

00345

24



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

ENSAYO PARA PRODUCCION DE INOCULANTE DE HONGOS
MICORRIZICOS VESICULO-ARBUSCULARES (MVA)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS
(Biología Vegetal)

P R E S E N T A :

MA. BLANCA NIEVES LARA CHÁVEZ

DIRECTORA DE TESIS: M.C. LUCIA YOLANDA VARELA FREGOSO

MEXICO, D.F.

1998



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

*La ciencia no es sabiduría;
es conocimiento.
Sabiduría es conocimiento moderado por el juicio.*

Métraux Guy S. Y Francois Crouzet

Agradecimientos

Con respecto y admiración a mi directora de Tesis M. en C. Lucia Varela Fregoso, por ayudarme en todo el proceso para la realización del presente trabajo, por compartir su valioso tiempo y conocimientos conmigo, y brindarme su amistad, por continuar dándome su apoyo en mi formación como investigadora, gracias.

Al Dr. Arturo Estrada Torres, por su ayuda tan valiosa en la realización del presente trabajo, gracias por el tiempo y conocimientos compartidos conmigo.

Al Dr. Joaquin Cifuentes Blanco, Por su paciencia, amabilidad y sus valiosas sugerencias para evaluar y corregir mi trabajo cada semestre, como parte de mi comité tutorial.

A los sinodales, Dr. Francisco Javier Alvarez Sánchez, M. en C. Hermelinda Margarita Villegas Rios, M. en C. Guadalupe Vidal Gaona y M. en C. María Guadalupe Santiago Martínez. Por sus atinadas sugerencias en la revisión y corrección de mi trabajo.

Con Respeto y Cariño al M. en C. Ramón Martínez Barrera, por influir en mi formación como investigadora, por el apoyo brindado todo el tiempo que estuve realizando los estudios de Maestría. Por su impecable ejemplo.

Al M. en C. Salvador Aguirre Paleo por su apoyo constante e incondicional, en los momentos más difíciles, gracias.

A La Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, a la Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", al Departamento de Vinculación y a todas las personas que de una u otra forma colaboraron en mi formación profesional.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Ciencias, división de Estudios de Posgrado. A todos mis maestros de esta Institución.

A mis amigas Leticia Estrada Navarrete, Monica Aguilar Fernández, Sonia Alejandra Alvarez Santiago, Angelina Chemizo Checa, David Montiel y Hector, por estar siempre conmigo y tener amplia disponibilidad para ayudarme en diversos factores para la culminación de este trabajo.

A LOS SIGUIENTES LABORATORIOS

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional.
Laboratorio de Ecología Microbiana, donde se realizó la presente tesis.

Universidad Autónoma de Tlaxcala
Laboratorio de Micología del Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas.
En especial Dr. Arturo Estrada Torres por las fotografías tomadas y demás apoyos proporcionados.

Dedicatorias

A mi esposo Adrián y a mi hija Adriana, quienes han sido un gran estímulo en mi vida.

A mis padres: Nieves Chávez Garcilazo
José Lara Pérez.

Por todo su esfuerzo y confianza, que siempre me brindaron en la culminación de esta etapa de mi formación.

CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE CUADROS Y LÁMINAS	i
RESUMEN.....	ii
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Justificación.....	4
1.2 Objetivos.....	4
1.3 Meta	5
II ANTECEDENTES.....	6
2.1 Información general de los hongos micorrízicos arbusculares (MA).....	6
2.2 Cultivos puros	8
2.3 Cultivos <i>in vitro</i> de hongos micorrízicos arbusculares MA.....	9
2.4 Medios Nutritivos	14
2.5 <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	15
2.6 Inóculo de hongos micorrízicos arbusculares MA.....	17
III METODOLOGÍA	19
3.1 Muestreo.....	19
3.2 Propagación de esporas de hongos micorrízicos arbusculares (MA)	19
3.3 Extracción de esporas de hongos micorrízicos arbusculares.....	20
3.4 Establecimiento de cultivos monopecíficos.....	20
3.5 Identificación de especies de hongos micorrízicos arbusculares	21
3.6 Obtención de hospederos <i>in vitro</i>	21

3.6.1 Propagación de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	21
3.6.2 Desinfección de raíces de zanahoria	22
3.6.3 Infección con <i>Agrobacterium rhizogenes</i> en raíces de zanahoria.....	22
3.6.4 Cultivo de tejidos.....	23
3.6.5. Desinfección y selección de hongos micorrízicos arbusculares.....	24
3.6.6. Inoculación con los hongos micorrízicos arbusculares.....	25
3.6.7. Colonización.....	25
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
4.1 Propagación de hongos micorrízicos arbusculares.....	27
4.1.1 Macetas de propagación.....	27
4.1.2 Propagación y obtención de cultivos monoespecíficos.....	27
4.1.3 Identificación de especies de hongos micorrízicos arbusculares.....	28
4.1.4 Descripción de especies.....	29
4.1.5 Raíces transformadas.....	35
4.1.6 Cultivo de tejidos de raíces	36
4.1.7 Cultivo dual.....	36
VI CONCLUSIONES.....	52
VIII LITERATURA CITADA	54
APÉNDICES.....	66

ÍNDICE DE CUADROS Y LAMINAS

Cuadro 1. Lista de las especies encontradas e identificadas.....	44
Cuadro 2. Porcentajes de raíces transformadas de zanahoria colonizadas con <i>Glomus intraradix</i>	51
Lámina 1. Área de estudio	26
Lámina 2. Fotografías de las especies descritas.....	45
Lámina 3. Fotografías de las especies descritas	46
Lámina 4. Murogramas de las especies descritas.	47
Lámina 5. Cepa de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> y raíces transformadas provenientes de tubérculos de zanahoria.....	48
Lámina 6. Tubos germinativos de <i>Acaulospora</i> sp1 y desarrollo de micelio.....	49
Lámina 7. Raíces colonizadas con <i>Glomus intraradix</i>	50

RESUMEN

Se recolectaron diez muestras de suelo rizosférico de plantas de *Amelanchier denticulata* (HBK) Koch, procedentes de una área bajo disturbio del Cerro Tepecticpac, estado de Tlaxcala, México.

Para aumentar la población de hongos micorrízicos arbusculares se establecieron macetas de propagación. A los seis meses se extrajeron las esporas por la técnica de tamizado húmedo y decantación Gerdemann y Nicolson (1963) y cetrifugación en un gradiente de sacarosa 20 y 60% Daniels y Skipper (1982).

Con una parte de las esporas obtenidas se hicieron preparaciones permanentes para la identificación taxonómica de las especies encontrándose; *Glomus* sp.1, *Glomus* sp.2, *Glomus intraradix*, *Glomus geosporum*, *Sclerocystis* sp, *Acaulospora bireticulata*, *Acaulospora* aff. *foveata*, *Acaulospora rugosa*, *Acaulospora* sp, y *Scutellospora* sp.

Para la prueba de micorrización *in vitro* se utilizaron; *Acaulospora rugosa*, *Glomus* sp.1 y *Glomus intraradix*, y como plantas hospederas raíces transformadas de zanahoria y cultivo de tejidos de raíces de cebolla, ambos crecidas en medio nutritivo de White modificado (MWM) .

Las esporas de *Acaulospora rugosa*, germinaron, emitiendo varios tubos germinativos, con crecimiento de micelio, pero no hubo colonización de las raíces en ninguno de los dos hospederos (raíces transformadas de zanahoria y cultivo de tejidos de raíces de cebolla). En *Glomus* sp.1, no se observó germinación de las esporas ni indicios de desarrollo de las hifas. En el caso de *Glomus intraradix*, hubo germinación de las esporas, desarrollo de micelio, colonización de las raíces transformadas y producción tanto de vesículas como de arbusculos dentro de las células del hospedero, y formación de esporas en el medio nutritivo.

En cultivo de tejidos de raíces de cebolla aunque hubo germinación de las esporas y desarrollo de micelio no hubo colonización de las raíces.

I INTRODUCCIÓN

La micorriza es una asociación mutualista que se establece entre ciertos hongos del suelo y raíces de plantas superiores. Se trata de una simbiosis prácticamente universal, no sólo porque casi todas las especies vegetales son susceptibles de formarla, sino también por su ubicuidad en la mayoría de los hábitats naturales (Barea y Azcón-Aguilar, 1983).

El origen de las micorrizas parece ser tan antiguo como las propias plantas, como se deduce del estudio de los primeros registros fósiles de vegetales (370 millones de años), en los cuales se ha puesto de manifiesto la presencia de estructuras fúngicas similares a las de las actuales micorrizas arbusculares (MA) (Malloch *et al.* 1980; Nicolson, 1975; Stubblefield *et al.* 1987).

Existen varios tipos de micorrizas, pero la más extendida es la denominada micorriza arbuscular (MA), nombre que se asigna en virtud de las estructuras típicas que el hongo desarrolla en la corteza de la raíz.

La MA se caracteriza por una amplia ramificación del micelio que crece en el suelo, el cual se conecta en algunos puntos de la raíz de la planta hospedera para colonizarla. Ya en la raíz, el micelio crece entre y dentro de las células corticales desarrollando unas estructuras conocidas como arbuscúlos, los cuales se forman mediante ramificaciones repetidas de las hifas que van disminuyendo progresivamente de tamaño y presentan un área de contacto amplia entre el hongo y el plasmalema de la célula hospedera.

Las hifas internas contienen pequeñas vacuolas dentro de las que hay diminutos gránulos esféricos de polifosfatos que miden entre 0.1 a 0.2 micrómetros de diámetro. Se cree que estos gránulos se unen a las vacuolas para transportar el fosfato por medio de corrientes citoplasmáticas directamente de las hifas que se encuentran en el suelo a los arbuscúlos (Jackson y Mason, 1984).

Los arbuscúlos tienen una vida efímera (de 7-21 días) y terminan siempre por ser más o menos digeridos por el hospedero. En algunos casos se forman unos abultamientos intercalares o apicales en las hifas a las cuales se les ha llamado

vesículas. Inicialmente la pared de las vesículas es delgada pero se va engrosando paulatinamente y en su citoplasma se depositan lípidos. Se considera que las vesículas actúan como estructuras de reserva y algunas veces como propágulos de supervivencia cuando las raíces colonizadas mueren y se desintegran (Jackson y Mason, 1984).

La taxonomía de estos hongos se basa en las características de sus esporas; de acuerdo con Morton y Benny (1990), estos hongos se encuentran clasificados de la siguiente forma: pertenecen a la Clase Zygomycetes, Orden Glomales, este orden está constituido por dos subórdenes: Glomineae y Gigasporineae, el suborden Glomineae agrupa a las familias Glomaceae con los géneros *Glomus* y *Sclerocystis* y a la familia Acaulosporaceae con los géneros *Acaulospora* y *Entrophospora*. El Suborden Gigasporineae está constituido por una sola familia: Gigasporaceae con dos géneros, *Gigaspora* y *Scutellospora*.

En términos generales, se ha propuesto que los beneficios que aportan los hongos MA a sus plantas hospederas son los siguientes:

- 1). Incremento en la absorción de sales minerales
- 2). Incremento en la absorción de agua
- 3). Desarrollo más vigoroso
- 4). Resistencia a condiciones ambientales adversas como baja tensión de agua, pH y temperaturas extremas y altas concentraciones de metales pesados (Harley y Smith, 1983).

Con relación al desarrollo de las plantas, el papel de la micorriza al cual se le ha prestado mayor atención es el relacionado con la nutrición mineral, siendo el fósforo el nutrimento que más se ha estudiado en este sentido, no solamente porque es requerido por las plantas en grandes cantidades, si no también porque frecuentemente su concentración en la solución del suelo es muy baja (Baylis, 1967).

El hongo micorrízico es considerado como una extensión del sistema de la raíz, ya que una fina red de filamentos (hifas) exploran y extraen nutrimentos de un volumen del suelo más allá de los límites en que las raíces pueden hacerlo. Muchos de estos nutrimentos son translocados a través de la red de hifas de la micorriza

hasta los arbusculos donde son liberados a las raíces para ser utilizados por el hospedero; a cambio, el hongo recibe azúcares simples y probablemente otros compuestos derivados de la fotosíntesis del hospedero, (Molina y Trappe, 1984).

Diversos estudios han demostrado que la inoculación de las plantas con hongos MA no solamente es una práctica útil, si no que en algunos casos necesaria ya que hay especies de plantas que no se pueden desarrollar si no presentan esta asociación. Asimismo, los hongos MA son simbioses fisiológicamente obligados que no han podido ser aislados en cultivos puros y que necesitan estar colonizando a la raíz para poder completar su ciclo de vida (Bethelenfalvay, 1992).

Los estudios biológicos de los hongos MA se han dificultado en gran medida debido a sus relaciones de simbioses obligados con sus hospederos (Chabot *et al.* 1992). Se han hecho numerosos estudios con el objeto de investigar la influencia de determinados factores (físicos, químicos y biológicos), sobre la germinación de sus esporas, el crecimiento del micelio y la colonización a las plantas hospederas, con la finalidad de poder manipularlos *in vitro*. Estas investigaciones son prioritarias ya que permitirán introducir características bioquímicas como criterio taxonómico, realizar manipulaciones genéticas, clonación de los hongos más eficaces y facilitar la producción masiva de inóculo para su utilización en el campo (Azcón-Aguilar *et al.* 1991).

En años recientes, se han desarrollado algunos sistemas *in vitro* utilizando cultivo de tejidos de raíces en los cuales se ha logrado la colonización del hongo a su hospedero (Mosse y Hepper, 1975). Mugnier y Mosse (1987), modificaron esta técnica y utilizaron raíces genéticamente transformadas por el plásmido Ri (inductor de raíces) de *Agrobacterium rhizogenes* (Whiteman *et al.* 1987; Hamill *et al.* 1987), el rápido desarrollo *in vitro* y los requerimientos bajos en nutrimentos de estas raíces han dado la pauta a los investigadores para utilizar estos sistemas de cultivos duales en el establecimiento de hongos micorrízicos arbusculares y su hospedero.

Uno de los problemas que se presenta tanto en cultivo de tejidos como en raíces transformadas en estos sistemas duales es con relación al medio nutritivo debido a que si se le dan las condiciones al hongo simbiote se afecta el desarrollo de las raíces y si, se le dan las condiciones al hospedero se afecta el desarrollo del

hongo simbiote, por está razón se deben se deben estandarizar los medios nutritivos para que no se afecte a ninguno de los dos simbiotes.

Bécard y Fortin (1988) desarrollaron un medio mínimo para el establecimiento de sistemas duales *in vitro* en donde no se afecta a ninguno de los dos simbiotes (hongo y hospedero) y se puede utilizar tanto en cultivo de tejidos de raíces como en raíces genéticamente transformadas (Whiteman *et al.* 1987).

Chabot *et al.* (1992) utilizaron este medio mínimo con un sistema de raíces transformadas genéticamente, el de cultivo de tejidos de raíces y el hongo simbiote *Glomus intraradix*, completando el ciclo de vida de este simbiote.

La utilización de hongos micorrízicos arbusculares y su manipulación *in vitro* con la finalidad de producir inóculo para utilizarse en ecosistemas seriamente perturbados puede ayudar en gran medida para una recuperación más rápida mediante la reforestación con árboles y arbustos que esten ya micorrizados desde el vivero con especies de hongos micorrízicos arbusculares eficaces para estas zonas.

1.1 Justificación

Debido al manejo inadecuado de los recursos naturales, la República Mexicana presenta un gran número de áreas con un alto grado de perturbación y en vías de desertificación. Los hongos micorrízicos arbusculares adquieren singular relevancia en su recuperación, ya que la utilización de cepas nativas es una buena alternativa para asegurar el proceso de revegetación, ya que las especies de este grupo fúngico son ubicuistas, cosmopolitas y capaces de colonizar los ecosistemas mas dispares. No obstante, el uso de estos hongos está fuertemente limitado por el momento, por la incapacidad de poder producir inoculante a gran escala, por lo que es necesario buscar nuevas alternativas que nos permitan obtenerlo en forma más rápida y económica.

1.2 Objetivos

- a). Aislar y propagar hongos micorrízicos arbusculares de un área bajo disturbio.
- b). Identificar los hongos micorrízicos arbusculares (MA) aislados.

c). Colonización *in vitro* con hongos micorrízicos arbusculares en cultivo de tejidos de raíces de cebolla, *Allium cepa* y raíces transformadas obtenidas a partir de raíces de zanahoria inoculados con la bacteria *Agrobacterium rhizogenes*.

1.3 Meta.

Lograr la colonización *in vitro* de raíces con especies de hongos MA , como un ensayo preliminar para obtener inóculo de estos hongos.

II ANTECEDENTES

2.2 Información de los hongos micorrizicos arbúsculares (MA)

El término micorriza fue acuñado por Frank en 1885 y literalmente quiere decir "hongo-raíz"; define la asociación mutualista entre el micelio del hongo y las raíces de una planta (Harley y Smith, 1983).

Las micorrizas arbusculares (MA) se encuentran casi en la totalidad de las familias de las plantas vasculares (Trappe, 1987) y sin duda son las más extendidas entre las especies vegetales (Barea *et al.* 1991; Harley y Smith, 1983; Malloch *et al.* 1980; Trappe, 1987; Newman y Reddel, 1987).

La presencia y distribución de este tipo de micorrizas ha sido estudiada en una gran diversidad de hábitats naturales y comunidades vegetales (Abbot y Robson, 1977; Janos, 1984; Sanders, 1990; Sparling y Tinker, 1975), su importancia ecológica es enorme ya que hay especies de plantas nutricionalmente dependientes de esta simbiosis.

Este tipo de micorriza, está formada por el 90% de las familias de plantas que se encuentran poblando la superficie terrestre (Trappe, 1987); están presentes virtualmente en todos los tipos de hábitat, excepto en aquéllos en donde prevalece otro tipo de micorriza como la ericoide, ectomicorriza, arbutoide, o de otro tipo (Harley y Harley, 1987; Mosse *et al.* 1981).

En general las micorrizas favorecen la captación de agua y nutrientes minerales, especialmente fósforo y nitrógeno del suelo (Bowen, 1973), debido a la mayor habilidad que tienen los hongos en este sentido. También se ha confirmado mediante el uso de isótopos marcados que elementos como K, Ca, S, Zn, Cu y Sr, son absorbidos por las células fúngicas y transportados hasta la planta simbiote (Bowen, 1973; Gianinazzi-Pearson y Azcon-Aguilar, 1991; Harley y Smith, 1983; Mejsstrik y Krause 1973; Rygiewiz y Bledsoe, 1984; Thompson y Medue. 1984).

La estimulación del crecimiento en las plantas micorrizadas no se limita a una mejora nutricional, sino también a la inducción de fitohormonas por parte del hongo hacia la planta, siendo éste uno de los efectos indirectos que ayudan al buen desarrollo del vegetal micorrizado (Allen *et al.* 1980; Harley y Smith, 1982, 1983; Slankis, 1973), además mejoran la estructura del suelo (Thomas y Jackson, 1983) y protegen a la planta contra patógenos (Bagyaraj, 1984; Graham, 1986; Linderman, 1988; Marx, 1973; Perrin, 1985; Schenck, 1981; Schonbeck, 1979).

Las esporas de los hongos MA son estructuras muy grandes que se forman a partir del micelio externo y la diferencia en la estructura de las paredes de la espora es de vital importancia para la identificación de las especies.

Las esporas de los hongos MA se encuentran principalmente entre los 15 y 30 cm de la superficie del suelo decreciendo su número marcadamente a menos de 15 cm de la superficie (Bagyaraj, 1991; Redhead, 1980) y normalmente no se encuentran más allá del área de las raíces de las plantas, por lo que el mayor número de esporas, esporocarpos y raíces conteniendo micelio lo vamos a encontrar en la parte que comprende la rizósfera de las plantas (Mosse *et al.* 1981).

El micelio, por su parte, se extiende y ramifica abundantemente en el exterior de la raíz, por el suelo, de donde obtiene los nutrimentos minerales, que trasloca hasta los arbusculos donde se produce el intercambio de nutrientes para ambos simbioses (Olivares y Barea, 1991).

Los hongos MA se encuentran asociados con plantas de interés forestal, agrícola y ornamental. Solamente unas pocas familias botánicamente importantes como son las Cruciferae, Chenopodiaceae y Cyperaceae, incluyen especies no micorrizicas, (Allen, 1991; Harley y Harley, 1987; Honrubia *et al.* 1992; López-Sánchez y Honrubia, 1992).

En varios cultivos de plantas se ha demostrado que la inoculación con hongos micorrizicos incrementa la producción de biomasa, (Hayman y Mosse, 1979; Howeler y Sieverding, 1983; Islam *et al.* 1980; Khan, 1972; 1975; Kuo y Huang, 1982;; Powell y Metcalf. 1980; Saif y Khan, 1977).

Estos organismos adquieren singular relevancia en suelos alterados, erosionados, en vías de desertificación o con actividades mineras (Allen, 1984; Daft *et al.* 1975; Gemma y Koske, 1990; Reeves *et al.* 1979), donde las plantas representan los primeros estadios de vegetación natural. En tales ambientes hostiles, la presencia de estos hongos facilita el establecimiento de sus hospedantes vegetales asegurando su nutrición mineral y supervivencia. Una de las características de las micorrizas arbusculares es que, la raíz micorrizada no presenta cambios morfológicos y la colonización se produce a nivel de la corteza radical (Jackson y Mason, 1984).

Por su condición de simbioses fisiológicamente obligados, los hongos MA no han podido ser aislados en cultivos *in vitro*, ya que necesitan estar colonizando la raíz de una planta hospedera para llevar a cabo su ciclo de vida (Azcón-Aguilar *et al.*, 1991). La fuente de inóculo de los hongos MA consiste de esporas, esporocarpos, raíces colonizadas y micelio (Ferguson y Woodhead, 1982), por lo que todas estas estructuras del hongo pueden ser usadas como fuente de inóculo que se puede probar en diferentes especies de plantas.

2.2 Cultivos puros

Una forma de producir inóculo puro en invernadero, es mediante cultivos puros, en los cuales las esporas son usadas como fuente de inóculo debido a que son relativamente fáciles de aislar del suelo; sin embargo este tipo de inóculo sólo es adecuado para experimentación o para producción de plantas en almácigo, ya que su obtención a gran escala no ha sido técnicamente resuelta.

Por otro lado, las raíces colonizadas por hongos MA contienen tanto micelio externo como interno y su efectividad es mayor que la de las esporas (Barea, y Azcón-Aguilar, 1983; Ferguson, y Woodhead, 1982). La forma más simple de obtener esta fuente de inóculo es recolectar en campo raíces colonizadas por hongos MA, sin embargo, este proceso no es más apropiado ya que además de la posibilidad de introducir fitopatógenos, se desconoce la efectividad del inóculo (Varela, comunicación personal).

En la actualidad se han hecho diversas pruebas con la finalidad de obtener cantidades considerables de inóculo, una de ellas es mediante cultivos puros; la

producción de inóculo de diferentes especies de hongos MA, mediante esta técnica, la cual se lleva a cabo preparando, macetas con una mezcla de suelo/arena (1:1) la cual es esterilizada a vapor durante una hora, donde posteriormente se siembran plantas trampa (son plantas que presentan muy poca especificidad para asociarse con los hongos MA) (Secilia y Bagyaraj, 1988).

Las esporas generalmente se desinfectan superficialmente antes de ser inoculadas a la planta trampa, ya que comúnmente presentan micoparásitos y otros microorganismos asociados, (Schenck y Nicolson , 1977; Watrud, 1982). Estas macetas se mantienen en invernadero por varios meses, realizando revisiones periódicas hasta que se observa la propagación, sin embargo son susceptibles de contaminarse con esporas de otras especies de hongos MA (Sylvia, 1984).

El mantenimiento de los cultivos puros de hongos MA, no es sencillo y se presentan serias dificultades ya que se requieren técnicas laboriosas que implican constantes cuidados además de ocupar grandes espacios y consumo de tiempo (Dalpé y Mitrow, 1990; Douds y Schenck, 1990).

2.3 Cultivos *in vitro* de hongos micorrizicos arbusculares MA

Otra alternativa para la producción de inóculo de hongos MA es mediante cultivos *in vitro*. Estos han sido un importante desafío para la ciencia, sin embargo los cultivos de estos hongos en total ausencia del hospedero no se ha logrado aún. En métodos empíricos se han utilizado diversos cultivos incluyendo extractos y exudados de raíces, los cuales han logrado estimular la germinación y el desarrollo del micelio, pero nunca se ha establecido un cultivo permanente (Hepper, 1984).

En la mayoría de los casos se utilizan esporas esterilizadas superficialmente como material de partida, tratando de dar las condiciones (físicas, químicas y biológicas) que prevalecen en su hábitat natural (Olivares y Barea , 1991).

En general se ha observado que los hongos MA crecen mejor en condiciones aerobias; esto se ha comprobado mediante experimentos realizados con *Glomus mosseae* donde se observó que la extensión de la hifa es inhibida en concentraciones

de oxígeno atmosférico menores al 3%, sucediendo de igual manera a altas concentraciones de CO₂.

También se han estudiado los efectos de la aplicación de fuentes de nutrimentos de naturaleza muy variada, con relación a la estimulación de la germinación de las esporas y crecimiento del micelio, observándose diferentes respuestas desde la inhibición de la germinación, hasta abundante germinación y desarrollo de micelio, etc. (Hepper, 1984; Siqueira, 1987).

De las fuentes de carbono probadas, se ha encontrado que varios ácidos orgánicos estimulan el crecimiento de *Glomus mosseae*, pero ciertos carbohidratos, tales como la maltosa, celulosa, sacarosa y glucosa muestran un efecto inhibitorio; (Koske, 1981a; Mosse, 1970; Siqueira y Hubbell 1986).

En *Gigaspora margarita* sin embargo, el desarrollo del tubo de germinación fue estimulado en presencia de sacarosa, (Siqueira *et al.* 1987). También se ha experimentado con algunos aminoácidos como la cistina, glicina y lisina y se ha observado que en el caso de *Glomus calendonium*, el crecimiento de las hifas se incrementó en su presencia, siendo la lisina el más efectivo de los aminoácidos ensayados (Hepper y Jakobsen, 1983).

También se ha investigado el efecto de la cisteína, mostrándose que este aminoácido produce una notable estimulación del crecimiento del micelio generado a partir de esporas de *Glomus calendonium* y *Glomus mosseae* (García-García, 1989). Se ha estudiado asimismo la influencia de algunas vitaminas, concretamente tiamina, biotina y ácido nicotínico, siendo la primera en la que se observa mayor producción del micelio (Hepper, 1979).

Con respecto a las sales minerales, las más estudiadas han sido las de fosfato, siendo en general inhibitorias del desarrollo del micelio (Hepper y Jackobsen, 1983), aunque en algunos casos se han descrito estimulaciones de las mismas, en cuanto al nitrógeno, tanto en forma de amonio como de nitrato, parece ejercer un efecto negativo en el desarrollo del micelio (Siqueira, 1987).

La influencia de los compuestos azufrados sobre el desarrollo de los hongos MA, ha sido estudiada con cierta profundidad en *Glomus calendonium* y *Glomus mosseae*, poniéndose de manifiesto el incremento en el desarrollo del micelio a partir de esporas previamente germinadas, las formas que indujeron los más altos desarrollos miceliares, fueron sulfatos, tiosulfatos y metabisulfatos (Hepper, 1984).

Con respecto al efecto de la adición de distintos elementos minerales, se ha puesto de manifiesto que el cobre, el zinc y el aluminio, ejercen una inhibición sobre el desarrollo del micelio (Barkdoll y Schenck, 1986; Hepper y Smith, 1976; Siqueira *et al.* 1984). Igualmente, se ha ensayado la influencia de aportes nutritivos más complejos, tales como extractos de suelo y exudados radicales; donde se ha observado que el efecto del extracto de suelo depende en gran medida del método seguido para su obtención, aunque en algunas ocasiones se han descrito incrementos en el crecimiento del tubo germinativo, atribuyéndose éste efecto a la fracción proteica del suelo. (Siqueira y Hubbell, 1986).

En cuanto al efecto de los exudados radicales, se ha demostrado que su aplicación es benéfica en algunos casos, pero que en concentraciones altas puede ser negativa. (Elías y Safir, 1987; Graham, 1982). Koske (1982), describió una sustancia volátil de los sistemas radicales de judía y maíz, capaz de atraer los tubos germinativos de *Gigaspora gigantea*.

Una característica común de la rizósfera de las plantas, es la presencia de poblaciones activas de microorganismos, por lo que se pensó que éstas podían jugar un papel importante en la estimulación del desarrollo de los hongos micorrízicos arbusculares cuando se encuentran en las proximidades de la raíz. (Azcón-Aguilar *et al.* 1985).

En efecto, en varios estudios se ha puesto de manifiesto una considerable estimulación del crecimiento de determinados microorganismos habitantes comunes del suelo; este efecto no parece estar limitado a un grupo determinado de microorganismos, puesto que ha sido descrito para varios hongos (Azcón-Aguilar *et al.* 1986a,b; Calvet *et al.* 1988) y bacterias (Azcón-Aguilar, 1987; Mayo *et al.* 1986), incluyendo actinobacterias (Mugnier y Mosse, 1987), por lo que parece tratarse de un

efecto generalizado a la mayoría de los grupos microbianos del suelo (Azcón-Aguilar *et al.* 1986a).

En años recientes la utilización de cultivo de tejidos de raíces genéticamente transformadas con el plasmido Ri (inductor de raíces) de *Agrobacterium rhizogenes*, ofrece nuevas alternativas a las investigaciones que tienen como objetivo completar el ciclo de vida de estos hongos simbiotes, para obtener inóculo *in vitro*, estudiar los factores físicos, químicos, biológicos así como algunos elementos bioquímicos que influyen en el desarrollo de la simbiosis (Bécard y Fortin, 1988; Bécard y Piché 1989b; Chabot *et al.* 1992; Mosse y Hepper, 1975; Mugnier y Mosse, 1987). Estos métodos se han visto como una buena alternativa, especialmente el uso de raíces genéticamente transformadas debido a su rápido desarrollo *in vitro*.

Mosse y Hepper (1975) reportaron el uso de cultivo de tejidos *in vitro* de raíces de *Trifolium pratense* L. inoculado con esporas de *Glomus mosseae*, obteniendo la colonización típica a los 28 días, sin embargo debido a que fue ajustado el contenido de sacarosa y el pH del medio de cultivo a la tolerancia del hongo, el desarrollo de las raíces fue muy lento y no hubo bastante micelio externo.

Mugnier y Mosse (1987) hicieron una modificación al sistema propuesto por Mosse y Hepper (1975), utilizando raíces transformadas de *Convolvulus sepium* L. y el hongo micorrízico *Glomus mosseae*, obteniendo la colonización de las raíces además de observar micelio, arbuscúlos y vesículas; aunque su sistema no fue totalmente reproducible debido a que no se estandarizó el medio de cultivo para ambos simbiotes.

Mosse (1988), observó que el desarrollo de *Glomus intraradix* en cultivos *in vitro*, tenía cierta dependencia con su hospedero, de lo cual dedujo que la utilización de cultivo de tejidos en estos sistemas tiene un potencial poco estudiado.

Bécard y Fortin (1988) desarrollaron un sistema simple y reproducible para el estudio de hongos MA, basado en la colonización *in vitro* de raíces transformadas de zanahoria inoculadas con *Gigaspora margarita* y el medio mínimo de White (MMW) que ellos mismos estandarizaron a partir del medio formulado por White (1954), en el cual redujeron la sacarosa y eliminaron el sulfato de sodio y el fosfato de sodio debido

a sus efectos negativos en los procesos de colonización; el establecimiento de la micorriza depende en gran medida de la presencia o ausencia de estos elementos, ya que anteriormente se habían detectado los efectos negativos del fósforo en los procesos de colonización de los hongos micorrízicos arbusculares a sus plantas hospederas (Baylis, 1967; Mosse y Phillips, 1971).

Chabot *et al.* (1992) lograron que *Glomus intraradix* completara su ciclo de vida utilizando raíces genéticamente transformadas de zanahoria (*Daucus carota* L.) y cultivo de tejidos de raíces de jitomate (*Lycopersicon sculentum* Mill.) como plantas hospederas y el medio nutritivo de White (Bécard y Fortin, 1988). El desarrollo del hongo se inició con la emisión de tubos germinativos y posteriormente la formación de una red de hifas de micelio y la observación de estructuras dentro de la raíz como micelio, vesículas y arbusculos dentro de las células, aunque el sistema tuvo sus limitaciones por contaminación y algunos otros factores que no se lograron controlar totalmente, el porcentaje de colonización fue de un 10% en ambos hospederos, produciéndose 100 esporas por caja de petri, de las cuales el 70% fueron viables.

Bécard y Piché (1992) desarrollaron un sistema donde utilizaron el hongo simbiote *Gigaspora margarita* y como hospederos raíces genéticamente transformadas de zanahoria (*Daucus carota* L.), el cultivo de tejidos de raíces de jitomate (*Lycopersicon sculentum*, Mill.) y el medio nutritivo de White modificado por Bécard y Fortin (1988), sustituyeron además el Bacto-Agar por el Gel-Gro, el cual permite un mejor desarrollo de las raíces y contiene muy bajo porcentaje de impurezas, dejando el medio nutritivo completamente transparente. En este sistema se obtuvieron porcentajes de colonización en cultivos jóvenes hasta de 50% y 40% en cultivos viejos.

Debido a la transparencia del medio nutritivo el sistema no se destruyó y se observó directamente con una lente para ir siguiendo el proceso de colonización desde que se emitieron los tubos germinativos por las esporas hasta la formación de estructuras dentro de la raíz como son; micelio intercelular, algunas vesículas y arbusculos. Al año de establecido este experimento se produjo 500 esporas hijas viables a partir de 3 esporas madres por caja Petri, de ahí la importancia de este sistema ya que las esporas pueden ser tomadas directamente sin tanta manipulación

ya sea para emplearse directamente como inóculo o bien para el establecimiento de otros cultivos duales con diferentes objetivos.

De hecho, el uso de cultivo de tejido de raíces y raíces genéticamente transformadas presentan muy buenas perspectivas para el futuro, ya que éstos pueden ser utilizados como un modelo simplificado de la rizósfera para estudios ecológicos, físicos y de ontogenia entre otros, donde son controlados todos los parámetros, usándose como bioensayos que permitan la investigación de numerosos efectos ambientales extremos (como metales pesados, compuestos tóxicos, temperaturas y pH extremos, simulación de lluvia ácida, pesticidas, etc.), que influyen directamente en el establecimiento de la colonización con hongos MA.

Para iniciar el cultivo de raíces, se requiere, primeramente que las semillas estén bien desinfectadas. Uno de los estándares para la esterilización superficial de la semilla es sumergiéndolas en una solución 1-3% de hipoclorito de sodio, por treinta minutos a temperatura ambiente, se pueden utilizar otras soluciones para desinfectar, pero en cada una se usan diferentes tiempos de inmersión; la desinfección superficial puede ser mejorada con pretratamientos con etanol (1-2 minutos) y/o con un surfactante (Tween 20 u 80), la meta es llevar a cabo una desinfección que no afecte la germinación. (Butcher, 1980).

Las semillas pueden ser germinadas en la oscuridad, en cajas Petri conteniendo papel filtro húmedo o bien en agua-agar, o si es posible en un medio microbiológico para detectar de inmediato los contaminantes, una vez que emerge la radícula se cortan las hojas cotiledonales y se pasa al medio nutritivo ya sea líquido o sólido; después únicamente se van clonando y manteniendo *in vitro* usando medio nutritivo (White, 1954).

2.4 Medios nutritivos

El medio nutritivo de White fue primeramente utilizado para desarrollar raíces de jitomate y desde entonces se ha usado como un punto de partida como medio de desarrollo para otras especies; es un medio completamente definido que contiene macro y microelementos, vitaminas y sacarosa como fuente principal de carbono; ha sido modificado por Boll y Street (1951) quienes adicionaron cobre y molibdeno y por

Sheat *et al.* (1959) fide Bécard y Piché, (1992) quienes sustituyeron el sodio por el hierro, adicionándolo en una preparación de FeEDTA. El pH del medio debe ser 7.5.

A pesar de lo mencionado con anterioridad, el cultivo de tejidos de raíces de algunas especies de plantas aún no se ha podido desarrollar *in vitro*. Especialmente en algunas especies arbóreas, monocotiledóneas y Gimnospermas no se han encontrado los medios ni las condiciones adecuadas para el desarrollo de las raíces (Butcher y Street, 1964).

Como una evidencia más se sabe que si se le agregan al medio algunas sustancias como azúcar, alcohol, mio-inositol, se mejora el desarrollo de las raíces en general (Goforth y Torrey, 1977). Algunas veces el desarrollo de las raíces se puede mejorar adicionando al medio de cultivo sustancias reguladoras del crecimiento como las auxinas naturales, o sustancias sintéticas que tienen un modo de acción similar (Lazzeri y Dunwell, 1984).

2.5 *Agrobacterium rhizogenes*

Recientemente se ha avanzado en el cultivo *in vitro* de raíces, especialmente en cultivo de raíces genéticamente transformadas y desarrolladas mediante la infección a plantas con *Agrobacterium rhizogenes*. Esta bacteria pertenece a la familia Rhizobaceae; es reportada como patógeno de plantas ocasionando: agalla de la corona, agallas en ramas nuevas, agalla de la caña y raíz pilosa, (Agris, 1985).

Agrobacterium rhizogenes fue descubierta por Smith y Townsed en 1907; (Riker *et al.* 1930; fide Whiteman *et al.* 1987) y desde entonces ha sido objeto de numerosos estudios debido a sus efectos morfogenéticos en las plantas, como patógeno, como posible inductor del desarrollo de ciertas plantas transgénicas y por su gran número de hospederos en plantas dicotiledóneas (Whiteman *et al.* 1987).

Agrobacterium rhizogenes inserta parte de su plásmido Ri inductor de raíces en las células de las plantas sensibles. Actualmente se han reportado alrededor de 100 especies de plantas dicotiledóneas susceptibles a ser infectadas por *Agrobacterium rhizogenes* (Tepfer, 1989), y se siguen reportando cada vez más plantas hospederas a esta bacteria debido a la importancia que han tomado los

estudios sobre producción de plantas transgénicas, producción de opinas, y utilización de las raíces producidas por este método en diferentes técnicas, como la producción de metabolitos secundarios, entre otros (Hamill et al, 1987).

Esta bacteria es un patógeno oportunista habitante del suelo y la penetración en plantas en el campo es mediante heridas ocasionales que los mismos agricultores hacen con los equipos de labranza; a la enfermedad se le conoce como "raíces en cabellera" (Agris,1985).

La bacteria incorpora ADN a la células de las plantas mediante el ADN de transferencia en el cual se encuentra el plásmido Ri, que es el responsable directo de la producción de raíces (Chilton *et al.* 1982). Las diferentes regiones o loci del ADN-T codifican para las opinas o para las auxinas en tanto otro loci está involucrado directamente con la producción de raíces (Tepfer, 1989). Las células de las raíces producidas por esta técnica contienen copias integradas de ADN-T, en el cual se encuentra el plásmido Ri (Chilton *et al.* 1982).

Transformaciones sucesivas de las raíces pueden confirmarse por la detección de opinas en el tejido de las raíces (Tepfer y Tempe, 1981), metabolitos que son un indicador de las presencia del plásmido Ri en las células de la raíz, o mediante hibridación molecular (Chilton *et al.* 1982).

Una vez que es inoculada la bacteria a una planta susceptible en el lapso de tres semanas empiezan a emerger las raíces y a partir de ahí pueden seguir siendo subcultivadas teniendo cuidado de eliminar el inóculo original de la bacteria, ya que ésta puede ocasionar problemas de pudriciones, también se utilizan antibióticos como la carbenicilina y la ampicilina adicionados al medio de cultivo para que después de varias transferencias las raíces queden libres de la bacteria.

Una de las características importantes de las raíces transformadas es su habilidad de producir rápidamente numerosas raíces laterales. Tepfer (1981) aseguró que éstas se adaptan mejor al desarrollo en cultivo de raíces *in vitro*, que las raíces normales y que también sobreviven grandes períodos fuera del subcultivo.

La posibilidad de la existencia de un nuevo genoma en las raíces transformadas, afecta la capacidad de producción de enzimas; otra característica que se ha observado es el geotropismo negativo (Watrud *et al.* 1978), sin embargo, al parecer las raíces transformadas tienen la misma capacidad sintética de las raíces normales o de las plantas y el número de cromosomas de las raíces transformadas es el mismo que el de la planta madre (Hamill *et al.* 1987; Ryeder *et al.* 1985).

Recientemente se han utilizado varios medios de cultivo para el desarrollo de raíces transformadas (Ri ADN-T): medio Murashige y Skoog (MS), medio Gamborg "B5" (Hamill *et al.* 1987) medio Torrey (1954) y Monnier (1976) fide Bécard y Piché (1992); y finalmente medio White (MW) (Bécard y Fortin, 1988). Este último es el que se ha preferido sobre el MS a igual disolución, ya que la presencia de amonio en el último es detrimental para el desarrollo de las raíces, en tanto en el medio de White el nitrógeno se usa exclusivamente en forma de nitratos asimilables que contrarrestan la acidificación del medio de cultivo, actuando éste como amortiguador del pH, para mantenerlo en 6.0, que es el adecuado para el desarrollo de las raíces (Bécard y Piché, 1992).

2.6 Inóculo de hongos micorrizicos arbusculares MA

Se han usado diferentes formas de inóculo de hongos MA en cultivos de tejidos y raíces transformadas, ya sea con esporocarpos y clamidosporas de algunas especies como *Glomus mosseae* (Mosse y Hepper, 1975; Mugnier y Mosse, 1987), *Glomus intraradix* (Bécard y Fortin, 1988; Bécard y Piché 1989a,b, 1990 Miller-Wideman y Watrud, 1984), segmentos de raíces colonizadas por micorrizas de diferentes especies, vesículas internas extraídas de raíces colonizadas (Strullu y Romand, 1987) o azigosporas no esporocárpicas de *Gigaspora margarita*.

Virtualmente todos los hongos MA se pueden propagar *in vitro*, sin embargo, se requiere seleccionar especies con alta producción de esporas, un factor que la restringe es la contaminación, debido a que puede ser determinante en el éxito o en el fracaso del sistema empleado.

La desinfección superficial de las esporas puede ser suficiente si se tiene cuidado, especialmente en esporas no esporocárpicas, porque el esporocarpo puede

tener algunas partículas contaminantes adheridas. Los altos porcentajes de contaminación que hay en estos organismos son debido a que sus esporas son aisladas y purificadas directamente del suelo rizosférico húmedo, ya que es en esta área donde se encuentra una gran cantidad de esporas y esporocarpos disponibles y es de ahí de donde van a ser seleccionados para posteriormente ser utilizados en los diferentes sistemas.

Una forma de evitar la contaminación de los esporocarpos es diseccionándolos para separar lo más posible las esporas, procediendo a continuación a su desinfección. En los sitios donde se encuentran grandes cantidades de esporocarpos y esporas también se encuentran raíces colonizadas, las cuales son una buena fuente de inóculo que puede desinfectarse y utilizarse en un 100% (Bécard y Piché, 1992).

Se han utilizado varios métodos de desinfección superficial de espore de hongos MA, como; Cloramina-T al 2% (Bécard y Fortin, 1988; Bécard y Piché, 1989, 1992; Mosse, 1962; Mugnier y Mosse, 1987;), el hipoclorito de sodio (Williams, 1990) y antibióticos como estreptomina y gentamicina (Mosse, 1962).

El material fúngico es desinfectado procurando eliminar esporas viejas que son difíciles de desinfectar debido a que muchas veces tienen restos de paredes muertas u otro material adherido que puede ser una fuente de contaminantes.

Las técnicas de tamizado húmedo (Gerdemann y Nicolson, 1963) y centrifugación en gradientes de sacarosa 20 y 60% (Daniels y Skipper, 1982) ayudan a remover restos de paredes viejas, esporas muertas, y otros desechos.

III METODOLOGIA

3.1. Muestreo

El muestreo se realizó en el Cerro Tepectipac, Municipio de San Juan Totolac, Tlaxcala, México. La vegetación en el sitio de estudio corresponde a un matorral secundario que se establece como consecuencia de la fuerte perturbación originada por la actividad humana, y la constante erosión eólica y aluvial que sufren las laderas. En la parte alta del cerro se presentan manchones de pino-encino. En la parte media se desarrolla una vegetación discontinua con especies arbustivas escasas, haciéndose notorias algunas hierbas anuales. En la parte baja se encuentra el poblado de Santiago Tepectipac donde se presenta una vegetación ruderal (Acosta et al. 1990) (ver lámina1).

Los suelos de este sitio se clasifican como migajón arenosos, los cuales están fuertemente compactados, tienen altos contenidos de carbonato de calcio, son muy pobres en fósforo disponible, la materia orgánica es de pobre a media y el pH es de 7.0.

Para la toma de muestras se seleccionó la planta de *Amelanchier denticulata* (HBK) Koch, una planta utilizada en la elaboración de artesanías en la zona. El muestreo se hizo de la parte baja del cerro hacia la parte alta, siendo cuantitativo y sistemático. La primera muestra fue tomada de suelo rizósferico en el primer manchón que se encontró de la especie seleccionada, caminando posteriormente hasta encontrar nuevamente a la especie, y continuando el ascenso del cerro en zig-zag hasta recolectar un total de 10 muestras de 1 kg. cada una. Las muestras de suelo fueron colocadas en bolsas de polietileno negro, las que fueron debidamente etiquetadas, transportadas al laboratorio y almacenadas a 4 °C hasta su uso.

3.2 Propagación de esporas de hongos micorrízicos-arbusculares MA.

A fin de disponer de material biológico suficiente para la determinación de las especies de hongos micorrízicos-arbusculares presentes en las muestras de suelo recolectadas, se montaron diez macetas de propagación, en las que se sembró un

policultivo con semillas pregerminadas de alfalfa (*Medicago sativa* L.), cebolla (*Allium cepa* L.) y pasto bahía (*Paspalum notatum* L.) como plantas trampa; las macetas se colocaron en un invernadero, regándose con agua de la llave cada vez que fue necesario (aproximadamente cada 4 días) y después de seis meses se revisaron para extraer las esporas que se propagaron.

3.3. Extracción de esporas de hongos micorrízicos-arbusculares

Con suelo rizósferico de estas macetas, se extrajeron las esporas presentes por la técnica de tamizado húmedo y decantación de Gerdemann y Nicolson (1963) y centrifugación de gradientes en sacarosa 20 y 60% (Daniels y Skipper, 1982) (apéndices 1 y 2). Las esporas obtenidas se separaron por tipos, bajo un estereomicroscopio diferenciándolas principalmente por su color y tamaño y se colocaron sobre un portaobjetos con alcohol polivinílico (PVL) y PVL mezclado con Melzer para montar preparaciones permanentes, otra parte de las esporas se dejaron para montar cultivos monoespecíficos.

3.4 Establecimiento de cultivos monoespecíficos

Con las esporas obtenidas de las macetas de propagación se establecieron macetas de cultivos monoespecíficos (propagando una sola especie por maceta). Esto se hizo en tubos de PVC de 4 cm de diámetro por 12 cm de largo, desinfectados previamente con alcohol diluido al 70%, y se llenaron con un mezcla 1:1 (v/v) de arena vermiculita esterilizada a vapor en autoclave durante 2 horas.

Se tomaron de 25-40 esporas del mismo tipo, las cuales fueron depositadas sobre las raíces de la plantas hospederas pregerminadas, se utilizaron las mismas plantas que en las macetas de propagación, (alfalfa, cebolla y pasto bahía). Las macetas fueron colocadas en un invernadero, regándose cada tercer día con agua de la llave, se revisaron a los ocho meses para verificar la presencia de micorriza y/o el incremento de propágulos. Solamente se establecieron los cultivos monoespecíficos de los morfotipos más abundantes.

3.5 Identificación de especies de hongos micorrízicos-arbusculares

Las esporas obtenidas se separaron en grupos discretos bajo un estereomicroscopio diferenciándolas por su color y tamaño colocándose sobre un portaobjetos con alcohol polivinílico (PVL) y PVL con reactivo de Melzer para montar preparaciones fijas, de acuerdo con la técnica descrita por Schenck y Pérez (1990) (apéndice 3).

Para disponer de material de referencia, de cada una de las especies encontradas se hicieron preparaciones permanentes montando al menos 20 esporas en PVL y 20 con PVL-Melzer; también se colocó la misma cantidad de esporas en azida de sodio al 1%. Las descripciones de las especies se hicieron observando al microscopio óptico las características de cada especie; tales como la composición de las paredes, ornamentación, tamaño y color y, si se presenta o no reacción al Melzer. Las especies fueron determinadas usando el Manual de Schenck y Pérez (1990) y para el color las tablas de Munsell (1975).

Las preparaciones y las esporas en azida de sodio de las especies identificadas se depositaron en los herbario ENCB del Instituto Politécnico Nacional y TXLM de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

3.6 Obtención de hospederos *in vitro*

3.6.1. Propagación de *Agrobacterium rhizogenes*

Se utilizó una cepa de *Agrobacterium rhizogenes* 9402 con marcador a kanamicina que fue proporcionada por el CINVESTAV Irapuato. La bacteria fue mantenida en crecimiento en medio semisólido YEB, (apéndice 4), bajo condiciones de oscuridad a 28°C.

Para la infección, la bacteria se dejó crecer 24 horas en medio YEB, líquido bajo las condiciones anteriores pero en agitación (100 rpm). Para esto se toma una asada de la colonia de la bacteria y se pasa al medio de cultivo líquido.

3.6.2 Desinfección de raíces de zanahoria

Para eliminar el suelo adherido, las raíces de zanahoria se limpiaron con un algodón humedecido en alcohol; después se hicieron cortes transversales de 2 ó 3 cm de grosor. Los cortes se sumergieron en etanol al 70% por un minuto, colocándolas posteriormente en una solución de cloro comercial al 20% durante 20 minutos, agitándose constantemente. Una vez pasado este tiempo, los cortes se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, se quitaron los bordes, se cortaron rodajas de aproximadamente 0.5 cm de grosor e inmediatamente después se procedió al método de infección.

3.6.3. Infección con *Agrobacterium rhizogenes* en raíces de zanahoria

Los cortes de zanahoria, se colocaron en cajas de Petri con la cara distal hacia arriba (con relación a la parte aérea), debido a que en esta parte la bacteria es más virulenta porque es donde se encuentran los niveles más altos de auxinas (Ryder *et al.* 1985). Con una aguja de disección estéril se picó toda el área superior de la rodaja evitando daño severo (esto con la finalidad de asegurar una mejor penetración de las células bacterianas).

A continuación con una asa bacteriológica, se inóculo la bacteria en cada corte, y posteriormente se transfirieron a cajas Petri que contenían una capa de 1 cm de agar agua al 1.5 %. Las cajas se incubaron en condiciones de oscuridad a 28°C por 24 horas.

Después de este tiempo, los cortes se enjuagaron con agua destilada estéril (esto con el fin de eliminar el exceso de bacteria y evitar pudriciones prematuras de los cortes), se secaron en papel filtro estéril, colocándose en medio de White modificado MWM (Bécard y Fortin, 1988) (apéndice 5), adicionando con Carbenicilina (500 mg/l). Este antibiótico se adiciona porque en esta etapa todavía no se ha eliminado completamente la bacteria y pudre las raíces que van a iniciar su desarrollo, además de que en este sistema es donde se va establecer el cultivo dual (hongo micorrizico y raíces de plantas hospederas).

Con la finalidad de tener suficientes raíces se prepararon 10 cajas cada una con 3 a 4 rodajas de zanahoria, dependiendo del diámetro de las mismas. Las cajas así preparadas se incubaron nuevamente a la temperatura ya mencionada. Las cajas se revisaron dos o tres veces por semana para detectar el desarrollo de la bacteria, debido a que si queda sobre las rodajas de zanahoria puede provocar pudriciones. Si se observa desarrollo de la bacteria, los cortes se lavan para eliminarla, pero cuando se detecta otro contaminante (hongos) entonces son desechadas por no poder eliminarlo, una vez listas se vuelven a incubar (se lavan cuantas veces sea necesario).

Después de tres semanas, cuando hay abundante proliferación de raíces en los explantes, se cortan segmentos de aproximadamente 0.1-0.2 mm de largo en condiciones de asepsia; estos segmentos se enjuagan tres veces con agua destilada estéril, se secan en papel filtro estéril, se colocan en cajas de petri conteniendo MWM adicionado con carbenicilina a la dosis ya mencionada y se incuban en la oscuridad a 28°C; es necesario repetir la operación anterior 3 o 4 veces para eliminar completamente la bacteria y tener las raíces limpias y libres de bacteria. Una vez que hubo suficientes raíces se procedió al método de inoculación con esporas de hongos MA.

3.6.4. Cultivo de tejidos

Para el establecimiento de cultivo de tejidos, se utilizaron semillas de cebolla las cuales se desinfectaron con una solución de cloro comercial al 20%, manteniéndose en agitación durante 30 minutos bajo condiciones aséptica (Bécard y Piché, 1992); para la desinfección superficial de las semillas, la literatura reporta que se utilice una solución de cloro comercial al 1-3% (Butcher, 1980), pero en este trabajo se modificó al 20% debido a que en las dosis reportadas se presentaban problemas severos de contaminación, con esta modificación se obtuvieron muy buenos resultados y no se afectó la germinación.

Posteriormente se decanta el cloro y las semillas se enjuagan tres veces con agua destilada estéril, secándose con papel filtro estéril (Mosse y Hepper, 1975); una vez desinfectadas las semillas fueron colocadas en cajas Petri conteniendo MWM (Bécard y Fortin, 1988) y se incubaron a 25°C durante 7-10 días o hasta que las

raíces alcanzaron un tamaño aproximado de 3 a 5 cm de longitud. Transcurrido este tiempo se procedió a quitar las hojas cotiledonales y cortar las raíces en segmentos de 0.2 ó 0.3 mm de largo y ponerlas nuevamente en cajas Petri con MWM, para proceder a su inoculación con esporas de hongos MA.

3.6.5 Desinfección y selección de hongos micorrízicos-arbusculares

Las esporas de las macetas de propagación fueron obtenidas mediante la técnica de tamizado húmedo y decantación (Gerdeman y Nicolson, 1963) y centrifugación en gradientes de sacarosa 20 y 60% (Daniels y Skipper, 1982). Las especies más abundantes fueron seleccionadas para realizar este estudio, donde las esporas de estas especies fueron desinfectadas superficialmente considerando la técnica propuesta por Williams (1990), de la manera siguiente:

- a). se colocaron en una solución de cloro comercial al 0.1% durante 10 minutos
- b). se pasaron a Gentamicina 20 µg/l, durante diez minutos y
- c). finalmente se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril.

Para el caso de *Glomus intraradix*; se utilizaron además de esporas, fragmentos de raíz de 1 a 3 mm de longitud que contenían micelio y esporocarpos, ya que de acuerdo con Williams (1984), el micelio es más efectivo que las esporas, por lo que las raíces fueron examinadas bajo el estereomicroscopio seleccionando aquellas que tenían más esporocarpos y consecuentemente más micelio.

La desinfección de las raíces se hizo de acuerdo con Williams (1990), como se indica a continuación:

- a). Las raíces se colocaron en una solución de cloro comercial al 2.5% durante dos minutos a intervalos de 30 segundos agitándose constantemente, enjuagándose con agua destilada estéril en cada intervalo.
- b). Se pasaron a Gentamicina 20µg/l, durante 30 minutos, en este caso también se agitaron.
- c). Se enjuagaron con agua destilada estéril 3 veces.
- d). Se secaron en papel filtro estéril para eliminar el exceso de humedad.

3.6.6. Inoculación con los hongos micorrízicos-arbusculares

Las raíces obtenidas tanto de cultivo de tejidos como las transformadas fueron inoculadas colocando cerca de ellas esporas desinfectadas de cada una de las especies seleccionadas. Una vez colocadas las esporas junto a su hospedero, se adicionó otra capa del mismo medio nutritivo MWM, el cual estaba a una temperatura de 40°C por lo que aún no solidificaba y se podía manipular no afectando a ninguno de los dos simbiontes, quedando el cultivo dual en forma de "emparedado". Este mismo procedimiento se llevó a cabo tanto para cultivo de tejidos de raíces como para raíces transformadas.

A continuación las placas se incubaron a 28°C; en el caso de raíces transformadas se incubaron en forma vertical debido al geotropismo negativo que presentan ambos simbiontes (Watrud *et al.*1978). En cultivo de tejidos de raíces las cajas se incubaron en forma invertida, esto con la finalidad de que el agua que se condensa en la tapa cono caiga sobre el cultivo y lo contamine.

Los cultivos duales se revisaron todos los días bajo el estereomicroscopio con la finalidad de detectar la germinación de las esporas, seguir los procesos de desarrollo de la hifa y detectar el momento de contacto con las raíces siguiendo en lo posible el proceso de colonización. El parámetro evaluado fue la colonización o no en las raíces.

3.6.7. Colonización.

Para poder observar la colonización las raíces se tiñeron mediante la técnica de Phillips y Haymann (1970), una vez teñidas se cortaron en segmentos y se colocaron sobre un portaobjetos observándose a continuación al microscopio compuesto. El porcentaje de raíces colonizadas se determinó cuantificando el número de raíces que presentaron colonización micorrízica.

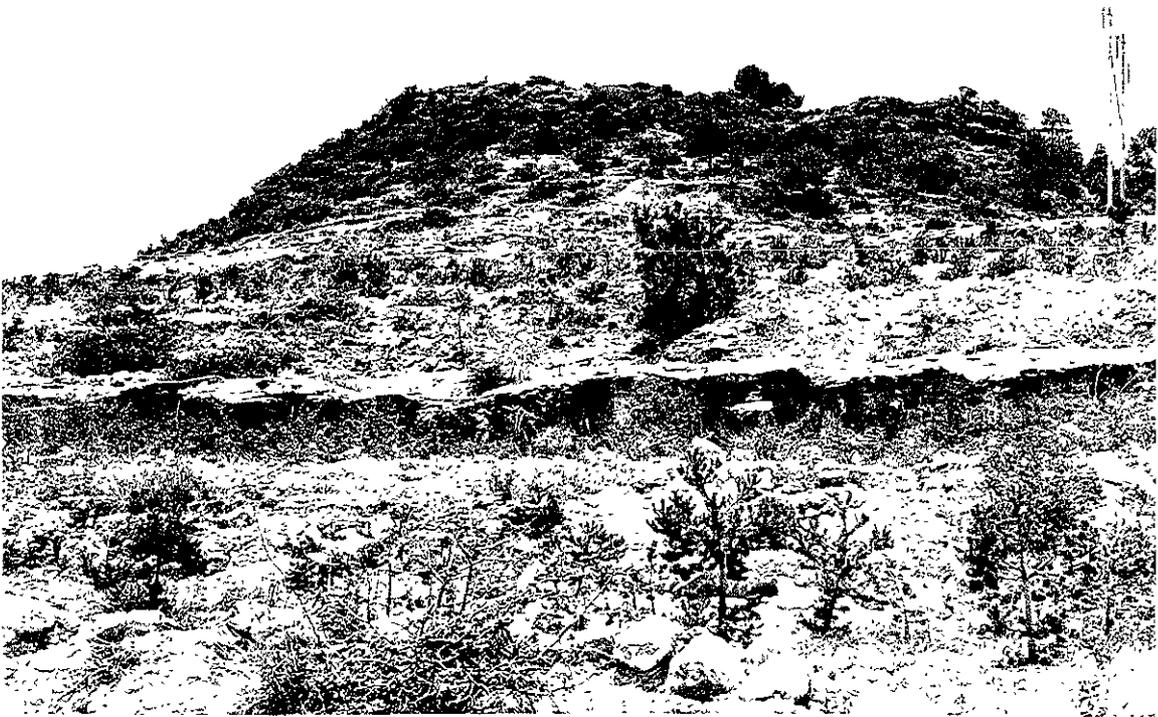


Lámina 1. Área de estudio

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PROPAGACIÓN DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

4.1.1 Macetas de propagación

La mayor parte de los suelos contienen una mezcla de hongos micorrízicos arbusculares asociados a las raíces de las plantas. Las esporas en estos suelos se presentan en diferentes etapas de madurez, parasitadas o aún muertas. Previamente al establecimiento de cultivos monoespecíficos a partir de inóculo esporal, es conveniente propagar en maceta las esporas presentes en los suelos de campo. Existen diferentes estrategias para cultivar las especies autóctonas.

En este estudio, aún cuando se logró incrementar el número de esporas de los suelos muestreados, no todos los tipos de esporas se propagaron en la misma proporción. Esto coincide con lo señalado por Morton (1990), quien observó que algunas especies presentes en los suelos de campo pueden disminuir su número o incluso desaparecer en macetas de propagación, debido a factores ambientales desconocidos o a las condiciones de invernadero; otras especies raras o aparentemente inexistentes pueden en cambio incrementar su número.

En las macetas de propagación establecidas en este estudio, se observaron 10 morfotipos de esporas de hongos micorrízicos arbusculares.

4.1.2 Propagación y obtención de cultivos monoespecíficos

Se establecieron seis cultivos monoespecíficos lográndose solamente la propagación de 3 de las especies. Éstas se obtuvieron, después de 8 meses de cultivo.

Gavito (1991), reporta que algunas especies de estos hongos se propagan abundantemente a las ocho semanas. El poco éxito y el tiempo requerido para la obtención de los cultivos monoespecíficos pudo deberse a que se utilizó un sustrato inerte (arena/vermiculita), que no reúne las condiciones físicas, químicas y biológicas del suelo original. Por otro lado, aún cuando se ha reportado que estos hongos son inespecíficos y pueden asociarse con un gran número de plantas, también se considera que las plantas trampa utilizadas pudieron no ser las más adecuadas.

4.1.3 Identificación de especies de hongos micorrízicos-arbusculares

La identificación de especies de hongos MA está basada en las características de sus esporas por lo que para poder hacer una identificación satisfactoria, es necesario contar con un número no menor de 50 esporas para cada especie. En el cuadro núm. 1 se observa la lista de especies, así como la familia a la que pertenecen.

Se encontraron representantes de todas las familias del Orden **Glomales**. Identificándose cuatro de los seis géneros conocidos de hongos micorrízicos-arbusculares: **Glomus**, **Acaulospora**, **Sclerocystis** y **Scutellospora**, los dos primeros son los más abundantes, se presentan con mayor frecuencia y tienen mayor número de especies; los géneros **Scutellospora** y **Sclerocystis** están poco representados y solamente se encontró una especie de cada uno de ellos.

Glomus intraradix se cita por primera vez para México. Tres de las especies corresponden aparentemente a especies aún no descritas ya que sus características no coinciden con las especies incluidas en el Manual de identificación de Schenck y Pérez (1990) ni con las especies descritas después de esa fecha.

Es importante señalar que en el Cerro Tepectipac existen varias especies que no fue posible identificar debido a que se encontraron una o dos veces, pero en forma extremadamente escasa o parasitadas, por lo que no fueron consideradas en el

listado de especies de hongos micorrízicos-arbusculares del Cerro Tepectipac. Las láminas no. 2 y 3 muestran las fotografías correspondientes a cada especie estudiada y en la lámina núm. 4 están representados los murogramas.

4.1.4 Descripción de las especies

Solo se describen aquéllas especies cuyo número de esporas propagadas permitió su descripción. Por esta razón no se describieron; *Sclerocystis* sp, de la familia Glomaceae; *Acaulospora* sp 2, *Acaulospora aff. foveata* y *Acaulospora bireticulata* de la familia Acaulosporaceae; *Scutellospora* sp. de la familia Gigasporaceae, pero se hace alusión a ellas porque también fueron encontradas en el área de estudio.

Familia Glomaceae

Glomus sp.1

Láminas 2 y 4

Esporas que se forman individualmente en el suelo, hialinas, globosas de (65-) 76 - 86 (- 108) μm de grosor. Conjunto de las paredes de la espora con un grosor total de (10 -) 17.5 - 19.5 (- 27.5) μm , formado por un grupo (A) con 3 paredes no separables (1, 2 y 3): pared 1: evanescente hialina; pared 2: membranosa hialina y elástica, que se expande al montar las esporas en alcohol polivinílico; pared 3: laminada, hialina y gruesa, dando la impresión de que son 2 ó 3 paredes cuando al presionarse la espora las láminas se rompen a diferente nivel; cianófilas en azul de algodón, inamiloides en reactivo de Melzer. Muronimo; A (EML) Contenido de la espora globular, lipídico.

Hifa de sostén recta, hialina, frecuentemente se rompe quedando la espora sin hifa o bien con un fragmento muy pequeño, de (2.4 -) 3.2 - 4.0 (-7.1) μm de ancho.

Hábitat y distribución:

Hipogeo, conocida sólo del cerro Tepecticpac Tlaxcala, México.

Colecciones examinadas: TLAXCALA, Municipio de San Juan Totolac, Cerro Tepectipac. Blanca Nieves Lara Chávez 1 ENCB y TXLM.

Observaciones: Esta especie se caracteriza por ser consistentemente hialina en todas sus etapas de desarrollo y por presentar una pared expandible. Otros taxa con pared expandible son *Glomus pansihalos* y *Glomus macrocarpum*, sin embargo el tamaño y el color de las esporas difiere de la especie reportada en este trabajo. Otra característica de esta especie es la reacción cianófila que presentan sus esporas con el azul de algodón, característica que no presenta *Glomus pansihalos* y que no ha sido descrita para *Glomus macrocarpum*. Esta especie se propagó en macetas utilizando suelo rizósferico de *Amelanchier denticulata* y como cultivo trampa pasto bahía *Paspalum notatum* lográndose obtener en cultivo asociada con cebolla *Allium cepa* L.

Glomus sp.2

Láminas 2 y 4

Esporas que se forman individualmente en el suelo, hialinas a blanco lechoso, globosas de (58-) 81.5 - 101 (-115.) μm . Conjunto de paredes de la espora formadas por 4 paredes diferenciables en 2 grupos (A y B), de (2.4 -) 3.1 (-3.9) μm de grosor. El grupo (A) está formado por tres paredes (1, 2 y 3); pared 1. evanescente, hialina; pared 2 unitaria, al montarla con reactivo de Melzer toma el color de éste; pared 3, laminada, hialina, de menos de 1 μm . Grupo (B) formado por una pared 4, membranosa, hialina. Murónimo A (EUL) B (M). Contenido de la espora globular, lipídico. Hifa de sostén recta, hialina.

Hábitat y distribución.

Hipogeo conocido solo del cerro Tepecticpac, Tlaxcala, México.

Colecciones examinadas: TLAXCALA, Municipio de San Juan Totolac, Cerro Tepectipac. Blanca Nieves Lara Chávez. 2 ENCB y TXLM.

Observaciones: Está especie es semejante a *Glomus occultum* Walker, en el tamaño y color de las esporas, pero se diferencia por la estructura de la pared; *Glomus sp.2* presenta cuatro paredes en dos grupos, en tanto *Glomus occultum* solo presenta un grupo con dos ó tres paredes.

Se ha propagado en macetas utilizando suelo rizósferico de *Amelanchier denticulata* y como cultivo trampa pasto bahía *Paspalum notatum*. No se logró obtener en cultivo monoespecífico.

Glomus geosporum (Nicolson & Gerdeman) Walker.

Láminas 2 y 4

Esporas formadas individualmente en el suelo y/o en raíces en descomposición de color café oscuro a color café oscureciéndose con la edad, globosas aunque algunas veces elipsoides de (144 -) 156 - 180 (-185) μm de diámetro. Conjunto de las paredes de la espora formada por un grupo (A) con 3 paredes (1, 2 y 3). Pared 1: evanescente hialina; pared 2: laminada color café rojizo de (5.5-) 6.3 - 11.0 (-14.9) μm de grosor. Pared 3. membranosa hialina de menos de 0.5 μm , de grosor. Murónimo A (ELM) ó A (L M). (Ver lámina 4). Contenido de la espora poco denso. Hifa de sostén color café rojizo de (8.6 -) 11.0 - 19.6 (-21.2) μm de ancho; grosor de la pared de la hifa de (2.4 -) 3.1 - 4.7 (- 7.8) μm .

Hábitat y Distribución

Hipogeo, esta especie se ha reportado de varias partes de Estados Unidos, Gran Bretaña y la India (Schenck y Pérez, 1990). Nava (1994), reportó esta especie de Tlaxcala, en suelos tepetatosos recuperados para uso agrícola.

Etimología. Del griego geo (tierra) y sporus (espora) refiriéndose a la formación ectocárpica de las esporas en el suelo y ausencia de un esporocarpo.

Colecciones examinadas: TLAXCALA, municipio de San Juan Totolac, Cerro Tepectipac. Blanca Nieves Lara Chávez. 3 ENCB y TXLM

Observaciones: Esta especie fue descrita de los Estados Unidos de norteamérica como *Endogone macrocarpa* var. *Geospora*, Nicolson & Gerdemann y redescrita por Walker (1982) quien aparentemente la reporta de México sin precisar localidad.

En algunas esporas de los ejemplares examinados se pudieron observar 3 paredes, notándose que la pared laminada está formada de 2 paredes estrechamente unidas que se separan difícilmente, pero que tienen distinta tonalidad de color, siendo la más interna de color más oscuro. Schenck y Pérez (1990) interpretan de dos formas la composición de la pared considerando que puede estar formada por 2 ó 3 paredes. Nuestras observaciones coinciden con la presencia de 3 paredes, las otras características coinciden con lo reportado por (Nicolson & Gerdemann) Walker, incluyendo el hecho de que las esporas frecuentemente están parasitadas.

Se ha observado que esta especie forma micorriza con *Bellis pereni* L., *Hypochaeris radicata* L., *Lolium* sp., *Mallus* sp., *Prunus* sp. y *Trifolium* sp.; se ha propagado en cultivo monoespecífico asociada con *Lycopersicum esculentum* L., *Zea mays* L., y *Fragaria* sp. (Schenck y Pérez, 1990). La presencia de *Glomus geosporum* (Nicolson y Gerdemann) Walker, en tepetates (Nava, 1994) y suelos de los Cerros Blancos podría estar indicándonos que se trata de una especie asociada con suelo de lugares fuertemente perturbados o muy empobrecidos.

Glomus intraradix Schenck & Smith

Láminas 3 y 4

Esporas agrupadas formando esporocarpos o en ocasiones solitarias, formadas adentro de las raíces o raramente en el suelo, predominantemente globosas, de (40.5-) 98.5 (-190.5) μm de diámetro, a subglobosas de 93 - 119 X 112 - 131 μm . Paredes de la espora en un grupo (A) con tres paredes o cuatro. Pared 1: evanescente, hialina, de 1-2 μm , de grosor. Pared 2: evanescente, hialina. Pared 3: Laminada; amarillenta de 3-15 μm , de grosor, reacciona con el reactivo de Melzer a un color café grisáceo; al romperse la espora las láminas de la pared interna se rompen a diferentes niveles dando la impresión de tener más de 1 pared laminada. Muronimo. A (EEL) ó A (EELL). Contenido de la espora globular. Hifa de sostén ocasionalmente constreñida en el punto de adhesión.

Hábitat y Distribución: Hipogeo, esta especie se ha citado de Florida en Estados Unidos (Schenck y Pérez, 1990).

Etimología. De latín Intra (Con) y radices (raíz), refiriéndose exclusivamente a la formación de clamidosporas en la raíz.

Colecciones examinadas. TLAXCALA, Municipio de San Juan Totolac, Cerro Tepectipac. Blanca Nieves Lara Chávez. 4 ENCB y TXLM.

Observaciones: Schenck y Pérez (1990) basándose en la descripción de Schenck y Smith (1982) interpretan la estructura de la pared reportando uno o dos grupos con una o dos capas respectivamente. Posteriormente Morton (1989) describe la estructura de la pared y considera 4 paredes en un solo grupo. Las paredes 1 y 2 de tipo unitario, mismas que en este trabajo se describen como evanescentes. No obstante, consideramos que las paredes evanescentes pueden interpretarse como unitarias cuando las esporas son jóvenes. Todas las demás características coinciden

con las reportadas para esta especie, incluyendo la formación de abundantes esporocarpos y esporas dentro de la raíz.

Glomus intraradix se ha encontrado formando micorriza con *Lycopersicon esculentum* Mill, *Apium graveolens* L., *Citrus* sp., *Arachis glabrata* Benth., *Stylosanthes* sp., *Zea mays* L., *Phaseolus vulgaris* L., *Fragaria chiloensis* Duch., *Daucus carota* L., *Solanum tuberosum* L. (Schenck y Pérez, 1990), propagándose en forma abundante asociada a *Medicago sativa* L., *Allium cepa* L. y *Paspalum notatum* L. Se obtuvo cultivo monoespecífico de esta especie utilizando *Allium cepa* L. y *Paspalum notatum* L. como plantas trampa.

Familia Acaulosporaceae

Acaulospora rugosa Morton

Láminas 3 y 4

Esporas que se forman individualmente en el suelo, de color amarillo (5Y 8/8), (Munsell, 1975), globosas, de (45.5 -) 81.5 - 96 (- 110.5) μm de diámetro. Conjunto de las paredes de la espóra formado por 5 paredes en 3 grupos (A, B y C), de (1.5 -) 2.4 - 3.1 (- 3.9) μm de grosor. El grupo A, formado por 2 paredes (1 y 2); pared 1: evanescente hialina; pared 2: laminada, color amarillo (5Y 8/8) (Munsell, 1975). Grupo B, formado por 1 pared (3); pared 3: unitaria, hialina, de menos de 1.2 μm de grosor. Grupo C compuesto de 2 paredes (4 y 5); pared 4: membranosa, hialina, ornamentada con excrecencias granulares, de menos de 1.0 μm de grosor. Pared 5: membranosa hialina de (1.2 -) 2.4 μm de grosor. Murónimo. A (EL) B (U) C (Mb M). (lámina 4). Contenido de la espóra globular, lipídico.

Hábitat y Distribución

Hipogeo. Esta especie se ha citado del oeste de Virginia en Estados Unidos de Norte América (Schenck y Pérez, 1990).

Colecciones examinadas: TLAXCALA, Municipio de San Juan Totolac, Cerro Tepectipac. Blanca Nieves Lara Chávez 5 ENCB y TXLM.

Observaciones: Las características observadas en las esporas propagadas coinciden en tamaño y estructura de la pared con las de las esporas descritas por Morton (1986) pero difiere en que la pared más interna (pared 5) es no se tiñe con el reactivo de Melzer. Esta última característica de acuerdo con Morton, solo se observa en esporas recién formadas por lo que puede perderse en esporas viejas.

Esta especie se propagó en forma muy abundante utilizando como cultivo trampa pasto bahía *Paspalum notatum* L. Obteniéndose en cultivo monoespecífico asociada con cebolla *Allium cepa* L.

4.1.5. Raíces transformadas

Dos semanas después de la inoculación con la bacteria, de las rodajas de zanahoria empezaron a emerger las raíces y una semana después se logró una gran proliferación de las mismas (lámina 5). Después de seis semanas pudieron obtenerse suficientes raíces para el establecimiento del cultivo dual.

La transformación de raíces implica la transferencia del plásmido Ri al genoma de las células de la raíz. Este plásmido una vez en las célula vegetal, estimula la proliferación de raíces. Una vez que las raíces son transformadas, se elimina la bacteria para evitar su pudrición y permitir la colonización por hongos MA

El uso de raíces transformadas es una alternativa que permite estudiar *in vitro* el efecto de diferentes factores sobre la colonización de raíces, entender los eventos que se presentan en la fase de pre y postcolonización y son una alternativa para la producción a gran escala de inoculante de hongos MA.

Es importante señalar que las raíces transformadas deben mantenerse en medio fresco para impedir su envejecimiento y contaminación. Los resultados obtenidos concuerdan con los de Mugnier y Mosse (1987); Bécard y Fortin (1988); Bécard y Pichè (1990).

4.1.6 Cultivo de tejidos de raíces

Para este ensayo se utilizaron raíces de cebolla ya que con semillas de zanahoria no se logró una desinfección completa aún cuando se aumentó el tiempo de exposición y las dosis del desinfectante, siempre aparecieron contaminantes al cabo de cuatro días; por esta razón se tuvo que cambiar de hospedero. Las semillas de cebolla no presentaron este problema y fue fácil su desinfección y manejo.

Las semillas de cebolla germinaron después de siete días de sembradas y en diez días se obtuvo la cantidad suficiente de raíces para establecer el cultivo dual. la contaminación fue menor al 5%, desechándose el material contaminado, el antibiótico carbenicilina a dosis de 500 mg/l, que se agregó al medio nutritivo no presentó ningún problema de fitotoxicidad para las raíces.

4.1.7 Cultivo dual

La desinfección superficial de las esporas usando el método de Williams (1984) para las tres especies de hongos micorrizicos-arbusculares probadas; *Glomus sp. 1*, *Acaulospora rugosa* y *Glomus intraradix*, fue eficientes.

A los 8 días de establecido el cultivo dual se observó que algunas esporas de *Acaulospora rugosa* empezaron a emitir un tubo germinativo (lámina.6), después de dos semanas, un 95% de las esporas germinadas presentaban tubos germinativos en varias direcciones, desarrollándose micelio en el medio y cerca de las raíces (transformadas y cultivo de tejidos); las raíces también presentaban un buen desarrollo en ambos casos.

A las cuatro semanas de la inoculación, se examinaron las raíces previamente teñidas para determinar el grado de colonización de las mismas, observándose ausencia de colonización ya que no hubo penetración del micelio en la raíz (cultivo de tejidos y raíces transformadas).

Estos resultados pueden ser explicados en parte por los obtenidos por Mosse y Hepper (1975), Mugnier y Mosse, (1987) y Bécard y Piché, (1989b), quienes observaron que los exudados de raíces promueven la germinación y desarrollo de micelio de las esporas de los hongos MA pero si se acumulan en cantidades elevadas pueden llegar a ser letales o bien detener el desarrollo de las hifas, o formar barreras del hospedero hacia el hongo micorrízico.

En este caso, un factor importante que se debe tomar en cuenta es que al medio de cultivo utilizado, se le dieron más las condiciones para la germinación y desarrollo del hongo, reduciendo la cantidad de glucosa y de fósforo y eliminando el sodio, lo cual pudo influir en el desarrollo y producción de exudados radicales que pudieran atraer las hifas del hongo hacia la raíz para su colonización (Bécard y Fortin, 1988; Struble y Skipper, 1988).

A pesar de que existen factores capaces de estimular la germinación y el desarrollo de algunas especies de hongos MA, puede presentarse otros que son negativos. Bécard y Piché (1990), observaron que los exudados radicales de raíces transformadas de zanahoria *Daucus carota* L. estimulan la germinación y desarrollo de las hifas de *Gigaspora margarita* así como su posterior colonización.

En contraste los exudados radicales de la remolacha azucarera *Beta vulgaris* L. no estimulan la germinación de las esporas de *Gigaspora margarita*, pero si las esporas eran germinadas aparte y luego colocadas cerca de las raíces de la remolacha azucarera no se inhibía el crecimiento del micelio, aunque se observaba mas escaso pero tampoco había colonización.

Para el establecimiento de estos sistemas duales se deben adecuar y tomar en cuenta los factores que influyen en ambos simbiontes.

En *Glomus sp.1*, se siguió el mismo procedimiento que para *Acaulospora rugosa*, no observándose germinación de las esporas, esto puede ser atribuido a diversos factores como los ya mencionados para la especie anterior, o bien pudo ser la aplicación de antibiótico al medio de cultivo (Mayo *et al.* 1986), el pH (Green *et al.* 1976; Daniels y Trappe, 1980), la temperatura (Schenck *et al.* 1975; Daniels y Trappe, 1980; Koske, 1981), el potencial hídrico (Daniels y Trappe, 1980; Koske, 1981a; Sylvia y Schenck, 1983), el contenido de nutrimentos en el medio de cultivo (Hepper, 1979; Daniels y Graham 1976; Daniels y Trappe, 1980; Hepper y Jakobsen, 1983), ciertos inhibidores del crecimiento (Watrud *et al.* 1978; y Hepper, 1979), la edad del cultivo (Daniels y Graham, 1976; Hepper y Smith, 1976; Sylvia y Schenck, 1983; Hardie, 1985; Safir *et al.* 1990) o latencia de las esporas (Tommerup, 1983).

Estos y otros factores pueden afectar de diferentes formas dependiendo de la especie de hongo que se trate. A pesar de que existen factores capaces de estimular la germinación y el desarrollo de algunas especies como los reportados por Bécard y Piché, (1990) en *Gigaspora margarita*.

Estos resultados no pueden ser generalizados para otras especies. Hay que considerar que de todas maneras, este tipo de estudios lleva consigo una serie de dificultades inherentes que es necesario tener en cuenta para tratar de interpretarlos fundamentalmente los negativos, y sacar conclusiones definitivas (A. León-Aguilar *et al.* 1991).

De acuerdo con Siqueira (1987), algunas de estas conclusiones podrían ser las siguientes:

- Algunos de los factores pudieran ser aplicados en dosis no adecuadas.
- Puede ser necesaria la interacción de dos o mas factores para que se ponga de manifiesto su efecto,

-Los distintos hongos MA pueden dar lugar a respuestas diferentes, con lo cual los resultados obtenidos con una especie no son generalizados a otra distinta .

-Exista una amplia variabilidad genética dentro de las poblaciones de esporas de una misma especie, incluso cuando se trata de uniformizar con base en características fenotípicas, lo que conduce a una gran variabilidad en las respuestas obtenidas.

En *Glomus intraradix*, al igual que en los dos casos anteriores a las cuatro semanas se procedió a teñir las raíces mediante la técnica ya mencionada.

Cuando se utilizaron raíces transformadas de zanahoria, se observó buena respuesta, con las tres fuentes diferentes de inóculo utilizadas (esporas, esporocarpos y raíces conteniendo micelio y esporocarpos) obteniendo germinación de esporas, desarrollo de micelio, colonización con micelio, arbusculos así como algunas vesículas dentro de las células y producción de esporas nuevas en el medio de cultivo (lámina 7). El porcentaje de raíces transformadas que fueron colonizadas por *Glomus intraradix* se muestra en el cuadro 2.

Los resultados obtenidos con este hospedero y esta especie de hongo MA, pueden ser utilizados, en estudios futuros en la producción masiva de inóculo; debido a que en la actualidad ha sido difícil propagar otras especies *in vitro*, esta especie puede ser una buena alternativa para optimizar el método, el cual posteriormente puede extenderse a otras especies de hongos MA, para estos y otros estudios importantes en el futuro.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Mosse y Hepper (1975), con cultivo de tejidos de raíces de *Trifolium pratense* L. y el hongo simbionte *Glomus mosseae* teniendo colonización a los 28 días.

Miller-Wideman y Watrud (1984), logran incrementar la colonización utilizando el mismo hongo simbionte y el mismo hospedero en un tiempo similar.

Mugnier y Mosse (1987), utilizando raíces transformadas de zanahoria y el hongo simbiote *Glomus mosseae*, obtienen germinación de esporas y colonización de las raíces a las tres semanas, observando tanto vesículas como arbusculos dentro de las células radicales.

Bécard y Fortin (1988), observan que la zona de elongación de las raíces transformadas de zanahoria es el sitio ideal para que se lleven a cabo los procesos de colonización, utilizando el hongo simbiote *Gigaspora margarita* y obtienen formación de esporas nuevas a los 5 días de que se inició la colonización.

Bécard y Piché (1989a), usaron raíces transformadas de zanahoria, el hongo simbiote *Gigaspora margarita* y el medio nutritivo de White modificado por (Bécard y Fortin 1988), obteniendo la colonización *in vitro*, y la formación de esporas nuevas, completando el ciclo de vida de *Gigaspora margarita*, en tres meses.

Bécard y Piché (1990), al igual que en el caso anterior usaron raíces transformadas de zanahoria y el hongo simbiote *Gigaspora margarita*, obteniendo en un tiempo menor la colonización y la formación de estructura dentro de la raíz (arbusculos, vesículos y micelio intercelular), así como producción de esporas en tres semanas.

Chabot *et al.* (1992), utilizaron cultivo de tejidos de raíces de tomate *Lycopersicum esculentum* Mill. y raíces transformadas de zanahoria *Daucos carota* L. y el hongo simbiote *Glomus intraradix*; a los cinco meses de establecido el experimento, observaron; micelio, vesículas y arbusculos dentro de las células radicales, teniendo una media de producción de esporas nuevas por caja de petri de 700 con ambos hospederos.

De las esporas nuevas obtenidas se tuvo un porcentaje de 70% de esporas viables, las cuales nuevamente se colocaron en presencia de los mismos hospederos,

teniéndose que entre 6 a 8 semanas nuevamente se inicio el proceso de colonización habiendo producción de nuevas esporas, con estos resultados ellos proponen a estos hospederos como una buena alternativa para producir esporas *in vitro* de *Glomus intraradix* para ser utilizadas en los diferentes estudios.

Bécard y Piché (1992), obtuvieron colonización a las nueve semanas de establecer su experimento, utilizando como hospedero raíces transformadas de zanahoria y el hongo micorrízico arbuscular *Gigaspora margarita*, y en cultivos de tres meses tuvieron producción hasta de 500 esporas por caja de petri, las cuales las conservaron en el sistema dual por periodos hasta de dos años a 28 °C sin perder su viabilidad.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo superan a los de Bécard y Fortin, (1988), Bécard y Piché (1989a), Bécard y Piché, 1990), Chabot *et al.* (1992) y Bécard y Piché (1992), en cuanto al tiempo de colonización y formación de esporas nuevas en el medio nutritivo. Y fueron más o menos similares a los reportados por Mosse y Hepper (1975), Miller-Wideman y Watrud (1984) y Mugnier y Mosse (1984), teniendo una diferencia de mas o menos una semana.

En cultivo de tejidos de raíces de cebolla, también hubo buena germinación de las esporas y desarrollo de micelio pero no colonización, sin embargo, cuando esta especie se puso a propagar en invernadero en cultivos monoespecificos y utilizando como hospedero la cebolla, tuvo buena respuesta, obteniéndose un número considerable de esporas y esporocarpos; la falta de colonización *in vitro* pudo deberse a algunos de los factores ya mencionados anteriormente, principalmente el medio de cultivo.

Por otro lado es importante considerar que para tener éxito en la colonización *in vitro* con hongos micorrízicos-arbusculares y su hospedero, así como producción de esporas viables, es importante ajustar adecuadamente las propiedades del medio de cultivo para que ninguno de los simbiosistas se vea afectado (hongo y hospedero),

se debe acercar en lo posible a las condiciones que prevalecen en el área rizosférica donde se encuentran estos microorganismos con su hospedero, porque debe ser relativamente pobre en nutrimentos.

Los medios nutritivos más utilizados son el White y Murashige y Skoog, los cuales son usados para cultivo de tejidos de diferentes órganos de las plantas. Bécard y Fortin (1988), hicieron una modificación del medio de White debido a que se observó que elementos como el sodio, el fósforo y la sacarosa afectaban el desarrollo de estos hongos, por lo cual eliminaron completamente el primero y bajaron las concentraciones de los últimos; una vez hechos estos cambios lo denominaron medio de White modificado (MWM).

Si se agregan cantidades elevadas de estos elementos también pueden actuar sobre la raíz, y como ya se mencionó, actúan sobre la fisiología del hongo y notaron que el sodio es detrimental para la colonización de los hongos MA en las raíces de sus plantas hospederas.

El efecto negativo del sodio en el desarrollo y colonización de la micorriza *in vitro* fue primeramente observado por Mosse y Phillips (1975), quienes detectaron que el desarrollo interno de *Glomus mosseae* en raíces de *Trifolium parviflorum* L. decrece cuando el medio de cultivo contiene sodio, esto fue confirmado por Bécard y Fortin (1988) y Mosse y Hepper (1975).

El fósforo, es otro de los elementos que ha sido objeto de numerosos estudios como un elemento importante para que se establezca la colonización. Los altos niveles de fósforo en los suelos hacen que decrezca o se elimine por completo la asociación micorrízica .

Gavito (1991), encontró que adicionando cantidades elevadas de fósforo a cultivos de maíces criollos, no se establece la colonización, con esto probablemente

se reducen las poblaciones de hongos MA y esto puede tener un efecto negativo para aquellos ecosistemas donde los suelos son muy pobres.

La estimulación para la germinación y desarrollo de los hongos MA parece ser un fenómeno muy complejo para unas especies y más sencillo para otras. Este proceso puede ser propiciado tanto por microorganismos del suelo, como por células procedentes de tejidos no implicados en la formación de la simbiosis micorrízica (Azcón-Aguilar *et al.* 1991).

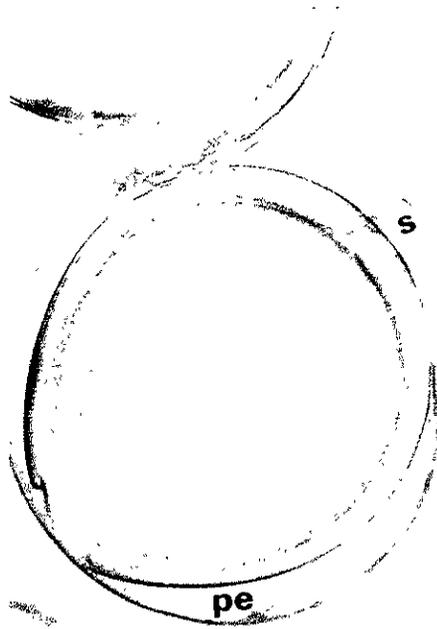
Recientemente se ha conseguido inducir un desarrollo considerable de *Gigaspora margarita* mediante la combinación de dos factores que tratan de simular las proximidades de un sistema radical activo: un ligero incremento en la concentración de CO₂ y la presencia de exudados radicales (Bécard *et al.* 1988). Ninguno de los dos factores por separado tuvo efectos relevantes, pero la combinación de ambos promovió un desarrollo extensivo del hongo.

El desarrollo *in vitro* de cultivo de tejidos de raíces y raíces transformadas, puede ser usado como un modelo simplificado de la rizósfera para estos estudios y además para estudios ecológicos de estos hongos, permitiendo la investigación de numerosos efectos del desarrollo como puede ser; tolerancia a condiciones adversas como altas concentraciones de metales tóxicos, temperaturas extremas, pH, simulación de lluvia ácida, pesticidas, interacciones planta patógeno y competencia con otras especies, entre otros (Bécard y Piché, 1992).

En lo que se refiere a la producción de inóculo con fines agronómicos y forestales, se debe de hacer una evaluación para determinar si este proceso es más factible en cuanto a costos y cantidades de inóculo producido en sistemas *in vitro*, ya sea en cultivo de tejidos de raíces o en raíces transformadas, o producción en forma tradicional en cultivos puros, ya que está también es muy buena alternativa para algunas especies como en este caso, donde hubo producción de buenas cantidades de inóculo.

Cuadro 1. Lista de especies de hongos MA encontrados e identificados del suelo rizósferico y de macetas de propagación de *Amelanchier denticulata* (HBK) Koch procedente del Cerro Tepecticpac, Tlaxcala , México.

F A M I L I A S	E S P E C I E S
Glomaceae	<i>Glomus</i> sp.1 <i>Glomus</i> sp. 2. <i>Glomus geosporum</i> (Nicolson & Gerdeman) Walker <i>Glomus intraradix</i> Schenck & Smith <i>Sclerocystis</i> sp.
Acaulosporaceae	<i>Acaulospora rugosa</i> Morton <i>Acaulospora</i> sp. <i>Acaulospora</i> aff. <i>foveata</i> Trappe & Janos <i>Acaulospora bireticulata</i> Rothwell & Trappe
Gigasporaceae	<i>Scutellospora</i> sp.



A



B

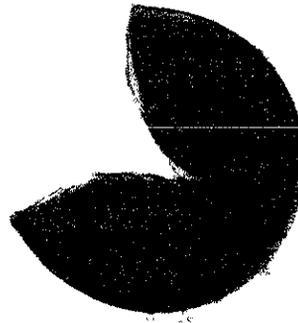
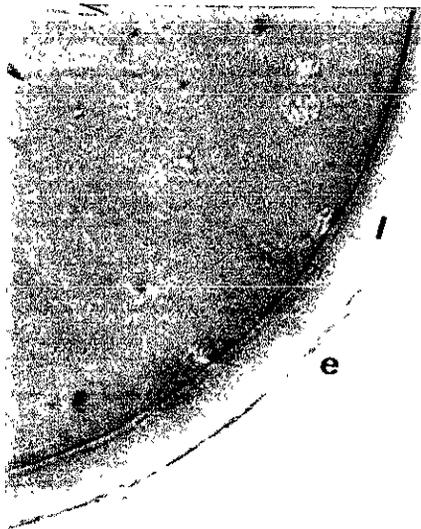


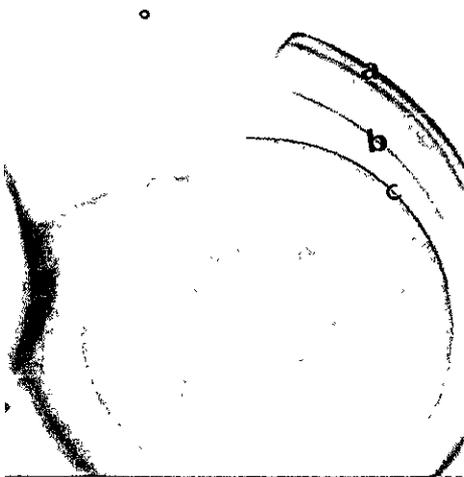
Lámina 2. A: *Glomus* sp.1; pared 2 elástica expandible (pe), con hifa de sostén (s). B, *Glomus* sp.2 , con hifa de sostén (s). C y D. *Glomus geosporum*, detalle de las paredes, restos de la pared evanescente (e), Pared laminada (l), membranosa (m) D; espora completa.



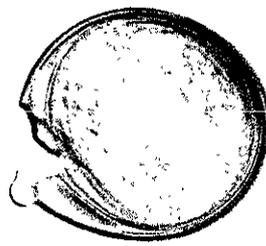
E



F



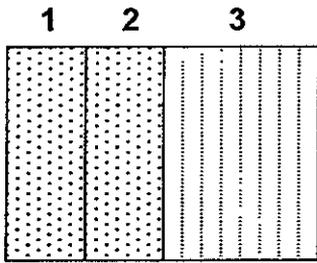
G



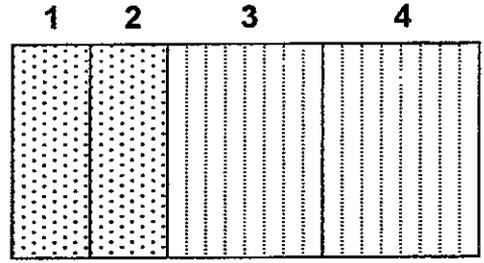
H

Lámina 3. E y F. *Glomus intraradix*; E. espora con reacción al Melzer F: esporocarpo. G y H *Acaulospor* sp. 1. G: Detalle de los tres grupos de paredes (A, B y C). H espora completa

Lámina 4. Murogramas de las especies descritas.



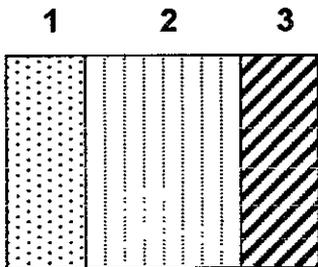
A



A

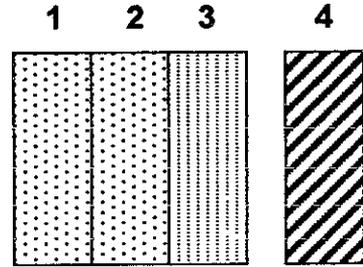
O

Glomus intraradix



A

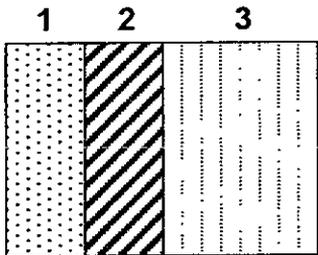
Glomus geosporum



A

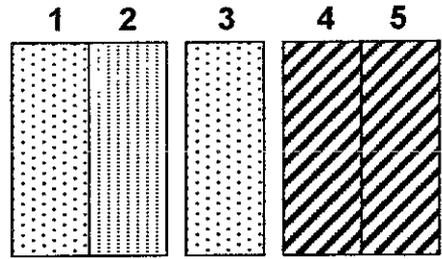
B

Glomus sp. 2.



A

Glomus sp. 1.



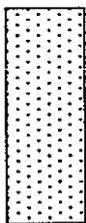
A

B

C

Acalospura rugosa

Tipos de Pared:



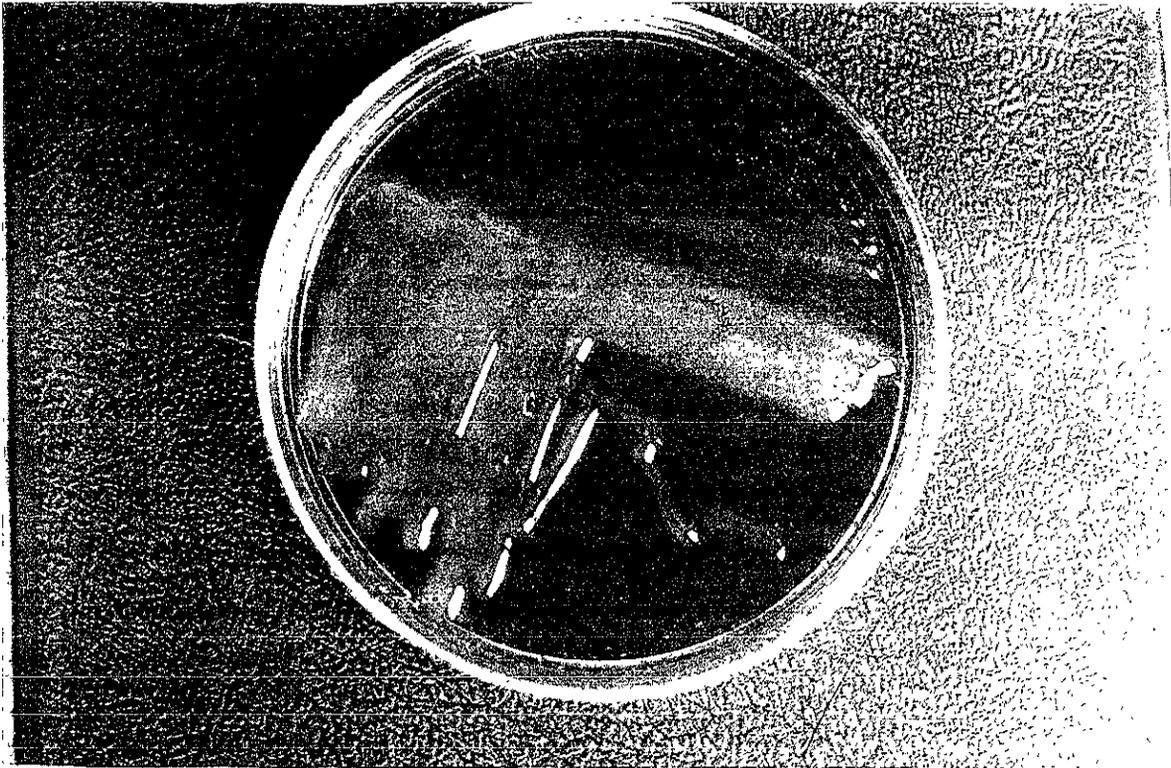
Evanescente



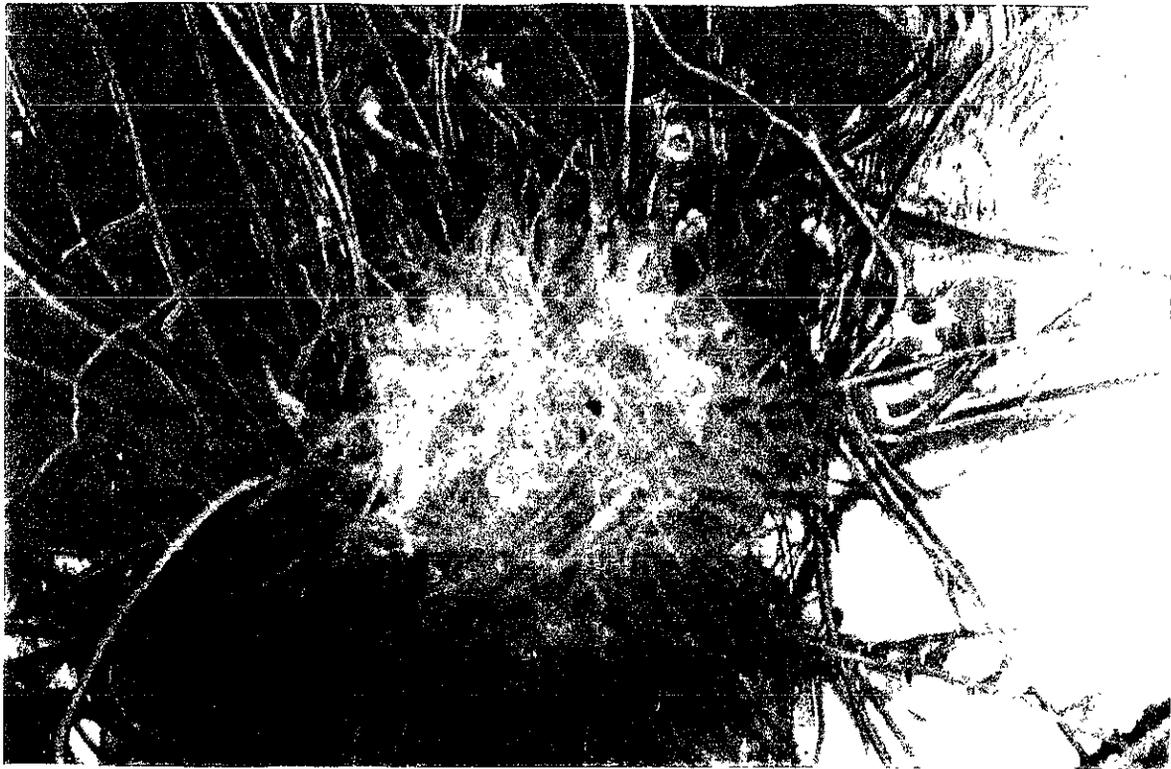
Membranosa



Laminada

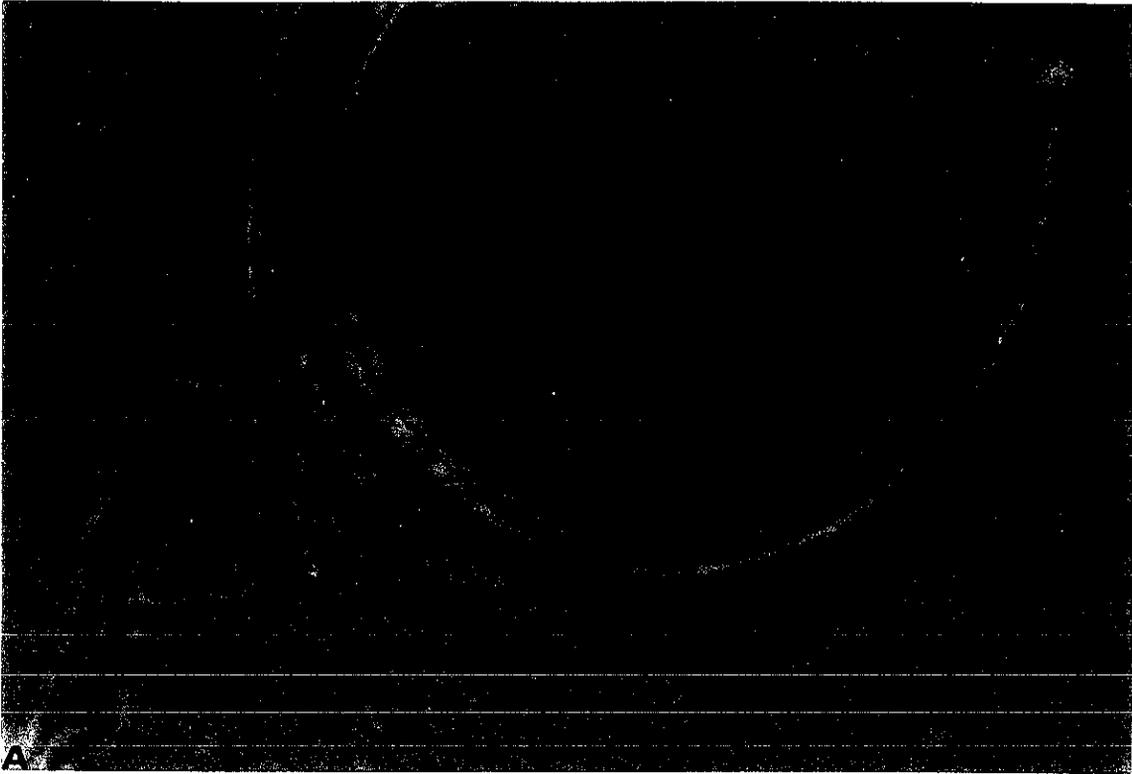


A



B

Lámina 5. A: Cepa de *Agrobacterium rhizogenes* en medio sólido YEB. B: Proliferación de raíces a partir de tubérculos de zanahoria inoculadas con *Agrobacterium rhizogenes*.



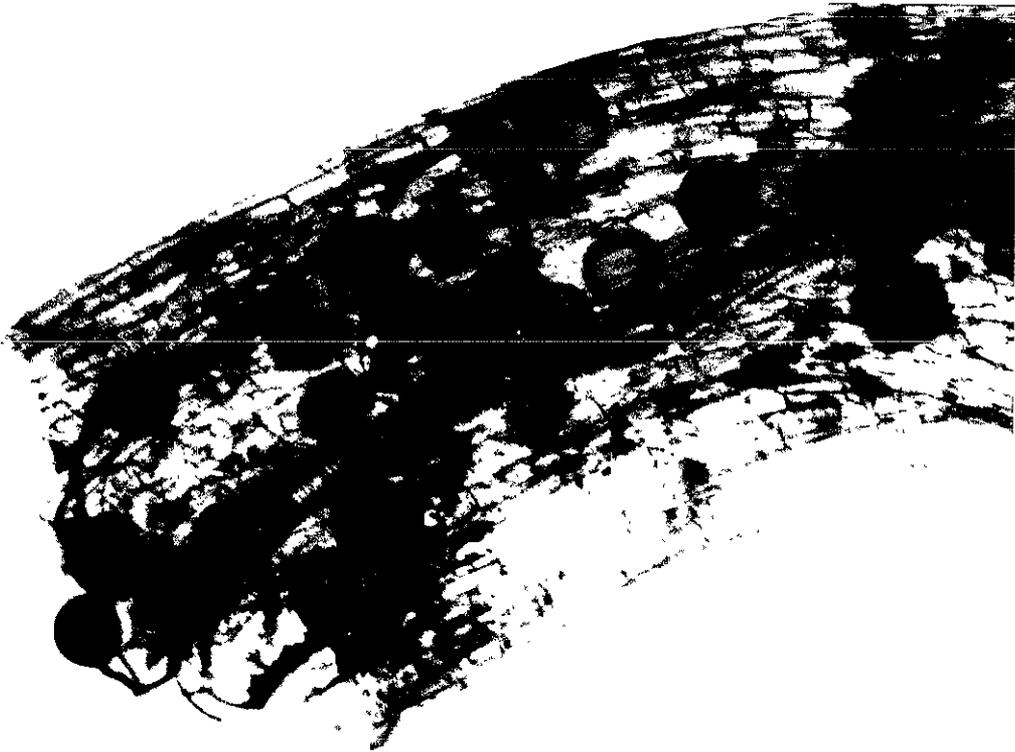
B
Lámina 6. A: Tubos germinativos de *Acaulospora* sp1 (t) B: Desarrollo de micelio en medio nutritivo de *Acaulospora* sp1 (m).



A



B



C

Lámina 7. Raíces transformadas colonizadas con *Glomus intraradix*, A: micelio (m) y arbusculos (a) formados dentro de las células. B: micelio (m) y vesículas (v) dentro de la raíz.. C: Formación de esporas intercelularmente (10X); esporas formadas dentro de la raíz(40X)

Cuadro 2. Porcentaje de raíces transformadas de zanahoria colonizadas con *Glomus intraradix*

NUMERO DE CAJA PETRI	RAÍCES COLONIZADAS EN PORCENTAJE POR CAJA PETRI
1	50
2	60
3	70
4	40
5	60
6	60
7	50
8	30
9	4
10	0
MEDIA	42.4

VI CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados y los resultados obtenidos, se pueden establecer las siguientes conclusiones.

En el Cerro Tepectipac, Se encontraron representantes de todas las familias del Orden Glomales, y cuatro de los seis géneros conocidos; **Glomus**, **Sclerocystis**, **Acaulospora** y **Scutellospora**.

Se identificaron taxonómicamente y describieron las especies *Glomus intraradix*, *Glomus sp.1*, *Glomus sp.2*, *Glomus geosporum* y *Acaulospora rugosa*.

Se obtuvieron cultivos monoespecíficos de las especies de hongos MA, *Glomus intraradix*, *Glomus sp.1* y *Acaulospora rugosa*.

La transformación genética de raíces de zanahoria con la cepa 9402 de *Agrobacterium rhizogenes* permitió la obtención de raíces suficientes en seis semanas, libres del inóculo inicial de la bacteria.

El método de Williams (1990), utilizado para la desinfección superficial fue eficiente tanto para esporas, esporocarpos y raíces conteniendo micelio y esporocarpos, siendo bajos los porcentajes de contaminación no afectando su germinación.

Acaulospora rugosa, presentó buenos porcentajes de germinación, *in vitro*, pero no colonizó ninguno de los dos hospederos utilizados.

No se logró la germinación de las esporas de *Glomus sp.1*.

Se obtuvo la colonización *in-vitro* con *Glomus intraradix* en raíces transformadas de zanahoria, observándose tanto micelio interno como externo así como arbusculos y vesículas dentro de las células de la raíz.

En el caso de cultivo de tejidos de raíces no se observó colonización, pero si hubo germinación de esporas y desarrollo de hifas.

El medio de cultivo utilizado (Bécard y Fortin, 1988) fue adecuado para el desarrollo y colonización de esta especie, así como para la producción de esporas nuevas en raíces transformadas de zanahoria.

La eliminación de sodio y disminución de fósforo y sacarosa, probablemente afectaron el proceso de colonización en *Acaulospora rugosa* y la germinación de las esporas en *Glomus* sp.1.

La utilización de este procedimiento abre la posibilidad de producir inoculante a gran escala, aunque antes deben de resolverse algunos problemas técnicos como la eliminación de altos contenidos de azúcares en los medios utilizados, pH etc.

VII LITERATURA CITADA.

- *Abbot, L. K. y Robson, A. D. 1977. The distribution and abundance of vesicular arbuscular endophytes in some Western Australian soils. **Aust. J. Bot.** **25**: 515-522.
- *Acosta, P. R., Sánchez, F. M., Cervantes, S. P. y Delgado, J. M. 1990. La Vegetación de los Cerros Tepectipac y Tizatlan. Boletín informativo No. 3. Jardín Botánico Tizatlán. Gobierno del Estado de Tlaxcala. Tizatlan Tlaxcala México.
- *Agrios, N. G. 1985. Fitopatología. LIMUSA. México.
- *Allen, M. F. Moore, S. T. Jr. y Christensen, M. 1980. Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular mycorrhizae. I. Cytikinin in the host plant. **Can. J. of Bot.** **58**: 371-374.
- *Allen, M. F., Moore, S. T. Jr. y Christensen, D. C. 1982. Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular mycorrhizae. II. Altered levels of gibberellin-like substances and abscisic acid in the host plant. **Can. J. of Bot.** **60**: 468-471.
- *Allen, M. F. 1984. VA mycorrhizae and colonizing annuals: implications for growth, competition and succession. In: S. E. Williams y M. F. Allen (eds.). **VA Micorrhizae and reclamation of arid and semiarid lands**. Univ. Wyoming Agric. Exp. Sta. Sci. rep. NSA. 1261. Laramie. Pp. 41-51.
- *Allen M.F. 1991. The Ecology of Mycorrhizae. Cambridge University Press. N.Y. U.S.A.
- *Azcón-Aguilar, C., Díaz-Rodríguez, R. M. y Barea, J. M. 1985. Effect of free-living fungi on the germination of *G. mosseae* on soil extract. In: **Gianinazzi-Pearson, V., y S. Gianinazzi.** (eds.). Physiology and genetics aspects on mycorrhizae. INRA, Press, Dijon, Paris. Pp. 337-340.
- *Azcón-Aguilar, C., Díaz-Rodríguez R.M. y Barea J. M. 1986a. Effect of free living fungi on the germination of *Glomus mosseae* on soil extract. In: **Gianinazzi-Pearson, V., y Gianinazzi. S.** (eds.). Physiological and genetics aspects of mycorrhizae. INRA, Paris. Pp. 515-520.
- *Azcón-Aguilar, C. Díaz-Rodríguez, R.M. y Barea, J. M. 1986b. Effects of soil microorganisms on spore germination and of growth the vesicular-arbuscular mycorrhizal "fungus *Glomus mosseae*", **Trans. Br. Mycol. Soc.** **86**: 337-340.
- *Azcón, R. 1987. Germination and hyphal growth of *Glomus mosseae* *in-vitro* effects of rhizosphere bacteria and cell-free culture media. **Soil Biol. Bioch.** **19**: 417-419.

- *Azcón-Aguilar, C., F. García-García y J. M. Barea, 1991. Germinación y crecimiento axénico de los hongos formadores de micorrizas vesículo-arbúsculares. **In:** (eds.). **Fijación y Movilización de nutrientes**. Vol. II. Fijación de nitrógeno y micorrizas. Consejo superior de Investigaciones Científicas Madrid, España. Pp. 28-47.
- *Bagyaraj, D. J. 1984. Biological interactions with VA mycorrhizal fungi. **In:** VA mycorrhizal fungi. (eds.). **Powel. C. LL. y D. J. Bagyaraj**. CRC Press Boca Raton Florida. U.S.A. Pp. 131-153.
- *Bagyaraj, D. J. 1991. Ecology of vesicular arbuscular mycorrhizae. **In:** Arora. D.K. B. Rai, F.G. Mukerji y G. R. (eds.). **Soil and Plant**. 1: 3-34.
- *Barea, J. M. y Azcón-Aguilar, T. C. 1983. Mycorrhizae and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants. **In:** . (eds.). **Advances in agronomy**. Brady, N. C, **36**: Pp. 1-54.
- *Barea, J. M., Azcón-Aguilar, C. y Roldan-Fajardo. 1984. Avances recientes en el estudio de las micorrizas V-A. I. Formación, funcionamiento y efectos en nutrición vegetal. **Anal. Edafol. Agrobiol**. **43**: 659-677.
- *Barea, J. M., Azcón-Aguilar, C. , Ocampo, J. A. y Azcón, R. 1991. Morfología, anatomía y citología de las micorrizas vesículo-arbúsculares **In:** J. Olivares y J. M. Barea (eds.). **Fijación y movilización de nutrientes** vol. III. Fijación de N y micorrizas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España. Pp. 149-194
- *Barkdoll, A.W. y Schenck, N.C. 1986. Effects of aluminium on spore germination of vesicular arbuscular micorrizas fungi and hyphal penetration of bean roots. **Phytopathology**. **76**: 1063-1064.
- *Baylis, G. T. S. 1967. Experiments on the ecological significance of phycomycetous mycorrhizas. **New Phytol**. **66**: 231-243.
- *Bécard, G. y Fortin, J. A. 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T- DNA transformed roots. **New Phytol**. **108**: 211-218. }
- *Bécard, G., Piché, Y. y Fortin, J. A. 1988. Some aspects of the biotrophy of VAM fungi. 2nd. European Symposium on Mycorrhizae, Praga. Pp. 27.
- *Bécard, G. y Piché, Y. 1989a. New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* **New Phytol**. **112**: 79-83.
- *Bécard, G. y Piché, Y. 1989b, Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Apl. Environ. Microbiol**. **55**: 2320 -2325.

- *Bécard, G. y Piché, Y. 1990. Physiological factors determining vesicular-arbuscular mycorrhizal formation in host and nonhost Ri T-DNA transformed roots. **Can. J. Bot.** **68**: 1260-1264.
- *Bécard, G. y Piché, Y. 1992. Establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza in root organ culture: Review and proposed methodology. **Methods in Microbiology** **24**: 88-108.
- *Bethelenfalvay, G. L. 1992. Mycorrhizas and crop productivity, In: Bethelenfalvay, G. J. y R. G., Linderman, (eds.). **Mycorrhizae in sustainable Agriculture**. American Society of agronomy. Madison.
- *Bowen, G. D. 1973. Mineral nutrition of ectomycorrhizae. In: Marks, G. C. y Kozlowski, T. T. (eds.). **Ectomycorrhizae their ecology and physiology**. Academic Press Londres. Pp. 151-205.
- *Calvet, C., Pera, J. y Barea, J. M. 1988. Interaction of *Trichoderma spp.* with *Glomus mosseae* and two wild pathogenic fungi, 2nd European Symposium on Mycorrhiza, Praga. Pp. 102.
- *Chabot, S., Bécard, G. y Piché, Y. 1992. Life cycle of *Glomus intraradix* in root organ culture. **Mycologia** **84 (3)**: 315-321.
- *Chilton, M., Tepper, D. A., Petit, A., David, C. Casses-Debart, F. y Tempé, J. 1982. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genome of the host plant root cells. **Nature**. **295**: 432-434.
- *Daft, M. J., Hacskaylo, E. y Nicolson, H. 1975. Arbuscular mycorrhizas in plants colonizing coal spoil in Scotland and Pennsylvania. In: F.E. Sanders, B. Mosse y Tinker, P. B. (eds.). **Endomycorrhizas**. Academic Press. Londres Pp. 561-580.
- *Dalpé, Y. y Mitrow, G. 1990. Long-term preservation of *Glomus mosseae*. **Proceedings the eigh North American Conference on Mycorrhizas**. 5-8 spe. Jackson. Pp 66.
- *Daniels, B.A. y S. O. Graham, 1976. Effects of nutrition and soil extracts on germination of *Glomus musseae* spores. **Mycologia** **68**: 108-116.
- *Daniels, B.A. y J. Trappe, 1980. Factors affecting spore germination of the vesiculo arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus epigaeus*. **Mycologia** **72**: 457-471.
- *Daniels, B. A. y Skipper, H. D. 1982. Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. Pp. 29-35. In: Schenck N. C. (eds.) **Methods and principles of mycorrhizal research**. American Phytopathological Society. St. Paul. Pp. 29-35

- *Douds, D. D. Jr. y Schenck, N. C. 1990. Cryopreservation of spores of vesicular-arbuscular mycorrhizas fungi. **New Phytol.** **115 (4):** 667-674.
- *Douds, D. D. Jr., Jenke, R. R. ., y Peters, S. E. 1993. VAN fungus spore populations and colonizate of roots of maize and soybean under conventional and low input sustainable **Agriculture. Agric., Ecosystems and Environ.** **43:** 325-335.
- *Elias, S.S. y Safir G. R. 1987. Hayphal elongation of *Glomus fasciculatum* in response to root exudates. **Appl Environm. Microbiol.** **53:** 1928-1933.
- *Ferguson, J. J. y Woodhead, S. H. 1982. Production of endomycorrhizal inoculum. A. Increase and maintenance of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytol.** **92:** Pp. 1754.
- *Furlan, V., Bartsem, H. y Fortin, J. A. 1980. Media for density gradient extraction of endomycorrhizal spores. **Trans. Br.Mycol.Soc.** **75:** 336-338.
- *García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen (para adaptarlo a las condiciones de las República Mexicana). SIGSA. México, D.F.
- *Gavito, P. M. 1991. Estudio de los hongos micorrízicos arbusculares asociados al maíz en el Volcan Malintzin Tlaxcala. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Ciecias UNAM. México, D. F.
- *Gemma, J. N y Koske, R. E. 1988. Pre-infection interactions between roots and the mycorrhizas fungus *Gigaspora gigantea* chimiotropism of germ tubes and root grwth response. **Trans. Br. Mycol. Soc.** **91:** 123-132.
- *Gemma, J. N. y Koske, R. E. 1990. Mycorrhizae in recent volcanic substrates in Hawai. **Amer. J. Bot.** **77:** 1193-1200.
- *Gerdemann, J. H. y Nicolson, T. H. 1963. Spores of mycorrhizal Endogone extracted from soil by wet sieving and decanting. **Trans. Br. Mycol. Soc.** **46:** 235-244.
- *Gianinazzi-Pearson, V. y Azcón-Aguilar, C. 1991. Fisiología de las micorrizas vesículo arbusculares. In: J. Olivares y J. M. Barea (eds.). **Fijación y Movilización Biológica de nutrientes** Vol. II. Fijación de N y micorrizas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, España. Pp. 175-202.
- *Giovannetti, M. y Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in root. **New Phytol.** **84:** 489-500.
- *Gnekow, M. A. y Marschner, H. 1989. Role of VA micorrhizal in growth and mineral nutrition of apple (*Malus pumila* var. *domestica*) rootstock cutings. **Plant and soli** **119:** 285-293

- *Graham, J. H. 1982. Effect of citrus root on germination of chlamidospores of the vesicular arbuscular mycorrhizas fungus, *Glomus epigaeum*. **Mycologia** **74**: 831-835.
- *Graham, J. H. 1986. Citrus micorrhizae potential benefits and interactions with pathogens. **Hort. Science** **21**: 1302-1306.
- *Green, N. E., Graham, S. O. y Schenck, N.C. 1976. The influence of pH on the germination of vesicular- arbuscular mycorrhizal spore. **Mycologia** **68**: 929-934.
- *Grierson, D. y Covey, N. S. 1991. Biología Molecular de las plantas. Acriba, S. A. pp. 149-163.
- *Hamill, J. D. Parr, A. J. Rhodes, M. J. C. Robins, R. J. y Walton, N. J. 1987. Ti plasmids of *Agrobacterium rhizogenes*. **Biotechnology**. **5**: 800-804.
- *Harley, J. L. y Smith, S. E. 1983. Micorrhizal Symbiosis. Academic Press, Londres.
- *Hayman D. S. y B. Mosse, 1979. Improved growth of white clover in hill grasslands by micorrhizal inoculation. **Ann appl. Biol.** **93**: 141-148.
- *Harley, J. L. y Harley, E. L. 1987. A check-list of mycorrhizas in thw British flora. **The New Phytol.** **105**: (2) 1-102.
- *Hardie, K. 1985. Effects of pot-culture age on spore germination in *Glomus mosseae*. **Proccedings of the 6th North American Conference on Micorrhizal.** 25-29 of june. Bend. Pp. 379.
- *Hayman, D. S. y . Mosse, B. 1979. Improved growht of white clover in hill grasslands by micorrhizal inoculation. **Ann Appl. Biol.** **93**; 141-148.
- *Hepper, C. M. y Smith, G. A. 1976. observations on the germination of endogone spores. **Trans. Br. Mycol. Soc.** **66**: 187-194.
- *Hepper, M. 1979. Germination and growth of *Glomus caledonium* spores the effects inhibitors and nutrients. **Soil. Biol. Biochem.** **14**: 269-277.
- *Hepper, C. M. y Jackbsen, I. 1983. Hyphal growth from spores of the micorrhizas fungus *Glomus calendonius*; effects of aminocids. **Soil. Biol. Biochem.** **15**: 55-58
- *Hepper, C.M. 1984. Isolation and culture of VA micorrhizas (VAM) fungi. In: (eds.). **Powell, C. Li., & Bagyaraj, D. J.** VA Mycorrhizas. CRC Press, Boca Raton, Florida. Pp. 95-112.
- *Hepper, C. M. y Smith, G. A. 1976. Observations on the germination of Endogone spores. **Trans. Br, Mycol.Soc.** **66**: 189 - 194.

- *Hepper, C. M. y Jakobsen, I. 1983. Hyphal growth from spores of the mycorrhizal fungus *Glomus calendonius*; Effects of amino acids. **Soli. Biol. Biochem.** **15**: 55-58.
- *Honrubia, M., Torres, P., Diaz, G., Cano, A. J., Molina-Niñorola, C. y Morte, M. A. 1992. Utilización de micorrizas en trabajos de repoblación en terrenos con procesos de desertificación en el Sudeste Español. ICONA-LUCDEME. Murcia, España. Pp 7-44.
- *Howeler R.H. y Sieverding, E. 1983. Potentials and limitations of mycorrhizal inoculations illustrated by experiments with field growth cassava **Plant and soil** **75**: 245-261.
- *Islam, R. H., Ayanaba, A. y Sanders, F.E. 1980. Response of Cowpea *Vigna unguiculata* to inoculation with VA- Mycorrhizal fungi and to rock phosphate fertilization in some unsterilized. **Nigeria Soils** **54**: 107-117.
- *Jackson, R. M. y Mason, P. A. 1984. Mycorrhiza. Arnold, Londres
- *Janos, D. P. 1984. Methods for vesicular-arbuscular mycorrhiza research in the lowland wet Tropics. In: E. Medina, H. A. Mooney y Vazquez-Yañes (eds.). **Physiological Ecology of plants of the wet Tropics**. The Hague: Junk. Pp 173-187.
- *Jonhson, N. C., Tilman, D. y Wedin, D. 1992. Plant and soil controls on mycorrhizal fungal communities. **Ecology** **73**: 2034-2042
- *Jodice, R., Nappi, P. y Luzzati, A. 1981. Influenza delle micorrizze vesicula-arbuscular e della sostanza organica sull'nutrizione borica de girasole. Presso Istituto Botanico dell'Univertita di Torino. Italia. **Allonia** **24**: 43-48.
- *Kado, C. I. y Kleinhofs, A. 1980. Genetic modification of plant cells through uptake of foreign DNA. **Rev. Cytol.** **18**: 47-79.
- *Khan, A. G. 1972. The effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations on growth of cereals. I. effects on maize growth. **New Phytol.** **71**: 613-619.
- *Khan, A. G. 1975. The effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations on growth of cereals. II. effects on wheat growth. **Ann. Appl. Biol.** **80**: 27-36.
- *Koske, R. E. 1981a. *Gigaspora gigantea* observations on spore germination of a VA mycorrhizal fungus. **Mycologia** **73**: 288-300.
- *Koske, R. E. 1981b. Multiple germination by spores of *Gigaspora gigantea*. **Trans. Br. Mycol. Soc.** **76**: 328-330.
- *Koske, R. E. 1982. Evidence for a volatile attractant from plant roots affecting germ tubes of a VA mycorrhizal fungus. **Trans. Br. Mycol. Soc.** **79**: 305-310.

- *Kuo C. G. y Huang, R. S. 1982. effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae on the growth and yield of rice-stubble soybeans. **Plant and soil** **64**: 325-330.
- *Linderman, R. G. 1988. Micorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect. **Phytopatology** **78**: 336-371.
- *López-Sánchez, M. E. y Honrubia, M. 1992. Seasonal variation of vesicular-arbuscular mycorrhizae in eroded soils from Southern Spain. **Mycorrhiza** **2**: 33-39.
- *Louis, I. 1990. Differential response in growth and mycorrhizal colonisation of soybean to inoculation with two isolates of *Glomus clarum* in soils of different availability **Plant and soil** **112**: 37-43.
- *Malloch, D. W., Pirozynski, K. A. y Raven, P. H. 1980. Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbiosis in vascular plants. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **77**: 113-118.
- *Marx, D. H. 1973. Mycorrhizae and feeder root diseases. In: Marks, G. C. y Kozłowski, T. T. (eds.) **Ectomycorrhizae their ecology and physiology**. Academic Press N. Y. Pp 351-382.
- *Mayo, K., Davis, R. E. y Motta J. 1986. Stimulation of germination of spores of *Glomus versiforme* by spore-associated bacteria. **Mycologia** **78**: 426-431.
- *Mejstrik, V. K. y Krause, H. H. 1973. Uptake of ³²P Pinus radiata roots inoculated with *Suillus luteus* and *Cenococcum graniforme* from different sources of available phosphate. **The New Phytol.** **72**: 137-140.
- *Miller-Wideman, M. A. y Watrud, L.S. 1984. Sporulation of *Gigaspora margarita* on root cultures of tomato. **Can. J. of Bot.** **30**: 642-646.
- *Molina, R. y Trappe, J. M. 1984. Mycorrhiza management in barer not nurseries pp. 211-223. In: Dureya, M. L. and D. L. Thomas (eds.). **Forest nursery manual**. Martin Nijhoff. La Haya.
- *Morton, J. B. 1989. Mycorrhizal fungi slide set. Morphological characteres Important in Identifying Endomycorrhizal Fungi in the Zygomycetes. Audio-Visual Electronic Publication 2. Agricultural and Forestry Experiment station. West Virginia University, West Virginia.
- *Morton, B. J. y Benny, G. L. 1990. Revised clasification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order Glomales, Two new soborders, Glomineae and Gigasporineae. **Mycotaxon** **37**:474-491.
- *Mosse, B. 1962. The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizae under aseptic conditions. **J. Gen. Microbiol.** **27**: 509-520.

- *Mosse, B. 1970. Culture of Endogone. **Rothamsted Exp. Stn, Annu. Rep.** 1: 97.
- *Mosse, B. y Phillips, J. M. 1971. The influence of phosphate and other nutrients on the development of vesicular-arbuscular mycorrhiza in culture. **J.Gen. Microbiol.** **69**: 157-166.
- *Mosse, B. y Hepper, C. M. 1975. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organ cultures **Physiol. Plant Pathol.** **5**: 215-223.
- *Mosse, B. , Stribley, D. P. y Letacon, F. 1981. Ecology of mycorrhizae and mycorrhizal fungi. **Advances In: Microb. Ecol.** **5**: 137-210.
- *Mosse, B. 1988. Some studies relating to "independent" growth of vesicular-arbuscular endophytes. **Can. J. Bot.** **66**: 2533-2540
- *Mugnier L. y Mosse, B. 1987. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in transformed root-inducing T-DNA roots grown axenically. **Phytopatology** **77** 1045-1050
- Munsell soil color charts. Soil Test Inc. Maryland. 1975.
- *Nava, G. Y. 1994. Población de hongos micorrízicos arbusculares en tepetates recuperados para uso agrícola. Tesis de Licenciatura. Departamento de Agrobiología, Ixtacuixtla, Tlaxcala. UAT.
- *Nemec, S., Menge, J. A., Platt, R. G. y Johnson, L. V. 1981. vesicular arbuscular mycorrhizal fungi associated with citrus in Florida and California and notes on their distribution and ecology. **Mycologia** **73**: 112-127.
- *Newman, E. I. y Reddell, P. 1987. The distribution of mycorrhizas among families of vascular plants. **New Phytol.** **106**: 745-751.
- *Nicolson, T. H. 1967. vesicular arbuscular mycorrhizae a universal plant symbiosis. **Science Progress.** **55**:561-581.
- *Nicolson T.H. 1975. Evolution of vesicular-arbuscular micorrizas. **In: Sanders F. E.; Mosse B., y Tinker P. B.** (eds.). Endomycorrizas. Academic. Press. London. Pp 25-34.
- *Olivares, J. y Barea J. M. 1991. Fijación y movilización biológica de nutrientes. Vol. II. (eds.). **Fijación de N y Micorrizas.** CSIC, Madrid, España. Pp 266.
- *Perrin, R. 1985. Peut-on compter sur les mycorrhices pour lutter contre les maladies des plantes ligneuses?. **Eur. J. For Path,** **15**: 372-379.

*Powell C. Ll. y Metcalf, F. D. 1980. Micorrhizal inoculation of a barley crop in the field. New zealand. **J. Agr. Res.** **23**:107-109.

*Phillips, J. M. y Hayman, D. S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizas fungi for rapid assesment of infection. **Trans, Br. Micol. Soc.** **55**: 158-161

*Redhead, J. F. 1980. Mycorriza in natural tropical forest.. In: Peitsa, M. (ed.). **Tropical Mycorrhizal Research**. Oxford University Press, New York. Pp. 127-146.

*Reeves, F. B., Wagner, D., Moormant, T. y Kiel, J 1979. The role of endomycorrhizae in revegetation practices in the semi-arid west. I. H. Comparison of incidence of mycorrhizae in severely disturbed natural enviroments. **Amer J. Bot.** **66**: 6-13.

*Ryeder, M. H., Tate, M. E. y Kerr, A. 1985. Virulence properties of strains of *Agrobacterium rhizogenes* on the apical and basal surfaces of carrot discs. **Plant. Physio.** **77**: 215-221.

*Rygielwiz, P. T. y Bledsoe, C. S. 1984. Rubidium transfer rates and storage in micorrhizal coniferous roots. In: Molina R. (ed.). **Proc. 6th North American conference Mycorrhizae**. Bend (OR). Pp. 345.

*Rzedowski J. 1978. Vegetación de México. LIMUSA. México.

*Saif S.R. y G. Khan, 1977. The effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal associated on growth of cereals. III. effects on barley growth. **Plant soil.** **47**: 17-26.

*Safir, G. R., J. O. Siquiere y P.S. Carlson, 1990. Imporvement and synchronization of VA mycorrhizal fungal spore germination by short-term cold storage. **Soil Biol. Biochem.** **22**: 109-111.

*Sanders, J. R. 1990. Seasonal patterns of vesicular-arbuscular mycorrhizal ocurrence in grassland, **Symbiosis**, **9**: 315-320.

*Schell J. *et al.* 1979. Interactions and DNA transfer between *Agrobacterium tumefaciens*, the Ti plasmid and the host. (eds.). **Proc. R. Soc. London. Ser. B.** **204**: 251-266.

*Schenck, N. C. 1981. Can mycorrhiza control root disease?. **Plant Disease** **65**: 230 - 234.

*Schenck, N. C., S. O. Graham y N. E. Green, 1975. Tempe natura and light effect on contamination and spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycologia** **67**: 1189-1192.

- *Schenck, N. C. y Nicolson, T. H. 1977. Azoosporic fungus occurring on species of *Gigaspora margarita* and others vesicular-arbuscular mycorrhizas fungi. **Mycologia** **69**: 1049-1053.
- *Schenck N. C., y Y. Pérez. 1990. Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. 3a. edition. Published by Synergistic publications. Gainesville. U.S A.
- *Schonbeck, F. 1979. Endomicorrhizas in relation to plant disease In: Schippers, B. y Gams, W. (eds.). **Soil-borne plant pathogens**. Academic Press. N. Y. U.S.A. Pp 271-280.
- *Secilia, J y Bagyaraj, J. 1988. Fungi Associated with pot cultures of vesicular arbuscular mycorrhizas. **Trans Br. Mycol. Soc.** **90**: 117-119
- *Secretaria de Programación y Presupuesto. 1986. Sintesis geográfica de Tlaxcala. INEGI.
- *Sieverding, E. 1987. VA. Mycorrhizae in soils under cultivation in tropical America Transaction of the XII Congress of international Society of soil Science **VI**: 840 -852.
- *Siqueira J O., Hubbell, D. H. y Mahmud, A. W. 1984. Effect of liming on spore germination, germ. tube growth and root colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizae fungi. **Plant Soil.** **76**:115-124.
- *Siqueira, J. O. y Hubbell, D. H. 1986. Effect of organic substrates on germination and germ tube growth of vesicular-arbuscular mycorrhizas fungus spores *in-vitro*. **Peq. Agropec. Bras.** **21**: 523-527.
- *Siqueira, J. O. 1987. Cultura axénica e monoaxénica dos fungos micorrízicos vesículo-arbúscular. II Reuniao Brasileira sobre micorrizas Sao Paulo, pp 44-70.
- *Siqueira, J. O. Hubbell, D. H. y Schenck N. C. 1987. Spore germination and germ tube growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *in vitro*. **Mycologia** **74**: 952 -959.
- *Slankis , V. 1973. Hormonal relationships in mycorrhiza. In: Marks, G. C. y Kozlowski, T. T. (eds.). **Ectomycorrhizae their Ecology and Physiology**.. Academic Press N. Y. Pp 231-298
- *Sparling, G. P. y Tinker, P. B. 1975. Mycorrhizas in peunine grassland. In: Sanders F. E. T., Mosse y Tinker, P. B. (eds.). **Endomicorrhizas**. Academic Press, Londres. Pp. 545-560
- *Strulu y, D. G. y Romand, G. 1987. Culture axenique de vesicules solés á partir d'endomicorrhizes et re-assetation in-vitro á dés racines de tomate. **Comp. Rend.Acad. Sc. Paris** **292**: 153-156.

- *Struble, J. E. y Skipper, H. D. 1988. Vesicular-arbuscular mycorrhizas fungal spore production as influenced by plant species. **Plant and soil** **109**: 277-280.
- *Stubblefield, S. P., T. N. Taylor y J. M. Trappe, 1987. Vesicular-arbuscular mycorrhizae from the triassic of antartica. **Amer. J. Bot.** **74**: 1904-1911.
- *Sylvia, D. M. y N. C. Schenck. 1983. Germination of chlamydospores of three *Glomus* species as affected by soil matric potential and fungal contamination. **Mycologia** **75**: 30-35.
- *Sylvia, D. M. 1984, Production of inocula of VA mycorrhizas fungi. pp. 8-16. In: Applications of Mycorrhizas fungi in crop production. (eds.). **J. J. Ferguson**, Univ. of Florida. Gainesville. pp 8-16
- *Tepfer, D. A. y Tempé, J. C. 1981. Production d' agropine par des racines formées sous l'action d' *Agrobacterium rhizogenes* Souche A4. **Comp. rend. Acad. Sc. Paris** **292**: 153-161.
- *Tepfer, D. A. 1989. Ri-T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes*. a source of genes having applications in rhizosphere biology and plant development, ecology and evolution. In: (eds.). **T. Kosuge and E.W. Nester Mc Graw-Hill** Plant Microbe Interactions. Molecular and Genetic Perspective. Academic Press N. Y. **3**: 294-342
- *Thomas, G. W. y Jackson, R. M. 1983 Growth responses of sitka spruce seedlings to mycorrhizal inoculation. **New Phytol.** **95**: 223-229.
- *Thompson, G. y Medue, R. J. 1984. Effects of aluminium and manganese on the growth of ectomycorrhiza fungi. **Env. Microbiol. Vol. 48: (3)**: 556-560
- *Tommerup, I. C. 1987. Physiology and ecology of VAM spore germination and dormancy in soil **Proceedings of the Seventh North American Conference on Micorrhiza** Ed. Sylvia, D. M. *et al.* 3-8 de Mayo. Gainesville, Pp 175-177.
- *Tommerup, I. C. 1983. Sporedormancia in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Trans. Br. Mycol. Soc.** **81**: 37-45.
- *Trappe, J. M. 1987. Phylogenetic and ecologist aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary stand point. In: Safir, G. R. (eds.). **Ecophysiology of VA mycorrhizas plants**. CRC. Press Boca Raton. Florida. Pp. 5-25.
- *Vázquez, T.G. A. M. 1992. Ecología y Formación ambiental. Mc Graw-Hill.
- *Watrud, L. S., J. J. Heithaus, y E. G. Jaworski, 1978. Evidence for production of inhibitor by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. **Mycol. Soc.** **70**: 821-828.

*Watrud, L. S. 1982. Spore germination and axenic culture of endomycorrhizae. **Mycol. Soc.** **60**: 79-82.

*Werner G. 1988 Los suelos del estado de Tlaxcala. Gobierno del estado de Tlaxcala. Universidad Autónoma de Tlaxcala, México.

*Whitemann, R. H., Scheffer, K. R. y Strobel G. 1987. Factors influencing root formation in dicots by *Agrobacterium rhizogenes*. **Can. J. Bot.** **66**: 642-644.

*White, P. R. 1954. The cultivation of animal and plant cells. 2nd ed. Ronald Press, New York. Pp. 258.

*Williams, P. G. 1984. Obligate parasitism and axenic culture. In: (eds.) **W. R. Bushnell & A. P. Roelfs**. The cereal Rusts. **1**. New York, U. S. A. Academic Press. Pp. 339-340.

*Williams, P. G. 1990. Desinfecting vesicular-arbuscular mycorrhizas. **Mycological Research** **94**: 995-997.

1) TÉCNICA DE TAMIZADO HÚMEDO Y DECANTACIÓN DE GERDEMANN Y NICOLSON (1963).

1.- Pesar 50 g de suelo húmedo y colocarlos en un frasco de aproximadamente 1 litro.

2.- Agregar agua corriente hasta 3/4 del frasco y agitar con fuerza.

3.- Dejar reposar de 10 a 15 segundos y pasar el sobrenadante a través de una serie de tamices de malla desde 0.50 mm hasta 40 micras, repetir lo anterior un mínimo de 5 veces.

i

2). GRADIENTES DE SACAROSA 20 Y 60% (DANIELS Y SKIPPER, 1982)

1.- recoger el suelo de los tamices y colocarlo en un gradiente de sacarosa de 20 y 60%.

2.- Centrifugar a 2500 rpm durante 3 minutos

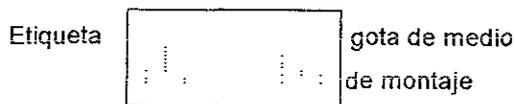
3.- Pasar el sobrenadante a través de un pequeño tamiz de 2 cm de diámetro y con un mallaje de 20 micras.

4.- Recoger los residuos del tamiz con agua destilada y colocarlos en una caja de Don Caster para contar las esporas.

3).- ELABORACIÓN DE PREPARACIONES PERMANENTES DE HONGOS MICORRÍZICOS VESÍCULO ARBUSCULARES CON PVL (SCHENCK Y PÉREZ, 1990).

1.- Tomar las esporas con una pipeta, con una mínima cantidad de agua. Colocar las esporas en un vidrio de reloj con agua destilada.

2.- En un portaobjetos poner una gota de medio de montaje sobre el lado izquierdo y derecho, dejando un espacio en una extremidad para etiquetar.



en cada parte habrá de 10 a 25 esporas

3.- Agregar las esporas con una mínima cantidad de agua en el medio de montaje.

4.- Simultáneamente se mezclan suavemente las esporas y el medio de montaje con una aguja u otro objeto para dispersar ligeramente las esporas.

5.- Dejarlo el medio de montaje condensarse por un mínimo de 3-5 minutos para hacerse más viscoso. Durante este tiempo las esporas pueden ser ubicadas en el centro de la gota para orientar el carácter deseado.

6.- Mover perfectamente el cubre-objetos seco a un ángulo de 45° hacia la gota de medio de montaje conteniendo las esporas hasta el contacto con el medio.

7.- Suavemente, realizar el deslizamiento del cubre-objetos sobre el medio de montaje (PVL). Dejar que el peso del cubre-objetos disperse el en medio de montaje,

esto puede disminuir la formación de burbujas de aire. No aplicar presión al cubre-objetos en este proceso.

8.- Repetir los pasos 6 y 7 en la segunda gota.

9.- Suavemente quebrar la pared de las esporas debajo del cubre-objetos por la aplicación ligera de presión sobre el cubre-objetos con la goma de un lápiz o el pulgar usando papel para evitar ensuciar la superficie del cubre-objetos.

10.- Dejar el medio de montaje con las esporas a secar por varias horas o toda la noche en una posición plana. Después de este período examinar las esporas; es importante que la rotura de las esporas sea la adecuada.

Las esporas de diámetro pequeño (menor de $77\ \mu\text{m}$) o con paredes extremadamente gruesas pueden ser difíciles de romper, si las paredes no están rotas realizar presión nuevamente en este paso. Mientras se observan las esporas bajo el microscópico, aplicar ligeramente más presión sobre el cubre-objetos hasta que las esporas se rompan o las paredes se separen ligeramente. Una punta de un lápiz o goma se puede usar para romper cada esporas individualmente.

11.- Limpiar todo el exceso de medio de montaje con un algodón ligeramente húmedo con solvente como etanol, dejar secar.

12.- Sellar los bordes del cubreobjetos con esmalte para uñas u otro sellador, dejar secar el sellador.

4).- Medio nutritivo YEB.

Cantidades para preparar 1 litro de medio de cultivo.

Extracto de levadura.....5 gr.

Peptona.....5 gr.

Extracto de carne.....5 gr.

Sacarosa5 gr.

Agar.....7 gr.

Ajustar el pH a 7.2.

Agregar los componentes de acuerdo al orden de la lista, agitar el medio de cultivo hasta que se mezclen completamente y calentar en un mechero hasta que este transparente y todos los componentes estén disueltos y a continuación esterilizar en autoclave a 15 lbs, por 15 minutos, una vez esterilizado ajustar el pH y adicionar los antibióticos como se indica.

Para el caso de la cepa 9402 de *Agrobacterium rhizogenes* con marcador a Kanamicina se le adicionan los siguientes antibióticos a la dosis que se señala:

Rifampicina 500 mg/l de medio

Kanamicina 500 mg/l de medio

Estos antibióticos se adicionan cuando el medio nutritivo ya ha sido esterilizado y alcanza una temperatura de 35 a 40°C, justo antes de solidificar, para poder hacer el vaciado en las cajas petri , cuando es liquido se adicionan los antibióticos cuando ya se ha enfriado completamente .

5).- DE MEDIO DE WHITE MODIFICADO "MWM"(BÉCARD Y FORTIN, 1988)

Elementos	mg l ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	731
KNO ₃	80
KCl	65
KH ₂ PO ₄	4.8
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	288
Sacarosa	10000
NaFeEDTA	8
KI	0.75
MnCl ₂ .4H ₂ O	6
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2.65
H ₃ BO ₃	1.5
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.13
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.0024
Glycina	3
Tiamina	0.1
Piridoxina	0.1
ácido nicotínico	0.5
Myo-inositol	50
Bacto Agar	10,000

Ir agregando los elementos de acuerdo con el orden en que aparecen, agitar y disolver los componentes, calentar hasta que el medio este transparente se ajusta el pH a 5.5, a continuación se mete a esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Una vez esterilizado y cuando alcanza una temperatura de 40°C se le agrega el antibiótico carbenicilina 500 mg /l de medio nutritivo. Procediendo a continuación al vaciado en cajas petri.

6).- TÉCNICA PARA ACLARAR Y TEÑIR RAÍCES (PHILLIPS Y HAYMAN, 1970).

1.- Lavar las raíces con agua corriente.

2.- Agregar KOH al 10% y dejarlas durante 24 horas. También se pueden hervir a baño maría hasta que las raíces estén flexibles.

3.- Lavar las raíces con agua destilada.

4.- Aplicar peróxido de hidrógeno alcalinizado y dejar de 10 a 15 min.

5.- Lavar las raíces con agua destilada.

6.- Sumergirlas en HCl al 1%, dejar de 5 a 10 min.

7.- Sin lavar, agregar la solución colorante, (azul de tripano al 0.05% por cada 100 ml de solución).

7) AZUL DE TRIPANO

100 ml de ácido láctico

200 ml de glicerina

100 ml de agua

Relación (v:v:v) 1:2:1 de ácido láctico, glicerina y agua, con 0.05 g de colorante azul de tripano para cada 100 ml de solución.