

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**INDUCCIÓN DE *GLOMUS INTRARADICES* EN MEDIO DE CÉLULAS
VEGETALES EN SUSPENSIÓN**

PRESENTA
M.C. LUIS ENRIQUE FLORES JIMÉNEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**

DICIEMBRE, 2016

**Inducción de *Glomus intraradices* en medio de células vegetales en
suspensión.**

Dr. Hugo Alberto Luna Olvera
DIRECTOR

Dr. Benito Pereyra Alférez
SECRETARIO

Dra. Ma. Guadalupe Rojas Verde
VOCAL 1

Dra. Myriam Elías de los Santos
VOCAL 2

Dra. Lilia H. Morales Ramos
VOCAL 3

Dra. Ma. Carmen Ojeda Zacarías
CODIRECTOR EXTERNO

**Inducción de *Glomus intraradices* en medio de células vegetales en
suspensión.**

Dr. Hugo Alberto Luna Olvera
DIRECTOR

Dra. Carmen Ojeda Zacarías
CODIRECTOR EXTERNO

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Hugo Alberto Luna Olvera por la asesoría y revisión de esta investigación y por la oportunidad de realizar mi posgrado de maestría.

A la Dra. Carmen Ojeda por la asesoría y el apoyo profesional y técnico que me brindó en la realización de esta investigación.

Al Dr. Alberto Flores Olivas por su apoyo profesional, y práctico que me permitió realizar este trabajo.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi padre a mi madre a mi hermano, quienes me dieron su apoyo y experiencias que me han servido en el desarrollo de mi persona.

A Dios que me permitió vivir para concretar este logro personal.

A mis familiares quienes me ayudaron en mi estancia en esta universidad, así como su compañía y apoyo.

A mis compañeros quienes hicieron ameno y que me ayudaron durante todo el proceso para concluir esta investigación.

INDICE

Agradecimientos	I
Dedicatoria	II
Índice	III
Índice Tablas	IV
Índice Figuras	V
1.Resumen	VII
2.Introducción	1
3.Definición del problema y justificación	3
4.Objetivos	4
5.Hipotesis	5
6.Antecedentes	6
6.1.Micorrizas	6
6.2.Tipos Micorrizas	6
6.3 <i>Glomus sp</i> : aspectos generales	7
6.4.Cultivos celulares vegetales	12
6.5. Cultivos de células vegetales	14
6.6 Interacción hongos micorrizicos y células vegetales en suspensión	16
7.Materiales y métodos	18
7.1.Desinfección de material vegetal	18
7.2.Inducción y mantenimiento de callo	18
7.3. Inducción y mantenimiento de los cultivos en suspensión	20
7.4.Obtención e inoculación de esporas	21
7.5.Propagación de esporas de <i>Glomus intraradices</i> en cultivos en suspensión	21
8.Resultados	22
9.Discusiones	36
10.Conclusiones	39
11.Literatura citada	40

INDICE DE TABLAS

Tablas		Núm. Pagina
Tabla 1	Composición del medio de Murashige-Skoog.	19
Tabla 2	Tratamientos Evaluados conforme a la dosis de los fitoreguladores y dosis de sacarosa	19
Tabla 3	Tratamientos Evaluados conforme a la dosis de los fitoreguladores y dosis de sacarosa	21
Tabla 4	Crecimiento en mm ² de cada una de las plantas evaluadas los tratamientos correspondientes a la primera fecha de toma de datos.	22
Tabla 5	Crecimiento en mm ² de cada una de las plantas evaluadas los tratamientos correspondientes a la segunda fecha de toma de datos.	22
Tabla 6	Crecimiento en mm ² de cada una de las plantas evaluadas los tratamientos correspondientes a la tercera fecha de toma de datos.	23
Tabla 7	Comparación de las medias de crecimiento para cada uno de los tratamientos, con un nivel de significancia de 0.05, con DMS para la tabla 7 de, 0.4581, para la tabla 8 de, 4.7539 y para la tabla 9, 0.9906.	23
Tabla 8	Comparación de las medias de crecimiento para cada uno de los tratamientos, con un nivel de significancia de 0.05, con DMS para la tabla 7 de, 0.4581, para la tabla 8 de, 4.7539 y para la tabla 9, 0.9906.	23
Tabla 9	Comparación de las medias de crecimiento para cada uno de los tratamientos, con un nivel de significancia de 0.05, con DMS para la tabla 7 de, 0.4581, para la tabla 8 de, 4.7539 y para la tabla 9, 0.9906.	23

INDICE DE FIGURAS

Figura		Núm. Pagina
Figura 1	Tipos de micorriza	7
Figura 2	Ciclo vida <i>Glomus</i>	8
Figura 3	Cultivo células en suspensión	15
Figura 4	Siembra de Callo vegetal en el medio MS	18
Figura 5	Establecimiento de los callos en condiciones de luz y oscuridad	20
Figura 6	Crecimiento de de las especies vegetales evaluadas en respuesta a los tratamientos correspondientes:1, Jatropha; 2, Pithaya; 3,Kalanchoe; 4, Helecho; 5, Papa; 6;Astrophytum; 7, Moringa; 8, Ebano; 9,Lisianthus;10, Tabaco.	25
Figura7	Muestran la el crecimiento de las especies de expalntes que mayor crecimiento presentaron, <i>Astrophytum</i> , ébano y jatrofa .	26
Figura 8	Muestran la el crecimiento de las especies de expalntes que mayor crecimiento presentaron, <i>Astrophytum</i> , ébano y jatrofa.	26
Figura 9	Muestran la el crecimiento de las especies de expalntes que mayor crecimiento presentaron, <i>Astrophytum</i> , ébano y jatrofa	26
Figura 10	Condiciones de agitamiento de los cultivos en suspensión inoculados con <i>G. intraradices</i>	27
Figuras 11-18	Micelio desarrollado de <i>G.intraradices</i> en los cultivos de <i>Astrophytum</i> en los diversos Tratamientos.	27
Figuras 19-26	Micelio desarrollado de <i>G.intraradices</i> en los cultivos de Ébano en los diversos Tratamientos.	28
Figuras 27-34	Micelio desarrollado de <i>G.intraradices</i> en los cultivos de Jatrofa en los diversos Tratamientos.	30

Figuras 35-42	Esporas de <i>G.intraradices</i> formadas en los cultivos de <i>Astrophytum</i> en los diversos Tratamientos.	31
Figuras 43-50	Esporas de <i>G.intraradices</i> formadas en los cultivos de Ébano en los diversos Tratamientos.	32
Figuras 51-58	Esporas de <i>G.intraradices</i> formadas en los cultivos de Jatrofa en los diversos Tratamientos.	34
Figuras 59-63	Esporas de <i>G. intraradices</i> formada a partir de <i>Astrophytum</i> reportado por Flores 2012	36

1. RESUMEN.

En el presente trabajo se evaluó el desarrollo de explantes de 10 especies vegetales; Cactus estrella (*Astrophytum capricorne* Detrich), Calancho (*Kalanchoe laciniata*), papa (*Solanum tuberosum*), Helecho (*Nephrolepis exaltata*), Moringa (*Moringa oleifera*), Ébano (*Diospyros ebenum*), Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*), Pitahaya (*Hylocereus undatus* (Hawort)), piñoncillo mexicano (*Jatropha curcas* L.), Tabaco (*Nicotina tabacum*) en medio de Murashige-Skoog mas la combinación de ácido 2,4-diclorofenoxiacético y Bencilaminopurina, ajustando el pH a 5.7, se colocaron en condiciones controladas de 25°C y oscuridad. Para este experimento se utilizó un modelo estadístico completamente al azar con 15 repeticiones por especie. En estas condiciones permanecieron por siete semanas. La variable a evaluar fue: crecimiento de los agregados celulares en mm², observándose que los explantes que tuvieron mayor crecimiento fueron; Cactus estrella con un crecimiento máximo de 96.33 mm², Ébano con un crecimiento máximo de 61.59 mm² y piñoncillo mexicano 38.77 mm². Se realizó un análisis estadístico de comparación de medias para evaluar la diferencia significativa entre los tratamientos. Así mismo se utilizaron estos explantes para inocular y propagar esporas del hongo micorrizico *Glomus Intraradices* utilizando cultivos en suspensión y se evaluó la presencia de esporas después de un periodo de siete semanas de crecimiento. Siendo cactus y ébano los que presentaron una formación más rápida de esporas de micorriza.

2. INTRODUCCION

La actual demanda en la producción de alimentos en la cantidad y calidad que sustente la creciente población mundial, ha traído como consecuencia la deforestación de bosques y selvas para dar espacio a la agricultura, aunque en un grado tal que aún resulta insuficiente. Aunado a esto, la utilización indiscriminada de productos agroquímicos, usados para fertilizar, controlar o erradicar enfermedades en cultivos básicos, ha propiciado la elevación de costos en la producción y generado consecuencias negativas, tanto para la salud humana como al medio ambiente, por lo cual, en los últimos años la industria agrícola ha observado una notable tendencia en la utilización de esquemas biológicos para mantener o incluso mejorar la productividad de cultivos, a través del uso de microorganismos entre los que destacan los hongos micorrízicos, capaces de favorecer de manera significativa el desarrollo de las plantas inoculadas (Bonafonte & Genre, 2010).

Uno de los hongos micorrizicos mejor conocidos por su capacidad de asociarse con una diversidad de especies vegetales y los bioprocesos comerciales desarrollados con este para su aplicación en campo, es *Glomus intraradices*, un organismo simbiote que requiere obligadamente de un hospedero para completar su ciclo de vida. Por lo cual, su propagación masiva hasta ahora, se realiza mediante la producción *in vivo*, a nivel de las células de las raíces, mismas que son extraídas y maceradas para constituirse como el principio de activo de los inoculantes comerciales, ya sea sólidos o líquidos (Botero *et al.*, 2006). No obstante, los alentadores resultados obtenidos a la fecha con este organismo, el proceso de producción aun presentan muchas desventajas como aquellas relacionadas al tiempo y labor requerida para la obtención de propágulos, además de los problemas técnicos como el taponamiento de los instrumentos de aplicación en campo.

Una opción muy poco explorada para la producción masiva de hongos micorrízicos involucra la tecnología de cultivos vegetales en suspensión. Esto obedece en parte a la escasa información sobre el cultivo de tejidos vegetales relacionados a simbiotes fúngicos (Carr *et al.*, 1985), y a los numerosos e infructuosos intentos para establecer estas interacciones (Hepper & Mosse, 1980), así como a la aparentemente imperiosa necesidad de estos microorganismos por un ambiente tan controlado como lo es el citoplasma celular del macrosimbionte. La posibilidad de hacer crecer este tipo de organismos en cultivos ajenos al entrono intracelular potenciaría un avance significativo en la producción masiva de

inoculantes micorrizicos con el consecuente progreso en términos de la eficiencia, costo y productividad ya mencionada. En el presente trabajo se evaluara el desarrollo de células indiferenciadas de diez especies vegetales, que se utilizaran para el establecimiento de las suspensiones liquidas para la propagación de esporas de *Glomus intraradices*.

3. DEFINICION DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION

La utilización indiscriminada de agroquímicos, para controlar o erradicar enfermedades, así como para el mejoramiento de la calidad de diversos cultivos básicos, ha traído como consecuencia en las últimas décadas un enorme impacto en el medio ambiente, a la salud humana y a los costos en la producción de alimentos. La utilización de estrategias biológicas ha resultado una alternativa muy valiosa que permite reducir costos, y producir más alimento de forma amigable con el medio ambiente. De entre estas últimas estrategias que utilizan bacterias u hongos. El uso de los hongos micorrizicos, es una de las más utilizadas para este propósito. Lo que involucra la asociación de estas especies fúngicas, a nivel intracelular de raíces de una planta, la cual que recibe los beneficios de esta interacción (acarreo de micronutrientes, disponibilidad de fosforo, resistencia desecación, etc.).

Debido a la naturaleza simbiótica obligada del hongo en esta asociación la propagación masiva se realiza comúnmente mediante la inoculación *in vivo* en raíces, lo cual resulta en un producto de lenta y laboriosa elaboración, aspecto que se añade a los problemas de aplicación en campo por conceptos de taponamiento de tuberías de maquinaria de aspersión como resultado de su consistencia sólida. Motivo por el cual se hace evidente la gran necesidad por el desarrollo de sistemas que permitan la producción masiva de estos hongos en una forma distinta a como se realiza actualmente.

4. OBJETIVO GENERAL:

Establecer las bases para el desarrollo de un sistema de producción masiva del hongo micorrizico *G. intrarradices* a través de cultivos de células en suspensión de diversas especies de plantas.

OBJETIVOS PARTICULARES:

*Evaluación del efecto en la formación de callo celular de 10 especies diferentes de vegetales, con diferentes formulaciones de medio.

*Establecimiento de cultivos en suspensión celular de los callos obtenidos y optimización del sistema de producción.

*Propagar el hongo micorrizico *Glomus intraradices* en los cultivos en suspensión celular.

5. HIPOTESIS

- La propagación de esporas de *G.intraradices* es posible mediante el uso de cultivos de células vegetales en suspensión.

6. ANTECEDENTES

6.1.- Micorrizas

Las micorrizas es un grupo de hongos que establece una asociación simbiótica mutualista con plantas, se cree que alrededor del 90% de las plantas terrestres presentan esta interacción (Smith & Read 1997). El hongo ayuda a la planta a absorber y almacenar nutrientes minerales del suelo y la planta a cambio le otorga a la micorriza compuestos carbonados que se derivan de la fotosíntesis, de echo esta simbiosis se cree fue lo que permitió a las plantas la colonización de la superficie terrestre (Simon *et al* 1993). Sin embargo la función de las micorrizas no solo se limita al mejoramiento de la nutrición, también contribuye a la protección contra organismos patógenos del suelo, confiere mayor tolerancia a factores abióticos de estrés como; concentración de sales, presencia de metales pesados (Ruiz-Lozano 2003).

6.2.- Tipos de Micorriza

Las micorrizas se dividen en tres grandes grupos principales que son:

Ectomicorrizas.- Estas conforman aproximadamente el 3% total de las micorrizas existentes y se presentan principalmente en especies vegetales de interés forestal, se caracterizan por que las hifas no penetran en las raíces de las plantas sino que se desarrollan entre los espacios intercelulares del córtex de la raíz, y forma lo que se le conoce como “red”, y la raíz queda cubierta por un entramado denso de hifas que conforman a lo que se le llama “manto”. (Smith & Read 1997).

Endomicorrizas.- Estas no forman manto y se introducen entre las células de la epidermis y del córtex de las raíces de las plantas, dentro de estas tenemos las Orquidoides, Ericoides y Arbusculares. Figura 1

Ectoendomicorrizas.- Presentan características de las dos anteriores, forman un manto más pequeño y hay una ligera penetración de las células.

El presente trabajo se centrara particularmente en las endomicorrizas tipo arbusculares con la especie *Glomus intraradices*.

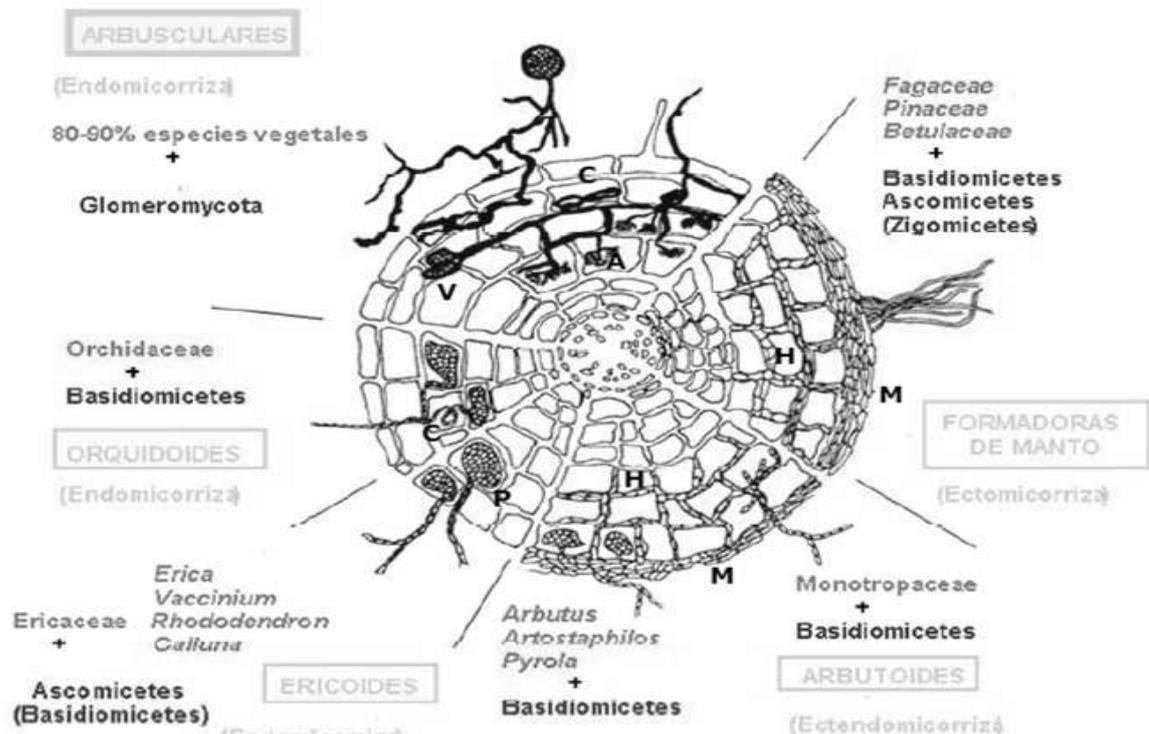


Figura 1: Tipos de micorriza. En azul se representa el desarrollo del micelio en cada tipo. M=manto, H= red de Harting, P= agregados de hifas (pelotones), C= oviductos, A= arbusculos y V= vesículas.

6.3.- *Glomus* sp: aspectos generales

Actualmente se clasifica en:

Reino Eumycota: Poseen paredes formadas de quitina y no poseen flagelos.

Phylum Glomeromycota: Forman interacciones simbióticas con las plantas.

Clase. Glomeromycetes: Forman arbusculos en las raíces de las plantas.

Orden Glomerales: Son biótrofos y producen esporas grandes.

Familia Glomeraceae: Presentan desarrollo de vesículas para formar esporas internas.

Genero *Glomus*: Proviene del latín *Glomus* = pelota, ya que las esporas tienen una forma esférica. Este género, además de ser el único en la familia Glomeraceae, agrupa a más de 85 especies de hongos micorrizicos arbusculares.

Especie *G. intraradices*: es una especie ampliamente dispersa entre los ecosistemas del mundo incluyendo aquellas regiones templadas a tropicales. Como simbiote, este organismo es altamente eficiente en movilizar el fósforo del suelo al interior de las múltiples plantas con las que se asocia, entre las que se encuentran muchas de interés agrícola como trigo, sorgo, arroz, alfalfa, y otras (Bonfante & Genre, 2010; Parniske, 2008; Redecker & Raab, 2006).

Glomus es un hongo simbiótico cuya planta hospedera juega un papel importante en su ciclo de vida, ya que sin la misma no puede reproducirse.

En su fase juvenil, *Glomus* tiene un color blanco cremoso, el cual cambia posteriormente a café amarillento. El ciclo de vida comienza con la formación de una hifa alargada a partir de la delgada pared o en otros casos una hifa pequeña, según el estado fisiológico, a esto se le llama tubo germinación (Dalpe & Monreal, 2003; Dalpe & Monreal, 2004). La hifa continúa creciendo, se ramifica para abarcar mayor superficie, hasta encontrar la raíz de alguna planta. Al momento de que las hifas entran en contacto con la raíz se forma un órgano llamado "appressorium", el cual permite penetrar en la raíz por acción de enzimas y procesos mecánicos. Una vez adentro de la raíz, las hifas se ramifican alrededor de las células corticales, para formar lo que se denomina "arbusculos" (son muy importantes ya que permiten el intercambio de nutrientes entre los dos organismos) y el micelio extra radical donde se forman las esporas (Figura 2).

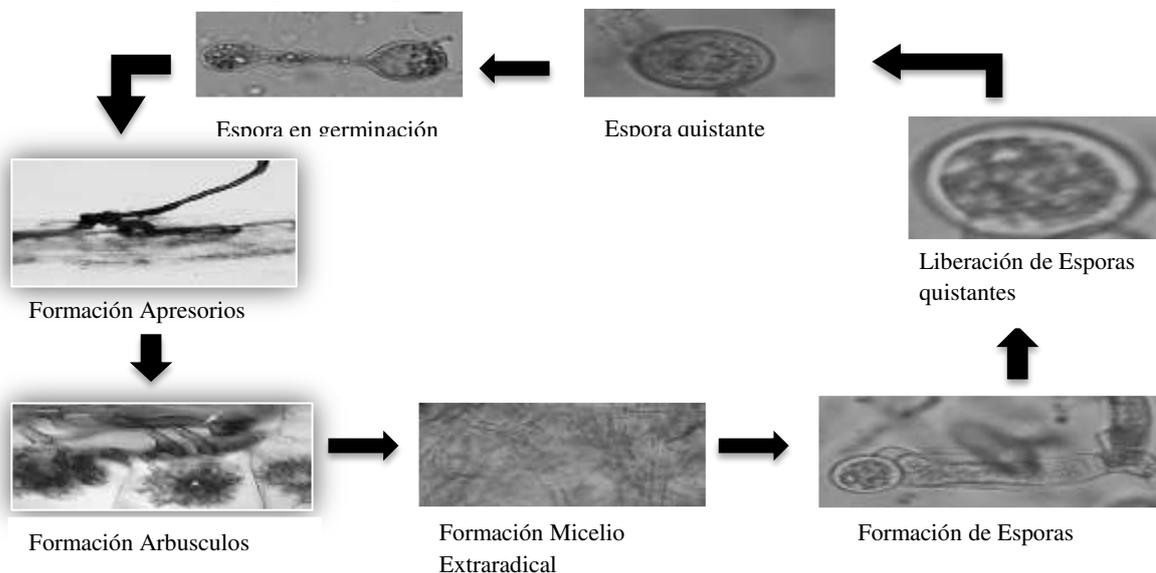


Figura 2: Ciclo de vida de *Glomus*.

Este proceso puede dar lugar a dos tipos diferentes de patrones; aquellos del tipo Arum o los de tipo Paris (Redecker & Raab, 2006).

En el tipo Paris las hifas (pueden ser muchas por célula) crecen directamente de célula a célula por lo que la fase intracelular es escasa o nula, siendo este el proceso de penetración fúngica más frecuente (Khan et al., 2010). Por su parte el tipo Arum es aquel en el cual la hifa del hongo crece entre los espacios de las células corticales de la raíz y de ahí se ramifican y forman un arbusculo terminal, generalmente en este caso hay penetración de una sola hifa por cada célula que contiene un arbusculo. Después de la formación de estos, el hongo forma unos órganos llamados "vasos" los cuales permiten acumular nutrientes que pueden ser utilizados por la planta (Armstrong & Peterson, 2002; Matekwor-Ahulu et al., 2005; Yamato, 2005)

Durante el proceso de colonización o penetración de un hongo, se puede activar en la planta hospedadora la expresión de los genes que determinan el mecanismo de defensa contra el ataque de patógenos por la invasión de los tejidos (Balestrini & Lanfranco, 2006; Blee & Anderson, 2000; Brechenmacher et al., 2004; Breuninger & Requena, 2004; Demartsev et al., 2005; Gao et al., 2004). Sin embargo, en el caso de este hongo esta respuesta se presenta muy disminuida, o retrasada, lo que sugiere que una supresión en la defensa contribuye a la colonización de *Glomus* (Dangl & Jones, 2001; Delledonne et al., 2002; Garcia-Garrido & Ocampo, 2002; Khan et al., 2010; Künke & Brooks, 2002; Segarra et al., 2009).

Esta relación de simbiosis es muy importante ya que *Glomus* adquiere de la planta lo que necesita para sobrevivir y le permite formar esporas, para continuar su ciclo, mientras que la planta ahora puede obtener nutrientes esenciales de una manera más fácil, mejorando su capacidad de absorción de 10 a 1,000 veces. A su vez *Glomus* produce enzimas que interactúan con los compuestos en el suelo haciéndolos más solubles por lo que pueden ser absorbidos con mayor facilidad, por lo que su desarrollo vegetal también se ve beneficiado. Además, se ha encontrado que la relación con este hongo le permite a sus plantas simbiotas, el colonizar con mayor facilidad suelos que de otra manera no podrían (Gonzales-Chávez & Ferrera-Cerrato, 2000; Mathur & Vyas, 2000). Otro de los beneficios que aporta *Glomus* a las plantas, es la protección a diversas situaciones dañinas como los efectos por el ataque de patógenos, y parásitos; ya que las protege por medio de eventos de competencia, lo que le impide a estos agentes, la llegada al entorno radicular o mediante la producción de sustancias antibióticas (quitinasas y fitoalexinas) que impiden el crecimiento o matan a algunos patógenos del suelo como por ejemplo; *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Thielaviopsis basicola*, *Macrophomina* y *Verticillium* (Caron et al., 1986; Datnoff et al., 1995; Filion et al., 1999; Habte et al., 1999; Jaiti et al., 2007; Li et al., 2007; Lioussanne et al., 2008; Singh et al., 2010; Vierheilig et al., 2008).

Estas propiedades son las que hacen a este hongo micorrizico una alternativa en el uso de cultivos, además puede disminuir el uso de pesticidas, por lo que también es una opción para reducir la contaminación del suelo y para la reforestación de bosques como demostró el estudio de Hernández y Salas en el 2009, donde se evaluó el efecto de la aplicación de *Glomus fasciculatum* en 4 especies forestales, tanto en vivero como en campo. En el primer caso se midió el diámetro basal, altura total, peso seco, absorción de nutrimentos tanto en follaje como en el sistema radicular. En campo se cuantificó altura total, diámetro, y absorción de nutrimentos y en el follaje. En este caso se obtuvieron como resultado que en vivero 3 de las 4 especies presentaron los mayores incrementos promedio (*Astronium graveolens*, *Tectona grandis*, *Terminalia amazonia*). Mientras que *Gmelina arborea* no mostro un efecto significativo. En el campo, de las 4 especies inoculadas, solamente *Gmelina arborea* reflejó diferencias significativas en diámetro y altura total. Así mismo, Zambrano & Díaz (2008), han realizado inoculaciones de semillas de *G. arborea* en tres grados de madurez con *Azospirillum brasilense* y de los hongos *G. manihotis* y *G. occultum*, estas se sembraron en suelo y en turba. A los cuarenta y un días después de la siembra, se determinó el efecto de los sistemas de siembra y de los microorganismos sobre la germinación, obteniendo un efecto positivo en las semillas micorrizadas. Aunado a lo anterior, midieron el efecto sobre la altura de las plantas a los cuarenta y siete días después del trasplante, dando como resultado una mayor altura en los tratamientos con micorrizas.

La utilización de *Glomus* para el mejoramiento de cultivos es una línea en la que se ha realizado mucho trabajo. Por ejemplo, Bago et al. (2006) observaron el efecto de *G. intraradices*, sobre dos líneas de tomate, una de ellas era normal y la otra una línea mutante con poca capacidad de asociarse con micorrizas. Los resultados obtenidos mostraron que la línea normal de tomate presento un crecimiento de *G. intraradices* lento, pero con mucho micelio y producción de esporas, mientras que en la línea mutante como se esperaba, no hubo un crecimiento extra radical del micelio y la producción de esporas fue muy pobre. Otro caso es el de Kristek et al. (2005), quienes compararon dos especies de micorriza, *G. mossae* y *G.intraradices*, sobre un cultivo de chícharo. En sus experimentos, midieron diversos parámetros como; masa de follaje, peso seco, concentración de Nitrógeno, Fosforo, Potasio, así como el número de plantas por metro cuadrado, y obtuvieron como resultado que *G. mossae* obtuvo mejores resultados en los anteriores parámetros, a excepción de masa de follaje y peso seco donde *G. intraradices* fue superior. Por otro lado, melgares de Aguilar et al. (2004), realizaron un ensayo en el cual aplicaron *G. intraradices* en lechuga tipo iceberg

de la variedad "fortunas". Se establecieron dos tratamientos: inoculación con micorrizas en el semillero e inoculación en el campo, usando como parámetro de medida sus producciones medias. Estos investigadores obtuvieron como resultado que las parcelas micorrizadas se vieron favorecidas con incrementos de entre 3,000 y 4,400 kg/ha de lechuga comercializable respecto al testigo.

También se han utilizado los hongos micorrizicos para mejorar ciertas características de los cultivos, por ejemplo, la capacidad de almacenamiento de sustancias. A este respecto, Qi et al., (2005) estudiaron el efecto de la inoculación de *G. mosseae*, *G. intraradices* y *G. versiforme*, sobre el almacenamiento de nutrientes y la resistencia al frío, durante el crecimiento de *Diospyros lotus*. Los resultados obtenidos mostraron incrementos del 1% en el azúcar soluble del floema, mientras que en el xilema, además de una mayor resistencia al frío, se observaron incrementos hasta del 5% en el azúcar y el Nitrógeno, con respecto al control.

Otros trabajos como el de Hršelová et al., (2003) han demostrado que el efecto de la inoculación de esporas de *Glomus sp.* en plantas de fresa (*Fragaria ananassa*) ocurre especialmente a nivel de la biomasa, la cual se ve afectada favorablemente en su volumen y en la cantidad acumulada de Fósforo, pero no así de Nitrógeno. En este caso, también se observó la formación de estolones con mayor longitud. Por su parte, Castellanos-Morales et al., (2010) destacan el efecto de la inoculación de *Glomus* en adición a la fertilización nitrogenada sobre la calidad del fruto de la fresa. Estos autores señalan en sus resultados el significativo mejoramiento de los parámetros sensoriales y las concentraciones de compuestos fenólicos en respuesta a la micorrización con la cepa usada de este hongo.

Otro aspecto en el que los investigadores han dirigido la utilización de micorrizas se relaciona al control de enfermedades de plantas. Por ejemplo, Petit & Gubler (2006), estudiaron el efecto de *G. intraradices* en plantas de vid y lo probaron contra la enfermedad denominada "pie negro" causada por *Cylindrocarpon macrododium*, donde los resultados obtenidos mostraron que las plantas inoculadas presentaron una menor incidencia de los síntomas de la enfermedad en comparación de las plantas no inoculadas con *Glomus*. Este hongo micorrizico también se ha aplicado para el control o eliminación de fitoparásitos como lo demuestra el trabajo de Ayuso en el 2002, quien evaluó el efecto de *Glomus sp.* contra el ataque del nemátodo *Radopholus similis* en plantas de banano. En esta investigación se encontró que *Glomus sp.* redujo significativamente la cantidad de raíces muestras como consecuencia del el ataque por este nematodo, pero no tuvo efecto sobre la población de *Radopholus similis*, ni

tampoco influyo en otros parámetros vegetales como la altura de la planta o la estimulación de crecimiento en los bananos.

6.4 Métodos de cultivo de hongos micorrízicos

En las últimas décadas se han desarrollado muchas técnicas de cultivo para hongos micorrizicos y productos derivados de estos, todas con ventajas y desventajas respecto a su diseño, comercialización y posibilidad de aplicación. Existen tres principales categorías en los sistemas de producción de hongos micorrízicos, los cuales puede definirse como sigue:

- 1) El sistema clásico de arena/suelo o el más avanzado a base de sustrato, que son ampliamente usados y representan una muy efectiva forma de producir masivamente las células del organismo.
- 2) Los sistemas de cultivo libres de sustrato que se han desarrollado para producir inóculo fúngico relativamente limpio. Sin embargo, los costos asociados con estos sistemas, han limitado su uso a propósitos de investigación y aplicaciones de pequeña escala.
- 3) Sistemas de cultivo in vitro, denominados también "cultivo en órganos vegetales" debido a que están basados ya sea en el uso de raíces extirpadas o en raíces de plantas completas. A pesar de sus altos costos, estos sistemas garantizan una producción del hongo micorrízico libre de contaminantes. El cultivo in vitro de estos organismos, se ha adaptado particularmente a la producción de cultivos de alto valor agregado por ejemplo aquellos cultivos generados por técnicas de micropropagación.

Los primeros intentos para cultivar hongos micorrizicos in vitro, datan de finales de 1950 (Mosse, 1959), y poco después (Mosse, 1962) cuando se reportó la primera asociación de una especie de *Endogona* con una planta. Desde entonces, se obtenido importantes progresos en la forma de producir los hongos micorrízicos. A mediados de los 70's (Mosse & Herper, 1975) se pudo establecer con éxito un cultivo de un hongo micorrízico asociado con raíces extirpadas de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.) y trébol (*T. pratense* L.) usando medios en placa, aunque poco más de una década después, Mugnier y Mosse (1987), así como Bécard y Fortin (1988) usaron un sistema de "cultivo de órganos vegetales" con raíces transformadas de zanahoria como hospedero para incrementar la formación de propágulos.

En 1996, St-Arnaud et al., diseñaron un sistema de compartimentos en placa y cultivo de "raíces extirpadas", que estaba conformado por una sección proximal que contenía las raíces y el hongo micorrízico, en la otra sección distal solo se desarrollaba el hongo. Mediante este mismo dispositivo, Douds (2002), demostró que el hongo micorrízico estudiado empezaba a esporular después de que se reemplazaba parcialmente el medio del compartimiento distal y se le proporcionaba glucosa al compartimiento proximal, estrategia con la cual se pudieron obtener varias cosechas del cultivo a partir de la misma caja de Petri. . A la fecha, se ha desarrollado una serie de variantes al sistema original de cultivo de raíces extirpadas en cajas de Petri. Por ejemplo, Tiwari y Adholeya (2003), propusieron el uso de estos sistemas de cultivo pero usando pequeños recipientes, donde pudieron lograr una producción a mayor escala. Asimismo, también se han podido realizar estos cultivos empleando algunos reactores, por ejemplo aquellos de tipo "Air Lift" (Jolicoeur et al., 1999); bioreactores con perlita como sustrato (Jolicoeur, 1998), o los que incluyen un soporte gelificado (Fortin et al., 1996). Por su parte, Wang (2003), ha patentado un tipo sistema de cultivo hidropónico que se basa en un recipiente donde las raíces cultivadas y el hongo micorrízico se exponen periódicamente a un medio de cultivo líquido. Luego del anterior diseño, Gadkar et al., (2006) han propuesto un recipiente que utiliza una caja Petri conteniendo un cultivo de raíces extirpadas, lo anterior con el objetivo de iniciar la proliferación en un compartimento separado lleno con partículas expandidas de arcilla.

Usando una estrategia distinta a los sistemas de raíces extirpadas, primero Voets et al. (2005), y luego Dupré de Boulois et al. (2006), han ideado por separado, sus propios sistemas de cultivo in vitro basados en el uso de plantas completas. En el primero de anteriores diseños, el tallo se deja crecer fuera de la caja Petri, mientras que las raíces y el hongo se desarrollan dentro de las placas preparadas con el medio sólido adecuado. En el segundo dispositivo, el tallo se desarrolla en un tubo estéril conectado verticalmente a la parte superior de la placa Petri donde se desarrollan las raíces y el hongo. Ambos sistemas de cultivo se colocan en cámaras bioclimática para proporcionarle a las plantas sus óptimas condiciones de crecimiento, pero protegiendo simultáneamente las placas de la exposición a la luz. De los dos anteriores métodos, el primero es mucho más laborioso y propenso a la contaminación, pero también quizás sea el más adecuado para la producción de esporas de hongos micorrízicos. En el estudio de Dupré de Boulois et al. (2006), se logró una productividad de casi 1,200 esporas en un período de 12 semanas, lo cual resulta destacable si se considera que el tipo de placas utilizadas eran de la mitad del tamaño a las usadas por Voets et al. (2005), quienes con su

metodología obtuvieron un promedio de 4,500 esporas en el mismo período y más de 12,000 después de 22 semanas de cultivo. Recientemente, se ha patentado un sistema de producción in vitro también basado en el uso de plantas (Declerck et al., 2009). Bajo este esquema, cada planta pre-inoculada producida in vitro, se introduce individualmente en un tubo de crecimiento estéril. En este sistema cerrado circula una solución nutritiva que fluye sobre las raíces micorrizadas.

6.5 Cultivos de células vegetales

El término “cultivo de tejidos” o “cultivo de células vegetales” involucra la utilización de diferentes técnicas de cultivo de material vegetal variado, incluyendo a los protoplastos (células desprovistas de su pared celular), células, tejidos, órganos y plantas completas (Figura 3).

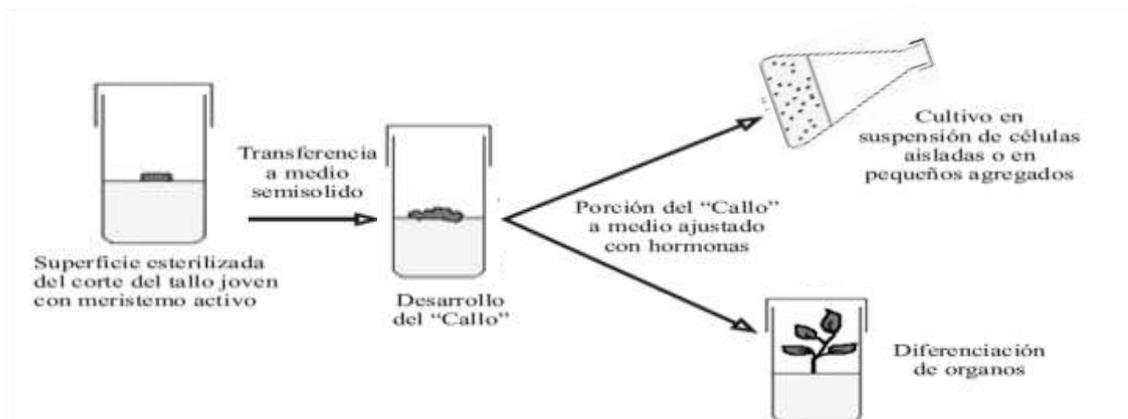


Figura 3: Cultivo de células Vegetales en Suspensión.

Mediante éstas y otras técnicas, es posible obtener plantas libres de microbios en un medio nutritivo aséptico en condiciones ambientales controladas. A este proceso también se le conoce como “cultivo in vitro de plantas”. Las primeras experiencias relacionadas con el cultivo de tejidos vegetales se remontan a Gottlieb Haberlandt quién en 1898 aisló células y tejidos de plantas superiores y las colocó en soluciones nutritivas para su crecimiento, pero no fué sino hasta 1922 cuando se lograron los primeros resultados exitosos con la germinación in vitro de semillas de orquídeas (Calva & Pérez-Vargas, 2005).

Las plantas son una fuente importante de metabolitos los cuales han sido usados como medicamentos, pesticidas, saborizantes y fragancias. Con la finalidad de producir estos compuestos sin necesidad de cultivar la planta completa, se ha desarrollado la tecnología de cultivo de sus células in vitro en forma de "callos", suspensiones y órganos (Arias et al., 2009). Esta es una magnífica alternativa, en especial cuando se trata de plantas silvestres

cuyos períodos de cultivo resultan bastante largos, o incluso cuando las plantas estudiadas tienen rendimientos de metabolitos secundarios bajos o no se cuenta con procesos de síntesis química. Sin embargo, en este sistema la producción es independiente de factores externos como la disponibilidad de tierra, condiciones climáticas o geopolíticas. Además, es posible controlar las condiciones de cultivo, lo que permite alcanzar un mayor rendimiento y calidad.

Pero para lograr la aplicación industrial de esta estrategia es necesario resolver ciertos inconvenientes; como la baja productividad, crecimiento lento e inestabilidad genética. Una parte crítica en los cultivos celulares ha sido la selección de un medio de cultivo empleado para las células. Los primeros medios utilizados fueron semisintéticos, los cuales comúnmente se formulaban a base de extractos o complejos orgánicos como agua de coco, hidrolizado de caseína y extracto de levadura. Actualmente, la mayoría de los medios se constituyen básicamente por cinco grupos de ingredientes: nutrientes inorgánicos, fuente de Carbono, fuente de Nitrógeno, vitaminas y reguladores del crecimiento que *in vivo* son sintetizados por una parte u órgano de la planta para luego ser transportados a otros órganos donde se metabolizan y/o acumulan. Las fuentes de Nitrógeno más comunes son el Nitrato y Amonio, pero también se han utilizado Urea, hidrolizado de Caseína, Extracto de Levadura y Aminoácidos, entre otros. La fuente de carbono más empleada es la Sacarosa o Glucosa y en menor grado la Maltosa, Galactosa, Almidón y Melaza. Los micronutrientes, generalmente adicionados al medio de cultivo en forma de sales, son utilizados por las células como cofactores enzimáticos, como el Molibdeno para la Nitrato Reductasa y el Magnesio para algunas cinasas (Calva & Perez-Vargas, 2005). Los fitorreguladores también conocidos como reguladores de crecimiento vegetal (RCV), juegan un papel importante en el cultivo de células vegetales, ya que la modificación en su concentración y tipo en el medio de cultivo, ha permitido un incremento significativo, tanto en la producción de biomasa como en la acumulación de metabolitos secundarios. De estas sustancias, las más utilizadas son las auxinas y las citocininas (Esperanza, 2004). Existen fundamentalmente tres formas de realizar cultivos vegetales *in vitro*: células en suspensión, células inmovilizadas o como tejidos u órganos. Sin embargo, el de mayor interés sigue siendo el de células en suspensión y

de este tipo existen 2 variantes:

Cultivo en suspensión: en las suspensiones, las células individuales se distribuyen en forma homogénea a través del medio de cultivo y por estar rodeadas del mismo, se facilita la transferencia de nutrientes y oxígeno hacia el citoplasma. En este tipo de cultivo presenta la

ventaja de alcanzar un control relativamente sencillo de variables como temperatura, pH y oxígeno disuelto; sin embargo, pueden verse modificadas algunas características de las células presentes en las plantas como su diferenciación y la comunicación intercelular (Arias et al. 2009; Biblioteca Digital de la Universidad de Chile).

Cultivos en suspensión intermitente: en esta técnica, las células se multiplican en un medio líquido, que es agitado continuamente para romper algunos agregados celulares. Excepto para la circulación de aire, el sistema es “cerrado” en cuanto a la adición o sustracción de líquido de cultivo.

6.6. Interacción hongos micorrizicos y células vegetales en suspensión

Existen muy pocos antecedentes sobre el uso de cultivos de células en suspensión para tratar de germinar hongos micorrizicos. Una de las primeras y clásicas investigaciones en esta línea del conocimiento corresponde al trabajo de Carr et al. 1985, quienes utilizaron el células de trigo (*Triticum aestivum*), papa (*Solanum tuberosum*) y alfalfa (*Medicago sativa*), y aplicaron variaciones en la concentración de azúcar, 0.5% menos del usado habitualmente en los cultivos celulares vegetales en suspensión, esto con la finalidad de estudiar la interacción de estas plantas con el hongo micorrizico *Glomus caledonium*, así como para estimular el crecimiento hifal de este mismo.

Por su parte, Fernandes et al. 2007, evaluaron la viabilidad de las esporas de los hongos micorrizicos arbusculares *Glomus clarum* y *Glomus fasciculatum*, en un medio líquido de conservación (bajo solicitud de patente) y emplearon como tratamiento control, agua destilada estéril. En sus resultados encontraron que en el medio líquido seleccionado se logró un tiempo de viabilidad y estabilidad superior a los 8 meses.

Otro trabajo es el realizado por Siqueira et al. 1991, quienes observaron que los compuestos flavonoides (Formononetina y Biochanina A) secretados por las raíces de los tréboles (*Trifolium repens*) estimulan y favorecen el proceso de colonización de las micorrizas arbusculares. A su vez Valpin et al. 1994 estudiaron el comportamiento de compuestos flavonoides, durante el proceso de colonización de raíces de alfalfa por parte del hongo *Glomus intraradices*, obteniendo como resultado que el compuesto flavonide

(Formononetina) fue el único que mostro un incremento en su concentración durante el proceso de colonización.

7. METODOLOGIA

7.1 Desinfección de material vegetal.

Para la inducción del callo y el mantenimiento del mismo, que posteriormente se utilizaron en la producción de células en líquido, en primer lugar se procedió con la desinfección del material vegetal (semillas frijol y sorgo): Fuera de campana de flujo laminar; Se lavó el material en 2 ocasiones con agua corriente y jabón, agitando durante 10 minutos encada ocasión, después se sumergieron las muestras en un recipiente con agua corriente durante 10 minutos. Dentro de la campana de flujo laminar; Se sumergió el material durante 2 minutos en una solución estéril de alcohol al 70%, posteriormente se colocó durante 15 minutos en una solución estéril de hipoclorito de sodio al 10% + 2 gotas de Tween 20 (2 gotas por cada 100ml). Y finalmente se limpió el material de la solución anterior con 3 lavados de agua destilada estéril (Ojeda, 2011).

7.2 Inducción y mantenimiento de los "callos vegetales"

Se utilizaran trozos de callo proporcionado por el laboratorio de biotecnología vegetal siendo responsable la Dra. Carmen Ojeda Zacarías de cada una de las 10 especies vegetales: Cactus estrella (*Astrophytum capricorne* Detrich), Calancho (*Kalanchoe laciniata*), papa (*Solanum tuberosum*), Helecho (*Nephrolepis exaltata*), Moringa (*Moringa oleifera*), Ébano (*Diospyros ebenum*), Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*), Pitahaya (*Hylocereus undatus* (Hawort)), piñoncillo mexicano (*Jatropha curcas* L.), Tabaco (*Nicotina tabacum*) para la medición de la formación de biomasa de células indiferenciadas (figura 4).

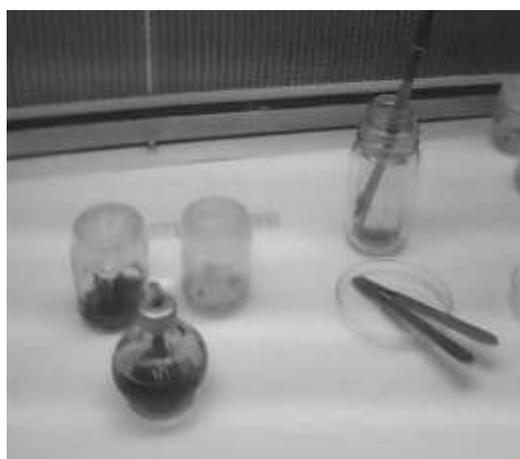


Figura 4: Siembra de Callo vegetal en el medio MS

Primeramente de cada una de las variedades vegetales se cortaron trozos de callo de 1cm por 1cm (1cm²) en una caja Petri de vidrio sobre un papel milimétrico, se colocaron dichos trozos en frascos de vidrio (Gerber) con medio de cultivo Murashige-Skoog (MS, *Tabla 1*), esterilizados a 15 libras de presión por 20 minutos. Se utilizaron dos concentraciones diferentes 50 y 100%, pH 5.6 y enriquecido con 30 g/l de azúcar y 4.5 g/l de agar. Cada concentración de medio se distribuyó en 4 concentraciones diferentes de los fitoreguladores: 2,4 D: ácido 2,4-dichlorofenoxiacético y BAP 6-benzilamino-purina; **T1 Control** 2,4D (2mg/L), **T2** 2,4-D (3mg/L), **T3** 2,4-D y BAP (2mg/L y 0.5mg/L) y **T4** BAPD (3mg/L y 1.0mg/L), con 15 repeticiones cada uno, *Tabla 2*, para un total de 8 tratamientos.

Tabla 1: Composición del medio de Murashige-Skoog.

Compuestos	Cantidad (g/L)
NH4NO3	1.65
KNO3	1.9
MgSO4.7H2O	0.37
KH2PO4	0.17
CaCl2.2H2O	0.44
KI	0.00083
H3BO4	0.0062
ZnSO4.7H2O	0.0086
Na2MoO4.2H2O	0.00025
CuSO4.5H2O	0.000025
CoCl2.5H2O	0.000025
FeSO4.7H2O	0.278
Na2.EDTA	0.373
MnSO4.4H2O	0.22

Tabla 2: Tratamientos Evaluados conforme a la dosis de los fitoreguladores y dosis de sacarosa.

MS + Sacarosa g L ⁻¹	2,4-D, 2.0 mg L ⁻¹	2,4-D, 3.0 mg L ⁻¹	2,4-D, 2.0 mg L ⁻¹ Y BAP 0.5 mg L ⁻¹	2,4-D, 3.0 mg L ⁻¹ Y BAP 1.0 mg L ⁻¹
MS + 30g L (100%) Sacarosa	T1	T2	T3	T4
MS + 15g L (50%) Sacarosa	T5	T6	T7	T8

El material se colocó en condiciones de fotoperiodo de 6 horas de luz y 12 de oscuridad a 25°C, durante un periodo de siete semanas cada tratamiento (figura 5), para c/u se realizaron 3 tomas de datos de crecimiento, una a los siete días del establecimiento, la a los quince días de crecimiento y la tercera al termino de las siete semanas. La variable a evaluar fue: crecimiento de los agregados celulares y Se realizó un análisis estadístico de comparación de medias, y se utilizó el programa computacional de la Facultad de Agronomía de la UANL y se observó la diferencia significativa en cuanto a la cantidad de callo formado con las diferentes concentraciones de sacarosa y fitohormonas.

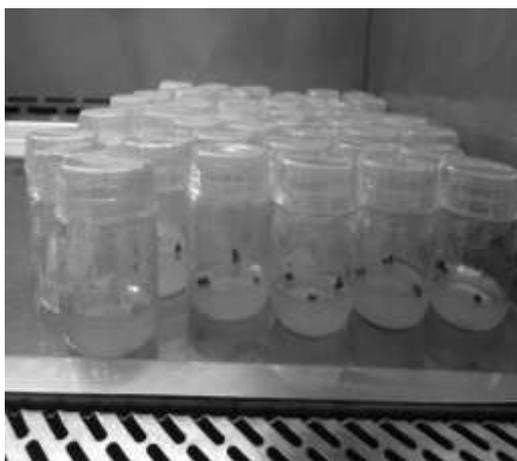


Figura 5: Establecimiento de los callos en condiciones de luz y oscuridad

7.3 Inducción y mantenimiento de los cultivos en suspensión

Se utilizaron trozos de callo de las especies vegetales que presentaron mayor crecimiento. Estos se colocaron en tubos de 50 ml, con medio de cultivo MS pH 5.6 y sin agar, sacarosa a dos concentraciones diferentes 50 y 100%, cada concentración de medio será distribuyó en 4 concentraciones diferentes de los fitoreguladores: 2,4 D: ácido 2,4-dichlorofenoxiacético y BAP 6-benzilamino-purina; **T1** 2,4D (2mg/L), **T2** 2,4-D (3mg/L), **T3** 2,4-D y BAP (2mg/L y 0.5mg/L) y **T4** BAPD (3mg/L y 1.0mg/L), con 3 repeticiones cada uno, Tabla 3, para un total de 8 tratamientos.

Tabla 3: Tratamientos Evaluados conforme a la dosis de los fitoreguladores y dosis de sacarosa.

MS + Sacarosa g L ⁻¹	2,4-D, 2.0 mg L ⁻¹	2,4-D, 3.0 mg L ⁻¹	2,4-D, 2.0 mg L ⁻¹ Y BAP 0.5 mg L ⁻¹	2,4-D, 3.0 mg L ⁻¹ Y BAP 1.0 mg L ⁻¹
MS + 30g L (100%) Sacarosa	T1	T2	T3	T4
MS + 15g L (50%) Sacarosa	T5	T6	T7	T8

Las condiciones de crecimiento que se utilizaran en el cultivo de células fueron; temperatura de 25°C; pH de 5.6 y agitación de 100 rpm, con fotoperiodo de 6 horas de luz y 12 de oscuridad. Después del tiempo de crecimiento de tres semanas se procedió a inocular los cultivos en suspensión con esporas de *Glomus intraradices*.

7.4 Obtención e inoculación de esporas

Las esporas de *Glomus intraradices* se obtuvieron a partir de un inoculante micorrízico de la marca comercial. Para tal propósito, se depositó un volumen total de 7gr de este inoculante en tubos de centrifuga de 50 mL de capacidad. A cada uno de estos tubos se les agregó 20 mL de una solución de Sacarosa 70 % (solución de azúcar) para luego someterlos a un proceso de centrifugación a 3,800 rpm durante 3 min (Botero *et al.*, 2006). Mediante observación microscópica de la interfase, se comprobó la obtención de esporas de *G. intraradices*, las cuales se extrajeron usando una jeringa y concentradas para su inoculación en los medios en suspensión obtenidos previamente.

7.5. Propagación de esporas de *Glomus intraradices* en cultivos en suspensión.

Finalmente a los medios con células obtenidos se inocularon con esporas de *Glomus intraradices* purificadas, y se colocaron en agitación (100 rpm) a 25°C por un periodo de 5 semanas, se observó por microscopia la formación de nuevas esporas para cada tratamiento de las especies vegetales *Astrophytum*, ébano y jatrofa.

8. RESULTADOS

8.1. Inducción y multiplicación de agregados celulares:

Se realizaron tres mediciones en total periodo, durante el periodo de crecimiento, a los siete días, a los quince días y a las siete semanas. Con el fin de comparar si había alguna diferencia entre los tratamientos en cuando a l desarrollo en mm² de los explantes.

Tabla 4: Crecimiento en mm² de cada una de las plantas evaluadas los tratamientos correspondientes a la primera fecha de toma de datos.

Medición Primera Fecha										
trat/rep	Piñoncillo	Pitahaya	Calancho	Helecho	Papa	Cactus	Moringa	Ébano	Lisianthus	Tabaco
1	10.36	0	1.86	0.13	0.66	26.31	4.19	3.12	8.19	5.99
2	9.92	0	1.21	0.93	0.46	14.72	3.44	7.06	7.26	5.53
3	4.46	0.13	0	0	0.26	3.39	1.06	3.33	3.79	7.39
4	4.86	0	0	0	0.13	5.4	0	4.85	5.33	7.44
5	2.35	0	0	0	0.26	13.3	1.06	3.7	21.3	2.18
6	1.9	0	0	0	0	9.3	1	1.2	15	1.2
7	2.4	0	0	0	0	8.2	2	2.4	13	2.6
8	1.9	0	0	0	1	9.3	1	1.2	15	1.2

Tabla 5: Crecimiento en mm² de cada una de las plantas evaluadas los tratamientos correspondientes a la segunda fecha de toma de datos.

Medición Segunda Fecha										
trat/rep	Piñoncillo	Pitahaya	Calancho	Helecho	Papa	Cactus	Moringa	Ébano	Lisianthus	Tabaco
1	17.39	0	4.59	0	0.66	3.32	4.33	3.19	10.19	7.99
2	17.53	0	1.79	0.93	0.46	32.13	6.66	12.99	9.86	12.52
3	7.39	0.33	1.62	0	1.59	6.79	1.66	6.99	6.86	13.59
4	7.66	0	0.24	0	0.73	33.13	0	10.53	7.26	12.06
5	2.5	0	0	0	1.59	19.62	1.66	6.14	16.44	4.44
6	2.5	0	0	0	0	10.2	1.5	1.9	13	1.5
7	2.8	0	0	0	0	9.5	2.6	2.9	16.1	3.5
8	2	0	0	0	0	10.2	1.9	2.1	13	1.5

Tabla 6: Crecimiento en mm² de cada una de las plantas evaluadas los tratamientos correspondientes a la tercera fecha de toma de datos.

Medición Tercera Fecha										
trat/rep	Piñoncillo	Pitahaya	Calancho	Helecho	Papa	Cactus	Moringa	Ébano	Lisianthus	Tabaco
1	38.77	0	4.59	0	0	45.77	7.66	6.13	19.19	10.13
2	20.79	0.26	1.46	2.06	0	35.92	6.66	13.86	13.33	13.59
3	12.93	0.33	1.62	0	2.11	52.39	4.79	61.59	13.19	15.19
4	11.04	0	1.26	0	0.73	96.33	2.86	11.93	11.39	15.86
5	2.98	0	0	0	2.11	23.3	4.79	8.9	17.1	6.2
6	3.1	0	0	0	0	11	2.1	2.3	19	2
7	3.5	0	0	0	0	10.2	4.1	3.6	20.1	4.9
8	4	0	0	0	0	16	1.88	2.56	18.55	2.99

Se procedió a realizar un análisis estadístico de comparación de medias para cada una de las fechas de medición con el fin de observar hay una diferencia significativa entre los tratamientos.

***Tablas 7,8,9:** Comparación de las medias de crecimiento para cada uno de los tratamientos, con un nivel de significancia de 0.05, con DMS para la tabla 7 de, 0.4581, para la tabla 8 de, 4.7539 y para la tabla 9, 0.9906.

Tabla 7			Tabla 8			Tabla 9		
Tratamiento	Media		Tratamiento	Media		Tratamiento	Media	
1	2.3622	A	3	3.4682	A	2	2.87	A
2	2.2729	A	1	3.1952	AB	4	2.4	A
5	1.9843	AB	4	3.134	AB	1	2.26	A
7	1.8092	B	2	3.0411	AB	3	2.21	A
4	1.7853	B	5	2.4178	BC	5	2.18	A
8	1.7707	B	7	2.0893	C	7	1.93	A
6	1.7293	B	8	2.0362	C	6	1.78	A
3	1.7219	B	6	1.927	C	8	1.78	A

La tabla 7 muestra a los tratamientos uno (2 mg de 2,4D, con 100% Azúcar), dos (3 mg de 2,4D, con 100% Azúcar) y cinco (2 mg de 2,4D, con 50% Azúcar) como los que promueven más crecimiento después de 7 días de crecimiento, mientras que los demás no muestran una diferencia significativa, sin embargo para la segunda fecha de medición 15 días tabla 8, los tratamientos muestran un desarrollo muy uniforme no hay una diferencia significativa en su crecimiento pero se muestra una tendencia de los tratamientos dos, cuatro (3mg/L, 2,4-D Y BAP 1.0 mg/L, con 100% azúcar) y uno a mostrar un poco más de desarrollo. Finalmente en la última fecha de toma de datos, tabla 9, el tratamiento que mostro un mejor desarrollo fue el tratamiento tres (2mg/L, 2,4-D Y BAP 0.5 mg/L), con 100% azúcar), seguido de los tratamientos uno, cuatro y dos. Siendo la tercera fecha la última toma de datos se observó que los explantes que obtuvieron mayor crecimiento fueron; *Astrophytum* con un crecimiento máximo de 96.33 mm² para el tratamiento 4 52.39 mm² para el tratamiento 3 y 45.77 mm² para el tratamiento 1. Ébano con un crecimiento máximo de 61.59 mm² para el tratamiento 3 y jatrofa 38.77 mm² para el tratamiento 1 y 20.79 mm² para el tratamiento 2 (Figura 6).

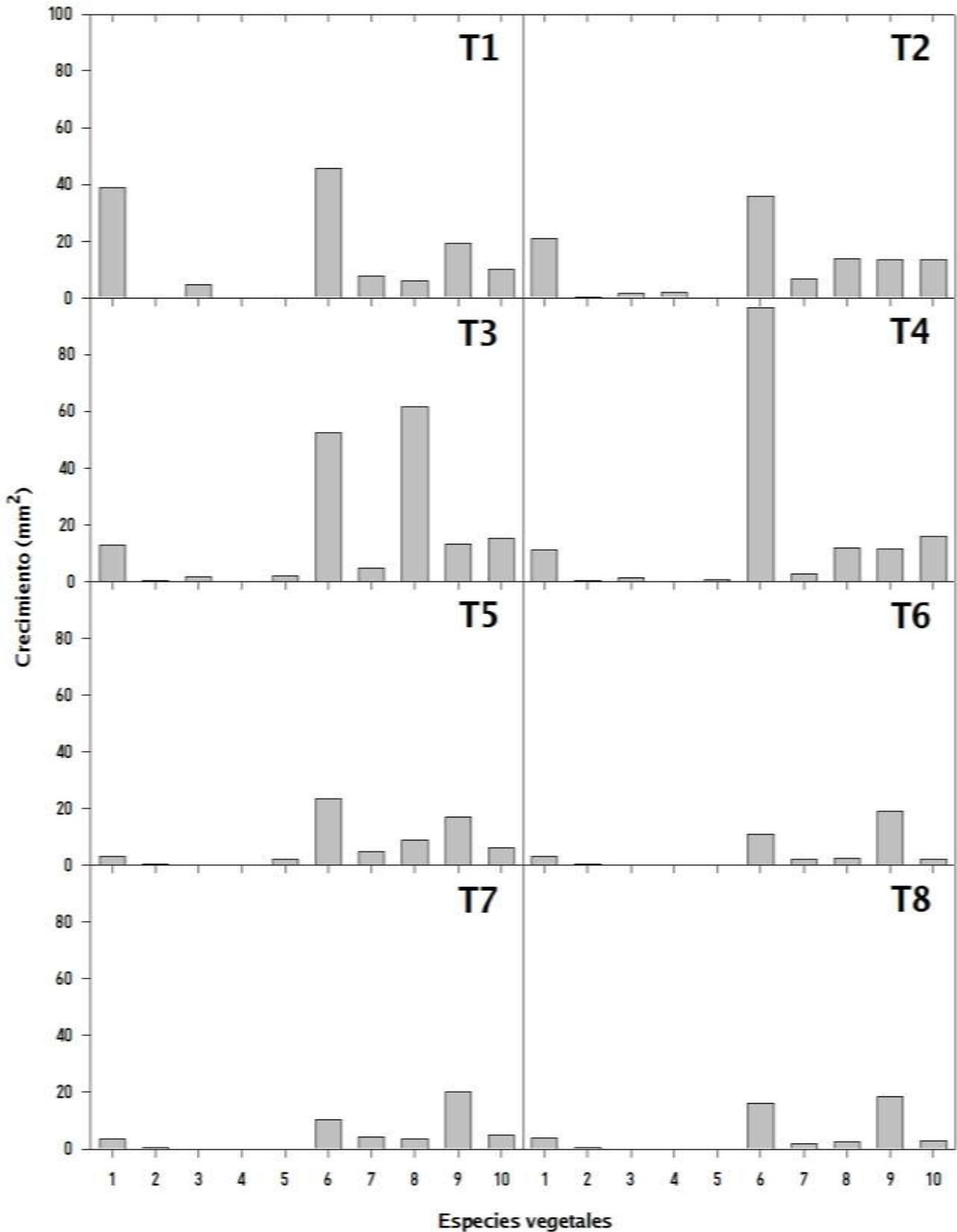
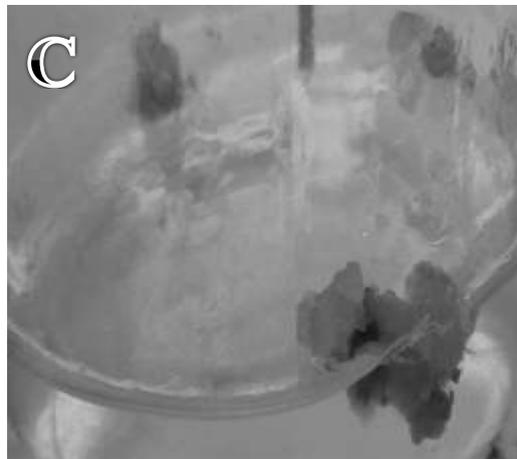
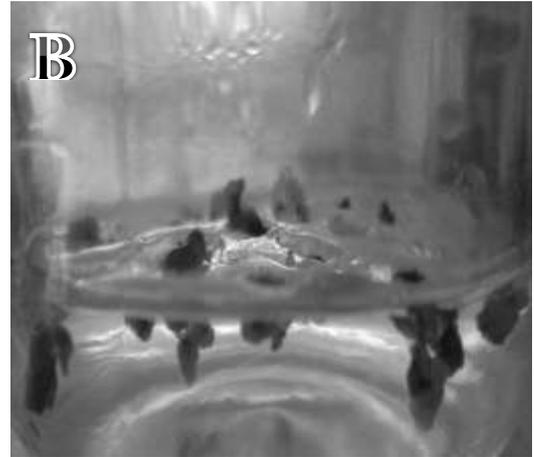
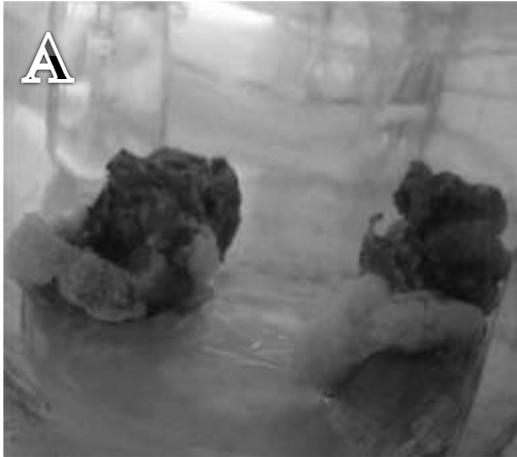


Figura 6: Crecimiento de de las especies vegetales evaluadas en respuesta a los tratamientos correspondientes:1, Jatropha; 2, Pithaya; 3, Kalanchoe; 4, Helecho; 5, Papa; 6, Astrophytum; 7, Moringa; 8, Ebano; 9, Lisianthus;10, Tabaco.

Figuras 7,8,9: Muestran la el crecimiento de las especies de expalntes que mayor crecimiento presentaron, *Astrophytum* (a), ébano (b) y jatrofa (c).



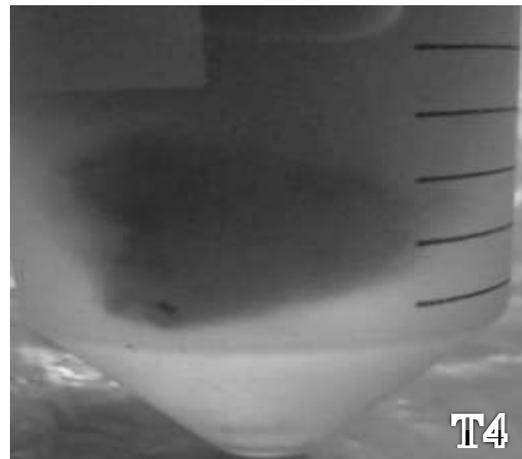
8.2 Cultivos en suspensión y propagación de *G. intraradices*:

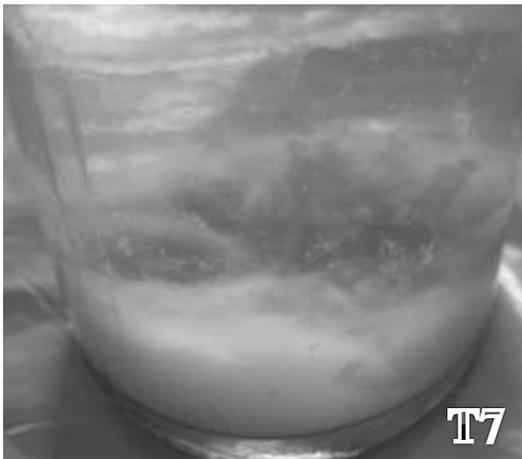
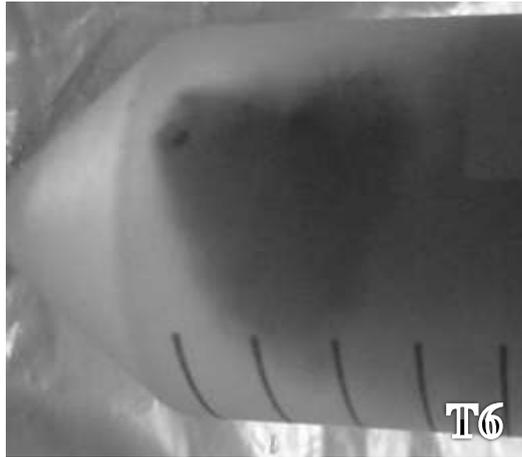
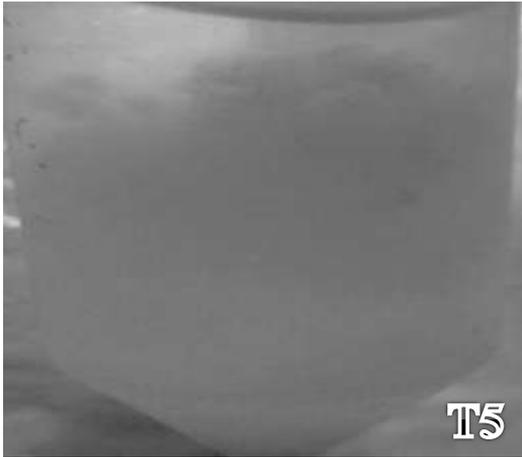
Se utilizó el material vegetal evaluado *Astrophytum* , ébano y jatrofa, para establecer los cultivos en suspensión, utilizando las mismas condiciones en el medio de cultivo a excepción del agente gelificante. Después de tres semanas de crecimiento en agitación a 100 rpm (Figura 8) se procedió a inocular los cultivos en suspensión con esporas purificadas de *glomus*, dándosele un periodo de crecimiento de cinco semanas, obteniéndose desarrollo de micelio (Figuras 17-32).

Figura 10: Condiciones de agitación de los cultivos en suspensión inoculados con *G. intraradices*.

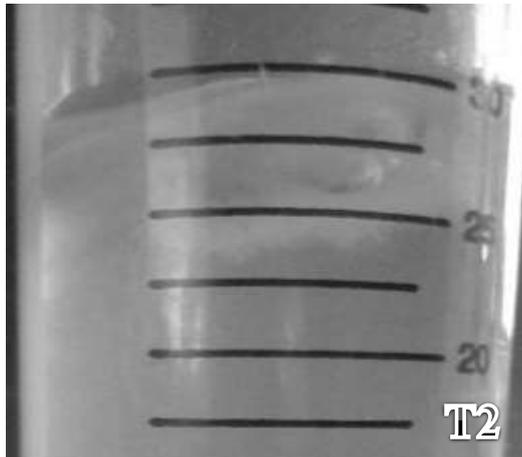
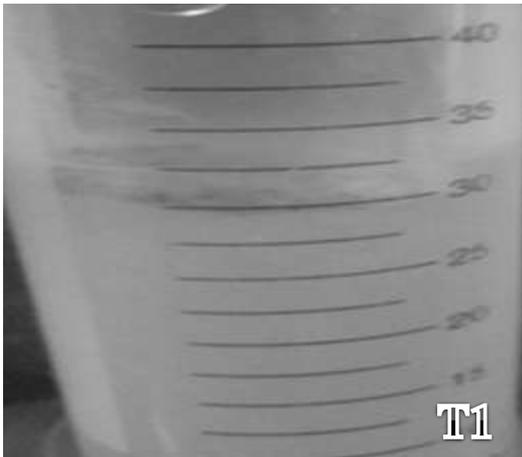


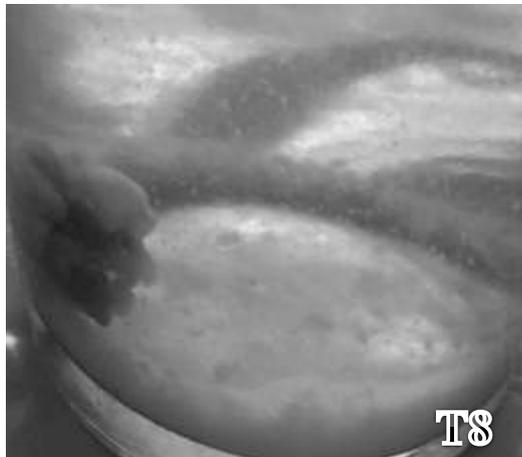
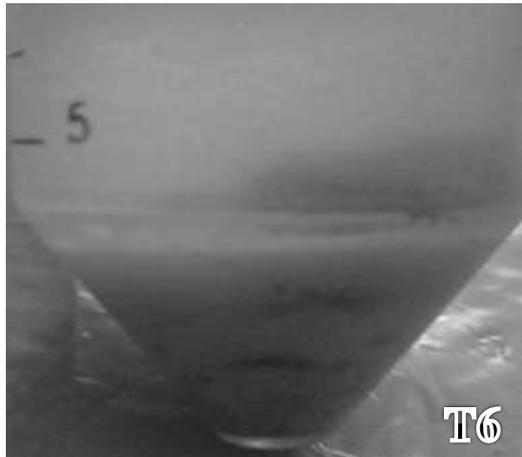
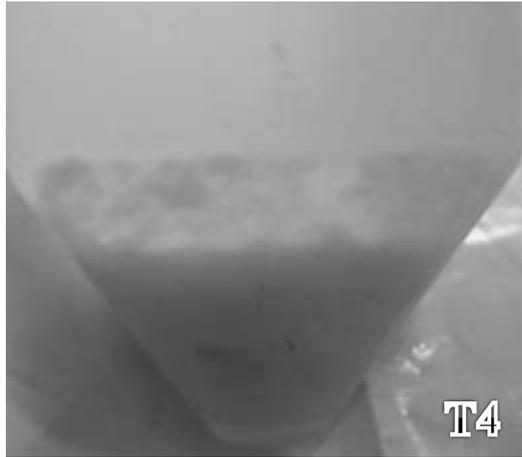
Figuras 11-18: Micelio desarrollado de *G.intraradices* en los cultivos de *Astrophytum* en los diversos Tratamientos.



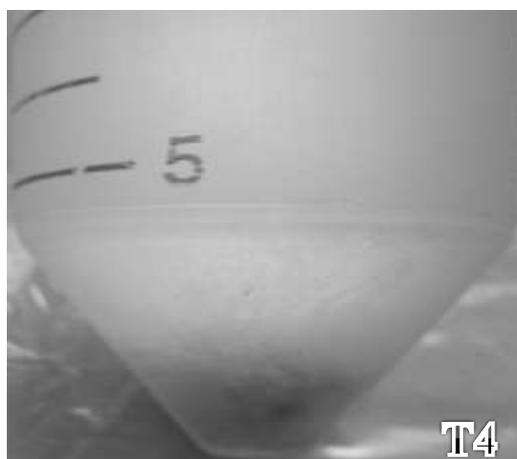
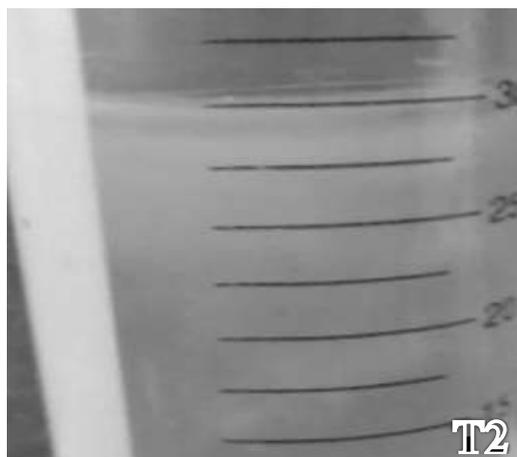


Figuras 19-26: Micelio desarrollado de *G.intraradices* en los cultivos de Ébano en los diversos Tratamientos.



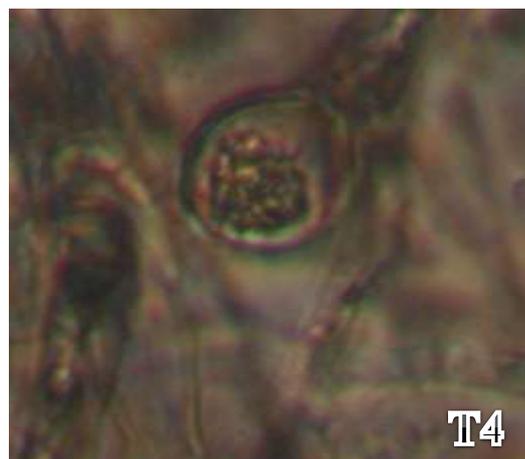
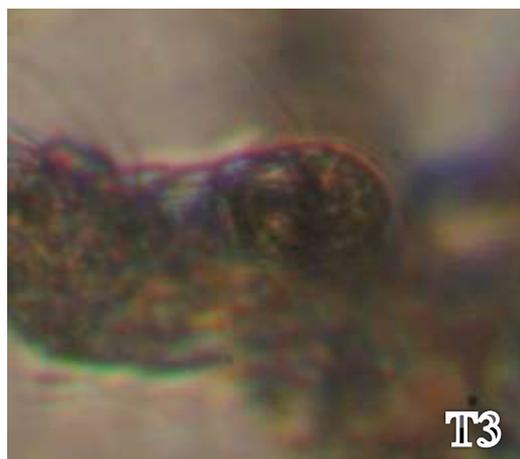
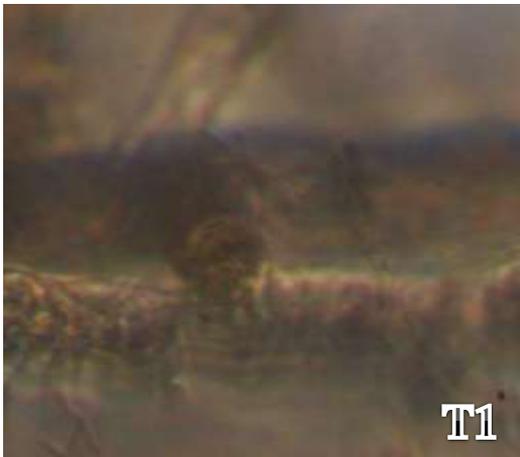


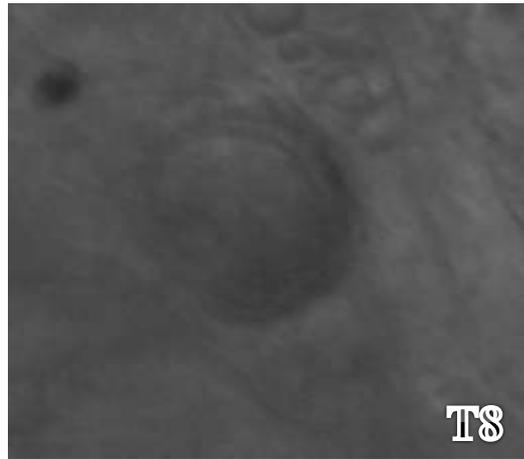
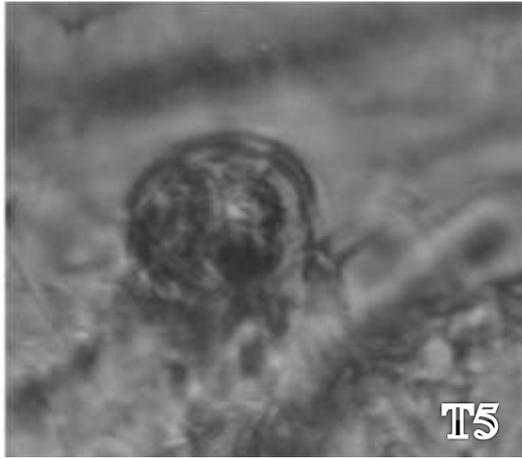
Figuras 27-34: Micelio desarrollado de *G.intraradices* en los cultivos de Jatrofa en los diversos Tratamientos.



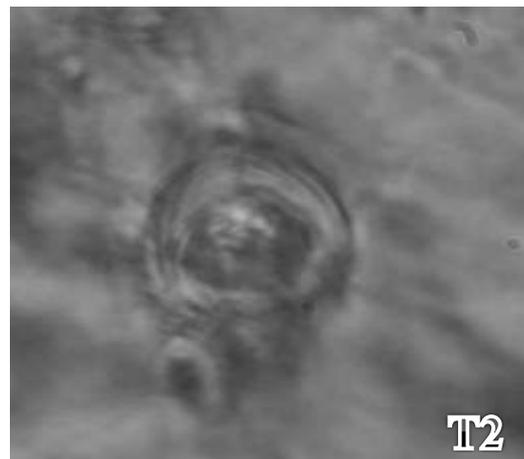
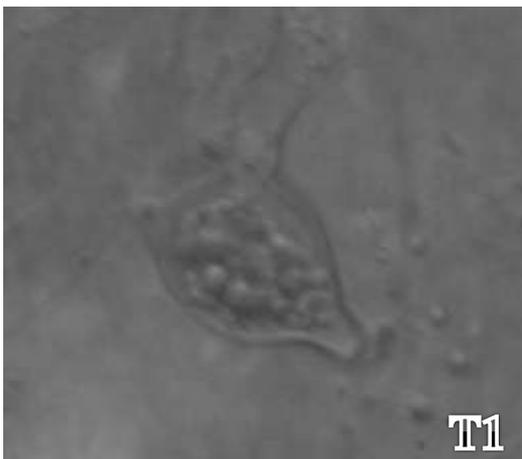


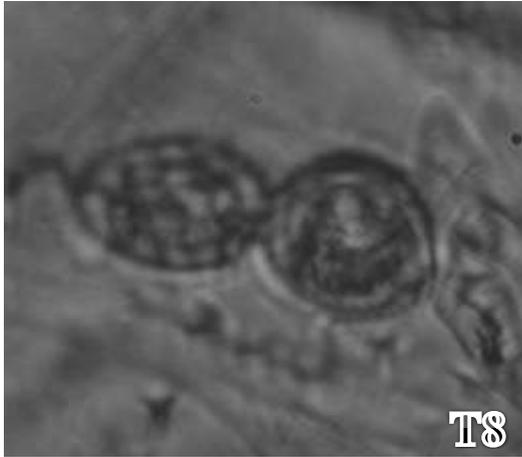
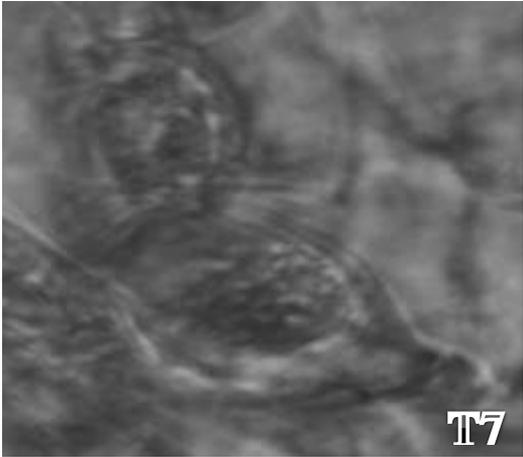
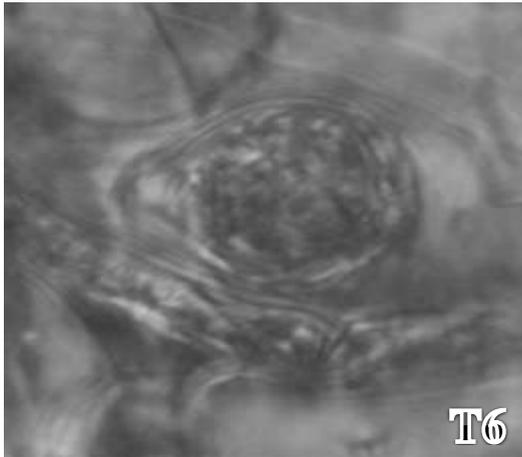
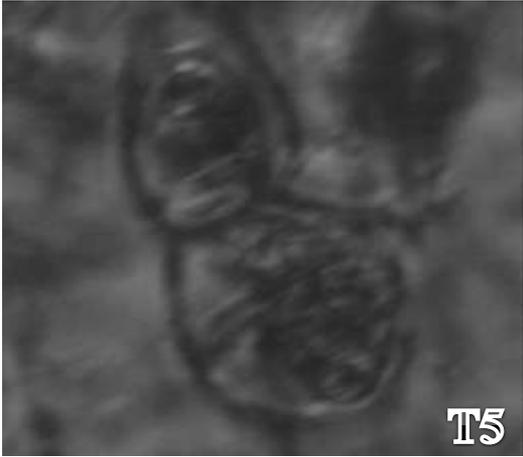
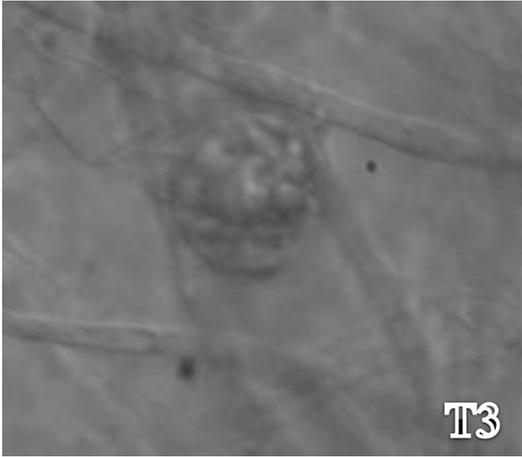
Figuras 35-42: Esporas de *G.intraradices* formadas en los cultivos de *Astrophytum* en los diversos Tratamientos.



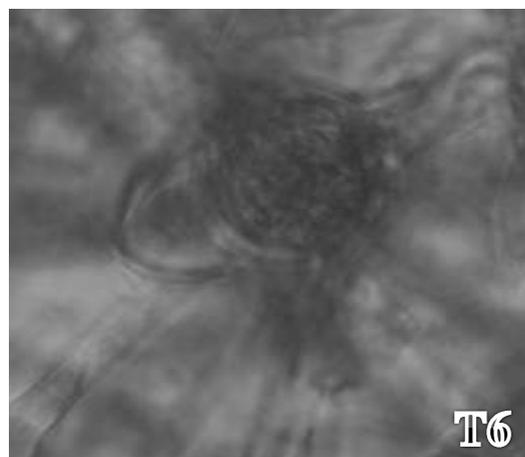
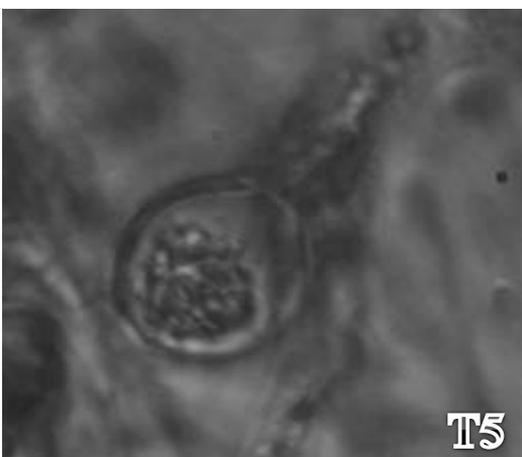
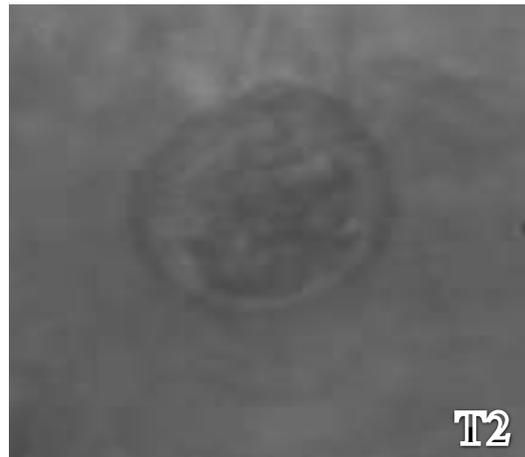
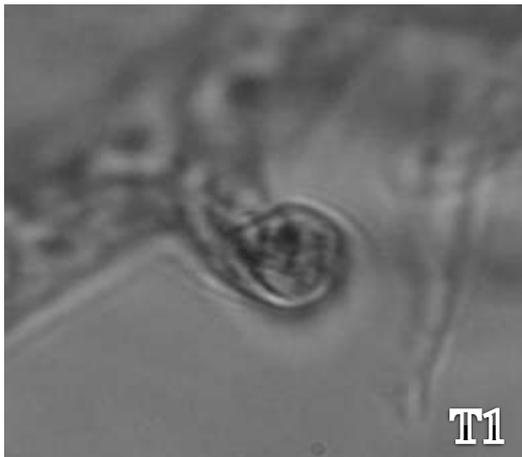


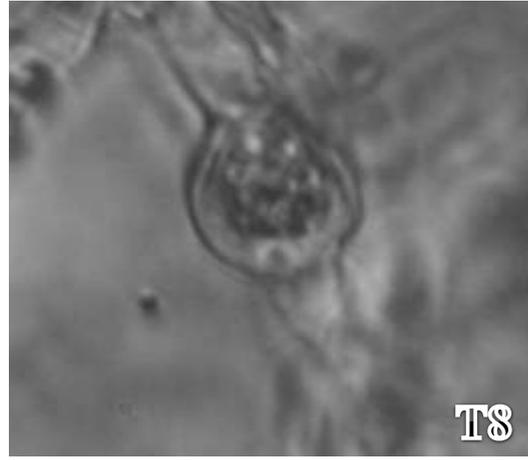
Figuras 43-50: Esporas de *G.intraradices* formadas en los cultivos de Ébano en los diversos Tratamientos.





Figuras 51-58: Esporas de *G.intraradices* formadas en los cultivos de Jatrofa en los diversos Tratamientos

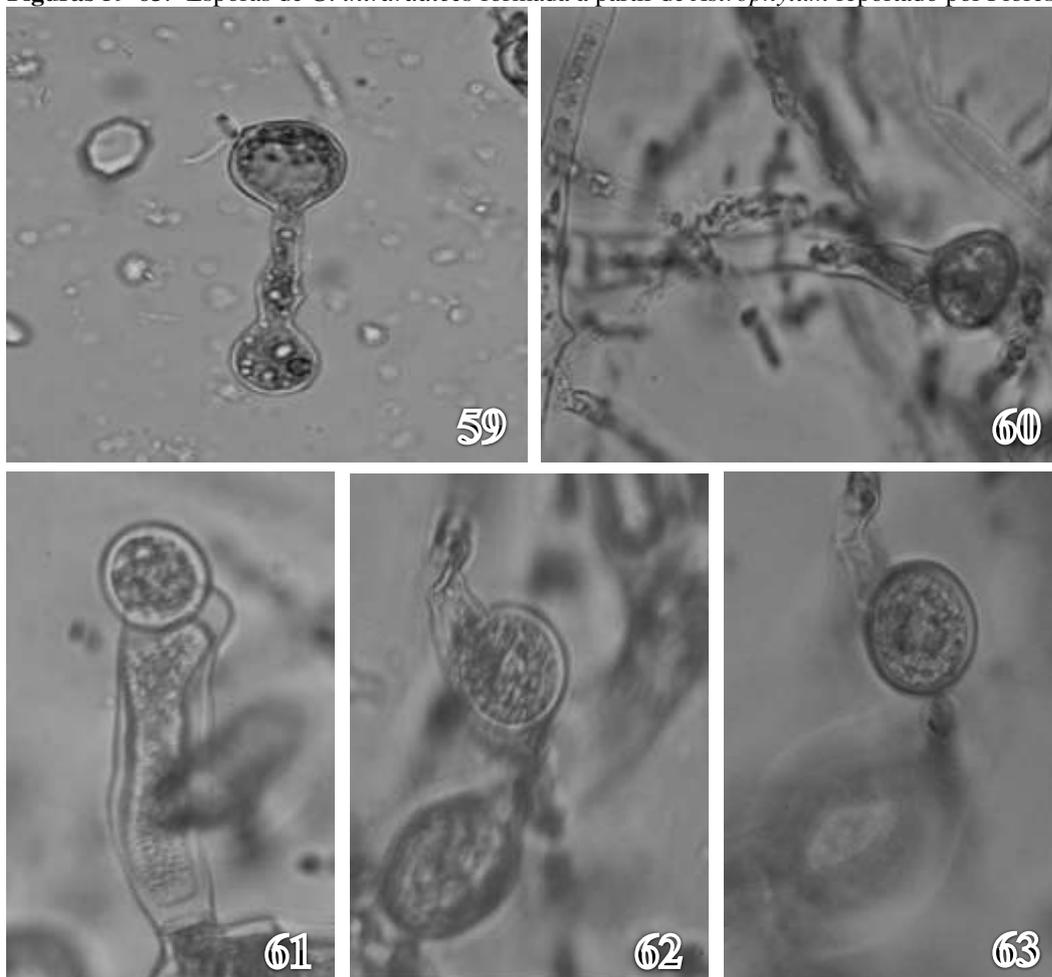




DISCUSIONES

Los resultados obtenidos se ponen de manifiesto que la repuesta de crecimiento celular de diferentes especies de plantas con dos fitorreguladores 2,4-D Y BAP, así como la concentración de sacarosa adicionados al medio de cultivo, se observó que el mayor desarrollo se presentó en cactus estrella (*Astrophytum capricorne*) en cinco de los diez tratamientos evaluados, esto coincide con lo reportado por Flores 2012, quien utilizo cultivo de tejidos con esta especie vegetal, y aquí también esta especie fue la que presento mayor crecimiento (Figuras 57-61).

Figuras 59-63.- Esporas de *G. intraradices* formada a partir de *Astrophytum* reportado por Flores 2012.



La especie que le sigue en crecimiento es Piñoncillo (*Jatropha curcas* L.) y para los tratamientos uno y dos, mientras que para Ébano (*Diospyros ebenum*) el tratamiento fue el tres. Y la otra especie que presento un crecimiento uniforme en su desarrollo en comparación con las tres anteriores fue el Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) para cada uno de los ocho tratamientos, por su parte las plantas de *pitahaya*, *helecho* y *papa* presentaron un crecimiento prácticamente nulo, Esto en contraste a lo reportado por Suárez *et al.* 2014, al utilizar *pitahaya* reporta una mayor respuesta al utilizar el ácido Naftalenacético, lo que podría ser la clave para el desarrollo de esta especie. En cuanto a la papa para los tratamientos tres, cuatro y cinco se obtuvo crecimiento de células indiferenciadas pero en una cantidad muy escasa y no en todas las repeticiones, para los demás tratamientos hubo un desarrollo de plántula, lo cual coincide con muchos trabajos escritos de micropropagación de esta especie, por ejemplo, Páez *et al.* 2001 donde utilizan MS, BAP para obtención propagación de plántula de buena calidad sanitaria. El *helecho* tampoco mostro crecimiento de células indiferenciadas, solo el tratamiento dos presento una cantidad mínima y no fue constante en las repeticiones. El establecimiento de cultivos *in vitro* de hongos micorrizicos en medio líquido es posible utilizando un medio de células en suspensión. En este trabajo se demostró que las células en suspensión de *Astrphytum capricorne* se estimulan más rápidamente, la germinación y producción de esporas en *G. intraradices*, presenta la característica de desarrollo prematuro de las esporas, efecto observado por Carr *et al.* 1985 trabajando con células de alfalfa. En contraparte con el cultivo en suspensión de *Kalanchoe* es conveniente para dichos fines, así mismo el cultivo en suspensión de *Ébano* produce esporas dobles en los tratamientos aquí estudiados. Esto sugiere que la estimulación de la germinación y esporulación no es específica de algunas especies de plantas, y además tampoco lo es en el tipo de células vegetales.

Tal comportamiento probablemente se deba a diversas sustancias secretadas por las células vegetales como lo demostró Koske (1982), mencionado por Carr *et al.* 1985 quien utilizo

células de *Trifolium pratense* que secretaban una serie de compuestos que jugaban un rol muy importante en la formación de la micorriza *Gigaspora gigantea*. Este trabajo aporta información sobre nuevas especies vegetales que permiten la producción de hongos micorrizicos en medio líquido, y deja abierta la posibilidad de otros trabajos de investigación al respecto la finalidad que sean un avance en el proceso para poder cultivar este tipo de hongos en un medio artificial, con lo cual se podría utilizar no solo en el área de investigación sino también en la industria agrícola, ya que se podría obtener este tipo de producto en menos tiempo y minimizando otros factores que limitan su producción actualmente. El medio de cultivo, la concentración de fitohormonas y sacarosa permitieron la obtención de tejido celular en las especies evaluadas.

CONCLUSIONES

*Los explantes; *Astrphytum capricorne*, *Diospyros ebenum* y *Jatropha curcas*, son los que presentan mayor crecimiento y los mejores candidatos a ser utilizados en co-cultivos con micorrizas arbusculares.

*Los cultivos de células vegetales en suspensión favorecen la germinación de esporas, la propagación de micelio y la esporulación del hongo micorrízico *Glomus intraradices*.

*Los cultivos de células en suspensión de *Astrphytum capricorne*, *Diospyros ebenum* presentaron los mejores efectos estimulatorios en los anteriores parámetros de desarrollo de *G. intraradices*.

*Es posible cultivar axénicamente el hongo micorrízico *G. intraradices*.

*Los resultados de esta investigación, incrementan las perspectivas de la producción masiva de hongos micorrizicos en ausencia de sus simbióntes vegetales.

LITERATURA CITADA

- Arias M., A. Aguirre, M. Angarita, C. Montoya & J. Restrepo. 2009. Aspectos ingenieriles del cultivo *in vitro* de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios. *Dyna*. 76:109-121.
- Armstrong L. & R.L. Peterson. 2002. The interface between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and root cells of *Panax quinquefolius*: a Paris-type mycorrhizal association. *Mycologia*. 94: 587-595.
- Ayuso F. 2002. Influencia de enmiendas orgánicas y un hongo endomicorrízico sobre el nematodo *Radopholus similis* en banano (Musa AAA cv Valery). *Manejo Integrado de Plagas*. 65: 82-91.
- Bago A., C. Custodia, J.P. Toussaint, S. Smith & S. Dickson. 2006. Interactions between the arbuscular mycorrhizal (AM) fungus *Glomus intraradices* and non transformed tomato roots of either wild-type or AM-defective phenotypes in monoxenic cultures. *Mycorrhiza*. 16: 429-436.
- Bécard G. & J.A. Fortin 1988. Early events of vesicular–arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist*. 108: 211-218.
- Biblioteca Digital de la Universidad de Chile. Disponible en: http://magaziner.sisib.uchile.cl/repositorio/ap/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/apbotfarm2c/evanswc01/08.html.
- Balestrini R. & L. Lanfranco. 2006. Fungal and plant gene expression in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*. 16: 509-524.
- Blee K.A. & A.J. Anderson. 2000. Defense responses in plants to arbuscular mycorrhizal fungi. En: (G.K. Podila & D.D. Douds, Eds) *Current Advances in Mycorrhizae Research*. APS, St. Paul, USA, pp 27-44.
- Bonafonte P. & A. Genre. 2010. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*. 1: 4.
- Botero M.J., C.A. Rivillas, G. Franco & A. Saldarriaga. 2006. Micorrizas arbusculares asociadas a los cultivos de mora, lulo y tomate de árbol en Antioquia, Valle, Risaralda y Caldas. *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria*. p.9.
- Brechenmacher L., S. Weidmann, D. van Tuinen, O. Chatagnier, S. Gianinazzi, P. Franken & V. Gianinazzi-Pearson. 2004. Expression profiling of up-regulated plant and fungal genes in early and late stages of *Medicago truncatula* - *Glomus mosseae* interactions. *Mycorrhiza* 14: 253-262.

- Breuninger M. & N. Requena. 2004. Recognition events in AM symbiosis: analysis of fungal gene expression at the early appressorium stage. *Fungal Genetics and Biology*. 41: 794-804
- Calva G. & J. Pérez-Vargas. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuentes de alimento para el futuro. *Revista Digital Universitaria*. 6: 1067-6079.
- Caron M., J.A. Fortin & C. Richard. 1986. Effect of inoculation sequence on the interaction between *Glomus intraradices* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomatoes. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 8: 12-16.
- Carr G.R., M.A. Hinkley, F. Le Tacon, C.M. Hepper, M.G.K. Jones & E. Thomas. 1985. Improved hyphal growth of two species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of suspension-cultured plant cells. *New Phytologist*. 101: 417-426.
- Castellanos-Morales V, J. Villegas, S. Wendelin, H. Vierheilig, R. Eder & R. Cárdenas-Navarro. 2010. Root colonisation by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* alters the quality of strawberry fruits (*Fragaria x ananassa* Duch.) at different nitrogen levels. *Journal of The Science Food and Agriculture*. 90: 1774-1782.
- Dalpe Y. & M. Monreal. 2003. Arbuscular mycorrhiza inoculum to support sustainable cropping systems. *Crop Management*. 10: 1094-1104.
- Dalpe Y. & M. Monreal. 2004. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soils*. 37: 1-16.
- Dangl J. & J. Jones, 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-833.
- Datnoff L.E., S. Nemecek & K. Pernezny. 1995. Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*. *Biological Control*. 5: 427-431.
- Declerck S., M. Ijdo, K. Fernandez, L. Voets & I. de la Providencia. 2009. Method and system for *in vitro* mass production of arbuscular mycorrhizal fungi.
- Delledonne M., I. Murgia, D. Ederle, P. F. Sbicego, A. Biondian, A. Polverari & C. Lamb. 2002. Reactive oxygen intermediates modulates nitric oxide signaling in the plant hypersensitive disease-resistance response. *Plant Physiology and Biochemistry*. 40:605-610.
- Demartsev V., E.R. Aussenberg, V. Gadkar, H. Koltai, A. Zilberstein & Y. Kapulnik. 2005. Alteration in tomato (*Lycopersicon esculentum*) gene expression during early stages of the interaction with *Glomus intraradices*. In: Management Committee and Final Meeting on

“Achievements and Future Landscape for Arbuscular Mycorrhiza Research”, Dijon, France, June 2005.

- Douds D.D. Jr . 2002. Increased spore production by *Glomus intraradices* in the split-plate monoxenic culture system by repeated harvest, gel replacement, and resupply of glucose to the mycorrhiza. *Mycorrhiza*. 12: 163-167.
- Dupré de Boulois H., L. Voets, B. Delvaux, I. Jakobsen & S. Declerck. 2006. Transport of radiocaesium by arbuscular mycorrhizal fungi to *Medicago truncatula* under *in vitro* conditions. *Environmental Microbiology*. 8: 1926-1934.
- Esperanza R.S. 2004. Formación de callo e inducción de un cultivo de células en suspensión en *Lophophora williamsii*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.
- Fernández F., J.M. Dell’Amico, Y. Pérez, E. Montilla, A. Morte, M. Honrubia, A. Rincón & Y de la Providencia. 2007. Evaluación de inoculantes de hongos micorrízicos arbusculares de *Glomus clarum* y *Glomus fasciculatum* en medio líquido (LICOMIC ®). *Agricultura Andina*. 12: 67-83.
- Fillion M., M. St-Arnaud & J.A. Fortin. 1999. Direct interaction between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and different rhizosphere microorganisms. *New Phytologist*. 141: 525-533.
- Fortin J.A., M. St-Arnaud, C. Hamel, C. Chaverie & M. Jolicoeur. 1996. Aseptic *in vitro* endomycorrhizal spore mass production. US Patent. No. 5554530
- Gadkar V, J.D.Driver & M.C. Rillig .2006. A novel *in vitro* cultivation system to produce and isolate soluble factors released from hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Biotechnology Letters*. 28: 1071-1076.
- Gao L.L., W. Knogge, G. Delp, F. Andrew-Smith & S.E. Smith. 2004. Expression patterns of defense-related genes in different types of arbuscular mycorrhizal development in wild-type and mycorrhiza-defective mutant tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 17: 1103-1113.
- Garcia-Garrido J.M. & J.A. Ocampo, 2002. Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of Experimental Botany*. 53: 1377-1386.
- Gonzales-Chávez M.C. & R. Ferrera-Cerrato. 2000. Roca fosfórica y *Glomus sp* en el crecimiento del naranjo. *TERRA Latinoamericana*. 18: 361-367.
- Habte M., Y.C. Zhang & D.P. Schmitt. 1999. Effectiveness of *Glomus* species in protecting white clover against nematode damage. *Canadian Journal of Botany*. 77: 135-139.

- Hernández W. & E. Salas. 2009. La inoculación con *Glomus fasciculatum* en el crecimiento de cuatro especies forestales en vivero y campo. *Agronomía Costarricense* 33: 17-30.
- Hepper C.M. & B. Mosse. 1980. Vesicular-arbuscular mycorrhiza in root organ cultures. En: *Tissue Culture Methods for Plant Pathologists* (D. S. Ingram & J. P. Helgeson, Eds.) pp. 167-171. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Hršelová H., M. Gryndler & V. Vanèura. 2003. Influence of inoculation with VA mycorrhizal fungus *Glomus sp.* on growth of strawberries and runner formation. *Agriculture , Ecosystems & Environment*. 29: 193-197.
- Jaiti F., A. Meddich & I. Hadrami. 2007. Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi in the protection of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) against bayoud disease. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 71: 166-173.
- Jolicoeur M. 1998. Optimisation d'un procédé de production de champignons endomycorrhiziens en bioréacteur. Dissertation, École Polytechnique de Montréal. Jolicoeur M., R.D. Williams, C. Chavarie, J.A. Fortin & J. Archambault. 1999. Production of *Glomus intraradices* propagules, an arbuscular mycorrhizal fungus, in an airlift bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 63: 224-232.
- Josefina Páez de Cásares, Roberto González. 2001. Conservación In Vitro de Dos Variedades de Papa (*Solanum tuberosum*) Bajo Condiciones de Crecimiento Mínimo. *Revista Latinoamericana de la Papa*. (2001). 12:121-129.
- Khan M.H., M.K. Meghvansi, V. Panwar, H.K. Gogoi & L. Singh. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungi-induced signalling in plant defence against phytopathogens. *Journal of Phytology*. 2: 53-69.
- Künke B.N. & D.M. Brooks, 2002. Cross talk between signaling pathway in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology*. 5: 325-331.
- Kristek S., A. Kristek & H. Pavloviæ. 2005. The influence of mycorrhizal fungi (*Glomus sp.*) on field pea plant survival and growth in drought caused stress conditions. *Plant, Soil & Environment*. 51: 385-389..
- Li B., S. Ravnskov, G.L. Xie & J. Larsen. 2007. Biocontrol of *Pythium* damping-off in cucumber by arbuscular mycorrhiza-associated bacteria from the genus *Paenibacillus*. *Biocontrol*. 52: 863-875.
- Lioussanne L., M. Jolicoeur & M. St-Arnaud. 2008. Mycorrhizal colonization with *Glomus intraradices* and development stage of transformed tomato roots significantly modify

the chemotactic response of zoospores of the pathogen *Phytophthora nicotianae*. *Soil Biology and Biochemistry*. 40: 2217-2224.

- Luis Enrique Flores Jiménez. 2012. Propagación de *Glomus intraradices* en medio de células vegetales en suspensión. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Martínez-Valenzuela C. & S. Gómez-Arroyo. 2007. Riesgo genotípico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 23: 185-200.
- Matekwor Ahulu E., M. Nakata & M. Nonaka. 2005. Arum- and Paris-type arbuscular mycorrhizas in a mixed pine forest on sand dune soil in Niigata prefecture, central Honshu, Japan. *Mycorrhiza*. 15: 129-136.
- Mathur N. & A. Vyas. 2000. Influence of arbuscular mycorrhizae on biomass production, nutrient uptake and physiological changes in *Ziziphus mauritiana* Lam. under water stress. *Journal of Arid Environments*. 45: 191-195.
- Melgares De Aguilar. M.J., D. González-Martínez, A. Gutiérrez, M. Honrubia & A. Morte. 2004. Efectos del hongo endomicorrícico *Glomus intraradices* en el cultivo ecológico de lechuga tipo Iceberg. En: VI Congreso de la Sociedad Española de Agricultura Ecológica Almería (Resumen): 241-242.
- Mosse B. & C.M. Hepper. 1975. Vesicular-arbuscular infections in root-organ cultures. *Physiological Plant Pathology*. 5: 215-233.
- Mosse B. 1959. The regular germination of resting spores and some observations on the growth requirements of an *Endogone* sp. causing vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Transactions of the British Mycological Society*. 42: 273-286.
- Mosse B. 1962. The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. *Journal of General Microbiology*. 27: 509-520.
- Mugnier J. & B. Mosse. 1987. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in transformed root-inducing T-DNA roots grown axenically. *Phytopathology* 77: 1045 -1050.
- Parniske M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbiose. *Nature Reviewa Microbiology*. 6: 763-775.
- Petit E. & W.D. Gubler. 2006. Influence of *Glomus intraradices* on black foot disease caused by *Cylindrocarpon macrodidymum* on *Vitisrupes tris* under controlled conditions. *Plant Disease*. 90: 1481-1484.

- Qi G.H., W.L. Yang, L.P. Zhang, X.T. Li & S.N. Gao. 2005. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on storage nutrient and cold resistance of *Diospyros lotus* L. Journal of Agricultural University of Hebei. Redecker D. & P. Raab. 2006. Phylogeny of the Glomeromycota (arbuscular mycorrhizal fungi): recent developments and new gene markers. Mycologia. 98: 885-895.
- Redecker D. 2008. Glomeromycota. Arbuscular mycorrhizal fungi and their relative(s).<http://tolweb.org/Glomeromycota/28715/2008.01.14>.
- Ruiz Lozano JM. 2003. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies Mycorrhiza 13: 309-317.
- Rocío Stella Suárez Román, Creuci María Caetano, Hernando Ramírez, Juan Gonzalo Morales Osorio. 2014. Multiplicación de *Selenicereus megalanthus* (pitahaya amarilla) e *Hylocereus polyrhizus* (pitahaya roja) vía organogénesis somática. Acta Agron. vol.63 no.3 Palmira. ISSN 0120-2812.
- Simon L, Bousquet J, Lévesque RC, Lalonde M. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. Nature 363:67-69
- Smith S, Read D. 1997. Mycorrhizal symbiosis Academic Press, London Book.
- Segarra G., S. Van der Ent, I. Trillas & C.M.J. Pieterse. 2009. MYB72, a node of convergence in induced systemic resistance triggered by a fungal and a bacterial beneficial microbe. Plant Biology. 11: 90-96.
- Singh P.K., M. Singh & D. Vyas. 2010. Biocontrol of Fusarium wilt of chickpea using arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium leguminosorum* biovar. Caryologia. 63: 349-353.
- Siqueira J.O., G.R. Safir & M.G. Nair. 1991. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. New Phytologist. 118:87-93.
- St-Arnaud M., C. Hamel, B. Vimard, M. Caron & J.A. Fortin. 1996. Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots. Mycological Research. 100: 328-332.
- Tinoco R., D. Halperin & N. Schwartz. 1999. "Balancing risks and resources: applying pesticides without protective equipment in southern Mexico". Oxford Univ. Press. Tiwari P. & A. Adholeya. 2003. Host dependent differential spread of *Glomus intraradices* on various Ri T-DNA transformed root *in vitro*. Mycological Progress. 2:171-177.
- Vierheilig H., S. Steinkellner, T. Khaosaad & J.M. Garcia-Garrido. 2008. The biocontrol effect of mycorrhization on soilborne fungal pathogens and the autoregulation of

the AM symbiosis: one mechanism, two effects?. En, A. Varma (Ed.) Mycorrhiza. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 307-320.

- Voets L., H. Dupré de Boulois, L. Renard, D.G. Strullu & S. Declerck. 2005. Development of an autotrophic culture system for the *in vitro* mycorrhization of potato plantlets. FEMS Microbiology Letters. 248: 111-118.
- Wang W.K. 2003. Method of facilitating mass production and sporulation of arbuscular mycorrhizal fungi aseptic. US Patent. No. 6759232.
- Yamato M. 2005. Morphological types of arbuscular mycorrhizas in pioneer woody plants growing in an oil palm farm in Sumatra, Indonesia. Mycoscience. 46: 66-68.
- Zambrano J.A. & L.A. Díaz. 2008. Efecto de la inoculación de *Azospirillum brasilense* y *Glomus sp.* en *Gmelina arborea* durante su germinación y manejo en vivero. Universitas Scientiarum. 13: 162-170.
- Hanne Volpin, Yonatan Elkind, Yaacov Okon, and Yoram Kapulnik. A Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungus (*Glomus intraradix*) Induces a Defense Response in Alfalfa Roots. Plant Physiol. (1994) 104: 683-689.