalon-Delmas, N., (2005). Life history strategies in Gigasporaceae: insight from monoxenic culture. En: Declerck, S., Fortin, J.A., y Strullu, D. G. (Eds.), *in vitro* culture of mycorrhizas. Springer Berlin, Heidelberg, pp. 73-91.
- Declerck, S., Strullu, D. G. y Plenchette, C. (1998). Monoxenic culture of the intraradical forms of *Glomus* sp. isolated from a tropical ecosystem: a proposed methodology for germplasm collection. *Mycologia* 90:579-585.
- Declerck, S., Strullu, D.G., y Plenchette, C. (1996). *In vitro* mass production of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus versiforme*, associated with Ri T-DNA transformed carrot roots. *Mycol. Res.* 100:1237-1242.
- Declerck, S., y Angelo-Van Coppenolle M.G. (2000). Cryopreservation of entrapped monoxenically produced spores of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol.* 148(1):169-76.

- Diederichs, C., y Moawad, A. M. (1993). The potencial of VA mycorrhizae for plant nutrition in the tropics. *Angew. Bot.* 67:91-96.
- Diop, T. A., Plenchette, C., y Strullu, G. D. (1994). Dual axenic culture of sheared-root inocula of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with tomato roots. *Mycorrhiza* 5:17-22.
- Douds, D. D. Jr. (2002). Increased spore production by *Glomus intraradices* in the split-plate monoxenic culture system by repeated harvest, gel replacement, and resupply of glucose to the mycorrhiza. *Mycorrhiza*. 12:163-167.
- Douds, D. D. Jr., Nagahashi, G., Pfeffer, P. E., Kayser, W. M., y Reider, C. (2005). On-farm production and utilization of arbuscular mycorrhizal fungus inoculum. *Can. J. Plant. Sci.* 85:15-21.
- Douds, D. D., Jr., Nagahashi, G., y Abney, G. D. (1996). The differential effects of cell wall-associated phenolics, cell walls and cytosolic phenolics of host and non-host roots on the growth of two species of AM fungi. *New Phytol.* 133:289-294.
- El-Atrach, F., Azcon, R. y Barea, J. M. (1989). International conference on the mechanisms of the relationship between soil-plant-microorganism in the rhizosphere, pp 85.
- Foo, E., Yoneyama, K., Hugill, C. J., Quittenden, L. J., y Reid, J. B. (2013). Strigolactones and the regulation of pea symbioses in response to nitrate and phosphate deficiency. *Mol. Plant.* 6:76-87.
- Fortin, J. A., Bécard, G., Declerck, S., Dalpé, Y., St-Arnaud, M., Coughlan, A.P., y Piché, Y. (2002). Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. *Can. J. Bot.* 80(1):1-20.
- Franche, C., Lindström, K., y Elmerich, C. (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil* 321:35-59.
- Gachomo, E., Allen, J. W., Pfeffer, P. E., Govindarajulu, M., Douds, D. D., Jin, H., Nagahashi, G., Lammers, P. J., Shachar-Hill, Y., y Bücking, H. (2009). Germinating spores of *Glomus intraradices* can use internal and exogenous nitrogen sources for de novo biosynthesis of amino acids. *New Phytol.* 184:399-411.
- Gadkar, V., Driver, J. D., y Rillig, M. C. (2006). A novel *in vitro* cultivation system to produce and isolate soluble factors released from hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Biotechnol. Lett.* 28:1071-1076.
- Genre, A., Chabaud, M., Faccio, A., Barker, D. G. y Bonfante, P. (2008). Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *Plant Cell* 20:1407-1420.

- Genre, A., Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P. y Barker, D. G. (2005). Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell* 17:3489-3499.
- Gianinazzi-Pearson, V., Branzanti, B., y Gianinazzi, S. (1989). *In vitro* enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. *Symbiosis*. 7:243-255.
- Giovannetti, M., Sbrana, C., Avio, L., Citernesi, A. S., y Logi, C. (1993). Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during preinfection stages. *New Phytol.* 125:587-593.
- Giovannetti, M., Sbrana, C., Citernesi, A. S. y Avio, L. (1996). Analysis of factor involved in fungal recognition responses to host derived signals by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 133:65-71.
- Giovannetti, M., y Sbrana, C. (1998). Meeting a non-host: the behaviour of AM fungi. *Mycorrhiza* 8:123-130.
- Gohre, V., y Paszkowski, U. (2006). Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* 223:1115-1122.
- Gomez-Roldan, V., Fermas, S., Brewer, P. B., Puech-Pages, V., Dun, E. A., Pillot, J. P., *et al.*, (2008). Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*, 455:189-194.
- Gryndler, M., Jansa, J., Hršelová, H., Chvátalové, I., y Vosátka, M. (2003). Chitin stimulates development and sporulation of arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl. Soil Ecol.* 22:283-287.
- Harrison, M. J. (2012). Cellular programs for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15:691-698.
- Harrison, M.J. (2005). Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis, *Annu. Rev. Microbiol.* 59:19-42.
- Helber, N., Wippel, K., Sauer N., Saarschmidt, S., Hause, B., y Requena N. (2011). A versatile monosaccharide transporter that operates in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus* sp. is crucial for the symbiotic relationship with plants. *Plant Cell*, 23(10):3812-23.
- Hepper, C. M. (1979). Germination and growth of *Glomus caledonium* spores: the effects of inhibitors and nutrients. *Soil Biol. Biochem.* 11:269-277.
- Hepper, C. M. (1981). Techniques for studying the infection of plants by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi under axenic conditions. *New Phytol.* 88:641-647.

- Hepper, C. M. (1984). Isolation and culture of VA mycorrhizal (VAM) fungi. In: VA Mycorrhiza (Ed. by C. L. Powell y D. J. Bagyaraj), pp. 95-112. CRC Press Inc., Boca Ratón, Florida.
- Hepper, C. M. (1987). VAM spore germination and hyphal growth *in vitro*: prospects for axenic culture. En: Sylvia, D. M., Hung, L. L., Graham, J. H. (Eds.), Mycorrhizae in the next decade: practical applications and research priorities. Institute of Food and Agricultural Sciences, Gainesville, pp 172-174.
- Hepper, C. M., Sen, R., y Maskall, C. S. (1986). Identification of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in roots of leek (*Allium porrum* L.) and maize (*Zea mays* L.) on the basis of enzyme mobility during polyacrylamide gel electrophoresis. *New Phytol.* 102:529-539.
- Hepper, C. M., y Jakobsen, I. (1983). Hyphal growth from spores of the mycorrhizal fungus *Glomus caledonius*: effect of amino acids. *Soil Biol. Biochem.* 15:55-58.
- Hepper, C. M., y Smith, G. A. (1976). Observations on the germination of *Endogone* spores. *Trans. Br. Mycologia Soc.* 66:189-194.
- Hijri, M., y Sanders, I. R. (2004). The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is haploid and has a small genome size in the lower limit of eukaryotes. *Fungal Genet. Biol.* 41(2):253-261.
- Hijri, M., y Sanders, I. R. (2005). Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei. *Nature* 433:160-163.
- Hosny, M., Gianinazzi-Pearson, V., y Dullieu, H. (1998). Nuclear DNA content of 11 fungal species in Glomales. *Genome.* 41(3):422-428.
- Ibjibijen, J., Urquiga, S., Ismaili, M., Alve, J. R., y Boddey, R. M. (1996). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition, and nitrogen fixation of three varieties of common bean (*Phaseolus vulgaris*). *New Phytol.* 134:353-360.
- Ijdo, M., Schtickzelle, N., Cranenbrouck, S., y Declerck, S. (2010). Do arbuscular mycorrhizal fungi with contrasting life history strategies differ in their responses to repeated defoliation? *FEMS Microbiol Ecol.* 72:114-122.
- Jakobsen, I. (1999). Transport of phosphorus and carbon in arbuscular mycorrhizas. En: Varma, A., y Hock, B. (Eds), Mycorrhiza: structure, function, molecular biology, 2nd edn. Springer, Heidelberg, pp 535-542.
- Janos, D. P. (1980). Micorrhizae influence tropical succession. *Tropical succession:* 12(2):56-64.
- Jarstfer, A. G., y Sylvia, D. M. (1992). Inoculum Production and inoculation technologies of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. In: Metting B (ed)

Soil technologies: applications in agriculture, forestry and environmental management. Dekker, New York, pp 349-377.

- Javot, H., Pumplin, N., y Harrison, M. J. (2007). Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: Transport properties and regulatory roles. *Plant Cell Environ.* 30:310-322.
- Johnson, N. C., y Gehring, C. A. (2007). Mycorrhizas: symbiotic mediators of rhizosphere and ecosystem processes. En: Cardon, Z. G., y Whitbeck, J. L., (Eds.), *The Rhizosphere: An Ecological Perspective* Academic Press, Amsterdam.
- Jolicoeur, M., Williams, R. D, Chavarie, C., Fortin, J. A., y Archambault, J. (1999). Production of *Glomus intraradices* Propagules, an Arbuscular Mycorrhizal Fungus, in an Airlift Bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 63(2):224-32.
- Jones, J. D. G., y Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444:323-329.
- Kape, R., Parniske, M., Brandt, S., y Werner, D. (1992). Isoliquiritigenin, a strong nod gene- and glyceollin resistance-inducing flavonoid from soybean root exudate. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1705-10.
- Klopffholz, S., Kuhn, H., y Requena, N. (2011). A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. *Curr. Biol.* 21:1204-1209.
- Kobae, Y., y Hata, S. (2010). Dynamics of periarbuscular membranes visualized with a fluorescent phosphate transporter in arbuscular mycorrhizal roots of rice. *Plant Cell Physiol.* 51:341-353.
- Koske, R. E. (1981). Multiple germination by spores of *Gigaspora gigantea*. *Trans. Br. Mycologia Soc.* 76:328-330.
- Kovalchuk, I., Turdiev, T., Mukhitdinova, Z., Frolov, S., Reed, B.M. y Kairova, G. (2014). New techniques for rapid cryopreservation of dormant vegetative buds. *Acta Hort.* (ISHS) 1039:137-146.
- Kretschmar, T., Kohlen, W., Sasse, J., Borghi, L., Schlegel, M., Bachelier, J.B., *et al.*, (2012). A petunia ABC protein controls strigolactone-dependent symbiotic signalling and branching. *Nature.* 483(7389):341-4.
- Kretschmar, T., Kohlen, W., Sasse, J., Borghi, L., Schlegel, M., Bachelier, J. B., Reinhardt, D, Bours, R., Bouwmeester, H. J., y Martinoia, E. (2012). A petunia ABC protein controls strigolactone-dependent symbiotic signalling and branching. *Nature.* 483:341-344.
- Lemoine, M. C., Gollotte, A., y Gianinazzi-Pearson, V. (1995). β 1-3 glucan localization in walls of the endomycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Acaulospora laevis* during colonization of host roots. *New Phytol.* 129:97-105.

- Maia, L. C., y Kimbrough, J. W. (1998). Ultrastructural studies of spores and hypha of a *Glomus* species. *Int. J. Plant Sci.* 159:581-589.
- Maillet, F., Poinot, V., André, O., Puech-Pagès, V., Haouy, A., Gueunier, M., *et al.*, (2011). Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature.* 469:58-63.
- Manoharachary, C., y Krishna, G. Mukerji. (2006). Rhizosphere Biology - an Overview. En: Mukerji, K. G., Manoharachary, C., y Singh, J. (Eds), *Microbial Activity in the Rhizosphere.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Manthey, J. A., y Buslig, B. S. (1998). Flavonoids in the Living System. Boston, MA. Springer US. *Adv. Exp. Med. Biol.* 439:26-29.
- Merritt, D. J., Hay, F. R., Swarts, N. D., Sommerville, K. D., y Dixon, K. W. (2014). Ex situ Conservation and Cryopreservation of Orchid Germplasm. *Int. J. Plant Sci.* 175(1):46-58.
- Mohammad, A., Khan, A. G., y Kuek, C. (2000). Improved aeroponic culture of inocula of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 9:337-339.
- Montañó Arias, N. M., Camargo Ricalde, S. L., García Sánchez, R., y Monroy Ata, A. (2007). Micorrizas arbusculares en ecosistemas áridos y semiáridos. Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAT, Mundi-Prensa SA de CV, UAM Iztapalapa, FES Zaragoza, UNAM. Distrito Federal, México. Pp 460.
- 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. Mycologia Soc.* 42:273-286.
- Mosse, B. (1962). The establishment of vesicular arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. *J. Gen. Microbiol.* 27:509-520.
- Mosse, B. (1970a). Honey-coloured sessile *Endogone* spores. I. Life history. *Arch. Microbiol.* 70:167-175.
- Mosse, B. (1970b). Honey-coloured sessile *Endogone* spores. II. Changes in fine structure during spore development. *Arch Microbiol.* 74:129-145.
- Mosse, B., (1988). Some studies relating to “independent” growth of vesicular-arbuscular endophytes. *Can. J. Bot.* 66:2533-2540.
- Mosse, B., y Hepper, C. M. (1975). Vesicular-arbuscular infections in root-organs cultures. *Physiol. Plant Pathol.* 5:215-223.
- Mugnier, J., y Mosse, B. (1987). Vesicular-arbuscular infections in Ri T-DNA transformed roots grown axenically. *Phytopathology*, 77:1045-1050.
- Nagahashi, G., Douds, D. D., Jr, y Abney, G. D. (1996). Phosphorous amendment inhibits hyphal branching of the VAM fungus *Gigaspora margarita* directly and indirectly through its effect on root exudation. *Mycorrhiza*, 6:403-408.

- Nagahashi, G., y Douds D. D. (1999). A rapid and sensitive bioassay with practical application for studies on interactions between root exudates and arbuscular mycorrhizal fungi. *Biotechnol. Tech.* 13:893-897.
- Nagahashi, G., y Douds, D. D. Jr. (2000). Partial separation of root exudate components and their effects upon the growth of germinated spores of AM fungi. *Mycol. Res.* 104:1453-1464
- Nagahashi, G., y Douds, D. D. Jr. (2003). Action spectrum for the induction of hyphal branches of an arbuscular mycorrhizal fungus: exposure sites versus branching sites. *Mycol. Res.* 107:1075-1082
- Nair, M. G., Safir, G. R., y Siqueira, J. O. (1991). Isolation and identification of vesicular–arbuscular mycorrhiza-stimulatory compounds from clover (*Trifolium ripens*) roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 434-439.
- Navazio, L., Moscatiello, R., Genre, A., Novero, M., Baldan, B., Bonfante, P., y Mariani, P. (2007). A diffusible signal from arbuscular mycorrhizal fungi elicits a transient cytosolic calcium elevation in host plant cells. *Plant Physiol.* 144:673-681.
- Nuutila, A. M., Vestberg, M., y Kauppinen, V. (1995). Infection of hairy roots of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) with arbuscular-mycorrhizal fungus. *Pl. Cell Rep.* 14:505-509.
- Oba, H., Tawaraya, K., y Wagatsuma, T. (2002). Inhibition of presymbiotic hyphal growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* by root exudates of *Lupinus* spp. *Soil Sci. Plant. Nutr.* 48:117-120.
- Oehl, F., Souza, F., y Sieverding, E. (2008). Revision of *Scutellospora* and description of five new genera and three new families in the arbuscular mycorrhiza forming Glomeromycetes. *Mycotaxon* 106:311-360.
- Oláh, B., Brière, C., Bécard, G., Dénarié, J., y Gough, C. (2005). Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signalling pathway. *Plant J.* 44:195-207.
- Olsson, P. A., Thingstrub, I., Jakobsen, I., y Baath, E. (1999). Estimation of the biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in a linseed field. *Soil Biol. Biochem.* 31:1879-1887.
- Parniske, M. (2005). Plant–fungal associations: Cue for the branching connection. *Nature.* 435:750-751.
- Pawlowska, T. E., Douds, D. D., y Charvat, I. (1999). *In vitro* Propagation and life cycle of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum*. *Mycologia Res.* 103:1549-1556.
- Pearson, J. N., y Schweiger, P. (1993). *Scutellospora calospora* (Nicol. y Gerd.) Walker and Sanders associated with subterranean clover: dynamics

- of colonization, sporulation and soluble carbohydrates. *New Phytol.* 124:215-219.
- Pearson, J. N., y Schweiger, P. (1994). *Scutellospora calospora* (Nicol. y Gerd.) Walker and Sanders associated with subterranean clover produces non infective hyphae during sporulation. *New Phytol.* 127:697-701.
 - Pfeffer, P., Douds, D. D., Becard, G., y Shachar-Hill, Y. (1999). Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiol.* 120:587-598.
 - Pinior, A., Wyss, U., Pich. Y., y Vierheilig, H. (1999). Plants colonized by AM fungi regulate further root colonization by AM fungi through altered root exudation. *Can. J. Bot.* 77:891-897.
 - Pinton, R., Varanini, Z, y Nannipieri, P. (2007). The Rhizosphere Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. CRC Press. Taylor y Francis Group.
 - Pirozynski, K. A., y Dalpe, Y. (1989). Geological history of the Glomaceae with particular reference to mycorrhizal symbiosis. *SYMBIOSIS* 7:1-36.
 - Plett, J. M., y Martin, F. (2011). Blurred boundaries, lifestyle lessons from ectomycorrhizal fungal genomes. *Trends Genet.* 27:14-22.
 - Pons, F., y Gianinazzi-Pearson, V. (1985). Observations on extramatrical vesicles of *Gigaspora margarita* *in vitro*. *Trans. Br. Mycologia Soc.* 84:168-170.
 - Poulin, M. J., Bel-Rhliid, R., Piché, Y., y Chênevert, R. (1993). Flavonoids released by carrot (*Daucus carota*) seedlings stimulate hyphal development of vesicular–arbuscular fungi in the presence of optimal CO₂ enrichment. *J. Chem. Ecol.* 19:2317-2327.
 - Poulin, M.J., Simard, J., Catford, J.G., Labrie, F., y Piche, Y. (1997). Response of symbiotic endomycorrhizal fungi to estrogen and antiestrogens. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 10:481-7.
 - Pumplín, N., y Harrison, M. J. (2009). Live-cell imaging reveals periarbuscular membrane domains and organelle location in *Medicago truncatula* roots during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol.* 151: 809-819.
 - Remy, W., Taylor, T. N. Hass, H., y Kerp, H. (1994). Four hundred million year old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:11841-11843.
 - Riker, A. J., Banfield, W. M., Wright, W. H., Keitt, G. W., y Sagen, H. E. (1930). Studies on infectious hairy root of nursery apple trees. *J. Agric. Res.* 41:507-540.
 - Roesti, D., Ineichen, K., Braissant, O., Redecker, D., Wiemken, A., y Aragno, M. (2005). Bacteria Associated with Spores of the Arbuscular

Mycorrhizal Fungi *Glomus geosporum* and *Glomus constrictum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(11):6673-9.

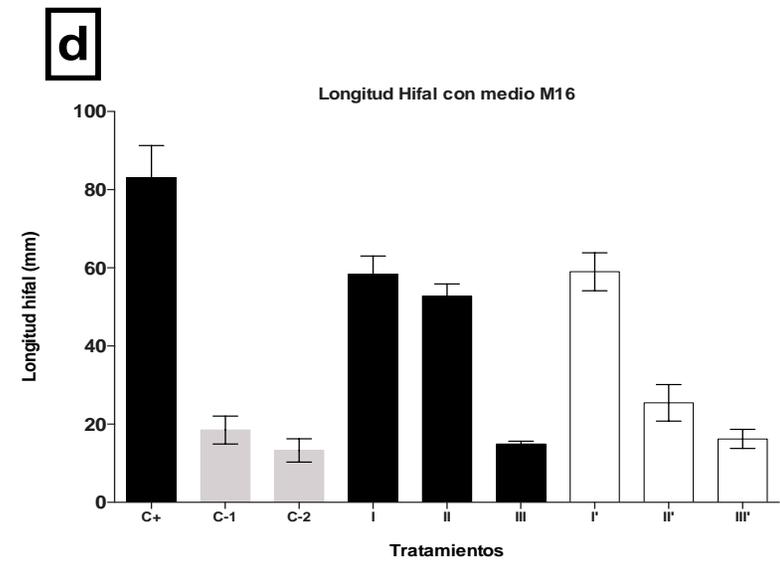
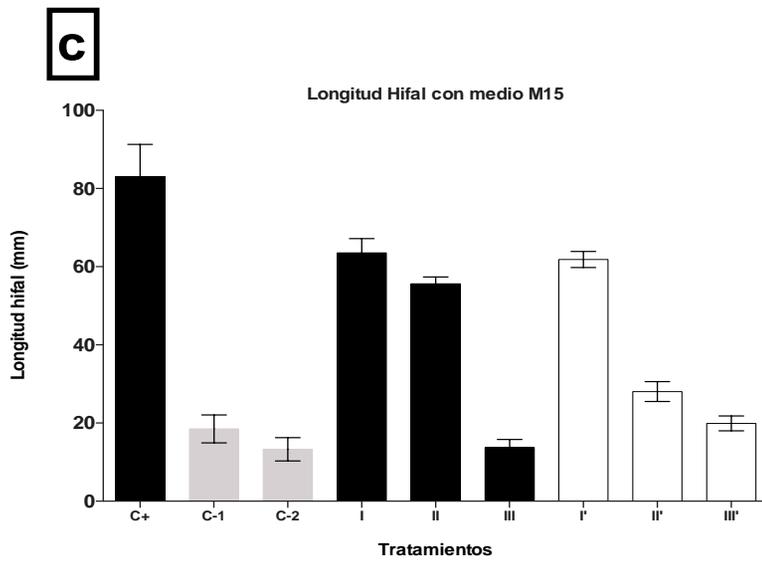
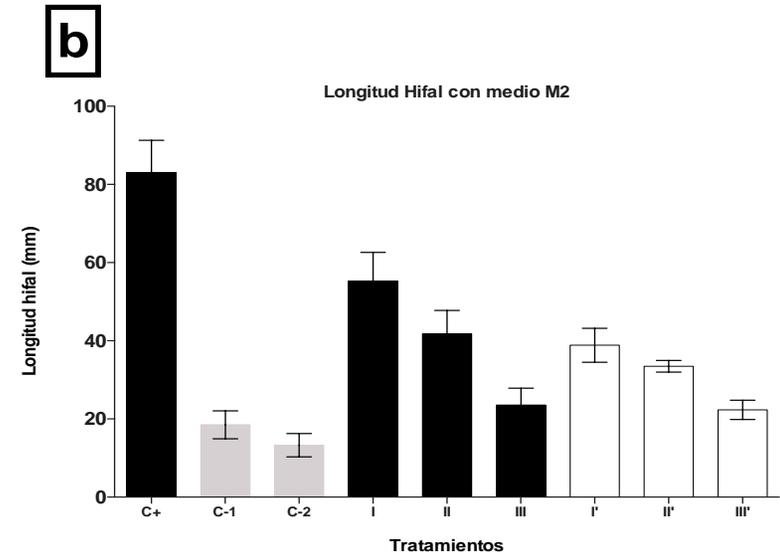
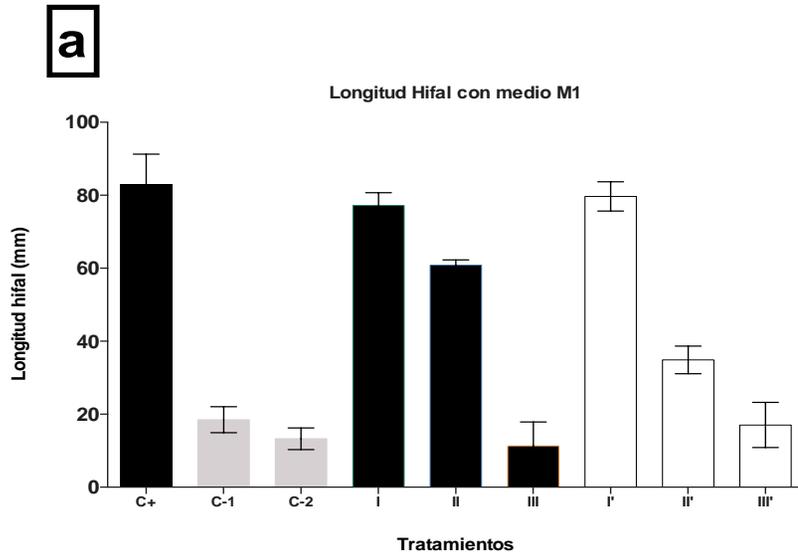
- Ruiz Lozano, J. M. (2003). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza*. 13:309-317.
- Saito, M. (1995). Enzyme activities of the internal hyphae and germinated spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker y Hall. *New Phytol.* 129:425-431.
- Sánchez, M., y Velásquez, D. C. (2008). El suelo: Las micorrizas, el micelio externo de los hongos formadores de micorriza arbuscular (HMA). Cuadernos Ambientales Número 12. Universidad Nacional de Colombia, Palmira. 12:1-15.
- Scervino, J. M., Gottlieb, A., Silvani, V. A., Pergola, M., Fernandez, L., Godeas, A. M. (2009). Exudates of dark septate endophyte (DSE) modulate the development of the arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) *Gigaspora rosea*. *Soil Biol. Biochem.* 41(8):1753-1756.
- Scervino, J. M., Ponce, M. A., Erra-Bassells, R., Vierheilig, H., Ocampo, J. A., y Godeas, A. (2005). Flavonoids exhibit fungal species and genus specific effects on the presymbiotic growth of *Gigaspora* and *Glomus*. *Mycologia Res.* 109(7):789-94.
- Schaarschmidt, S., Roitsch, T., y Hause, B. (2006). Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the apoplastic invertase LIN6 in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *J. Exp. Bot.* 57:4015-4023.
- Schmitz, A. M., y Harrison, M. J. (2014). Signaling events during initiation of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *J. Integr. Plant Biol.* 56(3):250-61.
- Schreiner, R. P., Koide, R.T. (1993). Antifungal compounds from roots of mycotrophic and nonmycotrophic plant species. *New Phytol.* 123:99-105.
- Schreiner, R. P., y Bethlenfalvay, G. J. (1995). Mycorrhizal interactions in sustainable agriculture. *Crit. Rev. Biotechnol.* 15:271–287.
- Shachar-Hill, Y., Pfeffer, P. E., Douds, D. D., Osman, S. F., Doner, L. W., y Ratcliffe, R. G. (1995). Partitioning of intermediary carbon metabolism in vesicular arbuscular mycorrhizal leek. *Plant Physiol.* 108:7-15.
- Siciliano, V., Genre, A., Balestrini, R., Cappellazzo, G., DeWit, P. J., y Bonfante, P. (2007). Transcriptome analysis of arbuscular mycorrhizal roots during development of the prepenetration apparatus. *Plant Physiol.* 14(3):1455-66.
- Siddiqui Z. A., Akhtar, S. M., y Futai, K. (2008). Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry. Springer, Dordrecht, the Netherlands.

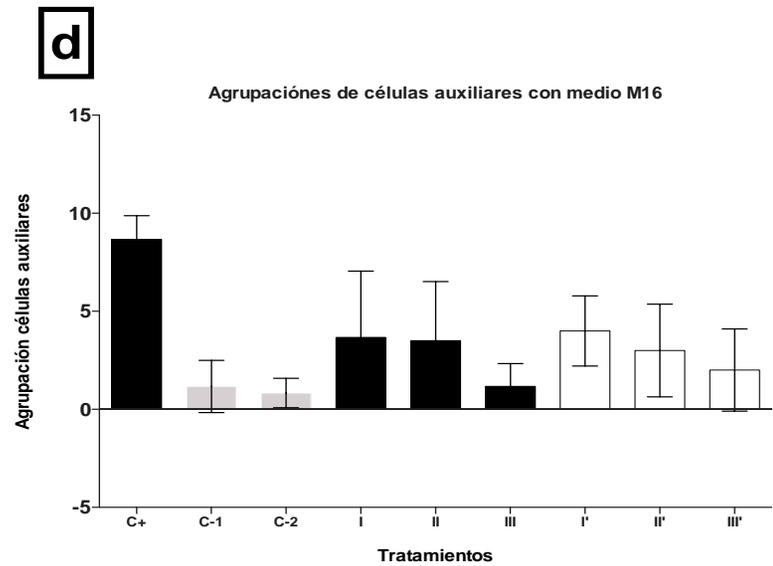
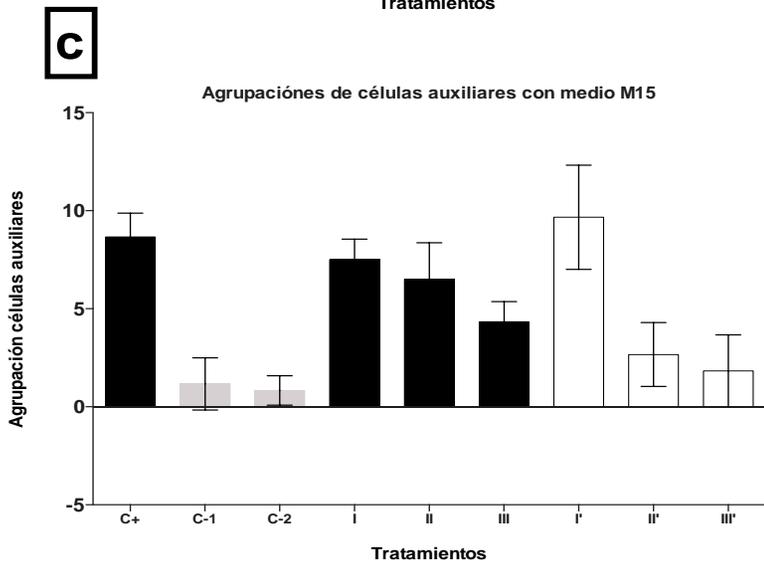
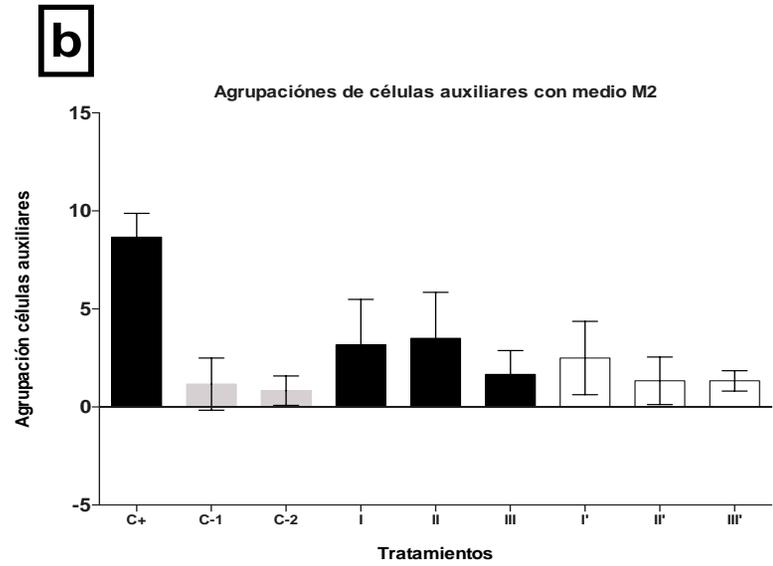
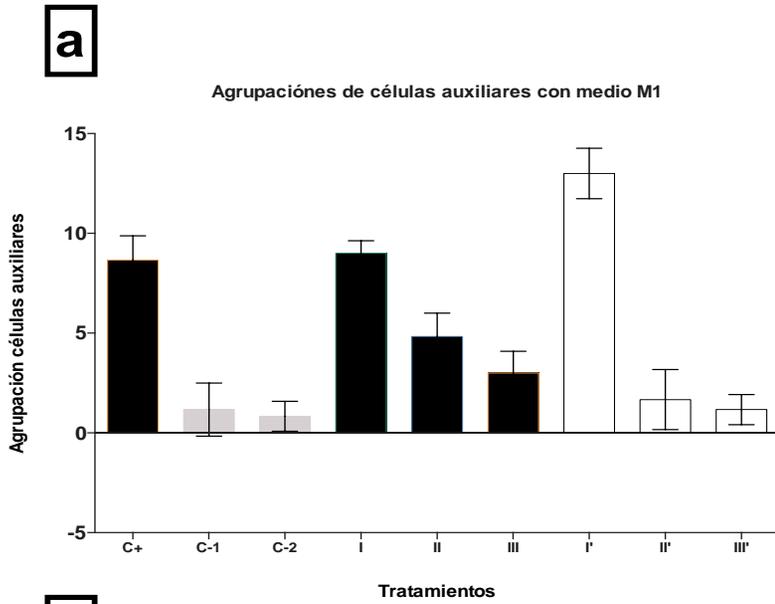
- Simon, L., Bousquet, J., Roger, Levesques, C., y Lalinde, M. (1993). Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature*. 363:67-69.
- Siqueira, J.O., Hubbell, D.H., y Schenck, N.C. (1982). Spore Germination and Germ Tube Growth of a Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungus in vitro. *Mycologia*. 74(6):952.
- Smith, S. E., y Read, D. J. (1997). Mycorrhizal symbiosis, 2nd edn. Academic, London.
- Solaiman, Z. M., y Saito, M. (1997). Use of sugars by intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by radiorespirometry. *New Phytol.* 136:533-538.
- St-Arnaud M, Hamel, C., Vimard, B., Caron, M., y Fortin, J.A. (1996). Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots. *Mycol. Res.*100:328-332.
- Strullu, D. G., Diop, T., y Plenchette, C., (1997). Réalisation de collection *in vitro* de *Glomus intraradices* (Schenck et Smith) et *Glomus versiforme* (Karsten et Berch) et proposition d'un cycle de développement. *C. R. Acad. Sci. Paris*. 320:41-47.
- Strullu, D. G., y Romand, C. (1986). Méthode d'obtention d'endomycorhizes à vésicules et arbuscules en conditions axéniques *C.R. Acad. Sci. Ser. III Sci. Vie*, 303:245-250.
- Strullu, D. G., y Romand, C. (1987). Culture axénique de vésicules isolées à partir d'endomycorhizes et ré-association *in vitro* à des racines de tomate. *C.R. Acad. Sci. Paris Sér. III*. 305:15-19.
- Tajini, F., Suriyakup, P., Vailhe, H., Jansa, J., y Drevon, J. J. (2009). Assess suitability of hydroaerobic culture to establish tripartite symbiosis between different AMF species, beans, and rhizobia. *BMC Plant. Biol.* 9:73.
- Tamasloukht, M., Sejalon-Delmas, N., Kluever, A., Jauneau, A., Roux, C., Bécard, G., y Franken, P. (2003). Root factors induce mitochondrial-related gene expression and fungal respiration during the developmental switch from. *Plant Physiol.* 131:1468-1478.
- Tisserant, E., Kohler, A., Dozolme-Seddas, P., Balestrini, R., Benabdellah, K., Colard, A., Croll, D., Da Silva, C., Gomez, S. K., Koul, R., Ferrol, N., Fiorilli, V., Formey, D., Franken, Ph., Helber, N., Hijri, M., Lanfranco, L., Lindquist, E., Liu, Y., Malbreil, M., Morin, E., Poulain, J., Shapiro, H., van Tuinen, D., Waschke, A., Azcón-Aguilar, C., Bécard, G., Bonfante, P., Harrison, M. J., Küster, H., Lammers, P., Paszkowski, U., Requena, N., Rensing, S. A., Roux, C., Sanders, I. R., Shachar-Hill, Y., Tuskan, G., Young, J. P. W., Gianinazzi-Pearson, V., y Martin, F. (2012). The

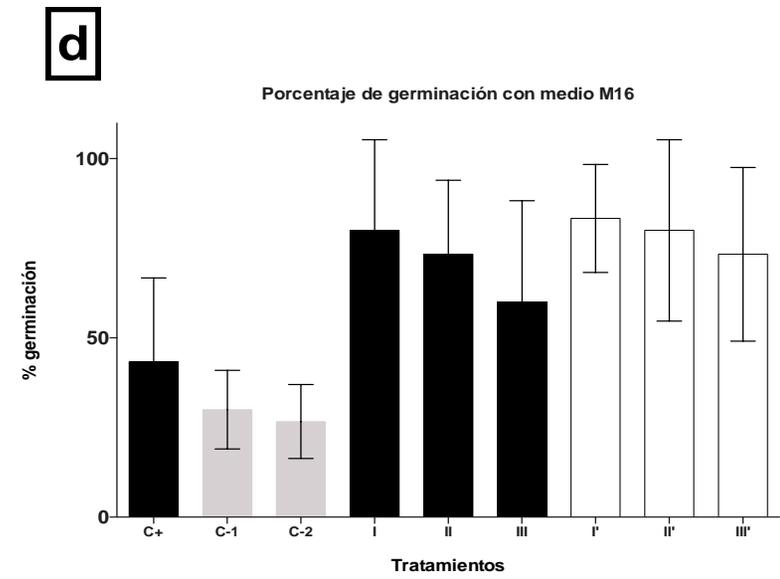
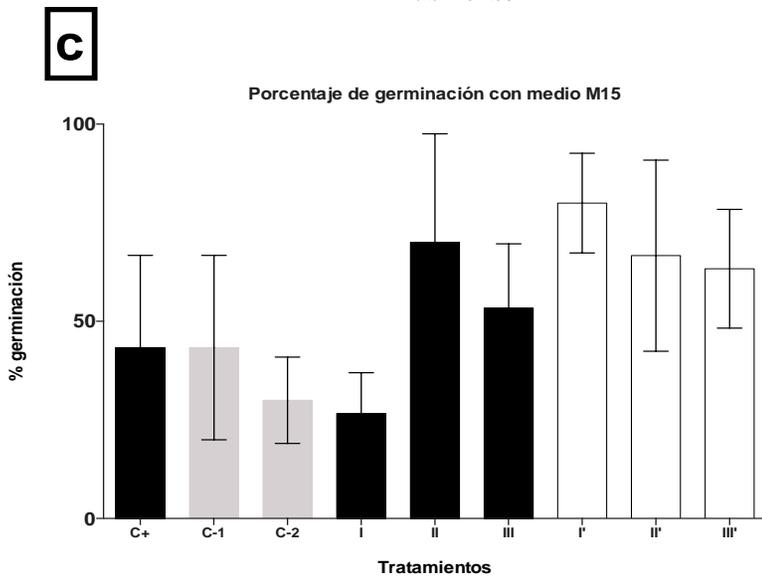
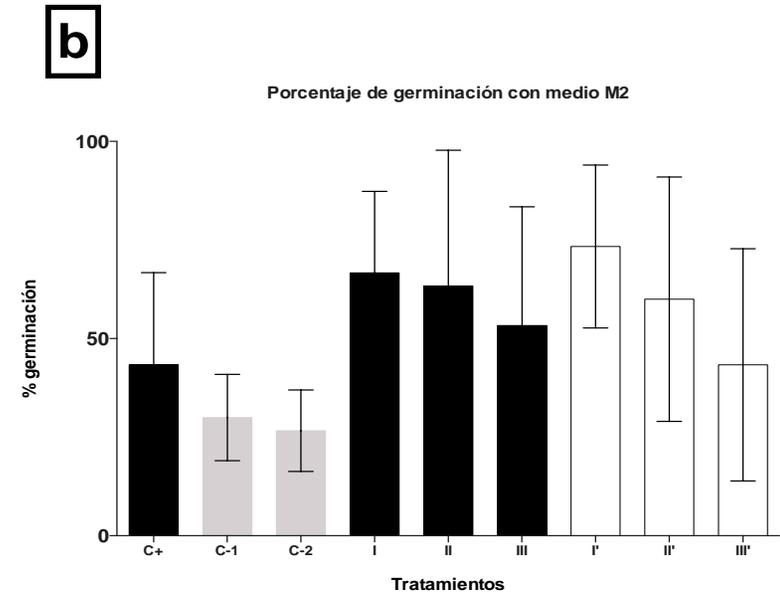
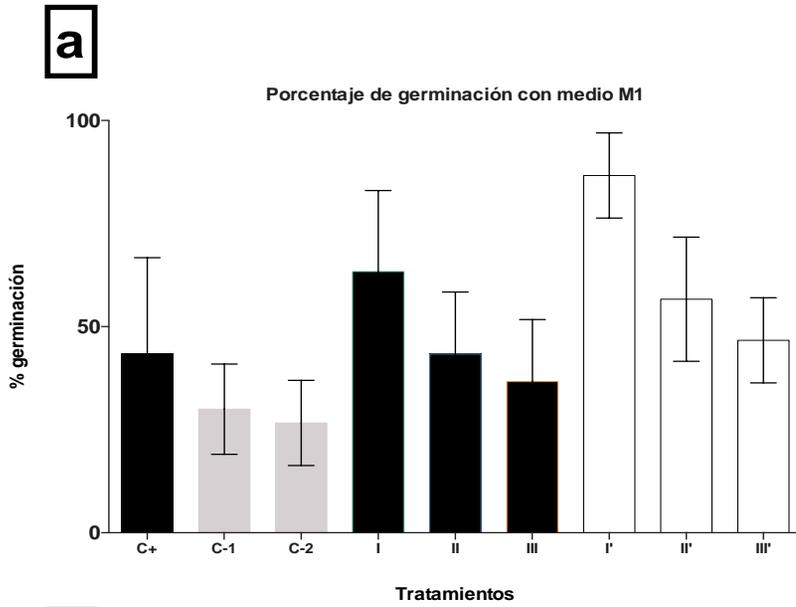
transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *New Phytol.* 193(3):755-769.

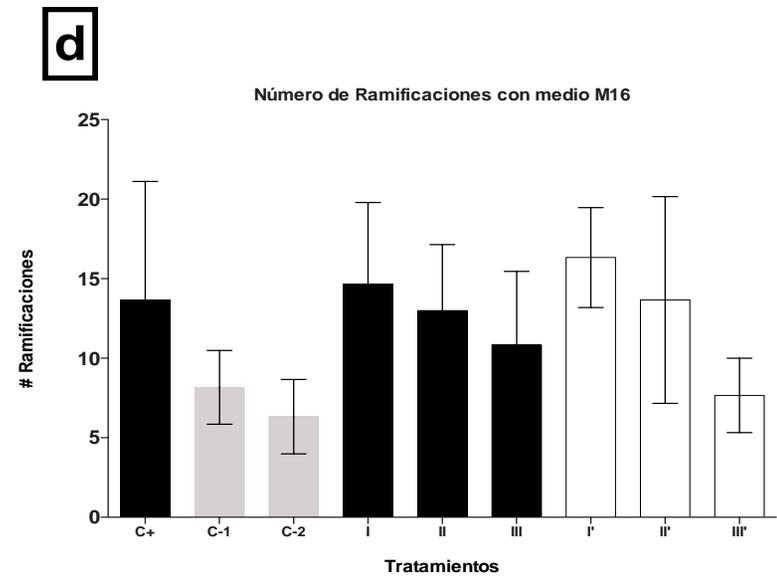
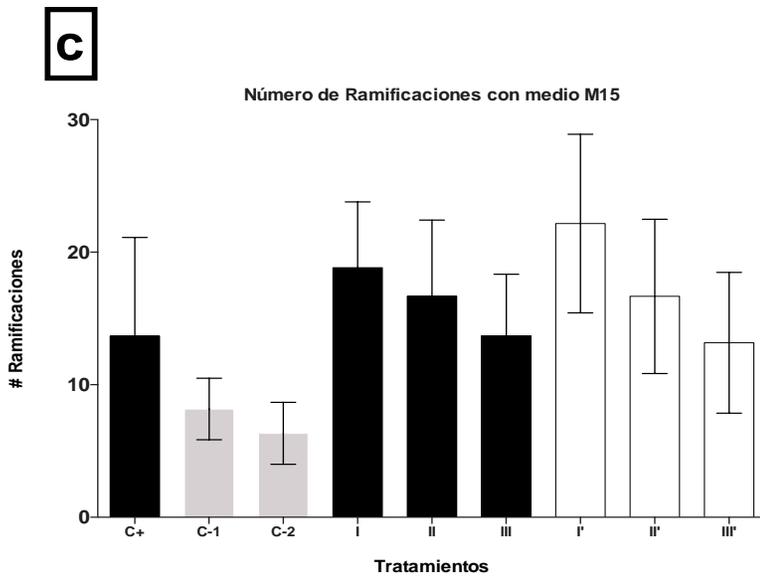
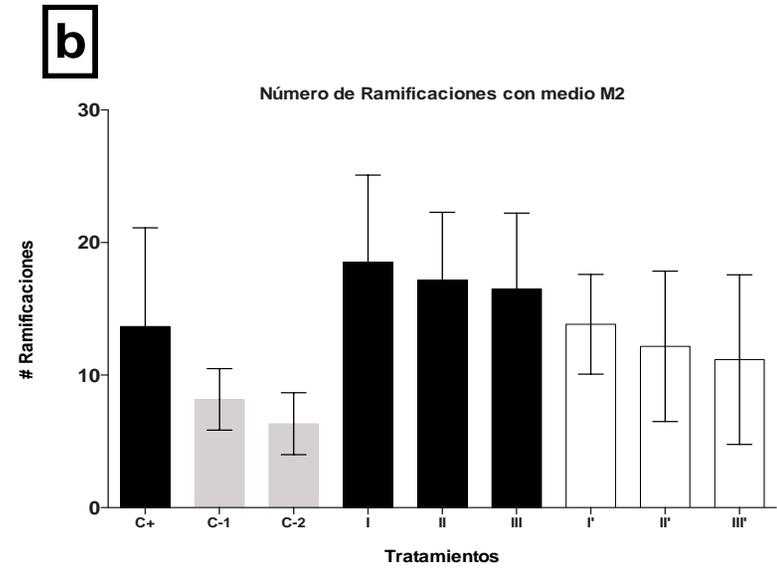
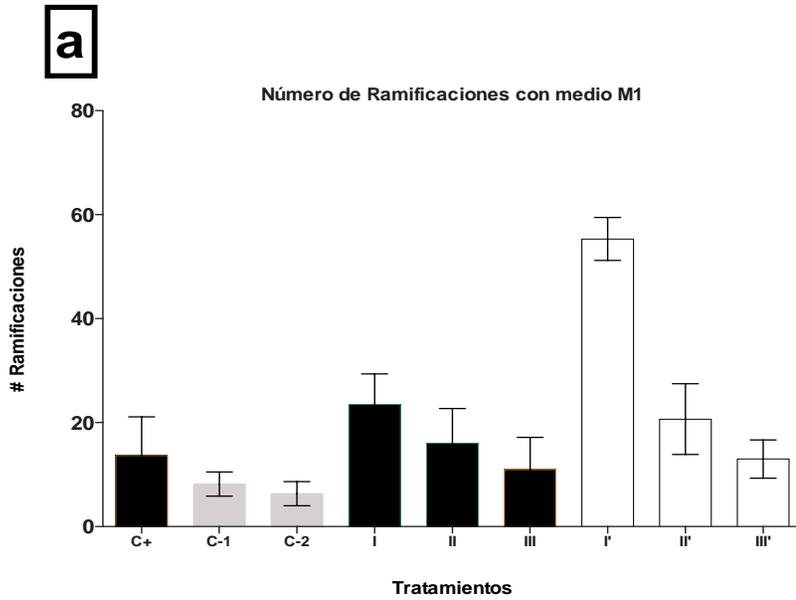
- Tisserant, E., Malbreil, M., Kuo, A., Kohler, A., Symeonidi, A., Balestrini, R., Charron, P., Duensing, N., Frei dit Frey, N., Gianinazzi-Pearson, V., Gilbert, L. B., Handa, Y., Herr, J. R., Hijri, M., Koul, R., Kawaguchi, M., Krajinski, F., Lammers, P. J., Masclaux, F. G., Murat, C., Morin, E., Ndikumana, S., Pagni, M., Petitpierre, D., Requena, N., Rosikiewicz, P., Riley, R., Saito, K., San Clemente, H., Shapiro, H., van Tuinen, D., Becard, G., Bonfante, P., Paszkowski, U., Shachar-Hill, Y. Y., Tuskan, G. A., Young, P. W., Sanders, I. R., Henrissat, B., Rensing, S. A., Grigoriev, I. V., Corradi, N., Roux, C., y Martin, F. (2013). Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110:20117-20122.
- Tsai, S. M., y Phillips, D. A. (1991). Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1484-1488.
- Vierheilig, H., Bago, B., Albrecht, C., Poulin, M. J., y Piché Y. (1998). Flavonoids and arbuscular mycorrhizal fungi. In: Manthey J, Buslig B, editors. Flavonoids in the living system. New York: Plenum Press. p. 9-33.
- Vierheilig, H., Steinkellner, S., Khaosaad, T., y García Garrido, J. M. (2008). The biocontrol effect of mycorrhization on soil-borne fungal pathogens and the autoregulation of the AM symbiosis: one mechanism, two effects? In: Mycorrhiza: Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics. Ed. A Varma. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, pp 307-320.
- Voets, L., Dupré de Boulois, H., Renard, L., Strullu, D. G., y Declerck, S. (2005). Development of an autotrophic culture system for the *in vitro* mycorrhization of potato plantlets. *FEMS Microbiol Lett.* 248:111-118.
- Walker, C., Giovannetti, M., Avio, L., Citernesi, A. S., y Nicolson, T. H. (1995). A new fungal species forming arbuscular mycorrhizas: *Glomus viscosum*. *Mycologia Res.* 99:1500-1506.
- Xavier, L. J. C., y Germida, J. J. (2002). Response of lentil under controlled conditions to co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia varying in efficacy. *Soil Biol. Biochem.* 34:181-188.
- Zhang, S., Reddy, M. S., y J. W. Kloepper. (2004). Tobacco growth enhancement and blue mold disease protection by rhizobacteria: relationship between plant growth promotion and systemic disease protection by PGPR strain 90-166. *Plant soil.* 262:277-288.

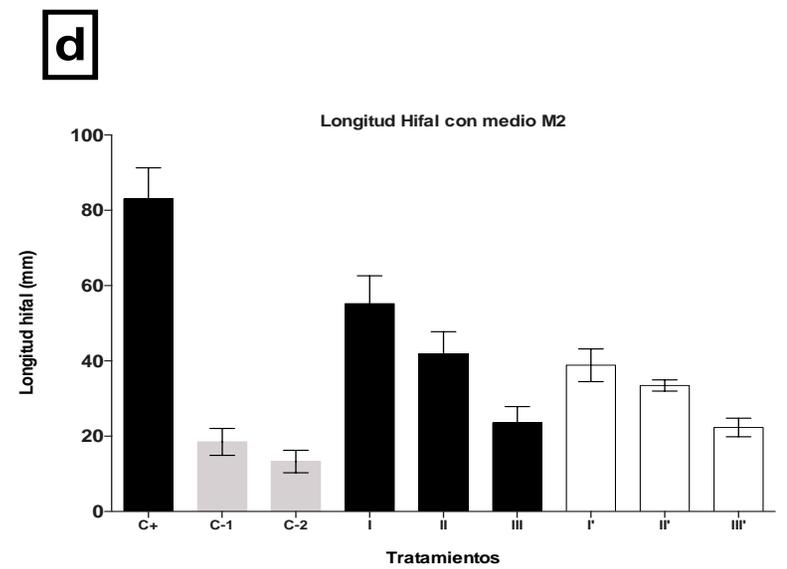
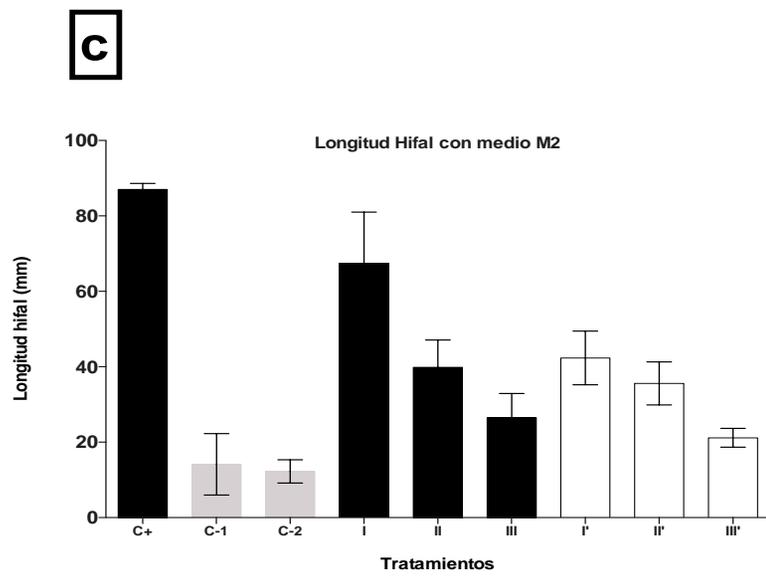
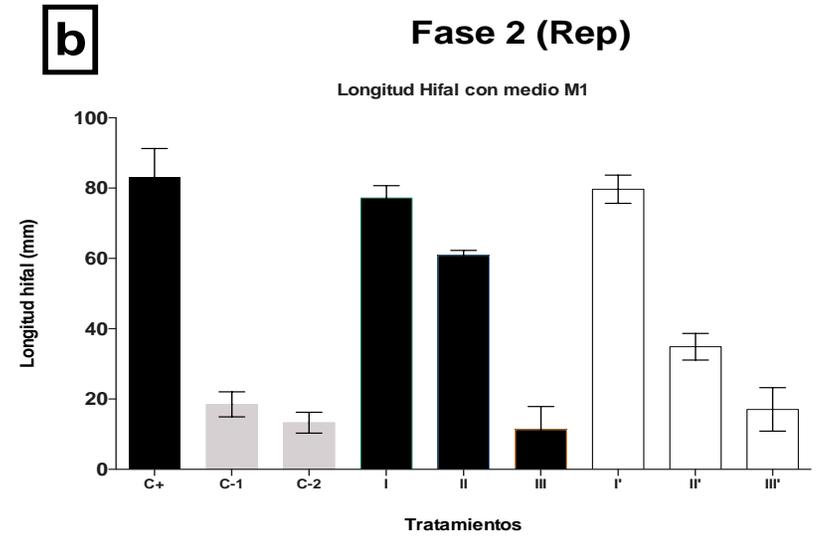
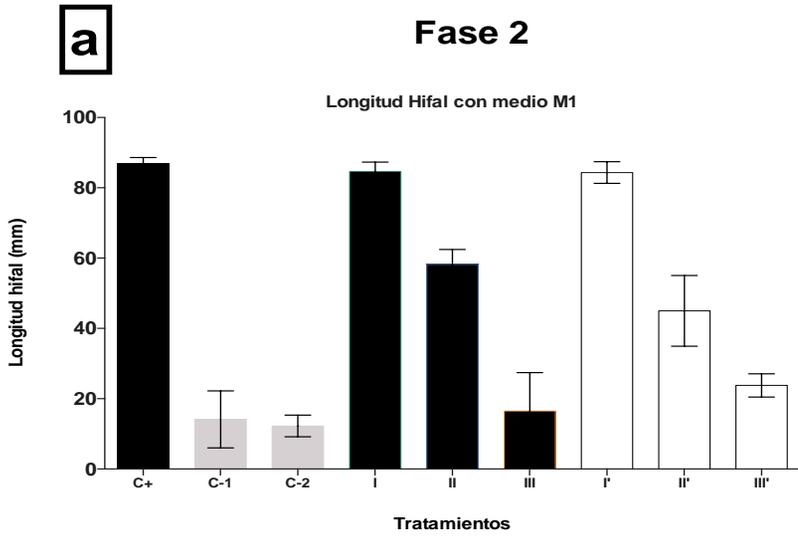
11. ANEXOS

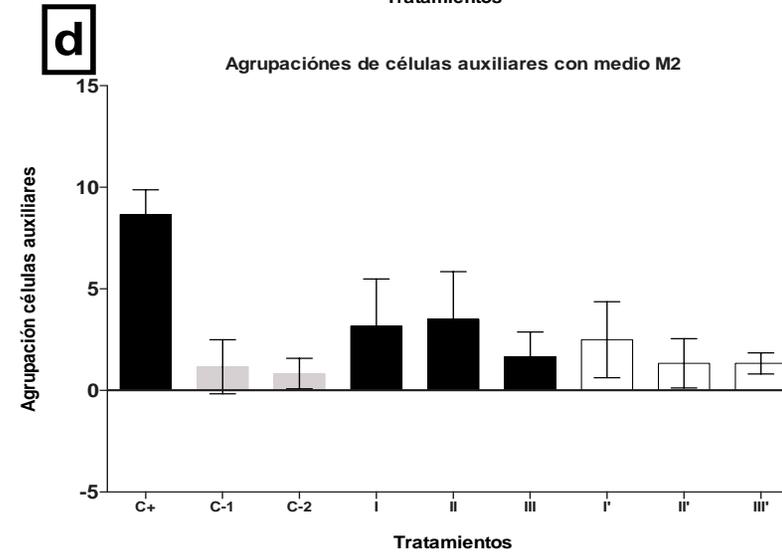
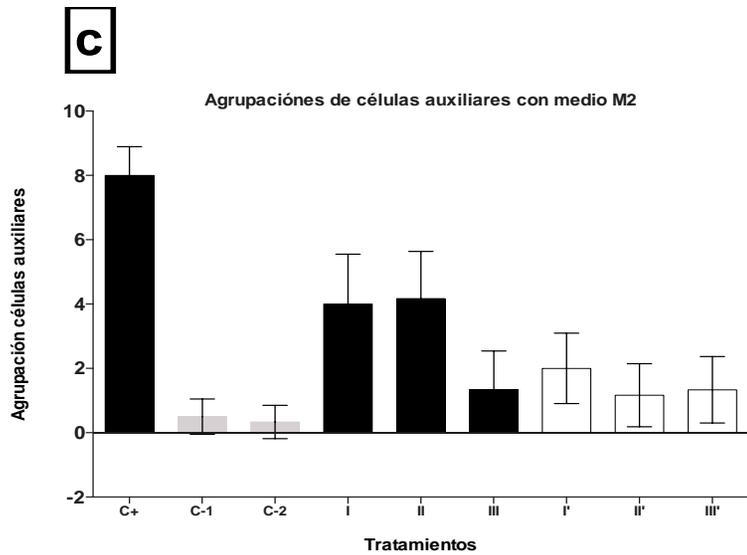
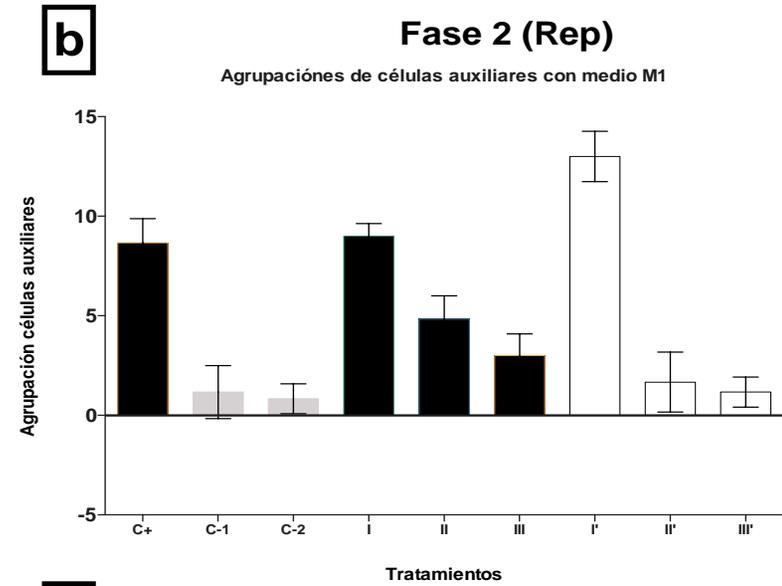
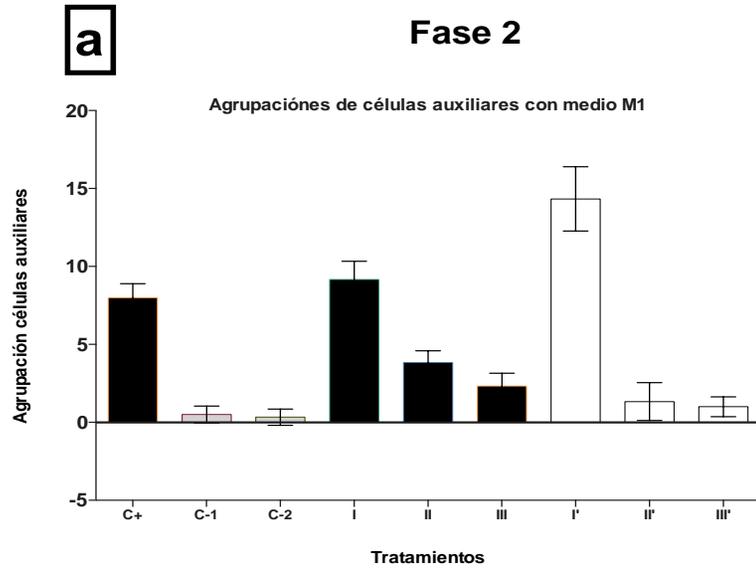


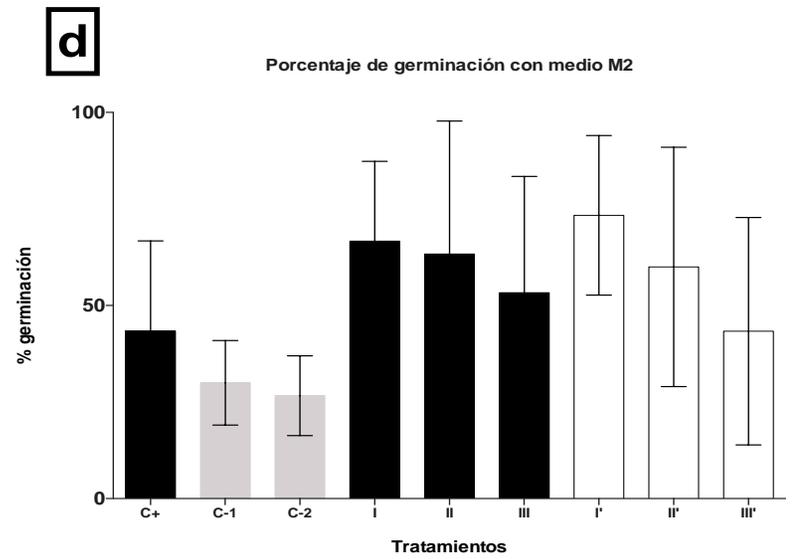
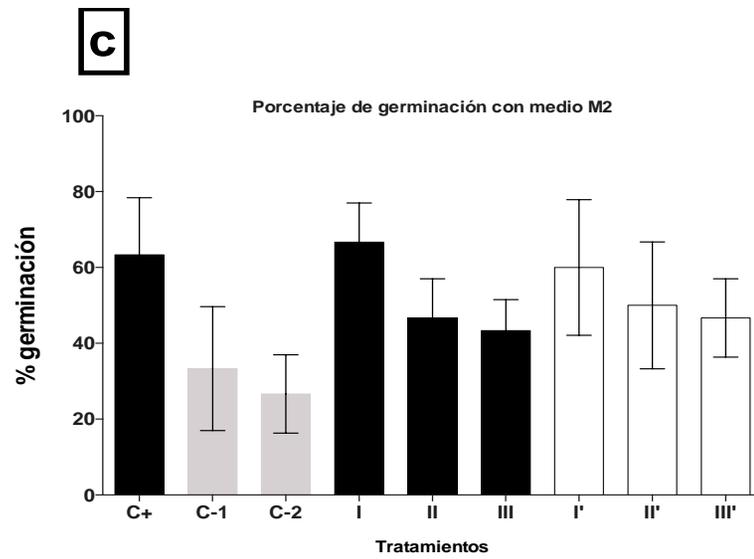
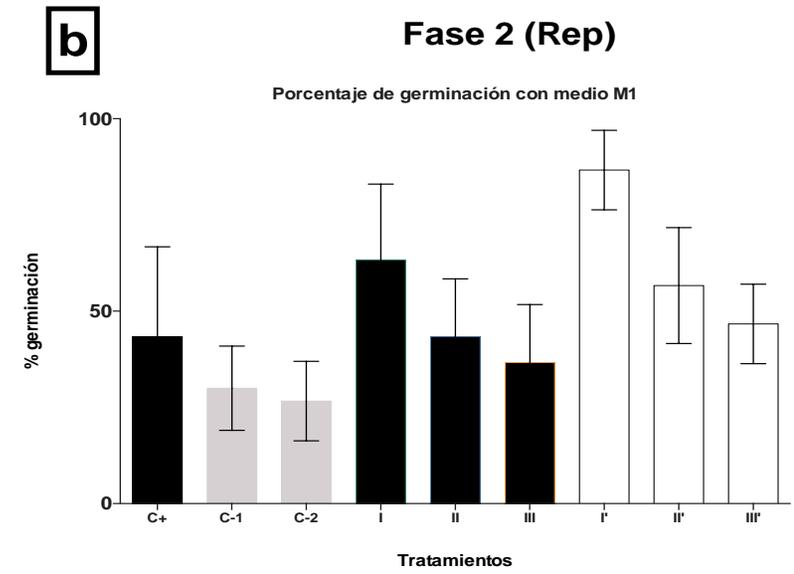
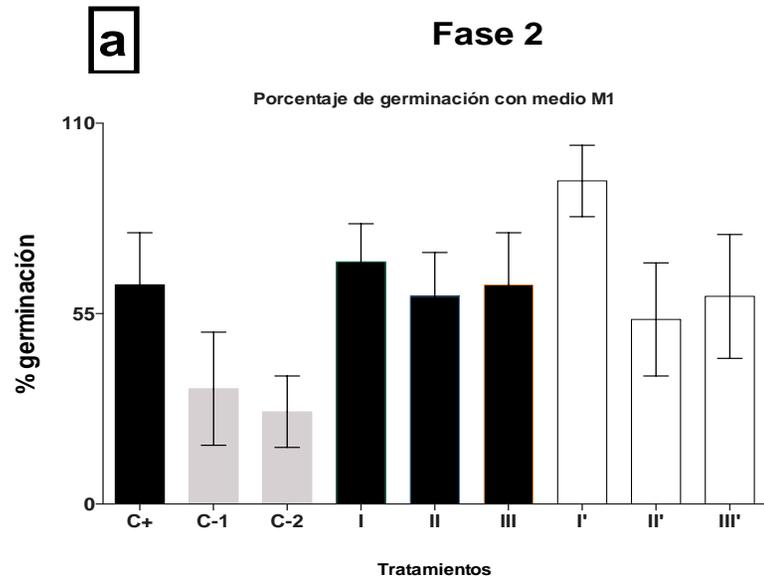


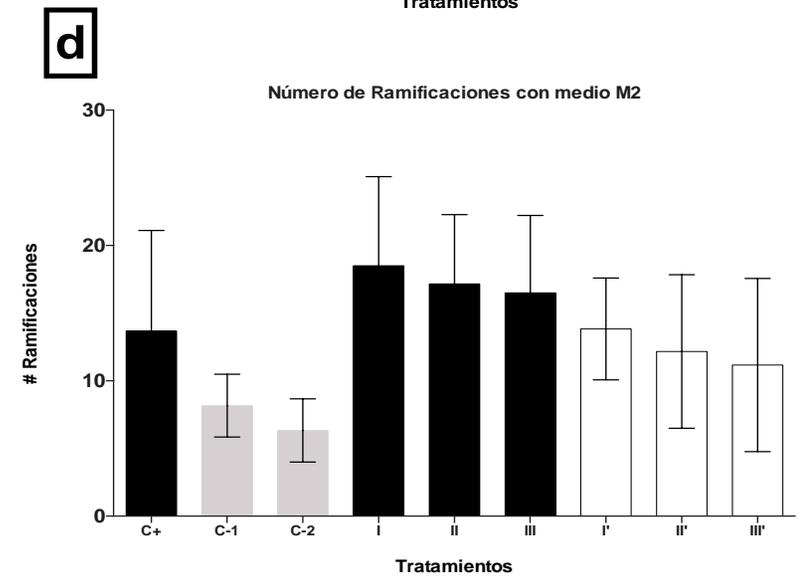
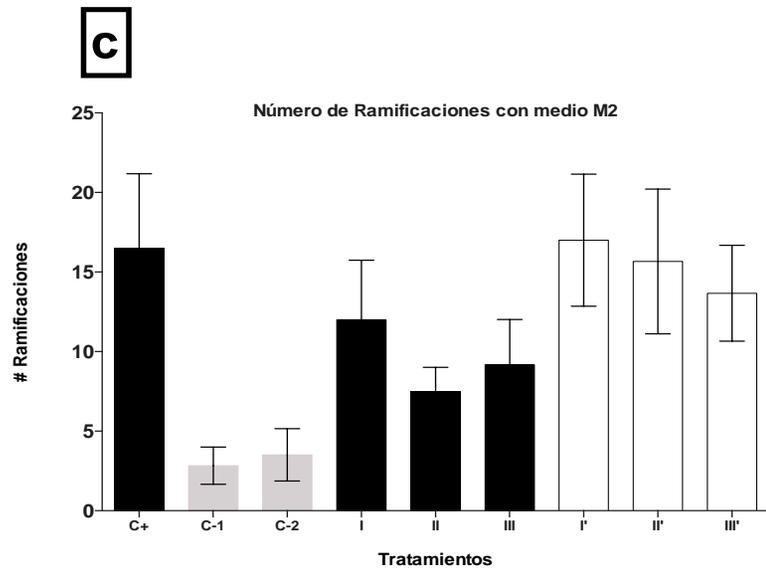
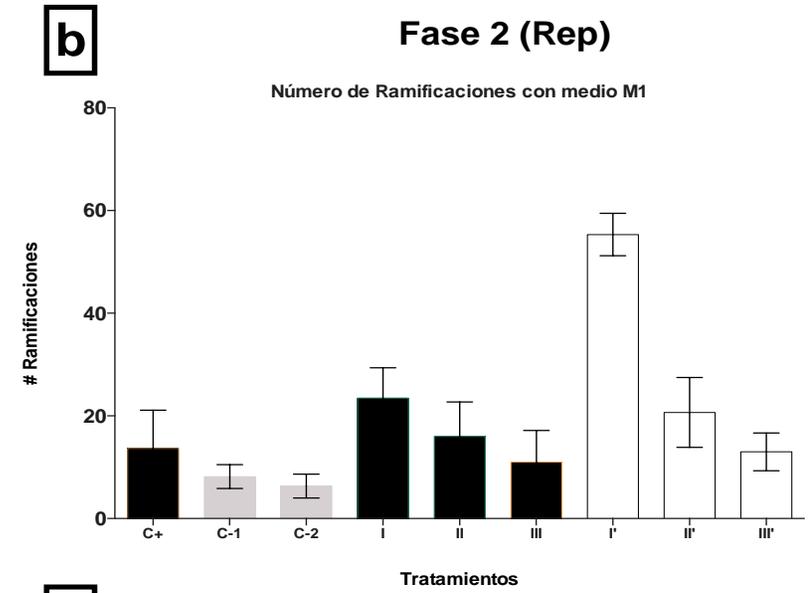
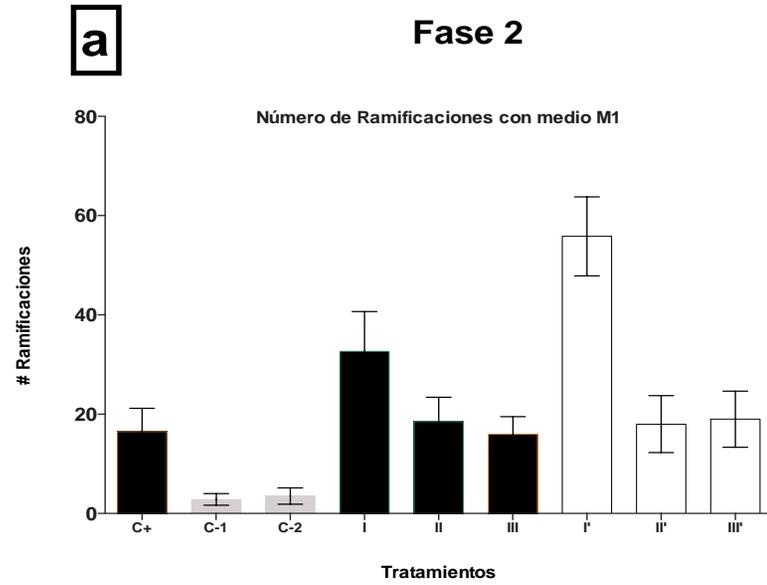


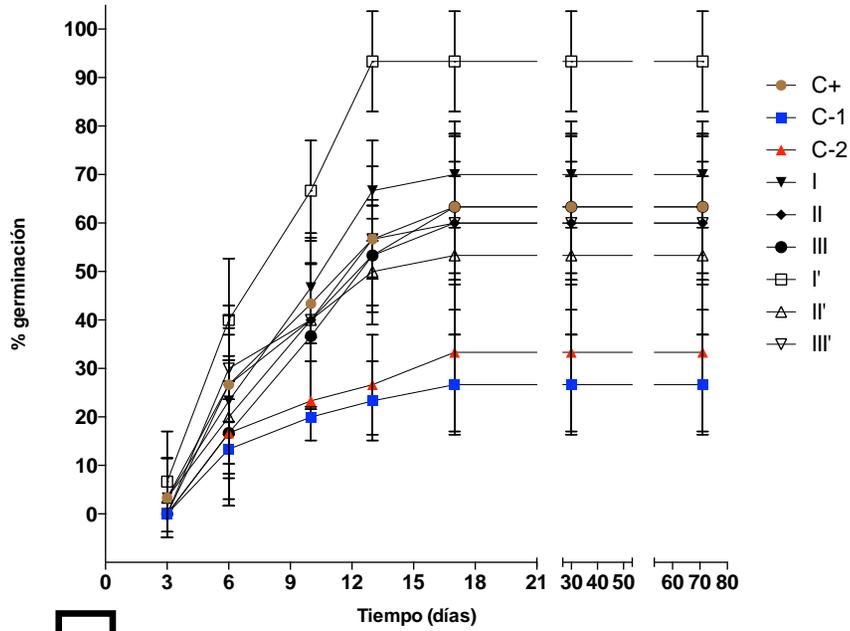
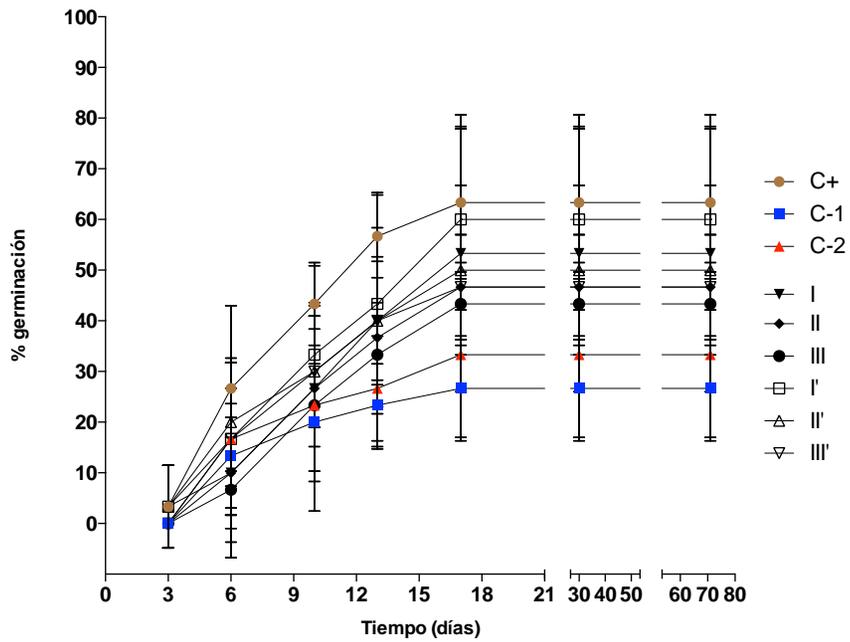
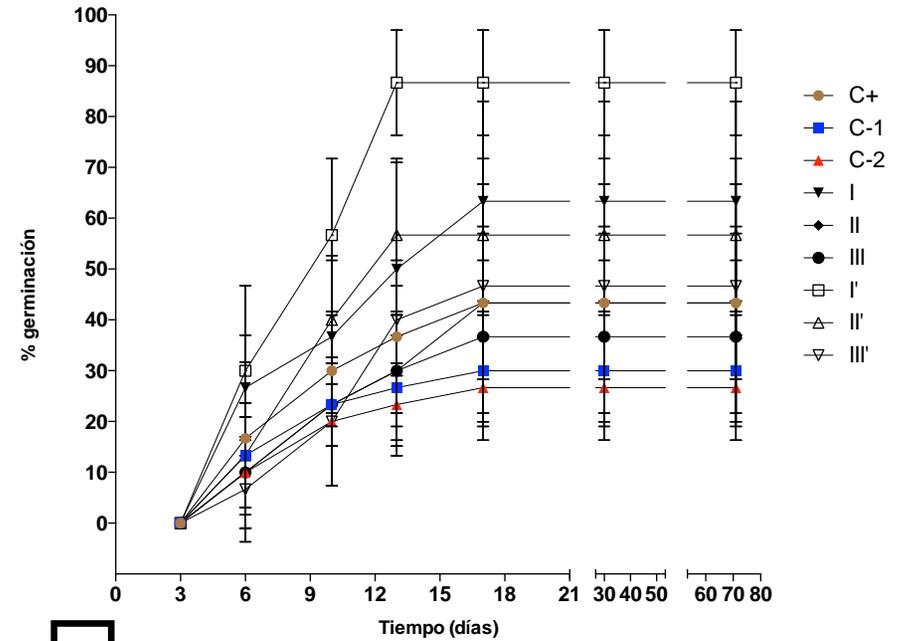










a**Fase 2***G. margarita* WV205A en medio M1**c***G. margarita* WV205A en medio M2**b****Fase 2 (Rep)***G. margarita* WV205A en medio M1**d***G. margarita* WV205A en medio M2