

Figura 12: Longitud promedio de todas las raíces de una plántula de arroz, crecida en medio de cultivo (LGI-P sólido, 1.5% agar, 2% sacarosa), inoculadas con microorganismos-asociados, aislados de esporas de *G. mosseae*. El control tenía idénticas condiciones pero no fue inoculado. Error estándar de la media 13.8 mm. n=3

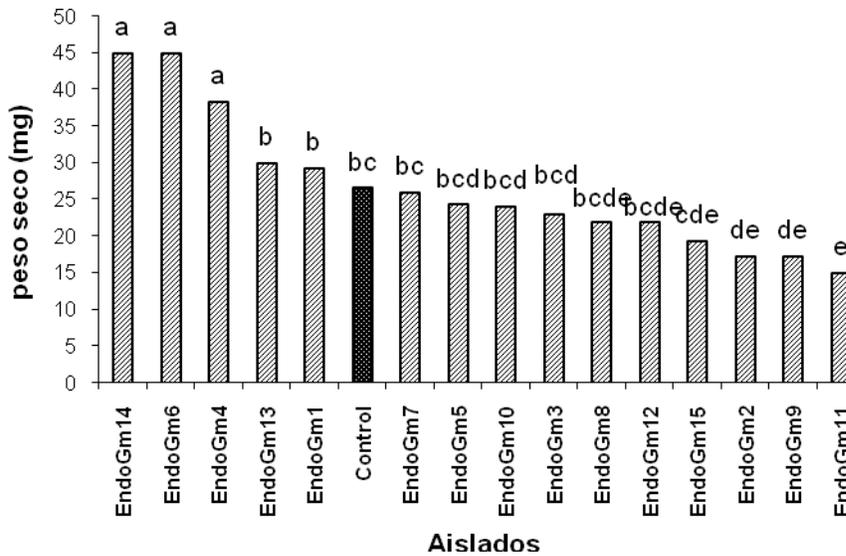


Figura 13: Peso seco del sistema radical de plántulas de arroz, inoculadas con aislados asociados a esporas de *G. mosseae*. Las características del experimento fueron idénticas a las descritas en la Fig. 3. Error estándar de la media 2.4 mg. n=3

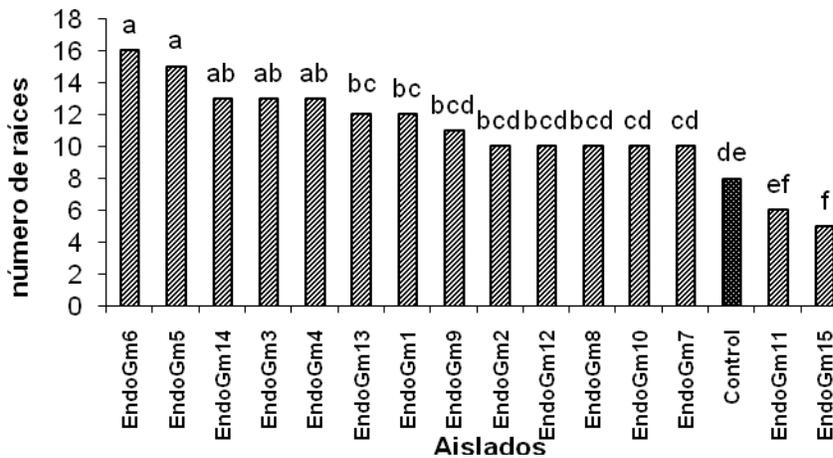


Figura 14: Número total de raíces crecidas en una plántula de arroz promedio, inoculada con microorganismos-asociados aislados de esporas de *Glomus mosseae*. Las características del experimento fueron idénticas a las descritas en la Fig. 3. Error estándar de la media 0.96. n=3

Los aislados EndoGm 1 (*Rhodotorula*), EndoGm 4, EndoGm 6 (*Pseudomonas aeruginosa*), EndoGm 13 y EndoGm 14 coincidieron en promover las tres variables.

El desarrollo radical en las plántulas de arroz promovido por estos microorganismos-asociados puede estar influenciado por la excreción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal como el ácido indolacético u otro compuesto durante el crecimiento de los microorganismos.

Por la conocida influencia de los compuestos indólicos en el crecimiento de las raíces de las plantas (Egamberdieva, 2008), se realizaron ensayos cualitativos de producción de indol por los 15 microorganismos-asociados aislados (Tabla 10). La mayoría de los aislados que estimularon el crecimiento de las raíces respondieron positivamente a la prueba del indol (Figura 15).

Tabla 10: Producción cualitativa de indol por los microorganismos-asociados (15), utilizando el reactivo de Kovacs (Cortés, 2001).

EndoGm	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Producción de indol	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-



Figura 15: Determinación cualitativa de la producción de indol. Los tubos, de izquierda a derecha tienen cultivos de *Escherichia coli*, control positivo (ATCC 25922); 9C, control negativo (Loiret, 2001); EndoGm (6, 8, 13, 5 que sí producen indol (halo rojo en la superficie del medio) y EndoGm 7 que no produce indol); blanco sin cultivo.

Existió una estrecha coincidencia entre algunos microorganismos-asociados que promovieron las tres variables analizadas (peso seco, número y longitud) y la producción de indol cualitativa, por lo que se determinó cuantitativamente las cantidades de la hormona posiblemente responsables de la respuesta; según la metodología de Selvakumar *et al.* (2008) (Tabla 11).

Los valores más elevados de concentración de indol fueron observados en los aislados EndoGm 6 (*P. aeruginosa*), EndoGm 12 (*D. acidovorans*), EndoGm 8 (*P. aeruginosa*) y EndoGm 5 (*P. aeruginosa*) con rango de 1,5 a 3,02 mg.mL⁻¹.

El aislado *EndoGm 6 (P. aeruginosa)*, cuyos resultados fueron positivamente relevantes para las tres variables fisiológicas evaluadas (Fig. 12, Fig. 13 y Fig. 14), produjo indol (Tabla 10, Fig. 15) y la determinación cuantitativa (Tabla 11) en presencia de triptófano en el medio fue de $1,5 \text{ mg.m L}^{-1}$. Se conoce que las hormonas a bajos niveles inducen estimulación (Egamberdieva, 2008), siendo el valor de concentración en presencia de triptófano en el medio la mitad de la concentración del aislado del mismo género y especie *EndoGm 5*.

Tabla 11: Producción de indol cuantitativa en presencia y ausencia de Triptófano en el medio.

Microorganismos- asociados	Concentración de indol (mg.m L^{-1}) en presencia de Triptófano en el medio de cultivo	Concentración de indol (mg.m L^{-1}) en ausencia de Triptófano en el medio de cultivo
<i>EndoGm 3</i>	0,85	0,46
<i>EndoGm 5</i>	3,02	1,07
<i>EndoGm 6</i>	1,5	0,26
<i>EndoGm 7</i>	0,62	0,39
<i>EndoGm 8</i>	2,2	0,075
<i>EndoGm 10</i>	0,6	0,19
<i>EndoGm 12</i>	1,9	-0,17

De forma general, en todos los microorganismos-asociados ensayados los valores más pequeños fueron observados en ausencia de Triptófano en el medio de cultivo (Tabla 11). El aislado *EndoGm 5 (Pseudomonas aeruginosa)* se destacó con los mayores valores de concentración de esta hormona. En las Figs. 13 y 14 se aprecia que la incidencia de esta bacteria-asociada en plántulas de arroz es inferior al control, por tanto con altos niveles de la hormona no se consiguió una estimulación mayor.

4.7- Efecto de los microorganismos-asociados, aislados de esporas desinfectadas de *Glomus mosseae* (INCAM-2) sobre la germinación y el crecimiento hifal del hongo micorrizógeno en condiciones *in vitro*

El enfrentamiento de las esporas de *G. mosseae* y microorganismos-asociados tuvo un interés especial y fue conocer como actuaban los microorganismos-asociados sobre el desarrollo de la especie de HMA de donde se aislaron. Se trabajó en un sistema de crecimiento donde se pusieran en contacto las esporas y los microorganismos-asociados.

Para el trabajo *in vitro* con las esporas se siguió la metodología de desinfección propuesta por Cranenbrouck *et al.* (2005). Estos autores con el uso de raíces transformadas de zanahoria mantienen conservados un gran número de HMA a través del cultivo *in vitro*; se hizo uso de dicha metodología y

se consiguió esporas de *G. mosseae* completamente desinfectadas, incluso a los 25 días en medio de cultivo no hubo crecimiento microbiano contaminante en las placas Petri donde se desarrolló el experimento, luego esto fue verificado a los 40 y 45 días; lo que evidenció una correcta desinfección del material fúngico así como un certero informe de los resultados propuestos.

La metodología propuesta por Cranenbrouck *et al.* en el 2005 limpió la pared externa de las esporas y permitió la germinación de las mismas, también esta última metodología es muy utilizada y propuesta con estos fines, es decir para experimentos *in vitro* de interacción y no ha sido utilizada por los científicos que abordan la temática para el estudio de microorganismos-asociados.

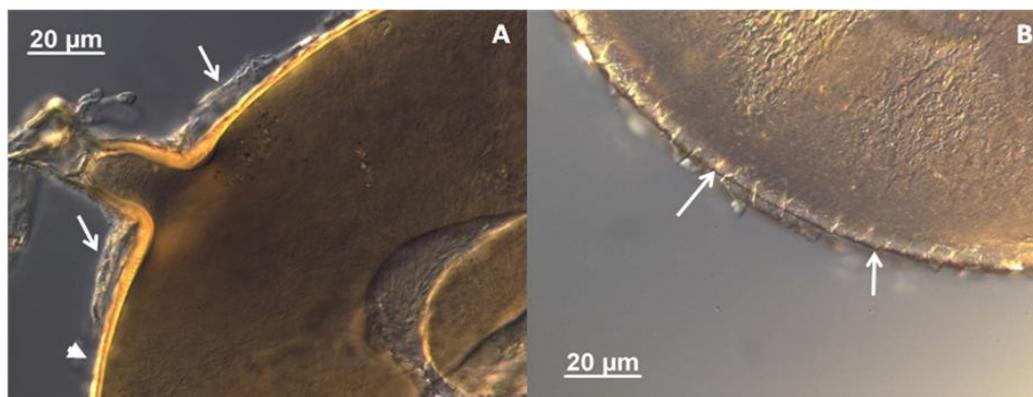


Figura 16: Esporas de *G. mosseae* desinfectadas con la metodología CTCf. A: las flechas indican restos de la pared externa, la saeta indica lugar donde ya no está la pared externa. B: las flechas indican la pared intermedia. Las imágenes fueron tomadas con microscopio estereoscópico (marca Carl Zeiss) y con ayuda del Software AxiVision.

En los experimentos que condujeron a esta tesis fue necesario el trabajo con dos metodologías de desinfección de esporas, debido a que la metodología CTCf utilizada para la completa desinfección de las esporas de *G. mosseae*, necesaria para la extracción de los microorganismos-asociados (bacterias y levaduras) impide la germinación de las esporas e incluso elimina en muchos casos la pared externa de las mismas (Fig. 16A) quedando las esporas con la pared intermedia expuesta (Fig. 16B). Este es un resultado muy positivo y útil para el aislamiento de microorganismos que estén íntimamente asociados a las esporas debido a que al eliminar la pared externa se eliminan microorganismos externos y otros contaminantes. La nitidez de la figura 16B fue considerada por el Dr. Ricardo Herrera como valiosa para distintos fines, como estudios de taxonomía de la spora y para el aislamiento de microorganismos endógenos (comunicación personal, del ya fallecido taxónomo Dr. Ricardo Herrera).

La germinación de las esporas tuvo lugar a los 10 días de haberse puesto en contacto los microorganismos-asociados y las esporas del HMA. Cuando solo se colocaron esporas en los medios de cultivo no se observó desarrollo de la hifa de germinación hasta pasados 17 días, lo que evidencia un posible efecto de los microorganismos-asociados sobre la germinación de la spora; adelantándose en el tiempo (aproximadamente siete días) este evento.

La germinación de las esporas controles demoró; a los 21 días (Fig. 17) se observó el desarrollo de pequeñas hifas en las tres repeticiones del experimento, que si bien indicaban el inicio del evento de germinación de las esporas, este crecimiento se detuvo (verificado midiendo el tamaño de las hifas desde el día 25 hasta el día 45) (Fig. 17, Tabla 12). En las esporas del tratamiento control el crecimiento ocurrió en forma curva y errática (sin tener una dirección específica), la hifa de germinación se enrolló sin llegar a sobrepasar un milímetro de distancia desde la pared externa de las esporas.

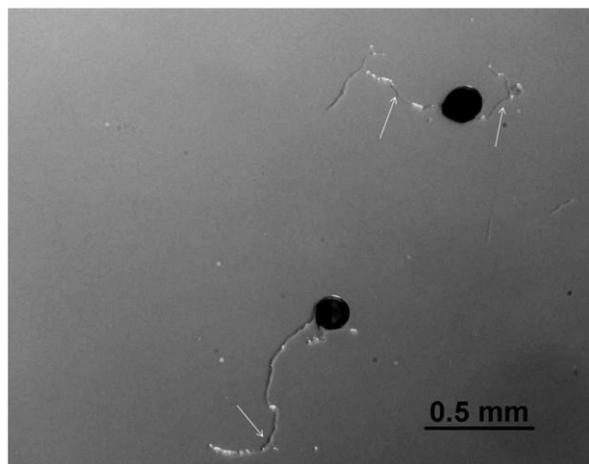


Figura 17: Germinación de esporas controles de *G. mosseae* desinfectadas sin inoculación, en medio SRM. Se observa en la figura poco crecimiento de la hifa de germinación (a los 45 días). Se señala con flecha la curvatura de la hifa, que tiende a enrollarse, sin ramificación.

El efecto de la coinoculación de las esporas con los microorganismos-asociados fue mayor cuando se inoculó el aislado EndoGm8, resultando en un 80% de esporas germinadas. El efecto de los aislados EndoGm1 y EndoGm12 con valores de germinación que oscilan entre un 60 y un 70%, sin embargo, no se diferenciaron del control. Ningún incremento se observó cuando se realizó la coinoculación con los aislados EndoGm3 y EndoGm6; la germinación del hongo en ambos casos fue semejante a la del control (Figura 18).

Tabla 12: Largo total de las hifas que crecieron durante 23 días a partir de las 15 esporas de *G. mosseae* sembradas en medio de cultivo SRM e inoculadas con las cepas microbianas-asociadas.

Aislados	Largo hifal (mm)	
	Mínimo	Máximo
Control	0,5	1*
<i>Rhodotorula glutinis</i> EndoGm1	0,05	10
<i>Delftia acidovorans</i> EndoGm3	0,5	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> EndoGm5	0,05	17
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> EndoGm6	0,5	1,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> EndoGm7	0,5	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> EndoGm8	1	26
<i>Delftia acidovorans</i> EndoGm10	4	16
<i>Delftia acidovorans</i> EndoGm12	1	14

*A los 45 días se volvió a realizar un análisis y no se observó crecimiento adicional.

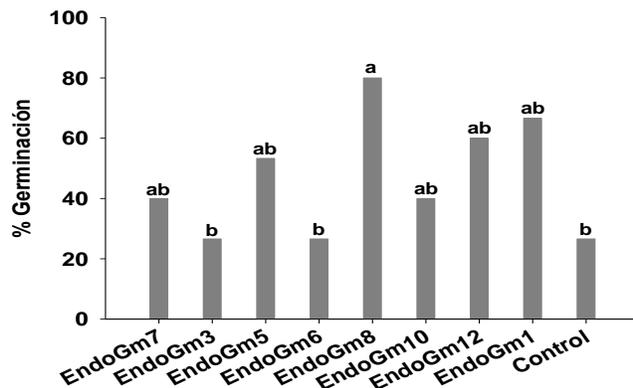


Figura 18: Germinación de las esporas de HMA INCAM-2 influenciado por la coinoculación en placas Petri con los diferentes microorganismos-asociados aislados de *G. mosseae*. Error estándar de la media 2,2. 100% = 15 esporas, los resultados son la media de 3 experimentos.

La Fig. 19 evidencia el desarrollo de ramificaciones provocadas por los microorganismos-asociados. La producción de nuevas hifas, hasta la formación de un micelio profuso fue observado durante los 45 días que se siguió el experimento, en las placas inoculadas con las esporas y el microorganismo-asociado EndoGm8 (*P. aeruginosa*) (Fig. 19B). Sin embargo, la influencia de EndoGm5 y EndoGm10 (Fig. 19C) arrojó un máximo del largo hifal de 17 y 16 mm respectivamente (Tabla 12) y además se puede apreciar un detalle en esta figura y es como la hifa es capaz de desplazar el crecimiento microbiano. Los microorganismos-asociados influyeron, por ejemplo EndoGm3 (*D. acidovorans*) y EndoGm6 (*P.*

aeruginosa) trajeron consigo ramificaciones en las hifas de la esporas pero el largo hifal fue de 3 y 1.5 mm respectivamente, muy cercano al control sin inocular (2 mm). En las placas donde solo estaban inoculadas las esporas controles, no se observó desarrollo de nuevas hifas (Fig. 17) ni crecimiento de las existentes en el período evaluado (Tabla 12).

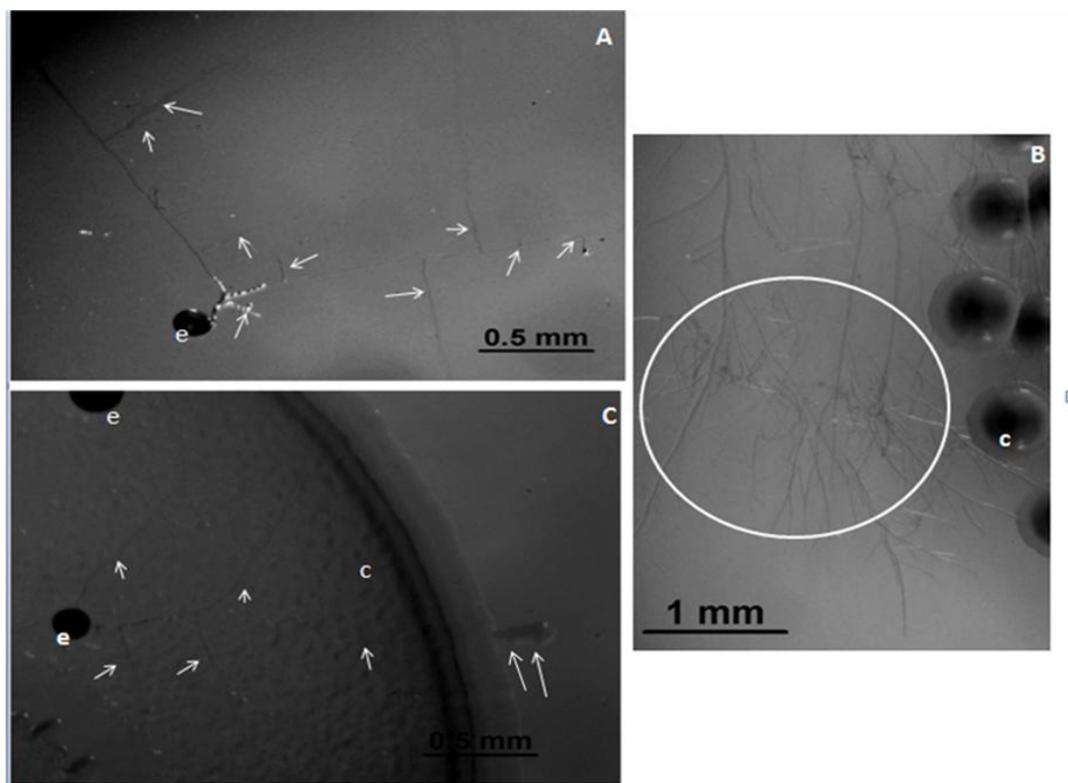


Figura 19: Aumento en el número de ramificaciones de las hifas cuando se ha inoculado algún aislado de los microorganismos-asociados (indicado con flecha). A: *EndoGm 7*, B: *EndoGm 8* y C: *EndoGm 10*. El círculo en la fotografía B indica la formación de micelio. En C se aprecia a la derecha (indicado con doble flecha) la ramificación en forma de brazo, producido por el desplazamiento de la colonia del aislado *EndoGm 10* al ser atravesada por la hifa. Las fotos fueron tomadas con microscopio estereoscópico (marca Carl Zeiss) y con ayuda del Software AxioVision, a los 27 días de haber comenzado el experimento.

Es necesario resaltar que el comportamiento no fue el mismo en todos los tratamientos. La cepa de *P.aeruginosa* (*EndoGm 8*) a los 45 días había cubierto de hifas toda la placa, por lo que fue imposible medirlas debido al tamaño alcanzado y el entrecruzamiento de las mismas. El desarrollo del hongo no se detuvo en los tratamientos donde estaban las esporas desinfectadas en contacto con los microorganismos-asociados; aunque si se tendría que tener en cuenta la adición de medio de cultivo a las placas o el cultivo en placas más grandes u otro sistema para poder tener el hongo creciendo durante

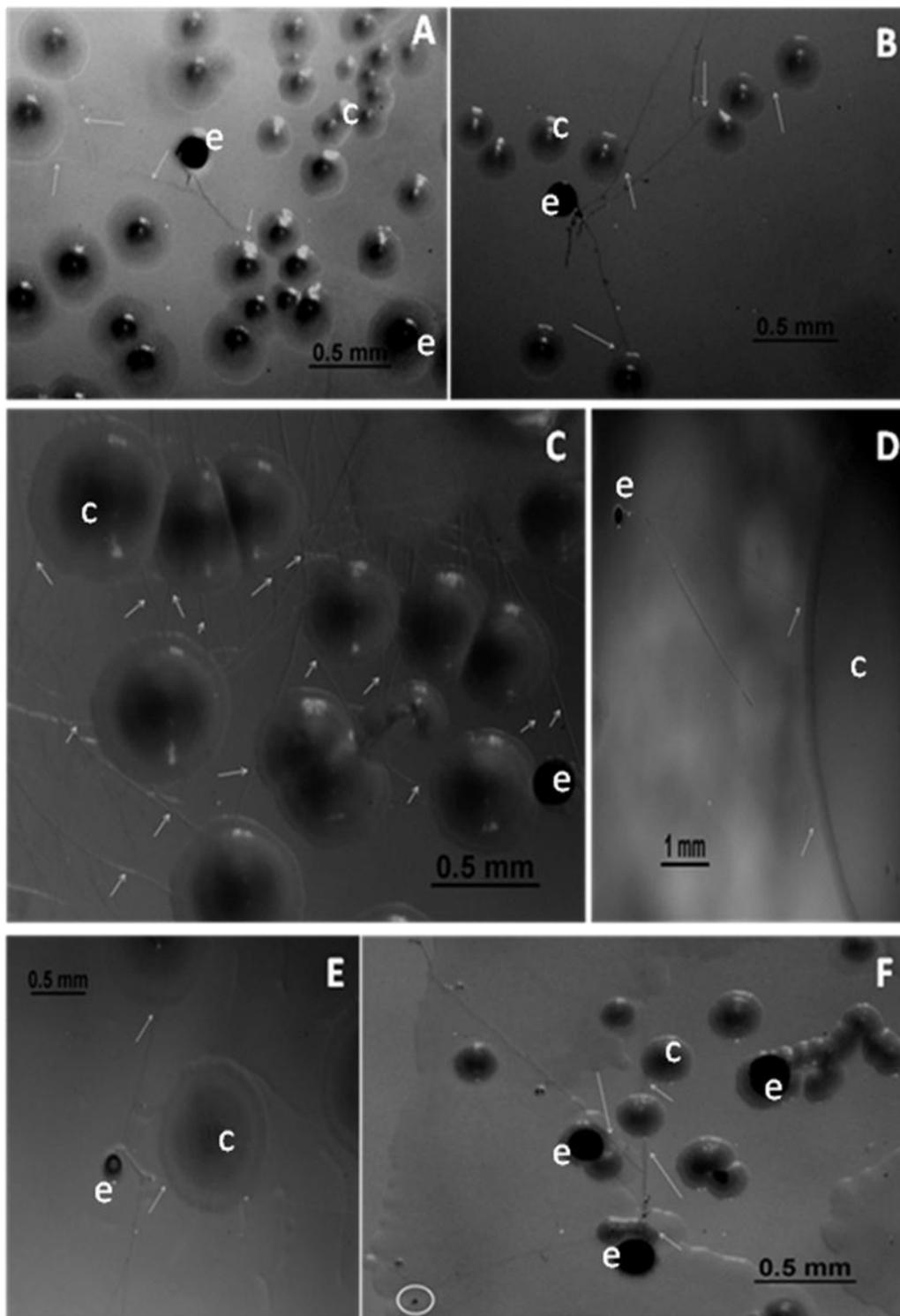


Figura 20: Hifas de *G. mosseae* creciendo en dirección a las colonias microbianas (señalado con flecha). e: espora, c: colonia. A: EndoGm 3, B: EndoGm 5, C: EndoGm 8, D y E: EndoGm 10, F: EndoGm 1. Las fotos fueron tomadas con microscopio estereoscópico (marca Carl Zeiss) y con ayuda del Software AxióVision, a los 27 días de iniciado el experimento.

un tiempo mayor, en vistas a la producción de este en medio de cultivo *in vitro* aprovechando la estimulación de los microorganismos-asociados.

Se observó también que las esporas germinaban y la hifa crecía e iba en dirección a las colonias de los microorganismos-asociados (Fig. 20), es posible que la excreción de sustancias por los microorganismos-asociados sea el factor quimioatractivo que promueva el crecimiento de las hifas de *G. mosseae* en tal dirección o que la espora excrete exudados específicos que estimulan el crecimiento de un microorganismo-asociado en específico y haya una retroalimentación entre ambos. De los siete microorganismos-asociados ensayados cinco están representados en la Fig. 20 y las flechas blancas señalan las hifas que penetran a la colonia.

A pesar que EndoGm1 no induce a la producción un micelio profuso, este aislado de *Rhodotorula glutinis* es el único microorganismo-asociado que trajo consigo la formación de nuevas esporas (Fig. 21) en el tiempo evaluado; constituyendo un resultado relevante debido a que sin la presencia de un órgano vegetal el HMA como simbiote pudiera estar imposibilitado de llegar a formar nuevas estructuras (Hildebrandt *et al.* 2006).

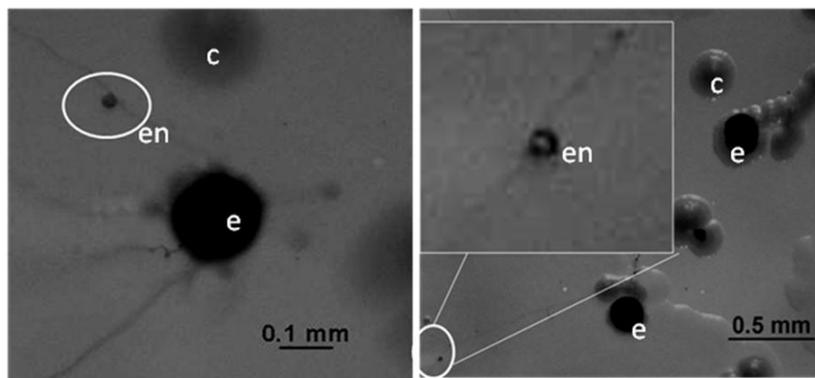


Figura 21: Dos vistas diferentes (A y B) de la formación de nuevas esporas al inocular esporas desinfectadas de *G. mosseae* y EndoGm1 (*Rhodotorula glutinis*). c: colonia, e: espora, en: espora nueva. Las fotos fueron tomadas con microscopio estereoscópico (marca Carl Zeiss) y con ayuda del Software AxioVision, a los 27 días de haber puesto el experimento.

Al inocular *in vitro* las esporas del HMA INCAM-2 con los microorganismos-asociados, se obtuvieron resultados novedosos al lograr la germinación de las esporas y el crecimiento de hifas por el efecto de los microorganismos-asociados. El efecto estimulador de la germinación de las esporas de *G. mosseae* (Fig. 18) y el crecimiento hifal del HMA ante los microorganismos-asociados aislados fue observado en tres repeticiones del experimento.

Las figuras demuestran la promoción de la germinación (Fig. 18), el crecimiento hifal, la formación de micelio abundante (Fig. 19) y el posible efecto de sustancias excretadas por las bacterias o la levadura. Posiblemente estas sustancias estimulan al hongo M A; se observa el frente de hifas en dirección a la colonia microbiana en cinco de los aislados (Fig. 20), en los otros dos que no están en la figura el comportamiento fue el mismo. Todo esto demuestra una relación estrecha entre el H M A y los microorganismos-asociados con implicaciones en el propio funcionamiento del hongo.

En este experimento se observó la formación de nuevas esporas a partir del efecto de *EndoGm1*, (Fig. 21) con la relevancia que esto puede tener para el H M A, sin dudas quedarían muchos experimentos por realizarse pero esta investigación abre nuevas expectativas sobre las características descritas hasta entonces del carácter de simbiosis obligados de estos hongos.

V - D i s c u s i ó n

5.1- D e s i n f e c c i ó n d e e s p o r a s d e *G l o m u s m o s s e a e* (I N C A M - 2)

Lograr esporas completamente asépticas en la pared externa del hongo en estudio fue un punto crítico de este trabajo de investigación, que tenía como meta poder aislar microorganismos-asociados del interior de las mismas. En la literatura científica consultada existían referencias a seis metodologías de desinfección (Mosse, 1962; Colozzi-Filho, 1988; Tilak *et al.* 1989; Nair *et al.* 1991; Bianciotto *et al.* 1996; Walley y Germida, 1996) encaminadas a lograr esporas libres de contaminantes microbianos en sus paredes externas, sin embargo un método de desinfección puede ser muy eficiente para una espora de HMA en específico y no serlo para otra, debido a su especificidad (Reis *et al.* 1999).

La metodología denominada en esta tesis Nair-Reis, utiliza la Cloramina T al 2% (Nair *et al.* 1991; Reis *et al.* 1999); evidentemente la combinación y concentración de productos desinfectantes que utilizaron no solucionó la necesidad de obtener esporas sin contaminantes (completamente asépticas) (Tabla 2). En otros trabajos (Walley y Germida, 1996) se ha utilizado la Cloramina T al 5% con tiempos de desinfección superiores, llegando hasta 20 minutos (Tommerup y Kidby, 1980). El método CTCf desarrollado en esta tesis combinó la experiencia anterior y nos permitió obtener esporas asépticas en el exterior. El no crecimiento de microorganismos a partir de esporas completas desinfectadas con este método así lo demuestra (Tabla 2).

El crecimiento microbiano observado entonces a partir de esporas maceradas previamente desinfectadas con el método CTCf (Tabla 2), induce entonces a pensar que los microorganismos-asociados aislados provienen de las partes más internas de la espora, o sea capa interna de paredes celulares y el citoplasma, por lo que también pudiéramos denominarlos microorganismos endógenos.

La metodología CTCf fue útil para la desinfección de esporas de la especie *G. mosseae* y para el aislamiento de microorganismos-asociados. Quizás en el caso de otras especies sea necesario mayor tiempo de exposición u otras concentraciones de sustancias desinfectantes como ocurrió en los trabajos de Tommerup y Kidby (1980) con *Acaulospora laevis*.

La adición de Tween 40 a la metodología de desinfección CTCf, uno de los surfactantes más utilizados como detergente para uso biológico, combinado con Cloramina T, fue positivo para este propósito a pesar de las evidencias de que el surfactante puede inhibir la efectividad del agente clorado; el Tween 40 pudiera

impedir la acción de la Cloramina T u otro compuesto clorado a concentraciones relativamente altas (Buck, 2003), sin embargo a concentraciones bajas puede mejorar el efecto del antimicrobiano por su acumulación dentro de las micelas del surfactante, facilitando por esta vía su adsorción sobre la pared celular de las esporas. De este modo, la sustancia activa (Cloramina T) se encontraría enriquecida en las paredes celulares, contribuyendo al mejoramiento de la descontaminación de las esporas. El uso de sólo 0,2 mL de Tween 40 en el método de desinfección CTCf, que luego se diluyó por la acción de cinco lavados sucesivos con solución de Cloramina T, garantizó una disminución gradual de la concentración del detergente, potenciando la acción del desinfectante.

El uso de antibióticos es un paso importante en las metodologías de desinfección de esporas de HMA (Walley y Germida, 1996). La Cefalexina pertenece a la familia de las Cefalosporinas y actúa fundamentalmente contra bacterias Gram positivas (Ferguson, 2003). Es un antimicrobiano que inhibe la transpeptidación, durante la síntesis de peptidoglucano de la pared bacteriana (Beltramino, 2003); si el antibiótico entrara o algo de este fuese absorbido por la espora, probablemente esta pudiera ser la causa de que solo se haya detectado un aislado bacteriano Gram positivo, entre los 30 aislados que originalmente fueron obtenidos en este trabajo, asociados al interior de las esporas de *Glomus mosseae*.

La nitidez observada en las paredes de las esporas que se han desinfectado con el método CTCf (Fig. 2A) indica eliminación de contaminantes como partículas de arcillas, grumos, organismos vivos y otras partículas provenientes del suelo, muchas de las cuales pueden ser fuentes de contaminación externa de las esporas de hongos micorrizógenos (Payró, 1998).

La posibilidad de obtener las esporas de HMA completamente desinfectadas, ha sido demostrado (Bianciotto *et al.* 2001) utilizando técnicas complejas como microscopía electrónica, ó el microscopio confocal con tinciones específicas con el "Kit Back Light". En nuestras condiciones necesitábamos un método sencillo para demostrar la desinfección. Al cultivar las esporas desinfectadas en medios de cultivo y que no haya ocurrido crecimiento microbiano, aún en un medio rico, después de siete días de incubación, nos aportó evidencias de que el método CTCf, es válido. Años más tarde nos encontramos que otros autores (Cruz *et al.* 2008) utilizaron un método semejante al nuestro.

Los microorganismos asociados no crecieron en medio LGI-P modificado hasta pasadas 96 h (Tabla 2 y Fig. 2D). Este medio solo tiene una pequeña cantidad de fuente de nitrógeno disponible porque se diseñó

para aislar microorganismos fijadores de nitrógeno (Döbereiner *et al.* 1993). Sin embargo, en AN las colonias se formaron en sólo 24 h y en medio SYP a las 48 h. Los medios SYP y AN son ricos en macroelementos, contienen nitrógeno en formas disponibles aportado por peptona o extracto de levadura, cuyo contenido de proteínas oscila entre 73 y 75% ; además contiene varias vitaminas (Sommer, 1996), todo lo cual contribuye al crecimiento de los microorganismos.

5.2- Microorganismos-asociados a esporas de HMA *Glomus mosseae*

Los resultados en los cuales se obtuvieron 30 tipos de colonias microbianas a partir de la siembra del macerado de las esporas previamente desinfectadas con el método eficiente CTCf, indican que asociados a las esporas conviven una serie de microorganismos y que los mismos provienen de zonas interiores de las esporas. Se descarta que sean microorganismos contaminantes asociados al exterior de las mismas.

Anterior a nuestro trabajo la literatura especializada sobre la interacción de los HMA con otros microorganismos contiene evidencias, indirectas algunas de ellas, sobre la asociación entre las esporas y otros microorganismos. Una de las primeras observaciones fue realizada por Mosse (1970) y por MacDonald y Chandler (1981), pero estos autores sólo alcanzaron a decir que observaron, asociadas a las esporas de HMA, ciertas estructuras a las cuales llamaron "*Bacteria-Like-Organisms*" (BLOs). Sin embargo, la incertidumbre sobre la verdadera presencia de bacterias-asociadas a los HMA se elevó cuando Walley y Germida (1996) pusieron en duda la posible presencia de bacterias-asociadas a las esporas de HMA y las atribuyeron a fallos en la descontaminación de las mismas.

Nuevas evidencias sobre la presencia de bacterias asociadas a HMA las pusieron de manifiesto Hosny *et al.* (1999) quienes encontraron evidencias indirectas de la presencia de bacterias en *Glomus mosseae*, amplificando el ADN. Utilizando un cebador universal en una extracción a partir de 100 esporas lograron una librería genómica de origen procariótico, pero estos autores no observaron amplificación para esporas simples, probablemente porque las bacterias, si existían, se encontraban adheridas en la superficie de la espora. Volvía a ponerse en duda la presencia de bacterias asociadas al interior de las esporas.

Bianciotto *et al.* (1996; 2000; 2003) arrojaron luz sobre la interacción de bacterias con esporas de HMA, pero los resultados estuvieron limitados a las especies *Gigaspora margarita*, *Scutellospora persica* y *S. castanea* y utilizando complejas metodologías.

Mientras todo esto ocurría se comenzaba este trabajo de tesis con el interés primordialmente de conocer si las esporas del HMA *G. mosseae*, utilizadas en el INCA para la producción de un biofertilizante contenían bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas.

Más recientemente, Cruz *et al.* (2008) aislaron e identificaron dos bacterias a partir de esporas de *G. margarita*: *Janthinobacterium lividum* (KCIGM 01) y *Paenibacillus polymyxa* (KCIGM 04), pero las bacterias fueron aisladas cultivando el contenido de la espora extraído por medio de una aguja que perfora las paredes y extrae el contenido de la espora; pero este trabajo deja la duda de la posible contaminación del contenido de la espora con microorganismos externos, al pasar la aguja por las capas externas de las esporas.

Algunos de los microorganismos-asociados que se obtuvieron a partir de las esporas de *G. mosseae* fueron capaces de multiplicarse en los tres medios de cultivo empleados, otros no lo lograron por lo que se les consideró microorganismos fastidiosos; su identificación taxonómica no pudo realizarse al no poder crecer en medio de cultivo axénico. Amann *et al.* (1995) plantean que quizás no se conozca un mayor número de bacteria asociada adherida a las esporas de HMA y que no sean apreciadas en su totalidad por la falta de medios de cultivo específicos, pues sólo del 1 al 10% del total de la comunidad bacteriana existente es cultivable.

Quizás, la imposibilidad de cultivar algunos microorganismos que están realmente asociados, se deba a la ausencia de algún componente nutricional específico en los medios de cultivo utilizados, o al hecho de que al ser aislados de forma independiente en medio de cultivo se pudieron haber interrumpido intercambios de sustancias, nutrientes (Jargeat *et al.* 2004) u otras relaciones que se establecen entre los microorganismos en el ecosistema. Sea la razón que sea, fue imposible mantenerlos todos viables en medios de cultivo artificiales. Estos hechos y evidencias nos inducen a pensar que muchos de los microorganismos-asociados pudieran estar en estado de latencia, no se multiplican y por eso no se reproducen en los medios de cultivo artificiales o quizás necesiten condiciones específicas para su aclimatación en el medio de cultivo. Pudieran analizarse fuentes de carbono, presión parcial de oxígeno, presión parcial de CO₂, pH o que alternativamente muchos de estos microorganismos-asociados sean endosimbiontes obligados que de una u otra forma dependen del hongo.

Del análisis anterior, se evidencia que en las esporas de hongos micorrizógenos existen algunos microorganismos-asociados que al liberarse al exterior son capaces de utilizar las condiciones de los medios de cultivo y lograr su crecimiento, multiplicación y desarrollo, manteniendo su viabilidad durante largos períodos de tiempo (11 años) y otros que no pudieron reproducirse en los medios axénicos.

Sobre la dependencia que puede existir entre los microorganismos-asociados y las esporas de donde proceden consideramos la hipótesis sobre la posible coevolución de estos y los HMA. Según, Schüßler y Walker (2011) el hongo *Geosiphon pyriformis* antes de que existieran las plantas terrestres, ya hacia simbiosis con cianobacterias, recibiendo el carbono desde la cianobacteria; la dependencia de estos organismos a través de la simbiosis es muy antigua y existe gran compenetración entre las partes. Según estos autores los descubrimientos que se han hecho de la simbiosis *Geosiphon-Nostoc* pudieran explicar el comportamiento en otros HMA, todos estos hongos pertenecen al mismo phylum. Por tanto, una hipótesis es que la pérdida de viabilidad y el no crecimiento de algunos microorganismos-asociados, que originalmente fueron aislados de la cepa INCAM -2, pudiera deberse a la estrecha interacción entre el HMA y los microorganismos-asociados que coexisten y que se desarrolló durante la evolución.

5.2.1- Aislados con características de levaduras

Las anomalías en la tinción de Gram a los aislados EndoGm1 y EndoGm11 y la observación de que estos forman conglomerados de células con color anaranjado (Fig. 4C) llevó a muchos análisis, elucubraciones y dudas. La similitud de la coloración (indeterminada al Gram) con el de levaduras en otros trabajos (Melasniemi y Hernesmaa, 2000), la forma, tamaño, el agrupamiento de células teñidas de color similar al observado en nuestros experimentos y el crecimiento en pH 5,5, constituyeron evidencia de que estos dos aislados podían ser levaduras. El dilema sobre el resultado que se avizoraba estaba relacionado con el hecho de que en hongos micorrizógenos arbusculares, sólo en una especie (*Gigaspora margarita*) Bianciotto *et al.* (2001), habían detectado un microorganismo endosimbionte y este era una bacteria, sin embargo en este trabajo se tenían cada vez más evidencias sobre la existencia de un microorganismo eucarionte en el interior de las esporas del HMA *G. mosseae*; algo totalmente inusitado.

Las características morfológicas de estos microorganismos-asociados (Tabla 3), la estructura típica del proceso de reproducción por gemación observada (Fig. 5A), la formación de cadenas de células o células pegadas unas con otras que se interpreta como células gemando y dispuestas unas detrás de otras (Fig. 5B)

como formando pseudomicelios (característica que se usa para su clasificación) son semejantes a las informadas por Phaff (2002) para las levaduras.

El color salmón de las colonias del aislado EndoGm1 (Tabla 3, Fig. 3A y 3B), ha sido detectado en colonias de levaduras, se debe en algunos casos a la presencia de carotenoides (Phaff, 2002). Un especialista sugirió que debido a la producción de esporas y al color de las colonias, podía ser *Sporobolomyces salmonicolor* (Dr. Jorge Martínez, Comunicación Personal), sin embargo, los estudios moleculares que se realizaron revelaron que no pertenece a este género (Tabla 4).

La tinción con calcofluor white (Fig. 6) fue otro resultado revelador de que se tenían levaduras entre los microorganismos-asociados que se habían aislado de la cepa INCAM-2 de *G. mosseae*. El calcofluor tiñe los enlaces β -1,4 hexapiranosos, constituyente de la quitina, la cual es muy común en las paredes celulares de los hongos, no así en las bacterias (Melasniemi y Hernesmaa, 2000). La tinción con calcofluor brindó un criterio adicional de clasificación: las células que fluorescen no son bacterias y tienen en la pared quitina (Melasniemi y Hernesmaa, 2000).

La prueba más contundente de la presencia de levaduras entre los microorganismos-asociados aislados en el trabajo se obtuvo con el análisis del 18S ADNr (Tabla 4). El aislado EndoGm1 está estrechamente relacionado con las levaduras *Rhodotorula glutinis*, *R. babjevae* y *R. diobovatum*, siendo *R. diobovatum* un teleomorfo de *R. glutinis* (de Hoog *et al.* 2000). El aislado EndoGm11 es muy similar a tres especies de *Cryptococcus*; *C. albidosimilis* fue aislado primeramente de suelo Antártico por Vishniac y Kurtzman (1992), *C. diffluens* a partir de uñas enfermas de pacientes en Austria y *C. liquefaciens* en Japón (Fonseca *et al.* 2000).

La capacidad antibacteriana de algunas levaduras, por ejemplo *Cryptococcus laurentii* es conocida (McCormack *et al.* 1994). Lo anterior junto al hecho de que *Cryptococcus neoformans*, *C. albidus*, *C. curvatus* y *C. laurentii* son identificados como patógenos de humanos, especialmente en pacientes con SIDA (Hamilton, 2002), nos hizo reflexionar sobre el hallazgo. Afortunadamente la especie de *Cryptococcus* encontrada en el interior de las esporas de *Glomus mossea* (INCAM-2) no pertenece a ninguna de las especies patógenas o que tienen actividad antibacteriana.

Levaduras del género *Cryptococcus* han sido previamente informadas en asociación con raíces de plantas y en esporas de hongos micorrizógenos (Renker *et al.* 2004). Este autor no aisló los microorganismos pues

trabajó con ADNr para detectarlas; como las esporas no fueron externamente desinfectadas no les fue posible determinar si las levaduras estaban asociadas externa o internamente con las esporas del hongo micorrízico arbuscular.

Según, Renker *et al.* (2004), las especies de levaduras de los géneros *Cryptococcus* y *Dioszegia* no son comunes en las raíces micorrizadas y esporas de HMA en la naturaleza, sin embargo de las dos levaduras-asociadas aisladas de las esporas de *G. mosseae* (INCAM-2), procedentes de suelo cubano, una pertenece al género *Cryptococcus* (EndoGm11).

Estudios realizados, pero en ectomicorrizas, han demostrado la presencia de diversos géneros de levaduras (Zacchi *et al.* 2003; Buzzini *et al.* 2005) en el ecosistema de trufas blancas y negras, pero ninguno asociado al interior de estructuras del hongo como se ha detectado en las esporas de *G. mosseae* (INCAM-2).

El descubrimiento de 30 aislados microbianos-asociados en las esporas de *G. mosseae* provoca muchas nuevas interrogantes acerca del papel de estos microorganismos en el ciclo de vida del hongo y de la planta. Las esporas de *Glomus* presentan alto contenido de lípidos (Beilby y Kidby 1980). Los lípidos en las esporas pueden constituir una fuente de carbono para dichos microorganismos. Es altamente probable que EndoGm1 sea una especie de *Rhodotorula* y la actividad lipasa ha sido demostrada en dicho género (Paskevicius 2001), lo que explicaría la capacidad de la levadura para utilizar los lípidos como fuente de carbono. Si los lípidos de las esporas están asequibles, ellos pueden constituir fuentes de carbono a algunos de los microorganismos-asociados como por ejemplo a la levadura EndoGm1.

En esporas del HMA *G. margarita*, *Scutellospora* (Bianciotto *et al.* 1996; 2000) y *G. intraradices* (Hildebrandt *et al.* 2006) los únicos microorganismos asociados detectados habían sido bacterias. Detectar y cultivar levaduras-asociadas a las esporas de HMA *G. mosseae* es un resultado novedoso para las ciencias biológicas y evidencia que no sólo algunas bacterias, como había sido informado anteriormente, sino también las levaduras, pueden encontrarse presentes en las paredes interiores ó en el citoplasma de las esporas de los hongos micorrizógenos arbusculares, en este caso *G. mosseae*.

5.2.2- Aislados con características de bacterias

Los resultados de este trabajo han revelado la presencia de bacterias Gram positivas y Gram negativas con forma bacilar ó cocoide, asociadas a esporas de *G. mosseae* (Tabla 3), sin embargo predominaron los bacilos Gram negativos. En *Gigasporaceae* se han observado bacterias con formas bacilares y formas

redondeadas (Bianciotto *et al.* 1996; 2000); a pesar de referir estos autores formas morfológicas diversas, no informan la respuesta a la tinción de Gram, pero podemos inferir la predominancia de Gram negativos a partir del género que informan.

A partir de esporas del género *Glomus* otros autores han aislado bacterias que las han informado como asociadas a las mismas, pero no han sido aisladas o detectadas a partir de esporas desinfectadas, no habiéndose evidenciado antes que dichas bacterias provengan del interior de las esporas (Mayo *et al.* 1986; Roesti *et al.* 2005). Bacterias con formas de bacilos y cocos, Gram negativas, fueron informadas por Bianciotto *et al.* (2001), sin embargo Xavier y Germida (2003) informan solamente bacterias Gram positivas en esporas sin desinfectar.

En los resultados de esta tesis se informan bacterias con ambas formas morfológicas (predominan los bacilos y un aislado con forma de coco) y Gram negativas, al igual que en trabajos de otros autores; lo diferente y nuevo es que estas bacterias están asociadas al interior de las esporas de HMA en el género *Glomus* donde nunca antes los estudios realizados habían detectado microorganismos-asociados al interior de las esporas.

La composición de especies cultivables de bacterias que están asociadas a esporas de hongos micorrizógenos arbusculares es afectada por su procedencia ambiental, por ejemplo especies de HMA, especies de plantas y la combinación de especies de plantas y hongos MA. La posible explicación de bacterias especie específicas asociadas, puede deberse a la producción de exudados específicos de las especies de plantas- y exudados específicos de las especies de HMA (Artursson *et al.* 2006). Este micro hábitat puede variar en dependencia de la morfología de la espora y del ambiente donde ellas se producen. Las esporas del hongo desarrolladas en monocultivo pueden, de alguna manera, seleccionar la bacteria que pueden multiplicaren su ambiente específico por el continuo crecimiento del mismo hospedero (Andrade *et al.* 1997). Así mismo, las raíces de las plantas y exudados de HMA pueden contener sustancias que sustentan el crecimiento de ciertos grupos de bacterias o inducen la producción de compuestos antimicrobianos que inhiben el crecimiento de otros microorganismos competidores y permiten el crecimiento sólo de aquellos microbios que pueden adaptarse al nicho particular que ofrece la pared de la espora.

No se observaron en la Tabla 5 colores en las colonias obtenidas que fueran característicos de los géneros *Gluconoacetobacter* ni *Azospirillum* y aunque se determinaron características morfológicas, la presencia o no de algunas enzimas y la respuesta a un número de antibióticos, la confirmación sobre la identidad de un aislado microbiano la ofrece el uso de varias técnicas, teniendo especial importancia por su alta confiabilidad las técnicas moleculares.

La literatura científica consultada informa que *Delftia acidovorans*, la especie a la cual pertenecen las cepas de bacterias-asociadas EndoGm3, EndoGm10 y EndoGm12, pertenece al Phylum Proteobacteria, clase Beta Proteobacteria, orden Burkholderiales, Familia Comamonadaceae y género *Delftia* (den Dooren de Jong 1926; Wen *et al.* 1999). Tiene forma bacilar, Gram negativa, ampliamente distribuida y llamada anteriormente como *Comamonas acidovorans* y *Pseudomonas acidovorans* pero es una especie típica del género *Delftia* (Kämpfer *et al.* 2008). Ha sido aislada desde muestras de suelo, sedimentos, lodos activados, aceite crudo, agua y muestras clínicas (Wen *et al.* 1999).

Pseudomonas aeruginosa, especie a la cual pertenecen las cepas de bacterias-asociadas EndoGm5, EndoGm6, EndoGm7 y EndoGm8 es Gram negativa. Dentro del género *Pseudomonas* se encuentran otras especies como *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae*, *P. alcaligenes* y *P. aeruginosa*. Considerada un patógeno que coloniza exitosamente una enorme diversidad de nichos. Se puede aislar de muestras de suelo, aguas contaminadas, así como de plantas, animales y el hombre. Mantiene una población con una secuencia genómica común mediante la recombinación, tiene una extraordinaria capacidad para adaptarse a diversos ambientes y tiene además, la particularidad de no presentar una población típica (Kiewitz y Tümmler, 2000).

Estructura coralina en las colonias de los aislados de *P. aeruginosa* (EndoGm5, EndoGm6, EndoGm7 y EndoGm8) fue observada al pasar siete días en medio SYP. Lalucat *et al.* (2006) observaron que este cambio en la morfología de la colonia se producía en especies de *Pseudomonas*, característica que se suma a las evidencias que demuestran la presencia de este género en las esporas de *G. mosseae* (INCAM-2).

En este trabajo de tesis se detectó el género *Pseudomonas* en las paredes o citoplasma de la espora, o sea asociado a las esporas del HMA *G. mosseae*. Xavier y Germida (2003) detectaron este género en asociación con esporas no desinfectadas de *G. clarum*. La asociación entre HMA y bacterias rizosféricas puede ocurrir debido a la coexistencia de estos en la rizosfera.

De la superficie de esporas no desinfectadas de *G. mosseae* se aisló también una especie de género *Bacillus* (Azcón-Aguilar *et al.* 1986) y *Paenibacillus* sp. fue aislado desde la micorrizosfera de plantas inoculadas con *G. mosseae* (Budi *et al.* 1999). Todo lo anterior indica una heterogeneidad genérica entre los microorganismos de alguna manera relacionados con HMA, pero en ninguno caso anterior a nuestro trabajo se ha demostrado que la asociación sea interna a las esporas del hongo.

De nueve microorganismos-asociados identificados, cuatro corresponden a *Pseudomonas aeruginosa*; cepas de esta bacteria están íntimamente asociadas al interior de las esporas, lo que refuerza la existencia de una relación entre el género *Pseudomonas* y los HMA. Además de los resultados de esta tesis Mansfeld-Giese *et al.* (2002) observaron dominancia de los géneros *Pseudomonas* y *Arthrobacter* en estudios de bacterias asociadas a la pared externa de los HMA. Hasta el momento, si bien es cierto que el género *Pseudomonas* se ha informado como aislado de esporas de HMA, nunca antes había sido informado asociado a las paredes interiores o al citoplasma de la esporas desinfectadas de *G. mosseae* por ningún autor en la amplia literatura científica consultada por la autora de la tesis.

No se han encontrado evidencias de trabajos anteriores a este que informen la presencia de *D. acidovorans* en íntima asociación con las esporas de *G. mosseae* u otro HMA. *D. acidovorans* pertenece a la familia Comamonadaceae, dentro de la que se encuentra el género *Acidovorax* que si ha sido informado asociado, pero a la pared externa de las esporas de HMA, en especies del género *Glomus* (*G. versiforme* y *G. clarum*) (Mayo *et al.* 1986; Xavier y Germida, 2003).

5.3- Caracterización de los microorganismos-asociados aislados de esporas de *G. mosseae*

La resistencia de los microorganismos a los antibióticos puede ofrecer información útil en la caracterización de los mismos (Wortman, 1993). Del análisis del comportamiento de los siete aislados bacterianos-asociados a las esporas ante diferentes antibióticos (Tabla 8) se observó un patrón similar de respuesta a los antibióticos entre los aislados con colonias de un mismo color. Sin embargo, dentro del grupo de microorganismos-asociados identificados con colonias color crema está el aislado EndoGm7; éste se diferencia de los otros tres aislados del mismo color porque es sensible o tiene una sensibilidad intermedia a Ceftriaxona. Por otra parte, el aislado EndoGm6 es resistente a Trimetoprim-Sulfametoxazol. Ambos aislados (EndoGm6 y EndoGm7) pertenecen a la especie *Pseudomonas aeruginosa* y en el género *Pseudomonas* otros autores como Lalucat *et al.* (2006) encontraron diferencias y patrones variables de

susceptibilidad a algunos antibióticos, pudiendo ser esta la casusa de variaciones entre estas bacterias que están en un mismo grupo (Tabla 8) aunque tienen respuestas diferentes ante antibióticos específicos.

El aislado EndoGm11 fermenta arabinosa (Tabla 7) y son precisamente las levaduras los microorganismos con mayor capacidad para fermentar azúcares, especialmente arabinosa, tal es el caso de *Candida arabinofementans* (Kurtzman y Dien, 1998). El interés de utilizar las levaduras en la fermentación de arabinosa ha estimulado la construcción de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* con dicha capacidad (Becker y Boles, 2003). Disponer de un microorganismo como EndoGm11 con tan amplia capacidad de fermentación de diferentes tipos de azúcares pudiera ser interesante para la industria alcoholera.

EndoGm11 no tiene actividad nitrato reductasa (Tabla 7) mientras que tres especies de *Cryptococcus* usan nitratos (Fonseca *et al.* 2000); esto sugiere que EndoGm11 puede ser una especie de *Cryptococcus* diferente.

Un comportamiento diferencial entre los aislados se observó adicionando concentraciones 3, 5 y 7 % de NaCl al medio de cultivo (Tabla 7). Los aislados EndoGm3, EndoGm10 y EndoGm12 identificados como *D. acidovorans* no crecieron a ninguna de las concentraciones salinas probadas, indicando muy poca resistencia a este estrés abiótico; en las condiciones del trabajo que utilizaron Wen *et al.* (1999) *D. acidovorans* no creció en un medio con 6,5% de NaCl. El resto de los aislados, sin embargo, crecen energícamente ante las distintas concentraciones de la sal impuestas en el medio de cultivo axénico. *P. alcaliphila* y *P. aeruginosa* se han aislado de aguas marinas (Barraquío *et al.* 1988), lo que pudiera explicar la capacidad para crecer en estas condiciones.

Las sales en altas concentraciones intoxican a los microorganismos o actúan como biocidas (Tejera *et al.* 2003), por lo que microorganismos que toleran concentraciones de sal pueden tener ventajas evolutivas, al poder crecer y sobrevivir ante estas condiciones de estrés.

5.4- Interacción entre esporas y microorganismos-asociados

En este trabajo de tesis se han aislado y cultivado no sólo bacterias sino también levaduras íntimamente asociadas al interior de esporas de *G. mosseae* (Tabla 3, 4 y 6), constituyendo las esporas y células auxiliares (Bianciotto *et al.* 2004) sitio donde las bacterias se acumulan durante el ciclo de vida del hongo. La diversidad biológica es un fenómeno que está presente en estos resultados: se detectaron 30 tipos de

colonias microbianas-asociadas al interior de las esporas de *G. mosseae* y entre éstas, tanto microorganismos procariontes como eucariontes, con cuatro géneros microbianos diferentes identificados.

La presencia de microorganismos en las esporas pudiera tener relación con el metabolismo del propio hongo. La gran cantidad de gotas que se aprecian en la Fig. 2C, al parecer son de lípidos salidos de las esporas de *G. mosseae* rotas. La hifa intrarradical toma hexosas provenientes de la planta a partir de la cual sintetiza lípidos y glucógeno (Bago *et al.*, 2002), ambas son fuentes principalmente de energía y carbono que son transferidas hacia la fase extrarradical y que a su vez pueden constituir nutrientes (lípidos y glucógeno) para los descubiertos microorganismos-asociados. También pueden ser usados como combustible metabólico y pueden almacenarse en las nuevas esporas formadas por el hongo micorrizógeno (Bago *et al.* 1999; Bago *et al.* 2002).

Tanto los gránulos de polifosfatos detectados (Fig. 10); en bacterias como en levaduras-asociadas a las esporas del HMA *G. mosseae* (INCAM-2) pueden funcionar como fuente de energía, precursores del ATP en la evolución bioquímica (Nesmeyanova, 2000). Como monómeros de estos polifosfatos pueden actuar los iones fosfato, que son solubilizados por los microorganismos-asociados. La translocación del fosfato solubilizado no se sabe si ocurre directamente hacia el hongo o hacia la planta, este es una característica que necesita de nuevos estudios para poderse dilucidar.

Los resultados de esta tesis demuestran la presencia de las bacterias (*P. aeruginosa* y *D. acidovorans*) y levaduras de los géneros *Rhodotorula* y *Cryptococcus* asociadas al interior de las esporas del HMA *Glomus mosseae* (INCAM-2). Hemos analizado características de la espora y funciones de estos microorganismos-asociados que pudieran explicar que ambos pueden coexistir en un ambiente común. Muy probablemente estos microorganismos-asociados tienen potencialidades biológicas relacionadas con las propias bondades y propiedades de los HMA que los hacen relevantes y que más adelante analizaremos.

Los microorganismos-asociados también pudieran utilizar la espora como refugio ante condiciones adversas e incluso es probable que exista algún mecanismo bioquímico que facilite la atracción o adhesión espora microorganismo-asociado. Los aislados EndoGm5, EndoGm6, EndoGm7 y EndoGm8 son cepas de *P. aeruginosa* y microorganismos de este género producen exopolisacáridos que llegan a formar una capa pegajosa (Hassett *et al.* 2002). Roesti *et al.* (2005) observaron en cocos bacterianos presencia de mucilago.

Pensamos que el mucilago o los exopolisacáridos característicos de algunas bacterias pueden contribuir a la adhesión de estas al interior de las esporas.

Otros autores no creen que sea una capa pegajosa alrededor de la bacteria lo que posibilite la adhesión entre estas y las esporas y sugieren que sea atracción electrostática (Bianciotto *et al.* 1996). Sin embargo, ésta misma autora refutó esta idea y demostró que polisacáridos extracelulares estaban muy relacionados con la adhesión *in vitro* (Bianciotto *et al.* 2001). La presencia de túneles en las esporas debido a la presencia de microorganismos-asociados hace que se sospeche en habilidad quitinolítica por estos microorganismos (Roesti *et al.* 2005) y que entonces no sea una simple adhesión mediada por polisacáridos extracelulares la que se pone de manifiesto entre las esporas y los microorganismos-asociados, debido a que actividades enzimáticas deben proveer a estos microorganismos de un mayor resguardo para hospedarse y protegerse ante condiciones adversas.

5.5- Capacidad solubilizadora de fosfatos

Los tamaños del halo de solubilización asociados con las cepas de *P. aeruginosa* EndoGm5, EndoGm6 y EndoGm7, cuando se utilizó fosfato tricálcico como fuente poco soluble de fósforo (Tabla 9), duplican los valores informados por Nautiyal (1999), para cepas del mismo género. No sólo el halo de solubilización medido en esta tesis es mayor que los informados por Nautiyal sino que se formó en un tiempo que representa la quinta parte (72 h) del tiempo de acción estudiado por este autor (14 días).

Los microorganismos-asociados EndoGm3 y EndoGm7 no formaron halo con ninguno de las dos fuentes de fosfatos insoluble y sin embargo los valores de concentración de fósforo solubilizado en las soluciones, no son bajos; la cepa EndoGm3 de *D. acidovorans* fue la que aportó los valores más altos de concentración de fosfato de hierro solubilizado. El método para determinar la capacidad solubilizadora de fosfato en medio líquido al parecer ofrece resultados que deben analizarse cuidadosamente; otros autores también encontraron resultados poca correspondencia entre las dos formas de medir la solubilización y plantean que varios aislados que no producen halo de solubilización en medio sólido si manifiestan un nivel de solubilización de fosfato mineral en medio líquido (Gupta *et al.* 1994; Nautiyal, 1999).

La concentración de fosfato solubilizado a partir de fosfato tricálcico en medio líquido, informada por Nautiyal en 1999, fue mayor que la que se detectó en los nueve aislados que se presentan en la Fig. 10A.

Los mayores valores oscilaron entre 12 y 19 $\mu\text{g P mL}^{-1}$ por 10^6 UFC a las 72 h, mientras que en un período

de 48 h Nautiyal informa sus menores valores en el orden de $21 \text{ a } 31 \mu\text{g P mL}^{-1}$ por 10^9 UFC. No obstante, debe tomarse en consideración que los microorganismos-asociados a las esporas de *G. mosseae* (INCAM-2) alcanzan esta concentración de fosfato solubilizado con un número menor de células.

En los resultados obtenidos (Tabla 9) el mayor valor de halo obtenido fue para el aislado Endo Gm 11 con 8 mm en 72 h. Al comparar los resultados con los previamente obtenidos por otros autores encontramos muy poca bibliografía afín. *Penicillium rugulosum* (IR-94MF1) creó un halo de solubilización de 24,7 mm a los siete días utilizando glucosa como fuente de carbono e hidroxapatita como fuente de fosfato insoluble (Reyes *et al.* 1999). Aunque la fuente de carbono en este trabajo de tesis y la utilizado por Reyes *et al.* (1999) coinciden, estos últimos autores utilizaron la hidroxapatita como fuente de fósforo. El β -fosfato tricálcico tiene una Kps de $2.83 \cdot 10^{-30}$ y la Kps de la hidroxapatita es de $2.34 \cdot 10^{-59}$ (Seymour, 2004), indicando que la hidroxapatita es más insoluble que el β -fosfato tricálcico. A pesar que el β -fosfato tricálcico sea relativamente menos insoluble que la hidroxapatita, hay que destacar que la capacidad solubilizadora de fosfato de los aislados asociados a las esporas de *G. mosseae* es relevante.

Con fosfato tricálcico como fuente insoluble de fósforo los valores de halo detectados oscilan entre 0.1 y 0.8 cm y utilizando fosfato de hierro entre 0,1 y 0,6 cm (Tabla 9). González (2010), utilizando fosfato tricálcico como fuente de fósforo poco soluble, en ensayos con aislados rizosféricos obtuvieron valores de halos de 0,27 y 1,0 cm y los halos de solubilización oscilaron entre 0,27 cm y 0,83 cm, al ensayar microorganismos aislados a partir del vástago de plantas de arroz. Caballero Mellado *et al.* (2007) en aislados rizosféricos del género *Burkholderia*, obtenidos a partir de plantas de tomate, observó halos de solubilización que oscilaron entre 0,15 y 0,97 cm. Cordero *et al.* (2008) detectaron que el endófito de la caña de azúcar *Pantoea* sp. produjo un halo de solubilización de 0,6 cm en siete días. Sin embargo, ninguno de estos microorganismos que aportaron estos valores de halo fue aislado desde el interior de esporas de HMA, pudiendo ser esto relevante desde el punto de vista de las posibilidades que representa como mecanismo biológico cooperativo en las funciones de los HMA como solubilizadores de fosfatos inorgánicos. Esto es una hipótesis que necesita nuevos y diversos estudios para poder corroborarla, pero este estudio permitió conocer la existencia de esta capacidad en los microorganismos-asociados a esporas del HMA *G. mosseae* (INCAM-2) ante un elemento vital en la vida de los seres vivos.

Los resultados (Tabla 9 y Fig. 10) muestran la relación de los microorganismos-asociados a esporas de HMA *G. mosseae* (INCAM-2) en el metabolismo del fósforo. Barea *et al.* (1983 y 1997) observaron que los HMA y bacterias solubilizadoras de fosfatos tenían efecto sinérgico o complementario cuando se aplican de conjunto. Numerosos aislados de rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas son capaces de solubilizar fosfatos inorgánicos liberando ácidos orgánicos, los que pueden ser tomados por el hongo y transportados hasta la planta hospedera. La aplicación de biofertilizantes a base de microorganismos solubilizadores de fosfatos es una alternativa para mejorar la cantidad de fósforo disponible para las plantas (Silva y Vidor, 2000). Sin embargo, al ser los microorganismos-asociados descritos en este documento, habitantes naturales de las esporas de HMA y ser la capacidad de solubilizar los fosfatos inorgánicos del suelo un atributo de ellos, la coinoculación de bacterias solubilizadoras de fosfatos es un fenómeno intrínseco a la inoculación con HMA (en este caso INCAM-2), lo que debe tener un efecto más directo o inmediato para la nutrición fosfórica de las plantas.

El aislado EndoGm6 es una cepa de *P. aeruginosa* que solubilizó altos valores de concentración de fosfato tricálcico y de fosfato de hierro, con diferencia significativa para ambos. Otros autores, utilizando *Pseudomonas* aisladas de suelo observaron que había mayor concentración de fosfato solubilizado cuando éstas crecían en presencia de *G. intrarradices* (Villegas y Fortin 2001; 2002). En nuestros experimentos la coinoculación es natural e intrínseca de las esporas de HMA *G. mosseae* y queremos resaltar que con las potencialidades de EndoGm6 en la solubilización de fuentes de fosfatos insoluble su aporte debe incidir en la nutrición fosfórica de las plantas. Nuevos estudios serán necesarios para conocer la forma en que estos entregan el fósforo solubilizado al hongo o si lo hacen directamente a la planta.

La capacidad que presentan los microorganismos para solubilizar fuentes de fósforo insoluble, constituye una ventaja competitiva en la evolución, les da la posibilidad de obtener este nutriente mineral (fundamental para muchas moléculas del metabolismo de las plantas, del hongo, de las bacterias y de las levaduras) y puede tener una repercusión en la capacidad de sobrevivir en disímiles nichos ecológicos.

La presencia de microorganismos-asociados al interior de las esporas de HMA como hemos informado en este documento arroja nueva luz sobre el tema coinoculación que ha sido tratado durante años; microorganismos con capacidad para solubilizar fosfatos inorgánicos tienen gran importancia y se muestran efectivos sólo en escasas situaciones; sin embargo cuando se les coinoculan con hongos formadores de

micorrizas arbusculares se muestra un efecto positivo y sinérgico de ambos grupos microbianos (Azcón-Aguilar y Barea, (1992); Goldstein, 1995).

Las asociaciones de hongos micorrizógenos-bacterias y las coinoculaciones ha sido un tema tratado en los trabajos de investigación previos. En este estudio al estar estos microorganismos, tanto levaduras como bacterias-asociadas coexistiendo de forma natural en las esporas, el efecto sinérgico es probablemente más notorio, existiendo una gran compenetración entre las partes. Según Bonfante (2003) la complejidad de la simbiosis se ve acrecentada debido a la presencia de un tercer simbiote: bacterias que viven dentro del hongo y existen genes de éstas bacterias involucrados en la adquisición de nutrientes minerales. La detección de un operón transportador de fosfato en el genoma de *Burkholderia* sp., bacteria que fue aislada del citoplasma de *G. margarita* (Ruiz-Lozano y Bonfante, 1999); pudiera sugerir que esta bacteria está potencialmente capacitada para incorporar fósforo desde el citoplasma del hongo donde ellas viven.

Los mayores valores de fosfato tricálcico solubilizado se corresponden con la cepa de *P. aeruginosa* (EndoGm6) con 8,36% P_2O_5 . En estudios anteriores a este sólo en esporas de *G. margarita*, como excepción, se han aislado microorganismos-asociados con posibilidad de solubilización de fosfato, en aquel caso *Janthinobacterium lividum* (KCIGM 01) y *Paenibacillus polymyxa* (KCIGM 04) con $10,6 \pm 0,7$ y $15,0 \pm 1,2$ por ciento de P_2O_5 respectivamente (Cruz et al. 2008). En aquel experimento no se demostró que los microorganismos asociados provinieran del interior de las esporas y la fuente de fosfato insoluble fue fosfato tricálcico. Los valores detectado en este trabajo de tesis son numéricamente menores, pero los mencionados autores no informan el número de células, tiempo de crecimiento transcurrido en que se hizo la detección y utilizaron el método de Gaid y Gaur, (1991) el cual esteriliza los medios con el fosfato tricálcico incorporado, lo que, de acuerdo a nuestra experiencia, puede traer consigo la solubilización no microbiana de esta fuente de fosfato insoluble. Todo lo anterior nos hace considerar que el fosfato soluble informado por los autores no sea completamente originado por los microorganismos, sino que una cantidad puede haberse solubilizado durante el proceso de esterilización; los valores tan altos de solubilización informados por Cruz *et al.* 2008, parecen posibles artefactos de la técnica de trabajo empleada.

En este trabajo de tesis los microorganismos-asociados proceden del interior de las esporas. Si estos microorganismos asociados estuviesen también en las hifas extrarradicales como han demostrado Bianciotto y Bonfante, (2002) en Gigasporaceae, estos pudieran tener un papel relevante en la

disponibilidad de fósforo a las plantas, dada su capacidad de solubilizar fosfatos insolubles durante la hipotética triple interacción. Consideramos que probablemente entre los microorganismos-asociados al interior o microorganismos endógenos de las esporas de los HMA y los propios hongos existe una estrecha relación, vinculada fundamentalmente con la solubilización, la acumulación y la translocación de fosfatos. La presencia de bacterias y levaduras asociadas a las esporas de HMA *G. mosseae*, con capacidad para solubilizar fosfatos, es un resultado que abre nuevas interrogantes sobre el papel biológico de estos microorganismos que viven en el interior de las estructuras del hongo y realizan actividades posiblemente simbióticas entre ellos; hipótesis que será necesario desentrañar en el futuro inmediato.

Interacciones intercelulares pueden ser importantes porque permiten un rápido intercambio de energía y nutrientes entre las raíces de las plantas, hongos micorrizógenos y bacterias-asociadas. Estos microorganismos-asociados durante las distintas fases de interacción con el hongo y las plantas pueden llegar a la micorrizosfera y a la rizosfera, y allí realizar sus funciones fisiológicas entre las cuales pudiera estar la solubilización de fosfato. La micorrizosfera puede proveer un ambiente beneficioso para ciertas bacterias asociadas, las cuales pueden tener un efecto positivo suministrando nutrientes (Johansson *et al.* 2004).

Otros autores, al no poder cultivar las bacterias endosimbióticas en medio de cultivo (Bianciotto *et al.* 2004; Jargeat *et al.* 2004) han trabajado con el genoma de la esporas de *G. margarita* y han observado una representación genómica de la bacteria (van Buuren *et al.* 1999). Genes aislados de la librería genómica de estas bacterias son de gran interés, por ejemplo: genes transportadores de fosfatos *pst* (Ruiz-Lozano y Bonfante, 1999).

5.6- Acumulación de polifosfatos

Los microorganismos-asociados aislados en esta tesis crecen, se reproducen y se mantienen viables en medio LGI-P modificado. El crecimiento en medios de cultivos pobres en nutrientes, podría ser indicativo de la presencia de polifosfatos en los aislados microbianos-asociados a esporas de *G. mosseae*. Nesmeyanova (2000) observó que la biosíntesis de polifosfatos responde a diferentes factores externos que puede ser componentes nutritivos del medio o condiciones físicas y químicas.

Se observó además anomalías en la coloración de las células de los aislados EndoGm1 y EndoGm11 (Fig. 4) a la tinción de Gram. Considerando las observaciones de Melasniemi y Hernesmaa, (2000) de que células

de levaduras acumuladoras de polifosfatos no se colorean uniformemente cuando se realiza esta tinción; el comportamiento indeterminado al tratar de realizar la tinción de Gram de estos aislados, así como el crecimiento en medio LGI-P modificado apuntaban a la posible acumulación de polisfosfatos en estos dos microorganismos-asociados aislados de la esporas desinfectadas de *G. mosseae*. Con azul de toluidina y azul de metileno se observó la presencia de polifosfatos en las dos cepas de levaduras estudiadas Fig. (11A, 11B y 11E). En levaduras provenientes de lodos activados Melasniemi y Hernesmaa (2000) y Grocetti *et al.* (2000) observaron células azules oscuras que indicaban presencia de polifosfatos. A partir de estas evidencias se analizó la posible presencia de polifosfatos en los aislados EndoGm1 y EndoGm11.

En bacterias, a pesar de ser donde más se ha estudiado la acumulación de polifosfatos (Nesmeyanova, 2000), de siete aislados ensayados solo dos cepas de *P. aeruginosa* (EndoGm5 y EndoGm6) al ser teñidas con DAPI específicamente, mostraron la coloración amarilla típica que indica acumulación de polifosfatos. Esto está muy relacionado con el tamaño celular y la forma de agrupamiento de las células. Para las levaduras, con células de 4,6 μm y 4,9 μm es más fácil la observación que para una bacteria cuyo tamaño es mucho menor, por ejemplo EndoGm5 tiene bacilos de 1,2 μm de longitud (Tabla 3). Las levaduras están organizadas en racimos (Fig. 4), generalmente no se observan células individuales, lo que facilita la observación de agrupamiento de células teñidas de color amarillo, indicando presencia de polifosfatos. Además en bacterias los polifosfatos representan del 0,2-0,4% del peso seco, mientras que en las levaduras es del 20% (Nesmeyanova, 2000).

Al teñir con DAPI se observaron células fluorescentes amarillas y azules (Fig. 11C y D). La efectividad del DAPI en el estudio de organismos acumuladores de polifosfatos no es accidental, tiene una elevada especificidad, esto se debe a una dependencia directa del cambio en la emisión de la longitud de onda cuando el DAPI se une a los polifosfatos dando fluorescencia amarilla (Hung *et al.* 2002). Este cambio solo ocurre en el caso de los polifosfatos y ha sido observado en estudios histológicos de polifosfatos en vacuolas de levaduras (Grey *et al.* 1990). Kapuscinski (1995) atribuyó el cambio de emisión del DAPI en polifosfatos, al incremento de afinidad entre éste y la alta densidad de cargas negativas de tres o más moléculas de fosfato. Este cambio no se observa cuando el DAPI se combina con ortofosfato o partículas coloidales de fosfato férrico.

Cepas de *P. aeruginosa* asociadas (EndoGm5 y EndoGm6) y cepas de levaduras-asociadas de los géneros *Rhodotorula* y *Cryptococcus*, provenientes del interior de esporas desinfectadas de HMA *G. mosseae* acumulan polifosfatos. El género *Pseudomonas* tiene posibilidad de acumular polifosfatos (Sidat y Kasan, 1999), a pesar de ello lo novedoso fue el haberlo detectado en microorganismos-asociados aislados del interior de esporas de HMA, por las posibilidades que representa la acumulación de polifosfatos y la ventaja que ofrece desde el punto de vista evolutivo.

Este documento informa por primera vez que asociada a esporas de HMA existen levaduras. En el género *Glomus* no se habían informado microorganismos-asociados a las esporas, menor aún es la posibilidad de encontrar polifosfatos en las células de estos aislados. Esto pudiera ser valioso para entender la interacción entre los microorganismos-asociados, los hongos y las plantas.

Las esporas de *G. margarita* almacenan entre otras cosas fosfatos y cantidades importantes de fosfatos se encuentran en organismos semejantes a bacterias (Cruz, 2004). Los hongos micorrizógenos tienen una importante función en la transferencia de nutrientes del suelo a la planta y se ha observado que el fósforo solubilizado por el hongo, es acumulado en forma de polifosfatos en el citoplasma del mismo (Cruz, 2004) y al estar también los microorganismos-asociados en este sitio, hipotéticamente pudieran también aportar el fósforo acumulado en forma de polifosfatos en el interior de sus células; pudiera posteriormente transferirse el fósforo a la planta a través de los arbusculos.

Según, Maria Harrison *et al.* (2002) en células corticales de la leguminosa *Medicago truncatula* se detectó un transportador de fósforo (MtPT4), que sólo se expresa en células micorrizadas. La expresión directa del promotor es exclusiva de células que contienen arbusculos. Evidencias como ésta son un fuerte indicador de que la transferencia de fósforo hacia la planta ocurre directamente a través de los arbusculos. La presencia de microorganismos-asociados al HMA en los arbusculos, pudiera ser una evidencia de su papel como donantes de fósforo, aspecto que aún está por estudiarse, aunque los microorganismos endosimbiontes nunca han sido observados en los arbusculos, probablemente debido al pequeño tamaño del diámetro de la hifa (Bianciotto *et al.* 2004).

En esporas e hifas intra y extrarradicales del género *Glomus*, Ezawa *et al.* (2001) estudiaron dos enzimas relacionadas con la fosforilación de la glucosa, observándose que la actividad de la enzima hexosa quinasa (HK) fue mayor que la actividad de la enzima polifosfato gluco-quinasa (PPGK), lo cual es indicativo de

que los polifosfatos no son el mayor fosfágeno en el metabolismo de la glucosa en el hongo. Sin embargo, este mismo autor se pronuncia por la hipótesis, pero no llegó a demostrarlo, de que la actividad de la enzima PPGK pudiera ser aportada por microorganismos contaminantes o microorganismos-asociados al hongo micorrizógeno arbuscular. Las evidencias experimentales que se brindan, sobre la presencia de microorganismos-asociados a esporas de HMA con capacidad para solubilizar fosfatos y acumular polifosfatos aporta evidencias a la hipótesis lanzada por Ezawa *et al.* (2001). Así nuestro hallazgo puede constituir un pequeño aporte al entendimiento del funcionamiento de la interacción entre los HMA y las plantas, agregando un factor adicional: los microorganismos-asociados, pueden intervenir en el metabolismo de la simbiosis bipartita y que consideramos que pudiera ser realmente tripartita.

De acuerdo a una de nuestras hipótesis, estos microorganismos *Rhodotorula*, *Cryptococcus* y *Pseudomonas* (EndoGm1, EndoGm11, EndoGm5 y EndoGm6), que acumulan polifosfatos en su interior, pudieran también transferir el fósforo de los polifosfatos a la planta, en el proceso de intercambio de nutrientes a través del hongo. Este mecanismo aumentaría entonces el contenido fosfórico que el hongo puede suministrar a la planta hospedera. Aunque este mecanismo de participación de los microorganismos-asociados en la nutrición mineral es algo desconocido hasta el momento, consideramos que su aporte pudiera haber existido siempre, ya que estos microorganismos endógenos parecen haber utilizado al hongo como hospedero desde el surgimiento de estos, conviviendo juntos durante la evolución y pasando de una generación fúngica a la siguiente. Estas funciones pudieran ser intrínsecas a las bondades que ofrecen los hongos HMA a las plantas. Todo lo anterior queda en el nivel de hipótesis, pero es promisorio el estudio que se abre al futuro de la triple interacción que al parecer se establece.

5.7- Influencia de microorganismos-asociados a esporas de *G. mosseae* sobre el crecimiento de las raíces de plántulas de arroz

Los resultados de esta Tesis demuestran un efecto superior de algunos microorganismos-asociados respecto al control en el crecimiento radical de plántulas de arroz. Tanto la longitud, como el número total y el peso seco de las raíces (Fig. 12, 13 y 14) fueron duplicados por *P. aeruginosa* (EndoGm6); otra cepa de *P. aeruginosa* (EndoGm5) incrementó dos veces el número de raíces (Fig. 14). El efecto de EndoGm14 incrementó el largo y la biomasa de las raíces (Fig. 12 y 13). Algunos trabajos informan el potencial que tienen bacterias asociadas a la micorrizosfera de HMA como posibles promotoras del crecimiento vegetal

(Artursson *et al.* 2006) y los resultados antes expuestos nos hacen sospechar esta suposición, sin embargo el efecto de los hongos en el crecimiento de las raíces ha sido muy estudiado (Lamhamedi *et al.* 1992; Vidal *et al.* 1992). Fidelibus *et al.* (2001), observaron que especies de *Glomus* (*Glomus* sp., *G. mosseae*, *G. intraradices*) tuvieron un efecto estimulante sobre el crecimiento en longitud y biomasa de las raíces de *Citrus volkameriana*; según estos autores el peso seco y la longitud total de las raíces fue 1,2 a 1,3 veces mayor en plantas inoculadas.

La acción de microorganismos que se desarrollan junto con el hongo micorrizógeno arbuscular pudiera ser una posible explicación adicional al efecto beneficioso de las micorrizas sobre el crecimiento de las raíces de las plantas. Por la relación estrecha entre el crecimiento de las raíces y el proceso de la nutrición mineral de las plantas (Sattelmacher *et al.* 1993; Marschner, 1998), el efecto de los microorganismos-asociados a las esporas de *G. mosseae*, puede tener una significación especial sobre la capacidad nutricional de las plantas, al incrementar el número, el largo y la biomasa de las raíces.

Los microorganismos EndoGm5 y EndoGm6 son cepas de *P. aeruginosa* que acumulan polifosfatos, tienen marcada actividad en la solubilización de fosfatos insolubles e incrementan el número de raíces de plántulas de arroz y adicionalmente producen AIA (Tabla 10). En otros trabajos se han aislado numerosos microorganismos del suelo, pertenecientes a diversos géneros microbianos como *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Clostridium* y *Pseudomonas*, trayendo consigo beneficios en las raíces de las plantas; debido a la acción de fitohormonas, sideróforos y fosfatasa (Glick, 1995; Jeffries y Dodd, 1996; Vazquez *et al.* 2000; Siddiqui y Shaukat, 2002; Vessey, 2003; Gamalero *et al.* 2004) excretadas por estas bacterias en la rizosfera de muchas especies, entre la cuales se encuentra crucíferas como la canola, solanáceas (tomate y papa) y gramíneas (trigo), según Bakker *et al.* (1986); Abbass y Okon (1993); de Fritas, Banerjee y Germida (1997).

Los niveles de producción de AIA por EndoGm6 (Tabla 11) son bajos respecto a otros microorganismos-asociados aislados en nuestro trabajo y quizás los bajos niveles de la hormona han hecho posible su positiva respuesta respecto a las variables medidas. *P. aeruginosa* tiene una potencial capacidad para promover el crecimiento de las plantas, aspecto en el cual la producción de AIA por la bacteria puede ser uno de los mecanismos fisiológicos que se encuentran mediando el incremento del número de raíces y también el incremento de la superficie de absorción de las raíces de las plantas (Ayyaduray *et al.* 2006). La cepa de *P.*

aeruginosa (EndoGm6) tiene un efecto positivo en las variables fisiológicas medidas en el crecimiento de las raíces de arroz. El hecho de encontrarse asociada al interior o endógena de las esporas de *G. mosseae* y tener capacidad promotora del crecimiento vegetal tiene una significación en la biología de la interacción microorganismo-asociado_hongo_planta. Según, Bianciotto *et al.* (2004) en *G. margarita*, los microorganismos asociados pasan por las distintas fases del desarrollo del hongo, ese hallazgo puede ser relevante en la hipotética triple interacción planta_hongo_microorganismo-asociado, ya que además del fenómeno ya analizado de la absorción y el metabolismo del fósforo, puede ocurrir el efecto beneficioso en el crecimiento de las raíces y por tanto en su alcance en la exploración del suelo en el cual se están desarrollando las plantas. Las plantas con micorrizas asociadas y raíces con crecimiento favorecido por la acción de los microorganismos-asociados, estarían en mejores condiciones para tomar del medio los nutrientes y el agua necesaria en el desarrollo de las plantas.

La cepa de *P. aeruginosa* EndoGm5 produce niveles relativamente altos de la hormona AIA, tanto en presencia ($3,02 \text{ mg.mL}^{-1}$) como en ausencia ($1,07 \text{ mg.mL}^{-1}$) de triptófano en el medio (Tabla 11). Sin embargo, tiene un efecto significativo sobre el número de raíces de plántulas de arroz. Se plantea que altos niveles de esta hormona pueden traer consigo inhibición del crecimiento (Egamberdieva, 2008). Cepas de *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* producen AIA, con valores que oscilan entre $0,8 \text{ mg.mL}^{-1}$ y $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ respectivamente, en ausencia de triptófano al medio; en presencia de este producen $0,9 \text{ mg.mL}^{-1}$ y $0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$, respectivamente (Karnwal, 2009).

Los valores de producción de indol del microorganismo-asociado EndoGm6, que estimula el crecimiento de las raíces de arroz (Tabla 11) son del orden de $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ (tomando como referencia el AIA para realizar el cálculo de la molaridad). Experimentos de fisiología vegetal han demostrado que las concentraciones de compuestos indólicos (AIA) pueden ser estimulantes o inhibitorias del crecimiento vegetal, en dependencia de la concentración de este regulador del crecimiento. Concentraciones de AIA del orden de 10^{-11} a $10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$ son estimulantes del crecimiento radical, mientras que concentraciones mayores (del orden de 10^{-8} a $10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$) inhiben el crecimiento de las raíces (Timan, 1969). El medio LGI-P modificado que se utilizó para evaluar el efecto de los microorganismos-asociados sobre el crecimiento de las plántulas de arroz, se prepara con cantidades mínimas de compuestos de nitrógeno asimilable; sin embargo el medio SYP que se utilizó para crecer los microorganismos-asociados y determinar las excreciones de indoles es un medio rico

(30 veces más concentración de extracto de levadura que el medio LGI-P modificado). El efecto estimulante del crecimiento radical que produjo el microorganismos-asociado *EndoGm6*, puede estar relacionado con la producción de reguladores del crecimiento tipo indol, producidos a concentraciones menores que las encontradas en el medio rico SYP por estos microorganismos en el medio LGI-P modificado durante el experimento para conocer el efecto de los microorganismos-asociados sobre el crecimiento de las plantas. Los resultados de la producción de indol tienen una gran utilidad, pues nos orientan sobre la capacidad de los microorganismos-aislados de producir un compuesto que posee actividad reguladora del crecimiento vegetal, pero la extrapolación de los resultados debe realizarse cuidadosamente ya que la real concentración de los compuestos indólicos dependerá de las poblaciones microbianas, las cuales estarán a su vez relacionadas con las condiciones y el medio de cultivo en el cual se desarrollan. Además de lo anterior, en su interacción con las plántulas de arroz los microorganismos-asociados pueden haber producido y excretado otros compuestos reguladores del crecimiento que favorecerían o inhibirían la elongación celular y cuya determinación estuvo fuera de los objetivos de esta tesis. Nuevas avenidas de investigación se abren en este sentido para el futuro.

El papel fisiológico y ecológico de microorganismos-asociados a los HMA no ha sido informado en trabajos previos, tampoco su papel potencial en la simbiosis micorrízica. En este documento se han puesto en evidencia algunas capacidades metabólicas de estas bacterias y levaduras asociadas que las hacen interesantes y tienen un valor potencial para entender el proceso de la nutrición de los cultivos y de la simbiosis.

5.8- Efecto de los microorganismos-asociados, aislados de esporas desinfectadas de *Glomus mosseae* (INCAM -2) sobre la germinación y el crecimiento hifal de este HMA en condiciones *in vitro*

En presencia de microorganismos-asociados las esporas desinfectadas de *G. mosseae* germinaron en el medio artificial SRM a los diez días, sin embargo las esporas controles desinfectadas y colocadas en dicho medio germinaron solo siete días más tarde (Fig. 17). En el mismo intervalo de tiempo en que germinaron las esporas coinoculadas con microorganismos-asociados también germinaron las informadas por Azcón (1987), con la diferencia que Azcón no realizó inoculación con otros microorganismos y en este trabajo experimental fueron inoculadas las placas Petri con microorganismos-asociados.

De los microorganismos-asociados inoculados con las esporas, una cepa de *P. aeruginosa* (*EndoGm8*) trajo consigo incremento de la germinación de las esporas (Tabla 6 y Fig. 18). Entre los factores que afectan el

proceso de germinación de las esporas se encuentran los microorganismos (Siqueira y Sylvia, 1985); y en estudios realizados con microorganismos en asociación con esporas sin desinfectar del género *Glomus* fueron encontrados bacterias degradadores de biopolímeros entre ellas *Pseudomonas* sp., interviniendo en el proceso de maduración y eventual germinación de la espora debido a su capacidad de degradación de la pared (Roesti *et al.* 2005). Esta capacidad de degradación de la pared pudiera ser una de las funciones por las que el aislado EndoGm8 provocó diferencia significativa respecto al resto de los aislados en el porcentaje de esporas germinadas de *G. mosseae*.

El incremento de un 80% en la germinación de las esporas de *G. mosseae* por EndoGm8, es un hecho relevante que fue propiciado por microorganismos-asociados a las esporas de *G. mosseae* (INCAM-2). A pesar de existir referencias en la literatura (Siqueira y Sylvia, 1985) que abarcan el tema de los microorganismos y su incidencia en la germinación de este propágulo fúngico, no existen trabajos científicos que vinculen el tema del incremento de la germinación propiciado por microorganismos-asociados aislados de las propias esporas, lo que pudiera de alguna manera acercarnos a una posible funcionalidad biológica de estos microorganismos que conviven con *G. mosseae*. Si en este género sucede un hecho como el observado en la familia Gigasporaceae (Bianciotto *et al.* 2004) estos microorganismos-asociados aislados pudieran encontrarse durante todas las generaciones del HMA y de esta manera influir en un evento tan importante para el mantenimiento de la especie como la reproducción.

Escasos resultados indican efecto de los microorganismos aislados sobre las esporas. Hongos saprofitos aislados de esporocarpos no desinfectados de *G. mosseae* también influyeron en la germinación (Fracchia *et al.* 1998). Sin embargo, bacterias aisladas desde hifas no desinfectadas de *G. claroideum* no influyeron en la germinación pero sí trajeron más efectos positivos que bacterias del suelo que fueron probadas (Gryndler *et al.* 2000). Los resultados expuestos en este documento de tesis están en desacuerdo con el hecho de que las esporas de *G. mosseae* sólo germinan *in vitro* en presencia de *Sporothrix schenckii* o *Streptomyces orientalis* (Mugnier y Mosse, 1987). El evento de germinación de las esporas y el crecimiento hifal pueden ser estimulados o inhibido por diferentes componentes y este resultado indica un posible y marcado efecto propiciado por microorganismos-asociados o microorganismos endógenos aislados de las propias esporas. Las hifas de *G. mosseae* se dirigieron a las colonias de los microorganismos-asociados inoculados (Fig. 20), y una hipótesis puede ser que este crecimiento direccional de la hifa del hongo a la colonia microbiana este

motivado por exudados específicos. El efecto puede estar relacionado con la habilidad que tienen los microorganismos del suelo de excretar sustancias biológicamente activas (Lynch, 1976; Strzelczyk y Pokojnska-Burdziej, 1984) ejerciendo alguna acción directa sobre el hongo. La comunidad bacteriana-asociada con las esporas depende más del HMA que de la identidad de la planta hospedera (Roesti *et al.* 2005), por tanto la composición de la población bacteriana-asociada a las esporas de HMA puede estar predominantemente influenciada por la composición específica de la pared celular o por los exudados del HMA, más que por los exudados específicos de la raíz; todo lo cual abre una nueva visión de la biología del papel de los microorganismos-asociados en interacción con las plantas y hongos micorrizógenos arbusculares.

El efecto de la levadura-asociada (EndoGm1) propició un desarrollo hifal de 10 mm total en 23 días (Tabla 12). Existen evidencias de la acción de levaduras aisladas del suelo sobre esporas de *G. mosseae* y *G. roseae*, consiguiendo un incremento del largo hifal de los dos HMA (Fracchia *et al.* 2003). Otras levaduras aisladas de suelo: *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cryptococcus laurentii* y *Saccharomyces kunasherenensis* también traen consigo estimulación de la germinación de la espora de *G. mosseae*, crecimiento hifal y desarrollo de la fase intraradical (Sampedro *et al.* 2004). Los resultados de esta tesis indican que al comparar el largo hifal provocado por la levadura-asociada (EndoGm1) es inferior al alcanzado en presencia de *P.aeruginosa* (EndoGm8), por tanto el desarrollo más notorio de la hifa no fue propiciado por la levadura-asociada sino por una bacteria-asociada, se incrementó en 16 mm más. De todos modos es necesario resaltar la influencia positiva provocada por la levadura-asociada y más que esto la acción positiva observada en este experimento por los microorganismos-asociados aislados desde esporas desinfectadas de *G. mosseae* y las propias esporas de este HMA. Si tomamos en consideración que los microorganismos-asociados pueden considerarse como microorganismos endógenos a las esporas, el resultado tiene una relevancia adicional.

Además de la estimulación de la germinación (Fig. 18) y del desarrollo de micelio (Fig. 19) ocurrió un evento adicional muy importante, el cual abre nuevas perspectivas en el estudio de los hongos micorrizógenos arbusculares. En el futuro será necesario desentrañar la pregunta que ha surgido de este trabajo de tesis: ¿Es el hongo micorrizógeno arbuscular capaz de reproducirse en medio de cultivo artificial sin la necesidad de una planta u órgano de ésta, con la cooperación de los microorganismos-asociados

descubiertos en este trabajo?. En presencia de la levadura-asociada *Rhodotorula glutinis*, el HMA *Glomus mosseae* (INCAM-2) produjo nuevas esporas en un período de 27 días (Fig. 21). La independencia biológica del HMA en medio de cultivo *in vitro* no es compartida por otros autores (Van Aarle *et al.* 2002); sin embargo fue un hecho que se observó en los experimentos realizados en este trabajo de tesis, lo que pudiera llegar a ser muy atractivo si se analiza la idea de la elaboración de biofertilizantes a base de estos hongos en ausencia de raíces como hasta ahora ha sido practica generalizada para la propagación de HMA en cultivo *in vitro*.

Los resultados presentados en la Fig. 21, sugieren que los HMA no dependen estrictamente de una planta u órgano de esta para su crecimiento. No sabemos si las esporas que se obtuvieron son fértiles y por tanto capaces de recolonizar raíces, pero sí hubo formación de nuevas esporas. De confirmarse la fertilidad de las esporas, pudieran reelaborarse conceptos y nuevas metodologías para el cultivo de estos microorganismos. Aparentemente, *Rhodotorula glutinis* (EndoGm1) pudiera sustituir a la planta para el desarrollo de *G. mosseae*, lo que representaría un paso adelante en el entendimiento entre los simbioses, aunque la complejidad de la simbiosis planta-HMA tiene muchos factores ocultos que necesitan nuevos y diversos estudios. No es una bacteria-asociada la que condujo a la formación de nuevas esporas sino una levadura-asociada, un microorganismo eucarionte, que hasta estos momentos no había sido descrita su presencia en ninguna especie de hongo micorrizógeno arbuscular y menos aún su efecto fisiológico sobre los HMA. La asociación de los HMA con microorganismos-asociados pudiera ser obligatoria para la sobrevivencia de los HMA y sus actividades en las esporas pueden o no afectar la relación del hongo con las plantas. Estas pueden constituir interrogantes para futuros estudios.

5.9- Consideraciones generales

Ha sido muy discutido en este trabajo de tesis el tema de los microorganismos-asociados o microorganismos endógenos en esporas de *G. mosseae*. En trabajos científicos relacionados existen divergencias en cuanto a las metodologías empleadas para obtenerlos. La metodología CTCf desarrollada en esta tesis permitió obtener esporas de *G. mosseae* completamente desinfectadas y permitió el aislamiento de 30 colonias microbianas diferentes.

Esta tesis revela que asociadas a las esporas de *G. mosseae* (INCAM-2) existen bacterias y levaduras que fueron inscritas en el Banco de Genes del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados

Unidos (NCBI) y por tanto tienen un Número de Acceso; el hecho de informar y poner a la disposición de la comunicada científica internacional por primera vez la presencia de levaduras-asociadas (eucariontes) aun HMA así como la presencia de otras bacterias-asociadas (procariontes) a un HMA, revela la reciprocidad e intercambio mutuo de los microorganismos durante la evolución de las especies. Hasta donde hemos podido constatar este constituye el primer informe científico que indica la presencia de microorganismos eucariontes, endógenos en las esporas de un HMA.

Estos microorganismos endógenos tienen un papel multifuncional (Fig. 22 y Fig. 23) estrechamente relacionado con las propias funciones que tienen los HMA, lo que hace muy novedosa la triple interacción que se establece entre hongos micorrizógenos arbusculares-plantas y microorganismos-asociados.

Las esporas del HMA *G. mosseae* (INCAM-2) constituyen un micro hábitat adecuado para la colonización de especies de microorganismos, con gran importancia en el ciclo de vida del hongo hospedero. Microorganismos endógenos que incrementan la germinación de las esporas y las ramificaciones de la hifa de *G. mosseae* e influyen en la formación de nuevas esporas en ausencia de órgano vegetal, lo que constituye un resultado novedoso que pone en duda el carácter simbiote obligado de estos hongos. Estos resultados informan la participación de estos microorganismos-asociados sobre el propio HMA de donde fueron aislados, por tanto ésta pudiera ser una de las funciones biológicas de estos microorganismos-asociados en la triple interacción.

Algunos de estos microorganismos-asociados aislados en la tesis participan además en el metabolismo del fósforo, solubilizando fosfatos inorgánicos y acumulando polifosfatos, tienen influencia en el crecimiento radical de plántulas de arroz, fermentan azúcares y pueden vivir en condiciones de salinidad en el medio.

El análisis de las múltiples interacciones establecidas por el HMA con plantas y según nuestros resultados, en interacción también con microorganismos-asociados, ofrece una nueva visión para el entendimiento de la compleja simbiosis de los Hongos Micorrizógenos Arbusculares. Se abren así nuevas interrogantes acerca del desarrollo de estos hongos en ausencia de raíces u otro órgano vegetal, y los resultados sugieren que la simbiosis de estos hongos pueden incluir un tercer simbiote, existiendo entonces asociaciones tripartitas. Los resultados pueden conducir al diseño de inóculos mixtos; mientras, la identificación de cultivos de hongos que contienen microorganismos endógenos asociados a cultivos de importancia económica, revela nuevas estrategias para el uso práctico de los hongos micorrizógenos arbusculares.

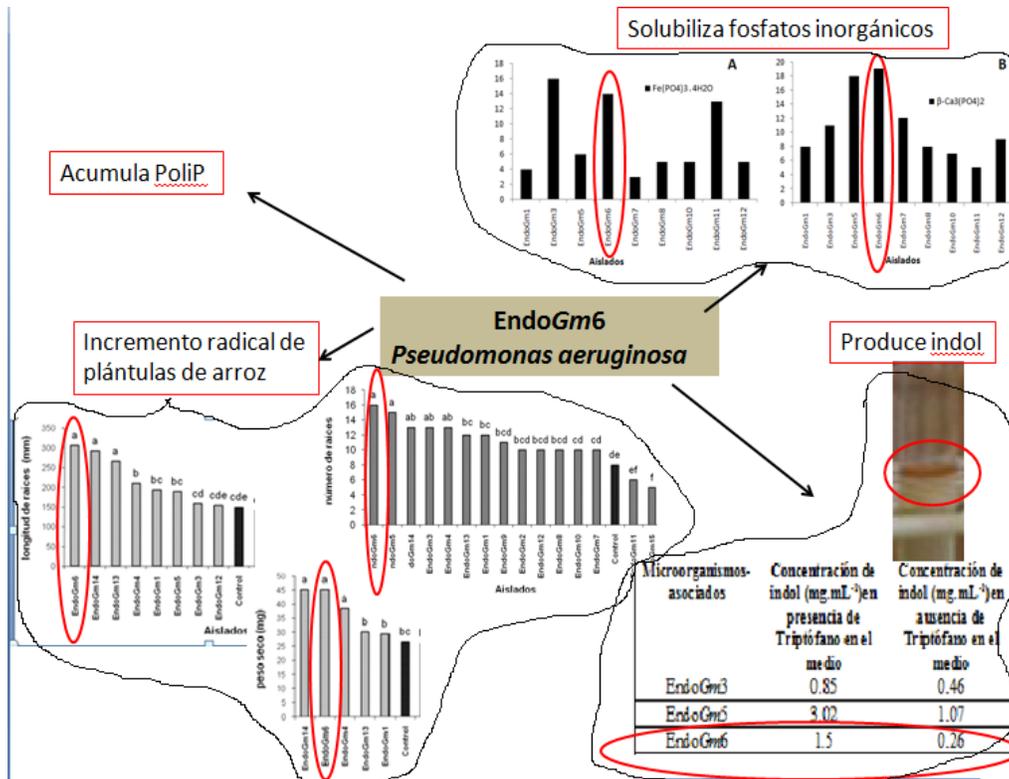


Figura 22: Representación esquemática del papel multifuncional de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (EndoGm6) aislada desde esporas desinfectadas de *G. mosseae* (IN CAM -2).

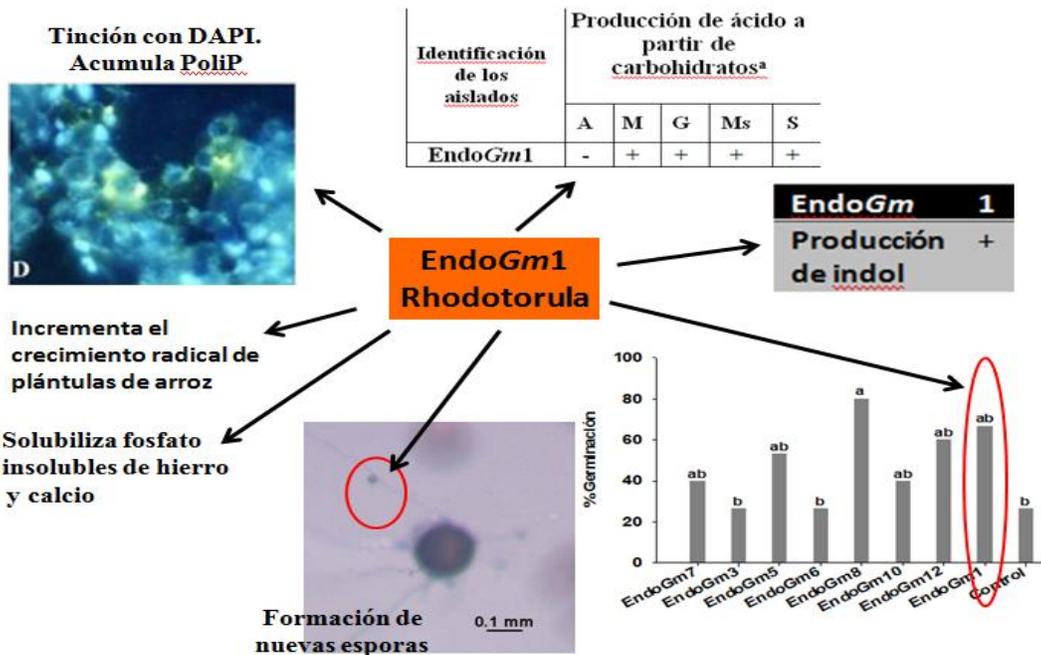


Figura 23: Representación esquemática del papel multifuncional de la cepa de *Rhodotorula glutinis* (EndoGm1).

Además de la relevancia que pueden tener los hallazgos realizados en esta tesis, que hacen algún aporte al entendimiento de la biología de la interacción entre el hongo micorrizógeno arbuscular de la especie *Glomus mosseae* y los otros microorganismos-asociados al interior de las esporas –interpretados incluso como una triple interacción o triple simbiosis– hay un aspecto que no se debe perder de vista. Este aspecto es el hecho de que cuatro de las cepas asociadas al interior de las esporas, con efectos positivos en el crecimiento de las raíces de plántulas de arroz y efectos positivos en la germinación y crecimiento de las hifas en condiciones *in vitro*, son de la especie *P. aeruginosa*. Es muy importante, que independiente del conocimiento teórico que aporten estos resultados, todos los que lean y analicen este documento de tesis conozcan que *Pseudomonas aeruginosa* es una especie de bacteria con un alto efecto patógeno (Wolfgang *et al.* 2003), no solo para plantas y animales, sino también para el hombre. Todo el trabajo realizado con estas cepas se hizo tomando en consideración las reglas de la bioseguridad; pero de ahora en lo adelante, independientemente de sus interacciones favorables con los HMA y con las plantas, no se debe olvidar el carácter patógeno de las mismas y en ningún caso incluir cepas de esta especie en ningún biofertilizante. Estos resultados, unidos a las características de esta especie dan contenido de trabajo para la realización de investigaciones que profundicen en la relación de *P. aeruginosa* con *G. mosseae* y con las plantas cultivables, pero siempre teniendo en consideración su carácter patógeno, lo cual no niega ninguno de los hallazgos y conocimientos que desde el punto de vista biológico puedan aportarse en este trabajo de tesis.

VI- Conclusiones y Recomendaciones

6.1-Conclusiones

- 1- Se ha demostrado la presencia de microorganismos íntimamente asociados a las esporas del HMA *Glomus mosseae*. Estos microorganismos, que colonizan biotróficamente el interior de las esporas, pertenecen a las especies bacterianas *Pseudomonas aeruginosa* y *Delftia acidovorans* y a las de levaduras del género *Rhodotorula* y *Cryptococcus*.
- 2- *In vitro*, algunos de los microorganismos-asociados y en ausencia de órgano vegetal alguno, provocan y acortan el tiempo de germinación de las esporas de *Glomus mosseae* e incrementan las ramificaciones de las hifas. Ocurre la formación de nuevas esporas y se evidencia la atracción de las hifas por las colonias microbianas.
- 3- La metodología de desinfección utilizando Cloramina T al 5%, Cefalexina ($2,5 \text{ g.L}^{-1}$) y Tween 40 (CTCF) permite eliminar del exterior de las esporas de HMA *Glomus mosseae* los microorganismos “contaminantes” comúnmente asociados a estas.
- 4- Microorganismos-asociados íntimamente con las esporas de *Glomus mosseae* favorecen el desarrollo radical en plántulas de arroz.
- 5- La mayoría de los microorganismos-asociados ensayados solubilizan fosfato tricálcico y fosfato de hierro y algunos acumulan polifosfatos, lo que sugiere la participación de la microbiota-asociada al HMA en la nutrición fosfórica de la planta y una potencial triple interacción microorganismos-asociados_hongo_planta.

6.2- Recomendaciones

- 1- Utilizar la microscopía confocal fluorescente para detectar y localizar en el interior de las esporas y otras estructuras de los HMA a los microorganismos-asociados descubiertos en este trabajo de tesis.
- 2- Realizar experimentos *in vitro* que permitan determinar si las esporas que se producen al poner en contacto EndoGm1 (*Rhodotorula*) y esporas de HMA *G. mosseae* son fértiles o no.
- 3- Valorar las ventajas que tendría un biofertilizante, a base de cultivos de HMA *Glomus mosseae* INCAM-2 con *Rhodotorula glutinis*.

- 4- No utilizar en la práctica ninguna de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en esta tesis, para la confección de biofertilizantes y ser estrictos en el cumplimiento de las reglas de bioseguridad para su manipulación.

V II- Referencias bibliográficas

1. Abbass, Z. y Okon, Y. (1993). Plant growth promotion by *Azotobacter paspali* in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 25: 1075-1083.
2. Alarcón, A. (2001). Actualización de la taxonomía de los Glomales. *Terra Latinoamericana* 19: 103-104.
3. Amann, R.; Ludwig, W. y Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59: 143-169.
4. Andrade, G.; Azcon, R. y Bethlenfalvay, G.J. (1995). A rhizobacterium modifies plant and soil responses to the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Applied Soil Ecology* 2: 195-202.
5. Andrade, G.; Mihara, K. L.; Linderman, R.G. y Bethlenfalvay, G.J. (1997). Bacteria from rhizosphere and hiphosphere soils of different arbuscular-mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 192: 71-79.
6. Andrade, G.; Mihara, K.L.; Linderman, R.G. y Bethlenfalvay, G.J. (1998). Soil aggregation status and rhizobacteria in the mycorrhizosphere. *Plant and Soil* 202: 89-96.
7. Artursson, V. y Jansson, J.K. (2003). Use of bromodeoxyuridine immunocapture to identify active bacteria associated with arbuscular mycorrhizal hyphae. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 6208-6215.
8. Artursson, V.; Finlay, R. D. y Jansson, J. K. (2006). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Applied and Environmental Microbiology* 8: 1-10.
9. Artursson, V.; Finlay, R.D. y Jansson, J.K. (2005). Combined bromodeoxyuridine immunocapture and terminal restriction fragment length polymorphism analysis highlights differences in the active soil bacterial metagenome due to *Glomus mosseae* inoculation or plant species. *Environmental Microbiology* 7: 1952-1966.
10. Ayyadurai, N.; Naik, P.R.; Rao, M.S.; Kumar, R.S.; Samrat, S.K.; Manohar, M. Y. y Sakthivel, N. (2006). Isolation and characterization of a novel banana rhizosphere bacterium as fungal antagonist and microbial adjuvant in micropropagation of banana. *Journal of Applied Microbiology* 100: 5-926.
11. Azcón, R. (1987). Germination and hiphal growth of *Glomus mosseae in vitro*: Effects of rhizosphere bacteria and cell free culture media. *Soil Biology and Bioquemistry* 19: 117-119.
12. Azcón, R. (2000). Papel de la simbiosis micorrízica y su interacción con otros microorganismos rizosféricos en el crecimiento vegetal y sostenibilidad agrícola. *Ecología Fisiología y Biotecnología de la Micorriza Arbuscular*. Mundi Prensa. México. p. 1-15.
13. Azcón-Aguilar, C. y Barea, J. M. (1992). Interactions between mycorrhizal fungi and other rhizosphere microorganisms. En: *Mycorrhizal Functioning. An integrative Plant- Fungal Process*, editado M.F. Allen, Chapman y Hall, Nueva York. 163-198.
14. Azcon-Aguilar, C.; Diaz-Rodriguez, R. y Barea, J. M. (1986). Effect of soil microorganisms on spore germination and growth on the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Transactions of the British Mycological Society* 86: 337-340.
15. Azcón-Aguilar, C.; Barea, J.M.; Gianinazzi, S. y Gianinazzi-Pearson, V. (editors). (2009). *Mycorrhizas Functional Processes and Ecological Impact*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 239.
16. Bago, B.; Pfeffer, P. E. y Douds, D. (1999). Carbon metabolism in spores of of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiology* 121: 263-271.
17. Bago, B.; Pfeffer, P. E.; Douds, D. D.; Brouillette, J.; Becard, G. y Sachar-Hill, Y. (1999). Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiology* 121: 263-271.
18. Bago, B.; Zipfel, W.; Williams, R. M.; Jun,J.; Arreola, R.; Lamers, P. J.; Pfeffer, P. E. y Sachar-Hill, Y. (2002). Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology* 128: 108-124.
19. Bagyaraj, D.J. y Menge, J.A. (1978). Interactions with VA mycorrhiza and *Azotobacter* and their effects on rhizosphere microflora and plant growth. *New Phytologist* 80: 567-573.
20. Bakker, P.A.H.M.; Lamers, J.G.; Bakker, A.W.; Marugg, J.D.; Weisbeek, P.J. y Schippers, B. (1986). The role of siderophores in potato tuber yield increase by *Pseudomonas putida* in a short rotation of potato. *European Journal of Plant Pathology* 92: 249-256.

21. Barea, J. M.; Azcón, R. y Azcón-Aguilar, C. (1983). Interactions between phosphate solubilising bacteria and VA mycorrhiza to improve plant utilization of rock phosphate in non-avidic soils. In proceedings 3rd International Congress on Phosphorus Compounds, 4-6 Oct. 1983 Brussels, Belgium. p. 127-144.
22. Barea, J. M.; Ferrol, N; Azcón-Aguilar, C y Azcón, R. (2008). Chapter 7 Mycorrhizal symbiosis. P.J. White, J.P. Hammond (eds.) The Ecophysiology of Plant-Phosphorus Interactions, © Springer Science + Business Media B.V. p. 143-163.
23. Barea, J.M. (2010). Mycorrhizas and agricultural fertility. In: *Agricultural Sciences: Topics in Modern Agriculture*. (González-Fontes, A., Gárate, A., Bonilla, I.) Stadium Press, Houston, Texas, USA. p. 257-274.
24. Barea, J. M.; Azcón-Aguilar, C. y Azcón, R. (1997). Interactions between mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms within the context of sustainable soil-plant systems. In Multitrophic interactions in terrestrial systems. Edited by A. C. Gange and V. K. Brown Blackwell Science Publishers, Osney, UK. p. 65-77.
25. Barea, J.M. y Jeffries, P. (1995). Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil-plant systems. In Mycorrhiza. Eds. A Varma and B Hock. pp 521-560. Springer-Verlag, Berlin.
26. Barea, J.M.; Pozo, M.J.; Azcón, R. y Azcón-Aguilar, C. (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 56: 1761-1778.
27. Becard, G. y Piche, Y. (1989). Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 2320-2325.
28. Becker, J. y Boles, E. (2003). Construction of an L-arabinose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain by genetic engineering and evolutive screening. En 25th Symposium on Biotechnology for fuels and chemicals. Breckenridge, Colorado.
29. Beilby, J.P. y Kidby, D.K. (1980) Biochemistry of ungerminated and germinated spores of the vesicular- arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus caledonius*: changes in neutral and polar lipids. *Journal of Lipid Research* 21: 739-750.
30. Beltramino D. 2003. Cefalosporina. Sociedad Argentina de Pediatría http://www.sap.org.ar/organización/comitesnacionales/cefen/cd_neo/drogas/c/c4.htm
31. Bianciotto, V.; Bandi, C.; Minerdi, D.; Sironi, M.; Tichy Hans, V. y Bonfante, P. (1996). An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 3005-3010.
32. Bianciotto, V. y Bonfante, P. (2002). Arbuscular mycorrhizal fungi: a specialized niche for rhizospheric and endocellular bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 365-371.
33. Bianciotto, V.; Andreotti, S.; Balestrini, R.; Bonfante, P. y Perotto, S. (2001). Extracellular polysaccharides are involved in the attachment of *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium leguminosarum* to arbuscular mycorrhizal structures. *European Journal of Histochemistry* 45: 39-49.
34. Bianciotto, V.; Genre, A. Jargeat, P.; Lumini, E. Becard, G. y Bonfante, P. (2004). Vertical Transmission of Endobacteria in the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Gigaspora margarita* through Generation of Vegetative Spores. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 3600-3608.
35. Bianciotto, V.; Lumini, E.; Bonfante, P. y Vandamme, P. (2003). '*Candidatus Glomeribacter gigasporanum*' gen. Nov., sp. Nov., an endosymbiotic of arbuscular mycorrhizal fungi. *International Journal of Systematic and Evolutionary* 53: 121.
36. Bianciotto, V.; Lumini, E.; Lanfranco, L.; Minerdi, D.; Bonfante, P. y Perotto, S. (2000). Detection and identification of bacterial endosymbionts in arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the Family Gigasporaceae. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 4503-4509.
37. Bielecki, R.L. (1973). Phosphate pools, phosphate transport and phosphate availability. *Annual Reviews Plant Physiology* 24: 225-252.
38. Bonfante, P. (2003). Plants, mycorrhizal fungi and endobacteria: a dialog among cells and genomes. *Biology Bulletin* 204: 215-220.
39. Bonfante, P.; Balestrini, R. y Mendgen, K. (1994). Storage and secretion processes in the spore of *Gigaspora margarita* Becker & Hall as revealed by high-pressure freezing and freeze substitution. *New Phytologist* 128: 93-101.
40. Brewin, N. J. (1991). Development of the legume root nodule. *Annual Review of Cell Biology* 7: 191-226.

41. Buck, K. M. (2003). Cleaning and disinfecting. The effect of germicides on microorganisms. In Infection Control Today. <http://www.infectioncontrolday.com/articles191clean.html>
42. Budi, S.; Van Tuinen, D.; Martinotting, S. y Gianinazzi, S. (1999). Isolation from the *Sorghum bicolor* Mycorrhizosphere of a Bacterium Compatible with Arbuscular Mycorrhiza Development and Antagonistic towards Soilborne Fungal Pathogens. Applied and Environmental Microbiology, p. 5148-5150.
43. Buzzini, P.; Gasparetti, C.; Turchetti, B.; Cramarossa, M.R.; Matini, V.A.; Martini, A.; Pagnoni, U.M. y Forti, L. (2005). Production of volatile organic compounds (VOCs) by yeasts isolated from the ascocarps of black (*Tuber melanosporum* Vitt.) and white (*Tuber magnatum* Pico) truffles. Archives of Microbiology 184: 187-193.
44. Caballero Mellado, J. y Martínez Romero, E. (1994). Limited genetic diversity in the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. Applied and Environmental Microbiology, p. 1532-1537.
45. Carpenter-Boggs, L.; Loynachan, T. E. y Stahl, P. (1995). Spore germination of *Gigaspora margarita* stimulated by volatiles of soil-isolated actinomycetes. Soil Biology 27: 1445-1451.
46. Cavalcante, V. A. y Döbereiner, J. (1988). A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. Plant and Soil 108: 22-31.
47. Colozzi-Filho, A. (1988). Desinfestação superficial de esporos de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares. Lavras: ESAL, 80p. Tese de Mestrado.
48. Cordero, Jorge.; Ortega-Rodés, P. y Ortega, E. (2008). Plant inoculation with *Pantoea* sp., phosphate solubilising-bacteria increases P concentration in leaf tissues. Revista Colombiana de Biotecnología 5: 111-121
49. Cortés, J. A. (2001). Ensayos microbiológicos. Manual de Laboratorio. <http://www.joseacortes.com>
50. Cranenbrouck, S.; Voets, L.; Bivort, C.; Renard, L.; Stullu, D. G. y Declercq, S. (2005). Methodologies for *in vitro* cultivation of arbuscular mycorrhizal fungi with root organs. In: In vitro culture of mycorrhizas. Eds.: Declercq, S.; Strullu, D. G.; Fortin, J. A. Springer, Berlin, p. 341-348.
51. Cruz, A.F.; Horii, S.; Ochiai, S.; Yasuda, A. y Ishii, T. (2008). Isolation and analysis of bacteria associated with spores of *Gigaspora margarita*. Journal of Applied Microbiology 104: 1711-1717.
52. Cruz, A.F. (2004). Element storage in spores of *Gigaspora margarita* Becker & Hall measured by electron energy loss spectroscopy (EELS). Acta Botanica Brasileira 18: 473-480.
53. Dale, C.; Plague, G. R.; Wang, B.; Ochman, H. y Moran, N. A. (2002). Type III secretion systems and the evolution of mutualistic endosymbiosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 12397-12402.
54. de Fritas, de Fritas, J.R.; Banerjee, M.R. y Germida, J.J. (1997). Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). Biology and Fertility of Soils 24: 358-364.
55. de Hoog, G.; Guarro, J.; Gene, J. y Figueras, M. J. (2000). Atlas of clinical fungi. 2nd ed, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Uppsala-laan 8, 3584 CT Utrecht, The Netherlands.
56. De la Torre y Callejas, S. (1975). Manual básico de microtecnia biológica. Edición revolucionaria. La Habana. 55-59.
57. Dell' Amico, JM.; Rodríguez, P.; Torrecillas, A.; Morte, A. y Sánchez-Blanco, M.J. (2002) Influencia de la micorrización en el crecimiento y las relaciones hídricas de plantas de tomate sometidas a un ciclo de sequía y recuperación. Cultivos Tropicales 23: 29-34.
58. Döbereiner, J.; Marriell, I. E. y Nery, M. (1976). Ecological distribution of *Spercllum lipoferum* Beijerinck. Canadian Journal of Microbiology 22: 1464-1473.
59. Döbereiner, J.; Reis, V.M.; Paula, M.A. y Olivares, F. (1993). Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants. En: New Horizons in Nitrogen Fixation. R. Palacios et al. (eds.). Kluwer Academic Publisher. Netherland p.671-676.
60. Douglas, A. E. (1995). The ecology of symbiotic microorganisms. Advanced in Ecological Research 26: 69-103.
61. Douglas, A. E. (1998). Host benefit and the evolution of specialization in symbiosis. Heredity 80: 599-603.
62. Edwards, S.G.; Young, J.P.W. y Fitter, A.H. (1998). Interactions between *Pseudomonas fluorescens* biocontrol agents and *Glomus mosseae*, an arbuscular mycorrhizal fungus, within the rhizosphere. FEMS Microbiology Letters 166: 297-303.

63. Egamberdieva, D. (2008). Plant growth promoting properties of rhizobacteria isolated from wheat and pea grown in loamy sand soil. *Turkic Journal of Biology* 32: 9-15.
64. Ewald, P. W. (1994). *Evolution of infectious disease*. Oxford University Press, New York, N.Y.
65. Ezawa, T.; Smith, S.E. y Smith, F.A. (2001). Enzyme activity involved in glucose phosphorylation in two arbuscular mycorrhizal fungi: indication that polyP is not the main phosphagen. *Soil Biology y Biochemistry* 33: 1279-1281.
66. Ferguson, P. J. (2003). Anti-infective agents. <http://dentistry.uwo.ca/info/flanagan.pdf>
67. Fernández, F.; de la Noval, B. M. y Rivera, R. (2000). Producto Inoculante Micorrizógeno. Patente # 22 641.
68. Fidelibus, M.W.; Martin, M.A. y Stutz, J.C. (2001). Geographic isolates of *Glomus* increase root growth and whole plant transpiration of Citrus seedlings grown with high phosphorus. *Mycorrhiza* 5: 231-256.
69. Filippi, C.; Bagnoli, G.; Citernesi, A. S. y Giovannetti, M. (1998). Ultrastructural spatial distribution of bacteria associated with sporocarps of *Glomus mosseae*. *Symbiosis* 24: 1-12.
70. Finlay, R.D. (2008). Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal Experimental of Botanic* 59:1115-1126.
71. Fitter, A. y Garbaye, J. (1994). Interaction between mycorrhizal fungi and other soil organisms. *Plant and Soil* 159: 123-132.
72. Fitter, A.H.; Helgason, T. y Hodge, A. (2011). Nutritional exchanges in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: Implications for sustainable agriculture. *Fungal Biology Review* 25: 68-72.
73. Fonseca, A.; Scorzetti, G. y Fell, J.W. (2000). Diversity in the yeast *Cryptococcus albidus* and related species as revealed by ribosomal DNA sequence analysis. *Canadian Journal of Microbiology* 46: 7-27.
74. Fracchia, S.; Godeas, A.J.; Scervino, M.; Sampedro, I.; Ocampo, J. A. y García-Romera, I. (2003). Interaction between the soil yeast *Rhodotorula mucilaginosa* and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Gigaspora rosea*. *Plant and Soil* 200: 131-137.
75. Fracchia, S.; Mujica, M.T.; García-Romera, I.; García-Garrido, J.M.; Martín, J.; Ocampo, J.A. y Godeas, A. (1998). Interactions between *Glomus mosseae* and arbuscular mycorrhizal sporocarp-associated saprophytic fungi. *Plant and Soil* 200: 131-137.
76. Gaid, D. y Gaur, A.C. (1991). Thermotolerant phosphate solubilizing microorganisms and their interaction with mung bean. *Plant and Soil* 133: 141-149.
77. Gamalero, E.; Trotta, A.; Massa, N.; Copetta, A.; Martinotti, M. G. y Berta, G. (2004). Impact of two fluorescent pseudomonads and an arbuscular mycorrhizal fungus on tomato plant growth, root architecture and P acquisition. *Mycorrhiza* 14: 185-192.
78. Garbaye, J. (1994). Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 28: 197-210.
79. Garbaye, J. y Bowen, G. D. (1989). Stimulation of mycorrhizal infection of *Pinus radiata* by some microorganisms associated with the mantle of ectomycorrhizas. *New Phytologist* 112: 383-388.
80. Garrido, B. (2002). <http://eos.anice.mecd.espmem2002/proteinas/practica/catalasaboton.htm>
81. Garrido, N.L. (1988). Mykorrhizen in den Nothofagus-Waldern Mittelchiles. *Bibliotheca Mycologica* 120: p.1-258.
82. Gehrig, H.; Schussler, A y Kluge, M. (1996). *Geosiphon pyriforme*, a fungus forming endocytobiosis with *Nostoc* (cyanobacteria), is an ancestral member of the Glomales: evidence by SSU rRNA analysis. *Journal of Molecular Evolution* 43: 71-81.
83. Genkai-Kato, M. y Yamamura, N. (1999). Evolution of mutualistic symbiosis without vertical transmission. *Theoretical Population Biology* 55: 309-323.
84. Gleditsch, J.W. y Nicolson, T.H. (1963). Spores of mycorrhizal Endogone species extracted by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycology Society* 46: 235-244.
85. Gianinazzi-Pearson, V. (1984). Host-fungus specificity in mycorrhizae. In *genes Involved in Plant-Microbe Interactions*, ed. D. P. S. Verma, T. H. Hohn, pp. 225-253. Wien. Springer. p. 393.
86. Glick, B. R. (1995). The enhancement of plant growth promotion by free living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 41: 109-117.
87. Gliglione, J.F.; Gourbiere, F.; Portier, P.; Philippot, L. y Lensi, R. (2000). Role of respiratory nitrate reductase in ability of *Pseudomonas fluorescens* YT101 to colonize the rhizosphere of maize. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4012-4016.

88. Goldstein, Alan H. (1995). Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by Gram negative bacteria. *Biological Agriculture and Horticulture* 12: 185-193.
89. González, I. (2010). Promoción del crecimiento de plántulas de arroz (*Oriza sativa* L., var. INCA Lp-5) por aislados bacterianos productores de compuestos indólicos y solubilizadores de fosfatos. Tesis de Licenciatura. Fac. Biología. Univ. de la Habana.
90. Gordon, R.E.; Haynes, W.C. y Pang, C.H.N. (1973). The Genus *Bacillus*: Agriculture Handbook No. 427. ARS-USDA, Washington, D.C.
91. Gordon, S.A. y Weber, R. P. (1951). Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology* 26:192-195.
92. Grey, D. I.; Gooday, E. W. y Peosser, J. I. (1990). Histological staining of nuclear material in Hyphae of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of Microbiological Methods* 12: 163-172.
93. Grocetti R, Hugenholtz. P.; Bond, P.; Schuler, A.; Keller, J.; Jenkins, D. y Blackall, L. (2000). Identification of polyphosphate - accumulating organisms and design of 16S RNADirected Probes for Their Detection and Quantitation. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1175-1182.
94. Gryndler, M.; Hrselova, H. y Chvatalova, I. (1996). Effect of free-soil-inhabiting or root associated microfungi on the development of arbuscular mycorrhizae and on proliferation of intraradical mycorrhizae hyphae. *Folia Microbiologica* 41: 193-196.
95. Gryndler, M.; Hrselova, H. y Striteska, D. (2000). Effect of soil bacteria on hyphal growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus claroideum*. *Folia Microbiologica* 45: 545-551.
96. Gryndler, M.; Hrselova, H.; Chvatalova, I. y Jansa, J. (1988). The effect of selected plant hormones on in-vitro proliferation of hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fistulosum*. *Biologia Plantarum* 41: 255-263.
97. Gunderson, J.H.; McCutchan, T.F. y Sogin, M.L. (1986). Sequence of the small subunit ribosomal RNA gene expressed in the bloodstream stages of *Plasmodium berghei*: evolutionary implications. *Journal of Protozoology* 33: 525-529.
98. Gupta, R.; Singal, R.; Shankar, A.; Kuhad, R. y Saxena, R. (1994). A modified plate assay for screening phosphate solubilising microorganisms. *Journal of General and Applied Microbiology* 40: 255-260.
99. Hall, I. R. (1977). Species of mycorrhizal infections of New Zealand Endogonaceae. *Transactions of the British Mycological Society* 68: 341-356.
100. Hameeda, B.; Srijana, M.; Rupela, O. P. y Reddy, G. (2007). Effect of bacteria isolated from composts and macrofauna on sorghum growth and mycorrhizal colonization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 883-887.
101. Hamilton, A. (2002) *Cryptococcus neoformans* – the encapsulated menace. *Mycologist* 16: 125-126.
102. Harrigan, W.F. y McCance, M. (1968). Métodos de Laboratorio en Microbiología. Editorial Academia. p. 7-82.
103. Harrison, J.; Deubre, G. R. y Liu, J. (2002). A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular micorrhizal fungi. *Plant Cell* 14: 2413-2430.
104. Hartmann, A.; Schmid, M.; van Tuinen, D. y Berg, G. (2009). Plant-driven selection of microbes. *Plant and Soil* 321: 235-257.
105. Harwood, C. X. S. (1990). Genetic analysis *Molecular Biological Methods for Bacillus*, A Wiley-Interscience Publication, England. p. 27-61.
106. Hassett, D.; Cuppoletti, J.; Trapnell, B.; Lymar, S.; Rowe, J.; Yoon, S.; Hilliard, G.; Parvatiyar, K.; Kamani, M.; Woźniak, D.; Hwang, S.; McDermott, T. y Ochsner, U. (2002). Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. *Advanced Drug Delivered Reviews* 54: 1425-43.
107. Herrera, R.A.; Ferrer, R.L.; Furrázola, E. y Orozco, M.O. (1995). Estrategia de funcionamiento de las micorrizas V A en un bosque tropical. *Diversidad en Iberoamerica: Ecosistemas, Evolución y Procesos sociales* (M. Monasterio (Ed.). Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo. Subprograma XII, Diversidad Biológica, Mérida.

108. Hijri, M.; Redecker, D.; MacDonald-Comber Petetot, J. A.; Voigt, K.; Wöstemeyer, J. y Sanders Ian, R. (2002). Identification and isolation of two ascomycete fungi from spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Scutellospora castanea*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 4567-4573.
109. Hildebrandt, U.; Janetta, K. y Bothe, H. (2002). Towards growth of arbuscular mycorrhizal fungi independent of a plant host. *Applied Environmental Microbiology* 68: 1919-1924.
110. Hildebrandt, U.; Ouziad, F.; Marner, F.J. y Bothe, H. (2006). The bacterium *Paenibacillus validus* stimulates growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* up to the formation of fertile spores. *FEMS Microbiology Letters* 254: 258-267.
111. Hosny, M.; van Tuinen, D.; Jacquín, F.; Fuller, P.; Zhao, P.; Gianinazzi-Person, V. y Franken, P. (1999). Arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria: how to construct prokaryotic DNA-free genomic libraries from the Glomales. *FEMS Microbiology Letters* 170: 425-430.
112. Hung Chun-Hsiung, Peccia Jordan.; Zilles, J.L. y Noguera, D.R. (2002). Physical enrichment of polyphosphate-accumulating organisms in activated sludge. *Water Environmental Research*. 74: 354-361.
113. Jackson, M. L. (1970). Análisis químico de suelos. Edición Revolucionaria. Inst. del Libro. La Habana. p. 199-203.
114. Jargeat, P.; Cosseau, C.; Ola'h, B.; Jauneau, A.; Bonfante, P.; Batut, J. y Bécard, G. (2004). Isolation, Free-Living Capacities, and Genome Structure of "*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*," the Endocellular Bacterium of the Mycorrhizal Fungus *Gigaspora margarita*. *Journal of Bacteriology*. 6876-6884.
115. Jeffries, P. y Dodd, J. C. (1996). Functional ecology of mycorrhizal fungi in sustainable soil-plant systems. In *Mycorrhizas in integrated systems: from genes to plant development*. Edited by C. Azcón-Aguilar and J. M Barea. European Commission, Brussels. p. 497-501.
116. Jeffries, P.; Gianinazzi, S.; Perotto, S.; Turnau, K. y Barea, J.M. (2003). The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soils* 37: 1-16.
117. Jeffries, P. y Barea, J.M. (2011). Arbuscular mycorrhiza - a key component of sustainable plant-soil ecosystems. En: Hock, B. (ed) *The Mycota, vol IX. Fungal Associations*, 2nd edition. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
118. Johansson, J.F.; Paul, L.R. y Finlay, R.D. (2004). Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology* 48: 1-13.
119. Kämpfer, P.; Thummes, K.; Chu, H-I.; Tan, CH-CH.; Arun, A.; Chen, W-M.; Lai, W-A.; Shen, F-T.; Rekha, P. y Young, Ch-Ch. (2008). *Pseudacidovorax intermedius* gen. nov., sp. nov., a novel nitrogen-fixing betaproteobacterium isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 491-495.
120. Kämpfer, P. (2002). Taxonomy of Phosphate solubilizing bacteria. <http://webcd.usal.es/web/psm/abstracts.htm#arriba>
121. Kapuscinski, J. (1995). DAPI: a DNA-Specific fluorescent Probe. *Biotechnology Histochemistry* 70: 220-233.
122. Karnwal, A. (2009). Production of indole acetic acid by fluorescent *Pseudomonas* in the presence of L-tryptophan and rice root exudates. *Journal of Plant Pathology* 91: 61-63.
123. Kerney, R.; Kim, E.; Hangarter, R.; Heiss, A.; Bishop, C. y Hall, B. (2011). Intracellular invasion of green algae in a salamander host. *PNAS Early Edition*. Edited by David B. Wake, University of California, Berkeley. p. 1-6.
124. Khasa, D. Piche y Coughlan, A.P. (2009). *Avances in Micorrizal Science and Technology*. Co-published by CABI Publishing, (Ed) P.B. Cavers. Canadá.
125. Kluge, M.; Gehrig, H.; Mollenhauer, D.; Mollenhauer, R.; Schnepf, E. y Schübler, A. (1997). News on Geosiphon pyriforme, an endosymbiotic consortium of a fungus with a cyanobacterium. En: *Eukaryotism and Symbiosis*. H.E.A, Herrmann R, Jeon K.W, Müller N.E, Schwemmler W (eds). Springer-Verlag. p. 469-476.
126. Koneman, W.E.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Schreckenberger, P.C. y Tenover, W.C. (1997). *Color atlas and text book of diagnostic microbiology*. 171-252. Lippincott-Raven.
127. Kornberg, A. (1995). Inorganic Polyphosphate: Toward making a forgotten polymer unforgettable. *Journal of Bacteriology*. 491-496.
128. Kuhn, G.; Hijri, M. y Sanders, I.R. (2001). Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 414: 745-748.

129. Kulaev, I. S. (1979). The biochemistry of inorganic Polyphosphate. Chichester: Wiley.
130. Kulaev, I.S.; Vagabov, V.M.; Kulakovskaya, T.V.; Lichko, L.P.; Andreeva, N.A. y Trilisenko, L.V. (2000). The development of A.N. Belozersky's ideas in polyphosphate biochemistry. *Biochemistry* 65: 325-333.
131. Kurtzman, y Dien, (1998). *Candida arabinofementans*, a new L-arabinose fermenting yeast. *Antonie Van Leeuwenhoek* 74: 237-243.
132. Lalucat, J.; Bennasar, A. Bosch, R.; García-Valdés, E. y Palleroni, N.J. (2006). Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70: 510-547.
133. Lamhamendi, M.S.; Bernier, P.V. y Fortin, J.A. (1992). Growth, nutrition and response to water stress of *Pinus pinaster* inoculated with ten dikaryotic strains of *Pisolithus* sp. *Tree Physiology* 10: 153-167.
134. Lambers, H.; Mougél, C.; Jaillard, B. y Hinsinger, P. (2009). Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. *Plant and Soil* 321:83-115.
135. Lekberg, Y.; Hammer, E.C. y Olsson, P.A. (2010). Plants as resource islands and storage units – adopting the mycogenic view of arbuscular mycorrhizal networks. *FEMS Microbiology Ecology* 74: 336-345.
136. Levy, A.; Chang, B. J.; Abbott, L. K.; Kuo, J.; Harnett, G. y Inglis, T. J. J. (2003). Invasion of spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora decipiens* by *Burkholderia* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 6250-6256.
137. Linderman, R. G. y Paulitz, T. C. (1990). Mycorrhizal-rhizobacterial interactions. In *Biological Control of Soil-borne Plant Pathogens*. Ed. D Hornby. Wallington, CAB International. p. 261-283.
138. Linderman, R.G. (1992). Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. In *Mycorrhizae in Sustainable Agriculture*. Bethlenfalvay, G.J., and Linderman, R.G. (eds). Madison, WI, USA: American Society for Agronomy, p. 45-70.
139. Loiret, F. G. (2001). Caracterización fisiológica de dos Endófitos Diazotrofos de la Caña de Azúcar. Una posible nueva especie. Tesis de Maestría.
140. Lumini, E.; Ghignone, S.; Bianciotto, V. y Bonfante, P. (2006). Endobacteria or bacterial endosymbionts? To be or not to be. *New Phytologist* 170: 199-201.
141. Lynch, J. M. (1976). Products of soil-microorganisms in relation to plant growth. *CRC Critical Reviews in Microbiology* 5: 87-107.
142. MacDonald, R.M. y Chandler, M.R. (1981). Bacterium-like organelles in the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Molecular Ecology* 8: 37-45.
143. Maia, L. C. y Kimbrough, J. W. (1998). Ultrastructural studies of spores and hypha of a *Glomus* species. *International Journal of Plant Sciences* 159: 581-589.
144. Mansfeld-Giese, K.; Larsen, J. y Bødker, L. (2002). Bacterial populations associated with mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *FEMS Microbiology Ecology* 41: 133-140.
145. Margulis, L. y Chapman, M.J. (1998). Endosymbioses: cyclical and permanent in evolution. *Trends Microbiology* 6: 342-345.
146. Marschner, H. (1998). Role of root growth, arbuscular mycorrhiza, and root exudates for the efficiency in nutrient acquisition. *Field Crops Research* 56: 203-207.
147. Mayo, K.; Davis, R. E. y Motta, J. (1986). Stimulation of germination of spores of *Glomus versiforme* by spore-associated bacteria. *Mycology* 78: 426-431.
148. McAllister, C. B.; García-Romera, I.; Martín, J.; Godeas, A. y Ocampo, J. A. (1995). Interaction between *Aspergillus niger* van Tiegh. And *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe. *New Phytologist* 129: 309-316.
149. McCormack, P.J.; Wildman, H.G. y Jeffries, P. (1994). Production of antibacterial compounds by phylloplane-inhabiting yeasts and yeastlike fungi. *Applied Environmental Microbiology* 60: 927-931.
150. Melasniemi, H. y Hernesmaa, A. (2000). Yeast spores seem to be involved in biological phosphate removal: a microscopic *in situ* case study. *Microbiology* 146: 701-707.
151. Mertz, S.M; Heithaus, J.J; Bush, R.L. (1979). Mass production of axenic spores of the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Transactions of the British Mycology Society* 7: 167-169.
152. Meyer, J. R y Linderman, R.G. (1986)b. Selective influence on populations of rhizosphere or rhizoplane bacteria and actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum*. *Soil Biology and Biochemistry* 18: 191-196.

153. Meyer, J. R. y Linderman, R.G. (1986)a. Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and a plant growth-promoting bacterium, *Pseudomonas putida*. *Soil Biology and Biochemistry* 18: 185-190.
154. Mira, A. y Moran, N. A. (2002). Estimating population size and transmission bottlenecks in maternally transmitted endosymbiotic bacteria. *Microbiology Ecology* 44: 137-143.
155. Moose, B. (1970). Honey-coloured sessile *Endogone* spores. II. Changes in fine structure during spore development. *Archives of Microbiology* 74: 146-159.
156. Moran, N. A. y Wernegreen, J. J. (2000). Lifestyle evolution in symbiotic bacteria: insights from genomics. *Tree* 15: 321-326.
157. Morton, J. (1990). Species and clones of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes): their role in macro- and microevolutionary processes. *Mycotaxon* 37: 493-515.
158. Mosse, B. (1962). The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizal under aseptic conditions. *Journal of General Microbiology* 27: 509-520.
159. Mosse, B. (1956). Fructifications of an *Endogone* species causing endotrophic mycorrhiza in fruit plants. *Annals of Botany* 20: 349-362.
160. 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 Mycology Society* 42: 273-286.
161. Mosse, B. (1973). Advances in the study of va micorrhiza. *Annals of Review of Phytopathology* 11: 171-196.
162. Mugnier, J. y Mosse, B. (1987). Spore germination and viability of a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus mosseae*. *Transactions of the British Mycology Society* 88: 411-413.
163. Murray, R.G.E. (1963). Role of superficial structures in the characteristic morphology of *Lampropedia hyalina*. *Canadian Journal of Microbiology* 9: 593- 601.
164. Nair, M.G.; Safir, G.R. y Siqueira, J.O. (1991). Isolation and identification of vesicular arbuscular mycorrhiza-stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) rotos. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 434-439.
165. Nautiyal, C.S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170: 265- 270.
166. Nesmeyanova, M.A. (2000). Polyphosphates and Encimes of polyphosphate metabolism in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 65: 368-374.
167. Old, K. M.; Nicolson, T. H. y Redhead, J. F. (1973). A new species of mycorrhizal *Endogone* from Nigeria with a distinctive spore wall. *New Phytology* 72: 817-823.
168. Onda, S. y Takii, S. (2002). Isolation and characterization of a Gram-positive polyphosphate-accumulating bacterium. *Journal of General and Applied Microbiology* 48: 125-133.
169. Ortega, E. y Rodés, R. (1986). Desinfección de semillas. En: *Manual de Prácticas de Fisiología Vegetal*. Pueblo y Educación (Ed.). Cuba. p.191.
170. Paskevicius, A. (2001). Lipase activity of yeast and yeast like fungi functioning under natural conditions. *Biologija (Lithuania)* 4: 16-18.
171. Paulitz, T.C. y Linderman, R.G. (1989). Interactions between fluorescent pseudomonads and VA mycorrhizal fungi. *New Phytology* 113: 37-45.
172. Payró, E. (1998). Micorrización vesículo arbuscular en cultivos de raíces transformadas de *Daucus carota*. En: *Avances de la investigación micorrízica en México*. Eds. Universidad Veracruzana. p.127-230.
173. Perotto, S. y Bonfante, P. (1997). Bacterial associations with mycorrhizal fungi: close and distant friends in the rhizosphere. *Trends in Microbiology* 5: 496-501.
174. Perry, D. A. (1990). Species migration and ecosystem stability during climate change; the belowground connection. *Conservation Biology* 4: 266-274.
175. Persoh, D. y Rambold, G. (2002) Phacopsis— a lichenicolous genus of the family Parmeliaceae. *Mycological Progress* 1: 43-56.
176. Peyronel, B.; Fassi, B.; Fontana, A. y Trappe, J.M. (1969). Terminology of micorrizae. *Micología* 61: 410-411.
177. Phaff, H. J. (2002). ¿Como se reproducen las levaduras?
http://www.canal_h.net/webs/sgonzales002/Micologia/LEVADURAS.appt.htm

178. Piex, A. y Martínez-Molina, E. (2002). Molecular methods for biodiversity analysis of PBS <http://webcd.usal.es/web/psm/abstracts.htm#arriba>
179. Pinton, R.; Varanini, Z. y Nannipieri, P. (2001). The Rhizosphere. Biochemistry and Organic Substances at the Soil - Plant Interface. Marcel Dekker. New York. p. 263-297.
180. Pirozynski, K.A. y Malloch, D.W. (1975). The origin of land plants: a matter of mycotropism. *BioSystems* 6: 153-164.
181. Rambelli, A. (1973). The rhizosphere of mycorrhizae. In *Ectomycorrhizae: Their Ecology and Physiology*. Edited by G.L. Marks & T.T. Koslowski. Academic Press. New York. p. 299-343.
182. Ravnskov, S.; Nybroe, O. y Jakobsen, I. (1999). Influence of an arbuscular mycorrhizal fungus on *Pseudomonas fluorescens* DF57 in rhizosphere and hyphosphere soil. *New Phytologist* 142: 113-122.
183. Reis, V.M.; Paula, M.A. y Döbereiner, J. (1999). Ocorrência de micorrizas arbusculares e da bactéria diazotrófica *Acetobacter diazotrophicus* em cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária* 34: 1931-1941.
184. Renker, C.; Blanke, V.; Borstler, B.; Heinrichs, J. y Buscot, F. (2004). Diversity of *Cryptococcus* and *Dioszegia* yeasts (Basidiomycota) inhabiting arbuscular mycorrhizal roots or spores. *FEMS Yeast Research* 4: 597-603.
185. Reyes, I.; Louis, B.; Regis, R.; Simard, P. T. y Hani, A. (1999). Characteristic of phosphate solubilization by an isolate of a tropical *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiology Ecology* 28: 291-295.
186. Richardson A.E. (2001). Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Australian Journal of Plant Physiology* 28: 897-906.
187. Richardson, A.E.; Barea, J.M.; McNeill, A.M. y Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil* 321: 305-339.
188. Richardson, A.E. (2002). Making Microorganisms Mobilize soil Phosphorus. <http://webcd.usal.es/web/psm/abstracts.htm#arriba>
189. Rinaudo, V.; Barberi, P.; Giovannetti, M. y van der Heijden, M.G.A. (2010). Mycorrhizal fungi suppress aggressive agricultural weeds. *Plant and Soil* 333: 7-20.
190. Rivera, R.; Fernández, F.; Fernández, K.; Ruiz, L.; Sánchez, C. y Riera, M. (2007). Chapter 5. Advances in the Management of Effective Arbuscular Symbiosis in Tropical Ecosystems. En: *Mycorrhizae in Crop Productions*. Ed. Hamel, C. y Plenchette, C., p. 151-195.
191. Roesti, D.; Ineichen, K.; Braissant, O.; Redecker, D.; Wiemken, A. y Aragno, M. (2005). Bacteria associated with spores of arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus geosporum* and *Glomus constrictum*. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 6673-6679.
192. Romão, L. (2001). Microbiologia. Agar Nutriente. Sao Paulo. (<http://www.midavid.hpg.ig.com.br/microbiologia.html>)
193. Ruiz-Lozano, J.M. y Bonfante, P. (1999). Identification of a putative P-transporter operon in the genome of a *Burkholderia* strain living inside the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Journal of Bacteriology* 181: 4106-4109.
194. Ruiz-Lozano, J. M. y Bonfante, P. (2000). Intracellular *Burkholderia* of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* possesses the *vacB* gene, which is involved in host cell colonization by bacteria. *Microbiology Ecology* 39:137-144.
195. Sampedro, I.; Aranda, E.; Scervino, J.M.; Fracchia, S.; García-Romera, I.; Ocampo, J. A. y Godeas, A. (2004). Improvement by soil yeasts of arbuscular mycorrhizal symbiosis of soybean (*Glicine max*) colonized by *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* 14: 229-234.
196. Sattelmacher, B.; Gerendas, J.; Thoms, K.; Brück, H. y Bagdady, N.H. (1993). Interaction between root growth and mineral nutrition. *Environmental and Experimental Botany* 33: 63-73.
197. Schüßler, A.; Bonfante, P.; Schnepf, E.; Mollenhauer, D. y Kluge, M. (1996). Characterization of the *Geosiphon pyriformis* symbiosome by affinity techniques: confocal laser scanning microscopy (CLSM) and electron microscopy. *Protoplasma* 190: 53-67.
198. Schüßler, A. y Kluge, M. (2001). *Geosiphon pyriformis*, and endocytosymbiosis between fungus and cyanobacteria, and its meaning as a model system for arbuscular mycorrhizal research. In *The Mycota IX*. Hock, B. (ed.). Berlin, Germany: Springer Verlag, p. 151-161.
199. Schüßler, A.; Schwarzott, D. y Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105: 1413-1421.

200. Schüßler, A.; Mollenhauer, D.; Schnepf, E. y Kluge, M. (1994). *Geosiphon pyriformis*, an endosymbiotic association of fungus and cyanobacteria: the spore structure resembles that of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Botanica Acta* 107: 36-45.
201. Schüßler, C y Wolf, E. (2005). *Geosiphon pyriformis*—a Glomeromycotan Soil Fungus Forming Endosymbiosis with Cyanobacteria. *Soil Biology, Volume 4. In Vitro Culture of Mycorrhizas.* (ed. by S. Declerck). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 271-189.
202. Schüßler, A y Walker, C. (2011). Evolution of the 'Plant-Symbiotic' Fungal Phylum, Glomeromycota. *Evolution of Fungi and Fungal-Like Organisms, The Mycota XIV.* S. Pöggeler and J. Wöstemeyer (Eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. P. 163-185.
203. Sidat, M. y Kasan, H.C. (1999). Polyphosphate accumulation by bacteria isolated from activated sludge. ISSN 0378-4738 = Water SA Vol. 25 <http://www.wrc.org.za>
204. Siddiqui, I. A. y Shaukat, S.S. (2002). Mixtures of plant disease suppressive bacteria enhance biological control of multiple tomato pathogen. *Biology and Fertility of Soils* 36: 260-268.
205. Silva, F. y Vidor, C. (2000). Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. *Revista Brasileira de Ciencia de Solo* 24: 311-319.
206. Selvakumar, G.; Kundu, S.; Joshi, P.; Nazim, S.; Gupta, A.D; Mishra, P.K. y Gupta, H.S. (2008). Characterization of a cold-tolerant plant growth-promoting bacterium *Pantoea dispersa* 1A isolated from a sub-alpine soil in the North Western Indian Himalaya. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 24: 955-960.
207. Siqueira, J.O.; Sylvia, D.M.; Gibson, J. y Hubbell, D.H. (1985). Spores, germination, and germ tubes of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Microbiology* 31: 965-972.
208. Smith, S.E. y Read, D.J. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis* 3rd ed.: Elsevier, Academic Press. New York.
209. Soderberg, K.H.; Olsson, P.A. y Baath, E. (2002). Structure and activity of the bacterial community in the rhizosphere of different plant species and the effect of arbuscular mycorrhizal colonisation. *FEMS Microbiology Ecology* 40: 223-231.
210. Solaiman, M.Z e Hirata, H. (1995). Effects of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi on rice growth and N, P, K nutrition under different water regimes. *Soil Science and Plant Nutrition* 41: 505-514.
211. Sommer, R. (1996). Yeast Extracts Production, Properties and Components. Trabajo presentado en: 9th International Symposium on Yeast Sydney.
212. Stante, L.; Cellamare, C.M.; Malaspina, F.; Bortone, G. y Tilche, A. (1997). Biological phosphorus removal by a pure culture of *Lamprospedia spp.* *Water Research* 31: 1317-1324.
213. St-Arnaud, M. y Vujanovic, V. (2007). Effect of the arbuscular mycorrhizal symbiosis on plant diseases and pests. In *Arbuscular mycorrhizae in crop production*. Edited by C. Hamel y C. Plenchete. Haworth Press, Binghamton, N.Y. p.67-122.
214. Strullu, D.G. (1991). *Les mycorrhizes des arbres et plantes cultivées. Technique et Documentation.* Lavoisier. Paris.
215. Strullu, D.G. y Romand, C. (1986). Méthode d'obtention d'endomycorhizes à vésicules et arbuscules en conditions axéniques. *Comptes Rendus de l'Académie des sciences. Série 3, Science de la vie* 303: 245-250.
216. Strzelczyk, E. y Pokojska-Burdziej, A. (1984). Production of auxins, gibberellin-like substances by mycorrhizal fungi, bacteria and actinomycetes isolated from soil and the mycorrhizosphere of pine (*Pinus silcesfri*). *Plant and Soil* 81: 185-194.
217. Sward R. J. (1981). The structure of the spore of *Gigaspora margarita*. I. The dormant spore. *New Phytology* 87: 761-768.
218. Sward, R. J.; Hallam, N. D. y Holland, A. A. (1978). *Endogone* spores in a heathland area of southeastern Australia. *Australian Journal of Botany* 26: 29-43.
219. Tandoi, V.; Blackall, L.; Caravaglio, N. y Duranti, F. (1990). Isolamento ed identificazione di specie batteriche fosforo accumulanti e di attinomiceti produttori di schiume. *Istituto di Ricerca sulle Acque, Rapporti Tecnici.* 131.
220. Tejera, N. A.; Ortega, E.; González-López, E. y Lluch, C. (2003). Effect of some abiotic factors on the biological activity of *Gluconoacetobacter diazotrophicus*. *Journal of Applied Microbiology* 95: 528-535.
221. Tilak, K.V.B.R.; Li, C.H. y H.O. I. (1989). Occurrence of nitrogen fixing *Azospirillum* in a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 116: 286-288.
222. Timan, K.V. (1969). The auxins. En: *Physiology of Plant Growth and Development.* M.B Wilkins ed. McGraw-Hill, Londres. p.695.

- 223.
224. Tommerup, I.C. y Kidby, D.K. (1980). Production of aseptic spores of vesicular arbuscular endophytes and their viability after chemical and physical stress. *Applied and Environmental Microbiology* 39: 1111-1119.
225. Trimble, M.R. y Knowles, N.R. (1995). Influence of VAM and phosphorus on growth, carbohydrate partitioning and mineral nutrition of greenhouse cucumber (*Cucumis sativus* L.) plant during establishment. *Canadian Journal of Microbiology* 75: 239-250.
226. Tylka, G. L.; Hussey, R. S. y Roncadori, R. W. (1991). Axenic germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi effects of select *Streptomyces* species. *Phytopathology* 81: 754-759.
227. Van Aarle, I.M.; Olsson, P.A.; y Soderstrom, B. (2002). Arbuscular Mycorrhizal fungi respond to the substrate pH of their extraradical mycelium by altered growth and root colonization. *New Phytologist* (155).
228. Van Buuren, M. L.; Lanfranco, L.; Longato, S.; Minerdi, F.; Harrison, J. y Bonfante, P. (1999). Construction and characterization of genomic libraries of two endomycorrhizal fungi: *Glomus versiforme* and *Gigaspora margarita*. *Mycology Research* 103: 955-960.
229. Vancura, V. (1986). Microbial interaction in the soil. In: Physiological and geentical aspects of mycorrhizae, eds. Gianinazzi-Pearson, V. and Gianinazzi, S., eds. INRA publishing servise, Versailles, p. 189-196.
230. Varma, A. y Hock, B. (1998) *Mycorrhiza. Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*, 2nd edn. Springer, Berlin.
231. Vazquez, M. M.; César, S.; Azcón, R. y Barea, M. (2000). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Applied Soil Ecology* 15: 261-272.
232. Velazco, A.; Fernández, F.; Furrázola, E. y Herrera, R. (1993). Presencia de *Acetobacter diazotrophicus* en esporas de la familia Endogonaceae. *Cultivos Tropicales* 14: 25-27.
233. Vessey, J.K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizer. *Plant and Soil* 255: 571-586.
234. Vidal, M.T.; Azcon Aguilar, C.; Barea, J.M. y Pliego-Alfaro, F. (1992). Mycorrhizal inoculation enhances growth and development of micropropagated plants an avocado. *Hort Science* (27)7: 785-787.
235. Vidal-Dominguez, M. T. (1991). Contribución al estudio de los factores que influncian el crecimiento 'in vitro' de hongos de las micorrizas VA y su establecimiento en plantas micropropagadas. Ph.D. Thesis, University of Granada, Spain.
236. Villegas, J. y Fortin, J. A. (2001). Phosphorus solubilisation and pH changes as a results of the interactions between soil bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on a medium containing NH_4^+ as nitrogen source. *Canadian Journal of Microbiology* 79: 865-870.
237. Villegas, J. y Fortin, J. A. (2002). Phosphorus solubilisation and pH changes as a results of the interactions between soil bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on a medium containing NO_3^- as nitrogen source. *Canadian Journal of Microbiology* 80: 571-576.
238. Vishniac, H.S. y Kurtzman, C.P. (1992). *Cryptococcus antarcticus* sp. nov. and *Cryptococcus albidosimilis* sp. nov., basidioblastomycetes from Antarctic soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary* 42: 547-553.
239. Von Bodman, S. B; Bauer, W.D.; Coplin, D.L. (2003). Quorum sensing in plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 41:455-482.
240. Walley, F. y Germida, J. (1996). Failure to decontaminate *Glomus clarum* NT4 spores is due to spore wall-associated bacteria. *Mycorrhiza* 6: 43-49.
241. Warcup, J. H. (1985). Ectomycorrhiza formation by *Glomus tubiforme*. *New Phytology* 99: 267-272.
242. Wen, A.; Fegan, M.; Hayward, C.; Chakraborty, S. y Sly, L. (1999). Phylogenetic relationships among members of the *Comamonadaceae*, and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tamaoka *et al.* 1987) gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49: 567-576.
243. White, T.J.; Bruns, T.D.; Lee, S.B. y Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelgand DH, White T (eds) *PCR protocols, a guide to methods and applications*. Academic, San Diego, CA, p. 315-322.

244. Wilson, G. W. T.; Hetrick, B. A. D. y Kitt, D. G. (1989). Suppression of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus spore germination by non-sterile soil. *Canadian Journal of Microbiology* 67: 18-23.
245. Wolfgang, M.C.; Kulasekara, B. R.; Liang, X.; Boyd, D.; Wu, K.; Yang, Q.; Garret Miyada, C. y Lory, S. (2003). Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolated of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Science* 100: 8484-8489.
246. Wortman, P.D. (1993). Treatment of a *Nocardia brasiliensis* Mycetoma with Sulfamethoxazole and Trimethoprim, Amikacin, and Amoxicillin and Clavulanate. *Archives of Dermatology* 129: 564-567.
247. Xavier, Lisette. J.C y Germida, James. J. (2003). Bacteria associated with *Glomus clarum* spores influence mycorrhizal activity. *Soil Biology and Biochemistry* 35: 471-478.
248. Yamamura, N. (1997). Diversity and evolution of symbiotic interactions. In T. Abe, S. A. Levin, and M. Higashi (ed.), *Biodiversity: an ecological perspective*. Springer, New York, N.Y. p. 75-82.
249. Zacchi, L.; Vaughan-Martini, A. y Angeline, P. (2003). Yeast distribution in a truffle-field ecosystem. *Annals Microbiology* 53: 275-282.