



Universidad de La Habana
Facultad de Biología



Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas
Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas

Establecimiento de un sistema eficiente de micorrización *in vitro* de plántulas de *Solanum tuberosum* L. y *Medicago truncatula* Gaertn.

Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Biológicas

Autor: Lic. Kalyanne Fernández Suárez, MSc

Tutor: Dr. C. Loiret Fernández García

Asesores: Dr. C. Eduardo Ortega Delgado

Dr. C. Stéphane Declerck

La Habana
2012

“The important thing in science is not so much to obtain new facts as to discover new ways of thinking about them.”

William Bragg

A Klaudia y Markos Daniel, por su existencia

A Moiset, por el amor y la confianza

Citación correcta

Estilo Apellido, año

Fernández Suárez, Kalyanne. 2012. Establecimiento de un sistema eficiente de micorrización *in vitro* de plántulas de *Solanum tuberosum* L. y *Medicago truncatula* Gaertn [Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Biológicas] La Habana: Universidad de La Habana, Facultad de Biología. 118 p.

Estilo Numérico

Fernández Suárez, Kalyanne. Establecimiento de un sistema eficiente de micorrización *in vitro* de plántulas de *Solanum tuberosum* L. y *Medicago truncatula* Gaertn [Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Biológicas] La Habana: Universidad de La Habana, Facultad de Biología, 2012. 118 p.

LISTADO DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
CH	Compartimento hifal
CR	Compartimento radical
CT	Compartimento del tallo
DAM	Disco adhesivo de microfiltración
Diám.	Diámetro
ERA	Estructuras ramificadas de absorción
M	Medio Mínimo
Min.	Minutos
MS	Murashige y Skoog
PDM	Planta donante de micelio
RME	Redes de micelio extrarradical
SA-PIV	Sistema autotrófico parcialmente <i>in vitro</i>
SA-TIV	Sistema autotrófico totalmente <i>in vitro</i>
SRM	Strullu y Roman modificado

SÍNTESIS

Contar con un sistema de cultivo *in vitro* que garantice la micorrización rápida, homogénea y eficiente de las plantas es actualmente una necesidad y un reto para la comunidad científica. Teniendo en cuenta esta premisa se realizaron un grupo de experimentos encaminados a desarrollar tal sistema. Se estudiaron diferentes medios, sistemas de cultivo y fuentes de inoculante y se evaluó además, la funcionalidad de la simbiosis en condiciones *in vitro*, a través del transporte de K utilizando ^{86}Rb como trazador. El micelio extrarradical de *Glomus intraradices* proveniente de una planta donante resultó ser la mejor fuente de inóculo para obtener plántulas de *S. tuberosum* y *M. truncatula* micorrizadas de forma acelerada, eficiente y homogénea. En el sistema de Planta Donante de Micelio (PDM) se alcanzaron altos niveles de colonización (55% en *S. tuberosum* y 80% en *M. truncatula*), a solo 12 días de haberse asociado las plántulas con la red de micelio extrarradical, lo cual no había sido obtenido con anterioridad. Estas plántulas fueron capaces de reproducir la colonia fúngica cuando se trasplantaron a medios frescos y producir un abundante número de estructuras extrarradicales (micelio y esporas). Se demostró además, la funcionalidad de la asociación Hongo Micorrizógeno Arbuscular – planta en condiciones *in vitro*, al ser *G. clarum* y *G. intraradices* capaces de absorber, transportar y translocar ^{86}Rb a plantas de *M. truncatula*, indicando así la participación de estos hongos en la adquisición y translocación de K a las plantas.

I. INTRODUCCIÓN

Durante 400 millones de años de interacción genoma-genoma, las plantas y los Hongos Micorrizógenos Arbusculares (HMA) se transformaron en organismos altamente interdependientes, tanto ecológica como fisiológicamente (Schuëler & Walker, 2011). Como resultado de esta dependencia, los HMA se convirtieron en biotrofos obligados, por lo que no pueden completar su ciclo de vida en ausencia de una planta hospedera (Brundrett, 2009); de ahí que la diferenciación de una micorriza funcional sea un proceso complejo que demanda la participación de ambos organismos (Bécard *et al.*, 2004).

La capacidad de los HMA de aumentar el crecimiento y la sobrevivencia de las plantas ha despertado el interés de los científicos en todo el mundo. En la actualidad se ha potenciado el uso de estos microorganismos como sustitutos de fertilizantes químicos y plaguicidas, en armonía con el desarrollo de prácticas de producción agrícola sostenible (Brundrett, 2009). No obstante, los estudios fisiológicos relacionados con esta simbiosis se dificultan considerablemente debido a la condición de simbiosis obligados que caracteriza a los hongos que intervienen en la asociación, lo cual, hasta el momento, hace imposible su crecimiento en condiciones axénicas (Ijdo *et al.*, 2010).

Por su parte, los sistemas de cultivo *in vitro* de raíces han contribuido a lograr numerosos avances en el conocimiento de la interacción HMA-planta (Bécard & Fortin, 1988 y Fortin *et al.*, 2002); sin embargo, la falta de tejido fotosintético activo y por tanto, la ausencia de un balance hormonal normal y de las relaciones fisiológicas típicas entre fuente y sumidero (Fortin *et al.*, 2002), limitan el alcance de dichos sistemas (Declerck *et al.*, 2005). Por esas razones, muchos de los resultados fisiológicos y bioquímicos que se obtienen por esta vía son recibidos con escepticismo.

En la actualidad, la necesidad de desarrollar sistemas que incluyan la planta completa es un reto y se han diseñado algunas metodologías con mayor o menor éxito (Elmeskaoui *et al.*, 1995; Voets *et al.*, 2005; Dupré de Boulois *et al.*, 2006 y Cano *et al.*, 2008) y con diferentes propósitos. La mayoría han estado dirigidas a la producción masiva de inóculo micorrízico; y aunque en algunos casos se

han obtenido un alto número de esporas (Voets *et al.*, 2005 y Dupré de Boulois *et al.*, 2006), las plantas involucradas no son aptas para ser trasplantadas debido al prolongado tiempo de cultivo y a la baja concentración de nutrientes de los medios utilizados.

Al diseñar sistemas de micorrización de plantas es necesario tener en cuenta que los medios empleados para establecer la micorrización *in vitro* sobre cultivos de raíces pueden ser no idóneos para la micorrización de plantas completas, pues éstos involucran a organismos con diferentes requerimientos nutricionales (Bressan, 2002). El cultivo *in vitro* de HMA en asociación con raíces se realiza en medios con una concentración relativamente baja de nutrientes (Bécard & Fortin, 1988; Declerck *et al.*, 1998 y Bressan, 2002), mientras que para la micropropagación de plantas se utilizan medios con concentraciones relativamente altas, como el MS (Murashige & Skoog). Por esa razón es necesario encontrar un medio balanceado, que permita tanto el crecimiento de las plantas como el establecimiento de la asociación micorrízica arbuscular *in vitro* (Bressan, 2002).

Bajo condiciones *in vitro*, los cultivos de raíces o de plantas son usualmente inoculados con esporas aisladas, fragmentos de raíces mostrando recrecimiento micelial o una combinación de ambos (Voets *et al.*, 2005; Declerck *et al.*, 2005 y Dupré de Boulois *et al.*, 2006). Por lo general se utilizan esporas pertenecientes al género *Glomus* (Ijdo *et al.* 2010), debido a su alto grado de eficiencia y competitividad, además de su rápida germinación, crecimiento y colonización. No obstante, en la naturaleza, el micelio proveniente de raíces micorrizadas también representa una importante fuente de inóculo para la colonización de plantas vecinas, debido a la gran cantidad de ápices con capacidad infectiva que se ramifican de la colonia (Friese & Allen, 1991 y Giovannetti *et al.*, 2004). Sin embargo, el micelio micorrízico arbuscular unido físicamente a una planta donante no ha sido utilizado hasta la fecha como fuente de inóculo para micorrizar plántulas *in vitro*.

Por otra parte, las condiciones heterotróficas en las que usualmente se producen las vitroplantas provocan desórdenes morfofisiológicos que reducen su capacidad adaptativa y de respuesta ante diferentes tipos de estrés, ya sean bióticos o abióticos (Nowak & Shulaev, 2003 y Hazarika, 2006).

Por tal motivo, en los últimos años se ha considerado la posibilidad de introducir inoculantes microbianos, como los hongos micorrizógenos, durante la fase *in vitro* de la micropropagación, como una alternativa para “preparar” las plantas desde esta fase, a enfrentar el estrés ocasionado durante el trasplante (Rai, 2001; Nowak & Shulaev, 2003 y Hazarika, 2006). Sin embargo, hasta el momento no existe un sistema que permita la introducción de los HMA en las prácticas convencionales de producción de plantas *in vitro* que posibilite hacer realidad esta alternativa. Por tanto, actualmente es un desafío diseñar un sistema de micorrización *in vitro* de plantas, que permita el establecimiento de una simbiosis funcional y garantice la obtención de plantas micorrizadas de forma rápida y eficiente, con capacidad de reproducir la colonia fúngica al ser trasplantadas a nuevos medios.

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos se propone la siguiente hipótesis de trabajo:

Hipótesis: La colonización de plántulas *in vitro* con hongos micorrizógenos arbusculares, en un corto periodo de tiempo y el establecimiento eficiente de la simbiosis micorrízica se garantizan variando la composición nutricional de los medios, los sistemas de cultivo y el tipo de inoculante.

Objetivo general

Desarrollar un sistema de cultivo *in vitro* que permita el estudio de la interacción Hongo Micorrizógeno Arbuscular - planta y la producción de plántulas micorrizadas de *S. tuberosum* L. y *Medicago truncatula* L. con utilidad práctica.

Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la micorrización *in vitro* con esporas de *G. clarum* en el crecimiento de plántulas de *S. tuberosum* L. cv. Desirée, en dos sistemas autotróficos parcialmente *in vitro*, utilizando diferentes medios de cultivo.
2. Demostrar las potencialidades del micelio extrarradical de HMA para colonizar plántulas de *S. tuberosum* L. cv. Desirée y *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong en un periodo corto de tiempo, con capacidad de reproducir la colonia fúngica en nuevos medios.

3. Demostrar la funcionalidad de la simbiosis en condiciones autotróficas de cultivo *in vitro* en el modelo *M. truncatula* Gaertn. cv. Jemalong, a través del transporte de potasio, utilizando ^{86}Rb como trazador.

Novedad científica

Se proponen las bases para el desarrollo de un sistema novedoso y eficaz de micorrización de plantas *in vitro*, utilizando por vez primera las redes de micelio extrarradical como fuente de inóculo. Se demuestra la posibilidad de producir, de forma rápida y homogénea, plántulas micorrizadas de *Solanum tuberosum* L. y *Medicago truncatula* Gaertn., aptas para ser trasplantadas a nuevos medios y reproducir eficientemente la colonia fúngica. Además, se demuestra la capacidad del micelio de *Glomus clarum* y *G. intraradices* de absorber y transportar rubidio, en condiciones de cultivo *in vitro*, a su planta hospedera. Esto permite asumir que la simbiosis micorrízica arbuscular en condiciones *in vitro* es funcional y que ambas especies de HMA son capaces de absorber y transportar potasio, lo cual no había sido demostrado con anterioridad.

Importancia teórica

Se enriquecen los conocimientos actuales relacionados con la interacción Hongo Micorrizógeno Arbuscular - planta en condiciones *in vitro*. Se demuestran las potencialidades de las redes de micelio extrarradical como inóculo para la micorrización *in vitro* de plántulas de *S. tuberosum* y *M. truncatula* de forma rápida y homogénea, en lugar de las esporas, usualmente utilizadas como inoculante en condiciones *in vitro*. Se aportan evidencias que indican que el K es transportado por las hifas extrarradicales de los HMA y que estos hongos participan en la adquisición de K por las plantas.

Importancia práctica

El sistema de micorrización *in vitro* a partir de una planta donante de micelio representa una herramienta potencial de gran aplicación en numerosos estudios fisiológicos, bioquímicos y moleculares relacionados con la interacción Hongo Micorrizógeno Arbuscular - planta. El sistema

logrado constituye la base para el desarrollo de nuevos sistemas que permitan la introducción de los HMA en las prácticas actuales de producción vegetal y la obtención de plántulas de diferentes especies, eficientemente micorrizadas *in vitro*, las cuales probablemente estarán más aptas para enfrentar el estrés que representa la adaptación a las condiciones edafoclimáticas. Este sistema también puede ser utilizado para la producción masiva de inóculo micorrízico de alta pureza (ej. biorreactores).

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Los Hongos Micorrizógenos Arbusculares (HMA) y su significación para las plantas

Las micorrizas son asociaciones mutualistas altamente evolucionadas que se establecen entre determinados hongos del suelo y las raíces de las plantas. Los individuos involucrados son hongos pertenecientes a los Phyla Glomeromycota, Ascomycota y Basidiomycota y la mayoría de las plantas vasculares (Smith & Read, 1997).

Existen al menos siete tipos de asociaciones micorrízicas reconocidas que incluyen diferentes grupos de hongos y plantas hospederas con variados patrones morfológicos (Brundrett, 2009).

Todas estas asociaciones varían ampliamente en estructura y función pero la asociación más común es la endomicorrízica arbuscular, la cual involucra a más del 80 % de las plantas terrestres incluyendo Briophytas, Pteridophytas, Gimnospermas y Angiospermas (Harrier, 2001). Sólo un pequeño número de plantas pertenecientes a las familias *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae*, *Chenopodiaceae* o *Urticaceae* no son micorrízicas (Vierheilig *et al.*, 1996 y Smith & Read, 1997).

Los HMA son parte integral de numerosos ecosistemas y se consideran particularmente ventajosos para las plantas que crecen en zonas tropicales, en las cuales los nutrientes se reciclan rápidamente y están presentes en bajas concentraciones (Parniske, 2004 y Gianinazzi *et al.*, 2010). Entre hongos y plantas se establece una simbiosis mutualista, altamente interdependiente (Paszkowski, 2006), que confiere beneficios directos a las plantas hospederas vinculados principalmente con la nutrición mineral, las relaciones con el agua y la resistencia a estreses bióticos y abióticos; y a cambio provee al hongo de carbohidratos y lípidos (Parniske, 2004 y Fitter, 2006).

Se ha estimado mundialmente que cerca de cinco billones de toneladas de carbono (C) son transferidas cada año desde las plantas a los HMA a través de la simbiosis (Bago *et al.*, 2000) y que la biomasa total de Glomeromycota es de 1,4 Pg (Treseder & Cross, 2006), comparada con la estimación global de la biomasa microbiana que es de 13,9 Pg (Wardle, 1992).

La clasificación taxonómica de los HMA ha sufrido numerosas modificaciones desde su primera descripción en 1842 (Nägeli, 1842), según Koide & Mosse (2004). La clasificación más reciente publicada por Schüßler & Walker (2011) se muestra a continuación:

Phylum Glomeromycota		
Clase Glomeromycetes		
Órdenes (4)	Familias (11)	Géneros (18)
Glomerales	<i>Glomeraceae</i>	<i>Glomus</i> <i>Funneliformis</i> <i>Rhizophagus</i> <i>Sclerocystis</i>
	<i>Claroideoglomeraceae</i>	<i>Claroideoglomus</i>
Diversisporales	<i>Diversisporaceae</i>	<i>Redeckera</i> , <i>Diversispora</i> , <i>Otospora</i>
	<i>Acaulosporaceae</i>	<i>Acaulospora</i>
	<i>Entrophosporaceae</i>	<i>Entrophospora</i>
	<i>Gigasporaceae</i>	<i>Gigaspora</i> , <i>Scutellospora</i> , <i>Racocetra</i>
	<i>Pacisporaceae</i>	<i>Pacispora</i>
Archaeosporales	<i>Geosiphonaceae</i>	<i>Geosiphon</i>
	<i>Ambisporaceae</i>	<i>Ambispora</i>
	<i>Archaeosporaceae</i>	<i>Archaeospora</i>
Paraglomerales	<i>Paraglomeraceae</i>	<i>Paraglomus</i>

2.1.1. Su carácter de simbioses obligados

El origen de la simbiosis micorrízica arbuscular se remonta al periodo Ordovícico (Redecker *et al.*, 2000), hace más de 450 millones de años. La existencia de estructuras fósiles sugiere, no sólo que la simbiosis micorrízica arbuscular ha evolucionado conjuntamente con las plantas terrestres, sino que ésta existía mucho antes de que las estructuras radicales hubiesen evolucionado completamente y que los hongos “Glomales” se hallaban en la Tierra antes que surgieran las primeras plantas con semillas (Gimnospermas) (Redecker *et al.*, 2000 y Remy *et al.*, 1994), por lo que algunos consideran que fueron un “instrumento” que las plantas utilizaron para colonizar la tierra (Barker & Larkan, 2002). Esta simbiosis es también considerada la más antigua, en comparación con otras

asociaciones planta - hongo, exceptuando los líquenes. El hecho de que las plantas hayan coevolucionado con los hongos micorrizógenos arbusculares explica fácilmente la amplia distribución de esta simbiosis, no sólo dentro del Reino Plantae, sino en los ecosistemas de manera global (Hause & Fester, 2005).

Por otra parte, la existencia en la actualidad de familias de plantas que no se micorrizan (Fitter & Moyersoen, 1996), o incluso que la condición micorrízica se haya perdido a lo largo de la evolución con la sola mutación de un gen, demuestra que la ocurrencia de la micorrización en las plantas es la regla y no la excepción (Smith & Read, 1997). Esto sugiere que la simbiosis micorrízica arbuscular (u otras menos antiguas como las micorrizas ericoides y ectomicorrizas) es de vital importancia para la supervivencia de las plantas en los ecosistemas naturales (Selosse & Le Tacon, 1998 y Barker & Larkan, 2002).

Debido a su carácter de simbioses obligados, los HMA no pueden completar su ciclo de vida en ausencia de una raíz hospedera, aunque los compuestos indispensables que requieren de las raíces aún no han sido totalmente identificados (Hildebrandt *et al.*, 2002). Uno de los principales factores que explica su condición de biotrofos obligados es el metabolismo o la absorción de carbono en el estadio presimbótico (Azcón-Aguilar *et al.*, 1998), debido al hecho de que las hifas extrarradicales de estos hongos son incapaces de absorber carbohidratos (Douds *et al.*, 2000).

2.1.2. Establecimiento simbiótico

La comunicación entre los simbioses comienza antes de cualquier contacto físico entre hongos y plantas. Los factores radicales liberados por el hospedero, conocidos como proteínas, CO₂, flujo de protones extracelulares y estrigolactonas (Akiyama *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2006 y Besserer *et al.*, 2006), son reconocidos por receptores específicos en la membrana plasmática del hongo (Lambais, 2006 y Requena *et al.*, 2007). Estos factores disparan una cascada de transducción de señales que involucran, desde la activación de genes simbióticos específicos del hongo, hasta las respuestas de

las raíces al percibir la hifa y activar la expresión de genes específicos de la interacción responsables de la simbiosis (Kosuta *et al.*, 2003 y Ramos *et al.*, 2008).

Como en otros sistemas biotróficos la penetración de las células de la planta hospedera ocurre sin dañar su integridad, a través de la invaginación de las paredes del plasmalema, mediante procesos mecánicos y enzimáticos bien localizados y controlados; lo cual evidencia una integración perfecta (alta compatibilidad) entre estos dos organismos (Siqueira & Franco, 1988 y Mohammadi *et al.*, 2008).

Bonfante & Perotto (1992) sugirieron tres fases o estadios del establecimiento simbiótico: germinación de las esporas y crecimiento hifal, estimulación del crecimiento hifal e inicio del proceso de colonización y desarrollo fúngico intracelular con formación de arbusculos.

La germinación de esporas de HMA es un proceso complejo que está influido por diversos factores, dentro de los que se encuentran: dormancia y almacenamiento, pH, temperatura, humedad, luz, aereación (oxígeno, CO₂), iones inorgánicos, otros factores nutricionales (carbohidratos, ácidos orgánicos, aminoácidos), microorganismos, agentes oxidantes, antibióticos y pesticidas (Siqueira *et al.*, 1985). Otras investigaciones más recientes reconocen también a los exudados radicales como estimuladores de la germinación de esporas (Suriyapperuma & Koske, 1995 y Khasa *et al.*, 2009) y el crecimiento hifal presimbiótico (Pinior *et al.*, 1999 y Buée *et al.*, 2000).

2.1.3. Transporte de nutrientes entre los simbioses

La nutrición en las micorrizas arbusculares está basada en la adquisición de nutrientes del suelo por el hongo (George *et al.*, 1995 y Jakobsen, 1999), la fijación de carbono atmosférico por parte de la planta (Bago *et al.*, 2002) y el intercambio de estos nutrientes en una interfase simbiótica (Figura 1), especialmente adaptada (Gianinazzi-Pearson, 1991 y Smith & Read, 1997), llamada matriz de intercambio. Cuando se alcanza el estadio simbiótico entre el HMA y la planta, el carbono derivado de la planta es tomado por el micelio intrarradical y translocado al micelio extrarradical, mientras

que los nutrientes minerales, especialmente fósforo, son tomados por el micelio extrarradical, distribuidos dentro de éste y translocados hasta el micelio intrarradical.

El fósforo es un nutriente mineral limitante del crecimiento de las plantas en muchos ecosistemas naturales y agrícolas, debido a su poca solubilidad y los HMA pueden transportarlo desde reservorios distantes a las plantas, extendiendo el alcance de las raíces. Smith *et al.* (2003) demostraron que las raíces micorrizadas reducen la actividad de su propio sistema de absorción de fósforo y se valen sólo de su simbionte micorrízico para la absorción del elemento. Los genes que codifican para los transportadores involucrados en la absorción de fósforo desde el medio externo hacia las hifas de HMA ya han sido clonados en *Glomus versiforme* (Harrison & van Buuren, 1995) y *G. intraradices* (Maldonado-Mendoza *et al.*, 2001).

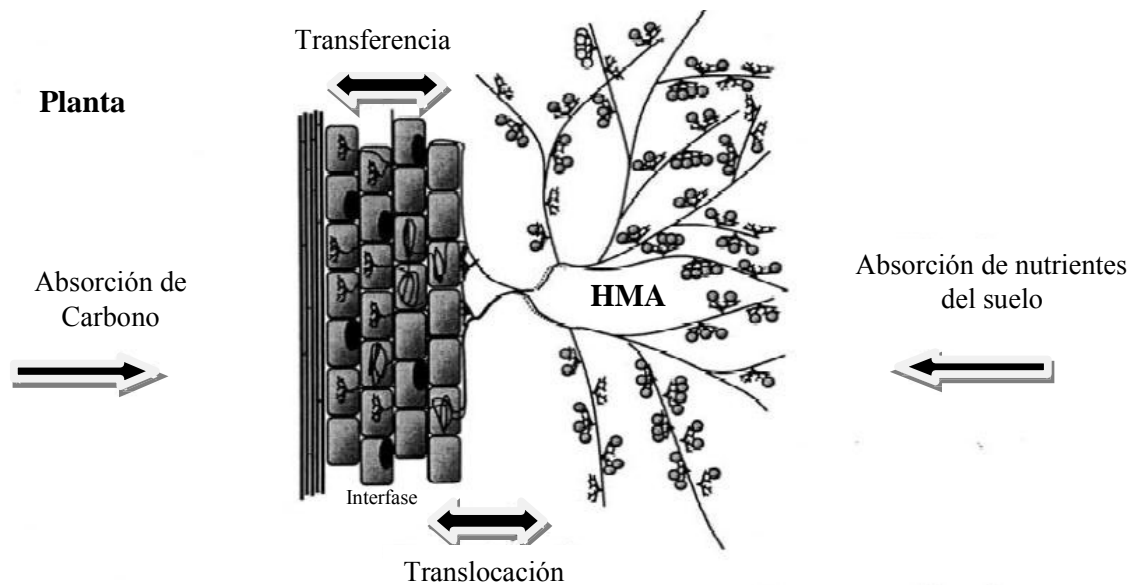


Figura 1. Principales procesos de transporte que ocurren en la simbiosis micorrízica arbuscular (modificado de Bago *et al.*, 2002).

En el caso de los nitratos, los HMA juegan un papel mucho más activo comparado con los fósforos, debido a que estos hongos son capaces de liberar nitratos de materiales orgánicos complejos en el suelo (Hodge *et al.*, 2001). Se han encontrado algunas proteínas involucradas en el transporte de nitratos en las raíces micorrizadas, dentro de ellas un transportador de nitrato con elevado nivel de

transcripción (Hildebrandt *et al.*, 2002). Por otra parte, en *G. intraradices* se ha clonado un gen que codifica para una nitrato reductasa que sólo se expresa en raíces micorrizadas y pudiera estar involucrada también en la transferencia de nitrógeno (Kaldorf *et al.*, 1998).

Esta especialización funcional para el transporte, basada en estos dos ejemplos, implica que el HMA posee un sistema de transferencia bidireccional de grandes cantidades de nutrientes a largas distancias (Smith *et al.*, 2001 y van Aarle & Olsson, 2008). Según van Aarle & Olsson (2008), la translocación de carbono y de nutrientes minerales como el P, debe ocurrir a través de diferentes sistemas. La mayor parte de los esqueletos carbonados son translocados en cuerpos lipídicos y posiblemente por vesículas ácidas, mientras que el P es translocado a grandes distancias en un sistema de vacuolas tubulares. Otra parte del transporte de ambos nutrientes puede ocurrir a través del flujo citoplasmático o por flujo de masa. La existencia de diferentes mecanismos para la translocación es un indicador de la vitalidad de las hifas y responde a la disponibilidad de nutrientes y otros factores externos (van Aarle & Olsson, 2008).

2.1.3.1. El transporte de potasio

Dentro de los nutrientes más estudiados relacionados con la absorción, translocación y transferencia hacia las plantas, a través de las hifas de los HMA, se encuentran el P (Karandashov & Bucher, 2005) y el N (Govindarajulu *et al.*, 2005), mientras que el K no ha recibido similar atención por parte de los investigadores; de ahí que la capacidad de los HMA para transportar este elemento aún no haya sido categóricamente demostrada (Dupré de Boulois, 2007).

El K es un componente obligado en las células vivientes, dependiendo de su absorción y ocasionalmente de su liberación para asegurar su crecimiento y mantenerse vivas (Rodríguez-Navarro & Rubio, 2006 y Dupré de Boulois, 2007). Según Sparks & Huang (1985), la liberación de K intercambiable en los suelos es más baja que las tasas de adquisición de K^+ por las plantas, por lo que el contenido de K^+ en los suelos es generalmente bajo (Pretty & Stangel, 1985). Además, como la difusión es el mecanismo dominante de liberación de K^+ a la superficie de la raíz (Seiffert *et al.*,

1995), puede observarse frecuentemente disminución del elemento alrededor del sistema radical. Por tanto, es de esperar que la participación de los HMA en la adquisición de K por las plantas represente una vía importante con que las plantas cuentan para obtener este elemento.

Los transportadores de K en las plantas son de tres tipos: KUP/HAK (transportador de K de alta afinidad), TRK (transportador de K) y KIR (canales rectificadores de entrada de potasio). En los hongos, sólo los transportadores KUP/HAK y TRK parecen estar presentes (Rodríguez-Navarro, 2000). Las investigaciones realizadas hasta la actualidad demuestran que los KUP/HAK están presentes en todas las plantas pero no en todos los hongos; sin embargo, Rodríguez-Navarro (2000) asegura que los TRK si están presentes en todos los hongos y plantas estudiados. En el caso específico de los HMA, aún no existe información sobre el ó los transportadores involucrados en la adquisición de potasio.

Algunas evidencias sugieren que los hongos micorrizógenos arbusculares pueden estar involucrados en el transporte de K. Por ejemplo, los estudios de George *et al.* (1992) informaron una disminución de K en un compartimento hifal colonizado por *G. mosseae*, de la misma manera que Marschner & Dell (1994) y Smith & Read (1997) encontraron incrementos en la concentración de K en tallos de plantas micorrizadas. Utilizando también un sistema de potes compartimentados, Suzuki *et al.* (2001) demostraron que existió absorción y translocación de $^{83}\text{Rb}^+$, pero fracasaron al demostrar si realmente el elemento fue transferido de las hifas intrarradicales del hongo hasta las células radicales. Por otra parte, Ryan *et al.* (2003) pudieron determinar la presencia de K en el micelio endomicorrízico y en las hifas intrarradicales, en este caso en altas concentraciones.

Dupré de Boulois *et al.* (2006) sugirieron que el K podría estar asociado con el P durante su transporte. Esta consideración está sustentada por las observaciones de Ryan *et al.* (2003 y 2007), quienes mostraron una fuerte correlación entre las concentraciones de P y K dentro del micelio intrarradical de HMA, sugiriendo que el K posiblemente está asociado con ortofosfatos y polifosfatos para balancear las cargas negativas de estos iones. Por otra parte, Corratgé *et al.* (2007)

identificaron recientemente un transportador de K^+ homólogo a un transportador de levaduras (TRK) en el hongo ectomicorrízico *Hebeloma cylindrosporum* (*HcTRK*). Estos autores aseguran que dicho transportador podría estar involucrado en la entrada de K, aunque su participación no fue determinada.

Que el transporte de K aún no haya sido demostrado definitivamente, responde más a las dificultades que existen para estudiar este elemento que a un desinterés por parte de los micorrizólogos. Sin dudas, los radioisótopos de K no se utilizan con frecuencia debido a lo inconveniente de sus tiempos de vida media, que van desde unas pocas horas (ej. 12,47 horas para ^{42}K) hasta 1,2 billones de años en el caso de ^{40}K (Rodríguez-Navarro, 2000). La mayor parte de los estudios realizados sobre transporte de K en plantas y hongos han sido llevados a cabo con rubidio (Rb) en lugar de K, ó ^{86}Rb (tiempo de vida media 18,6 días) como trazador de K (Drobner & Tyler, 1998 y Rodríguez-Navarro, 2000). A pesar de su alto peso molecular, Rb^+ tiene numerosas similitudes con K^+ , incluyendo su casi idéntico radio iónico hidratado (Drobner & Tyler, 1998). Ambos iones se fijan a las cavidades entre los átomos de oxígeno de las arcillas minerales y compiten probablemente por el mismo transportador al ser absorbido por las plantas (Baligar, 1995 y Drobner & Tyler, 1998). No cabe dudas, por tanto, que este isótopo podría ser utilizado para realizar estudios relacionados con la absorción y el transporte de K por parte de los HMA, en experimentos llevados a cabo en condiciones *in vitro*. Este tipo de experimento podría ofrecer evidencia directa sobre la participación de los HMA en la absorción de potasio.

2.2. Importancia de los sistemas de cultivo *in vitro* en el estudio de los HMA

2.2.1. Sistema de cultivo *in vitro* de raíces

Los estudios fisiológicos relacionados con la simbiosis micorrízica arbuscular se dificultan considerablemente debido a la condición de simbiosis obligados que caracteriza a los hongos que intervienen en la asociación, lo cual hace imposible su crecimiento en condiciones axénicas.

Por otra parte, todos estos eventos ocurren en un ambiente hipógeo, altamente complejo, que complica aún más las investigaciones, teniendo en cuenta que cualquier estudio bioquímico o molecular de la biología de un organismo dado requiere de material puro, fácilmente obtenible y en cantidades suficientemente grandes que permitan extraer las moléculas de interés.

No obstante, el empleo del cultivo de raíces (Figura 2) como un sistema simplificado para establecer la simbiosis micorrízica arbuscular, ha sido utilizado con frecuencia y es particularmente útil en numerosos estudios fisiológicos que incluyen dos aspectos fundamentales: el intercambio de señales entre los simbiontes y el metabolismo fúngico (Fortin *et al.*, 2002).

El cultivo de raíces fue desarrollado por primera vez por White (1943) y perfeccionado en años posteriores por Butcher & Street (1964) y Butcher (1980). Posteriormente, numerosos investigadores se sumaron al reto de establecer la simbiosis micorrízica sobre medios de cultivo axénicos.

La primera esporulación *in vitro* fue obtenida en el año 1988

por Bécard & Fortin, utilizando raíces transformadas de zanahoria, colonizadas con *Glomus intraradices* Schenck & Smith, como hospedero. Posteriormente, Bécard & Piché (1992) realizaron algunas modificaciones en el medio de cultivo existente, reduciendo las concentraciones de algunos elementos para evitar la inhibición del establecimiento micorrízico sin afectar el crecimiento y desarrollo radical. Esto permitió contar con un sistema de cultivo monoxénico altamente reproducible caracterizado por la producción de abundante micelio y esporas (Diop *et al.*, 1992).

El uso de este sistema permitió realizar un control riguroso de determinados parámetros como: la raíz hospedera, el inóculo fúngico y las condiciones ambientales físicas, químicas y microbiológicas. Además, bajo estas condiciones se pueden llevar a cabo observaciones no destructivas a nivel morfológico y celular que contribuyen a los estudios de fisiólogos, taxónomos y



Figura 2. Cultivo de raíces transformadas de zanahoria (*Daucus carota* L.) en placa Petri (90 mm).

genetistas (Dalpé *et al.*, 2005). Es igualmente una poderosa herramienta para estudios de interacción con patógenos y otros organismos. Este sistema de cultivo permite también la producción de inóculo fúngico puro en diferentes estadios simbióticos y en suficientes cantidades para realizar estudios citológicos y bioquímicos (Fortin *et al.*, 2002 y Diop, 2003).

El incremento creciente del número de especies de HMA cultivadas *in vitro* y la posibilidad del cultivo continuado y la criopreservación permitió crear una colección internacional de HMA *in vitro* conocida como GINCO (Colección *in vitro* de Glomeromycota), en la cual se conservan numerosas especies pertenecientes a varias familias de estos hongos y se reproducen nuevos individuos con el objetivo de incrementar la colección. Además, GINCO proporciona inóculo libre de contaminantes y de alta calidad para las investigaciones científicas.

A pesar de la naturaleza artificial de este sistema, existen numerosas razones para continuar utilizándolo en el estudio de los HMA. Está demostrado que las especies fúngicas cultivadas forman las estructuras típicas involucradas en la colonización (apresorios, arbusculos, vesículas y células auxiliares) y producen un profuso micelio extrarradical, así como abundante número de esporas. La producción de esporas es morfológica y estructuralmente similar a las producidas en potes de cultivo y las estructuras intrarradicales son capaces de iniciar nuevas asociaciones micorrízicas después de un periodo de subcultivo, indicando que la especie fúngica es capaz de completar su ciclo de vida en esas condiciones (Fortin *et al.*, 2002).

Sin embargo, que determinadas especies o aislados puedan sobrevivir en el ambiente que brinda este sistema de cultivo no quiere decir que todas puedan. Existen especies llamadas “recalcitrantes” que se resisten a colonizar las raíces e incluso, en muchos casos, a germinar en estas condiciones. El perfeccionamiento metodológico continuo del sistema de cultivo (ej. composición del medio de cultivo, condiciones ambientales de crecimiento e inclusión de la planta completa en el sistema en sustitución de la raíz), hará que muchas de estas especies puedan ser cultivadas exitosamente.

- Sistema compartimentado

El sistema de cultivo *in vitro* de raíces fue perfeccionado en un intento por incrementar su semejanza con el ambiente natural, brindándole al micelio extrarradical condiciones nutricionales cercanas a las encontradas en el suelo. Con este propósito St-Arnaud *et al.* (1996) crearon un sistema de cultivo en placas Petri compartimentadas, en las cuales colocaron el cultivo de raíces en el compartimento proximal y un medio de cultivo apropiado en un compartimento distal, en el que solo podía crecer el micelio extrarradical. La primera observación interesante utilizando esta técnica fue una estimulación notable del crecimiento del micelio fúngico y un valor diez veces superior del número de esporas en el compartimento distal comparado con el proximal.

Según Fortin *et al.* (2002), el envejecimiento de la raíz en el compartimento proximal puede liberar determinadas sustancias químicas que limitan el crecimiento del hongo y la producción de esporas; aunque también es posible que estas diferencias sean el resultado de cambios en el pH o alteraciones en la disponibilidad de nutrientes.

Este sistema es útil para los estudios de absorción y translocación de nutrientes en raíces micorrizadas bajo condiciones controladas. Ha sido utilizado para demostrar, utilizando radioisótopos de P, cierta capacidad mineralizadora de los HMA al absorber y translocar a las raíces colonizadas formas orgánicas (^{32}P -AMP) e inorgánicas de P ($^{33}\text{PO}_4$) (Joner *et al.*, 2000). Igualmente, ha sido empleado en los estudio de transporte de C (Pffefer *et al.*, 1999), N (Govindarajulu *et al.*, 2005), U (Rufyikiri *et al.*, 2002) y Cs (Dupré de Boulois *et al.*, 2005). Por otra parte, el sistema facilita el desarrollo de estudios diferenciados del metabolismo fúngico al permitir separar la fase intrarradical de la extrarradical (Bago *et al.*, 2000), lo cual es particularmente ventajoso para comparar la expresión genética entre ambas fases del micelio.

2.2.1.1. Limitaciones de los sistemas de cultivo *in vitro* de raíces

Si bien los sistemas de cultivo *in vitro* de raíces han permitido obtener valiosas informaciones sobre numerosos aspectos relacionados con la simbiosis micorrízica, es obvio que presentan algunas

limitaciones, pues son sistemas artificiales que tratan de imitar las condiciones encontradas por las raíces micorrízicas en la naturaleza.

Una de las más importantes es que la planta hospedera es reemplazada por un solo órgano, la raíz. Como resultado, el beneficio simbiótico que puede obtener el hongo de la planta se ve afectado por la ausencia de tejido fotosintético, un balance hormonal normal y las relaciones fisiológicas típicas entre fuente y sumidero.

En estos sistemas las raíces se alimentan de manera artificial a través del medio de cultivo. La sacarosa es adicionada para compensar la ausencia de fotosintatos y por tanto, la interfase o matriz de intercambio se ve “sumergida” en una solución de azúcar, lo cual no ocurre en condiciones *in vivo* (Fortin *et al.*, 2002). En este caso, los carbohidratos llegan a la corteza y al sistema vascular a través de la epidermis, por lo que es posible que la presencia de azúcar en la interfase modifique la bioquímica de la interacción entre la planta y el hongo.

Como resultado de estas limitaciones, numerosas cuestiones quedan aún por estudiar y algunos resultados son recibidos con escepticismo. Por tanto, la necesidad de desarrollar sistemas que incluyan la planta completa se convirtió en un reto y diversos sistemas han sido diseñados con mayor o menor éxito. Sin embargo, la mayoría son casi imposibles de reproducir y no propician un adecuado desarrollo de la colonización micorrízica, así como tampoco permiten realizar observaciones no destructivas (Dupré de Boulois *et al.*, 2006), u obtener plantas micorrizadas en cortos periodos de tiempo.

2.2.2. Sistemas de cultivo *in vitro* que incluyen la planta

En el año 1995, Elmeskaoui y colaboradores publicaron un novedoso sistema (Figura 3A) que permitía micorrizar *in vitro* plantas de fresa (*Fragaria* sp.) y demostrar la capacidad de los HMA de reducir el estrés hídrico en plantas micorrizadas. Este era un sistema tri-partita que incluía, además de las plantas, raíces cortadas provenientes de cultivo de raíces transformadas de zanahoria previamente micorrizadas, lo cual lo hacía en extremo complicado y difícil de reproducir.

Transcurridos diez años, Voets *et al.* (2005) proponen un sistema autotrófico parcialmente *in vitro* (Figura 3B) de micorrización de plantas de *Solanum tuberosum* L., utilizando solo placas Petri. En

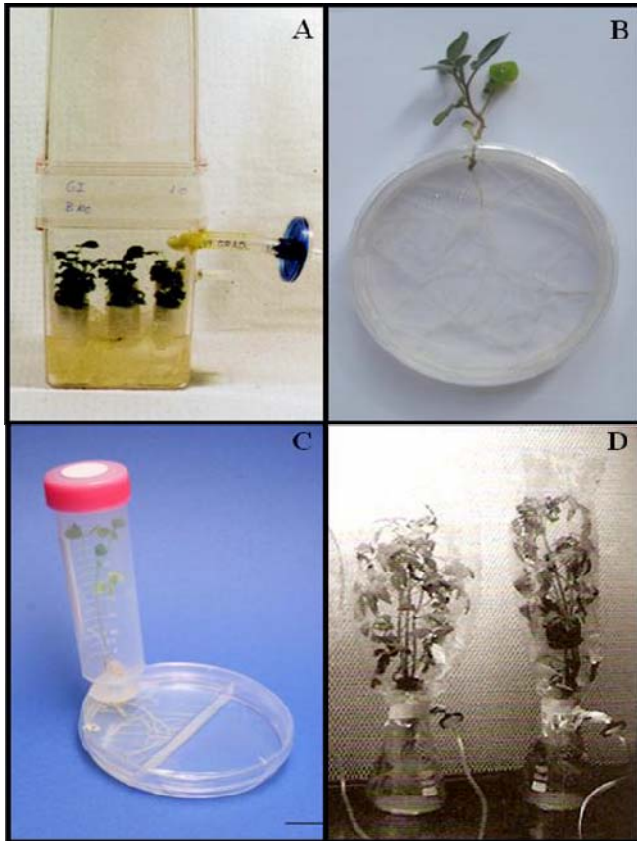


Figura 3. Ejemplos de sistemas de cultivo *in vitro* que incluyen la planta, desarrollados con diversos propósitos A.: sistema tripartita de Elmeskaoui *et al.* (1995), diseñado para estudios fisiológicos. B.: sistema autotrófico parcialmente *in vitro* (Voets *et al.*, 2005), propuesto para la micorrización de plantas y la producción de inóculo micorrízico. C.: sistema autotrófico totalmente *in vitro* en placas Petri bi-compartimentadas, diseñado para estudios de transporte (Dupré de Boulois *et al.*, 2006). D.: sistema de cultivo en medio líquido desarrollado para la producción masiva de inóculo micorrízico (Cano *et al.*, 2008).

dicho sistema las raíces se encuentran dentro de la placa Petri, en un ambiente totalmente *in vitro* y el sistema aéreo se desarrolla expuesto al ambiente. Estos autores obtuvieron una intensa colonización micorrízica y la producción de miles de esporas después de 22 semanas de cultivo, las que fueron capaces de colonizar nuevas plantas bajo las mismas condiciones. Sin embargo, al concluir el experimento las plantas mostraban numerosas afectaciones en su desarrollo y estado fisiológico, debido al prolongado tiempo de cultivo y la escasez de nutrientes. Estos dos factores estuvieron condicionados por la necesidad de producir una cantidad de propágulos dependiente de altos niveles de colonización y por la baja concentración de nutrientes del medio de cultivo utilizado (SRM).

Un año más tarde, Dupré de Boulois *et al.* (2006) propusieron un sistema de cultivo

completamente *in vitro* (Figura 3C) utilizando placas bicompartimentadas, que permitió realizar estudios de transporte de nutrientes entre plantas de *Medicago truncatula* Gaertn. y *G. lamellosum* MUCL 43195, también en el medio de cultivo SRM.

Dos años después, Cano *et al.* (2008) publicaron un sistema medianamente complejo (Figura 3D) que estuvo encaminado a la producción de abundante micelio y esporas de una planta micorrizada *in vitro* y bien colonizada, factible para realizar estudios de marcaje, fácil de muestrear y que permitiera realizar cosechas subsecuentes. Este sistema solo permitía alcanzar un 20% de colonización después de cuatro semanas de cultivo.

Todos estos sistemas (Figura 3 A, B, C y D) demostraron, por una parte, el potencial del sistema de cultivo *in vitro* para realizar cultivos continuados de HMA y su utilidad como herramienta para la investigación de numerosos aspectos relacionados con la simbiosis micorrízica, en las cuales se hace necesaria la presencia de tejido fotosintético activo y la relación fuente-sumidero. Por otra parte, la necesidad de búsqueda de nuevos sistemas en los cuales se pudieran, no sólo obtener igual o superior número de esporas y de estructuras fúngicas intra y extrarradicales, sino también plantas sanas y vigorosas de probada utilidad práctica. Sistemas que garanticen la obtención de plantas con altos niveles de colonización radical en el menor periodo de tiempo posible, factibles de ser trasplantadas y capaces de reproducir la colonia fúngica en nuevos medios o ambientes de cultivo.

2.3. Algunos factores a tener en cuenta para garantizar el establecimiento de la simbiosis micorrízica arbuscular *in vitro*

2.3.1. Propágulos micorrízicos

Los hongos micorrizógenos arbusculares poseen tres tipos de propágulos fundamentales en el suelo: las esporas, los fragmentos de raíces micorrizadas y las hifas (Biermann & Linderman, 1983; Hart & Reader, 2002, Klironomos & Hart, 2002 y de Souza *et al.*, 2005). Sin embargo, para iniciar los cultivos monoxénicos se utilizan por lo general dos de ellos: las esporas (Fortin *et al.*, 2002 y de Souza & Declerck, 2003), los fragmentos de raíces micorrizadas que muestran recrecimiento

micelial (Strullu & Romand, 1986; Diop *et al.*, 1994 a, b y Declerck *et al.*, 1996; 1998), o una combinación de ambos (Diop, 2003 y Declerck *et al.*, 2005).

Las esporas producidas en el suelo por los HMA son capaces de germinar en ausencia de señales derivadas de un hospedero (Giovannetti, 2000), pero son incapaces de extender su micelio y completar su ciclo de vida sin establecer una simbiosis funcional con la planta (Requena *et al.*, 2007). Las esporas son los propágulos más efectivos en la familia *Gigasporaceae*, mientras que se ha demostrado que *Glomeraceae* y *Acaulosporaceae* pueden iniciar nuevas colonias a partir de los tres tipos de propágulos antes mencionados (Budi *et al.*, 1999 y Klironomos & Hart, 2002).

Las esporas, por lo general, se colectan del suelo o de potes de cultivo a través de la técnica de tamizado húmedo y decantado y posterior centrifugación por gradiente, para separarlas de la fracción de suelo. Antes de que estas esporas sean utilizadas como inóculo *in vitro* deben someterse a un proceso de desinfección parcial (Bécard & Piché, 1992 y Fortin *et al.*, 2002). Este paso es crítico debido a que su éxito depende de que la mayor parte de los contaminantes sean eliminados, o al menos aquellos que no juegan un papel importante en la germinación de las esporas. Es necesario destacar que numerosos microorganismos viven entre las paredes de las esporas e incluso en su interior (Mirabal *et al.*, 2008), haciendo los procesos de desinfección aún más complicados y en algunos casos imposibles de lograr (Walley & Germida, 1996).

Los fragmentos de raíces micorrizadas se extraen principalmente de plantas trampa, provenientes de potes de cultivo. *Allium porrum* L. (ajo) es comúnmente utilizado para estos fines debido a que sus raíces más jóvenes son translúcidas y las vesículas pueden observarse fácilmente en su interior. Estos fragmentos también deben ser previamente desinfectados antes de su uso, empleando un procesamiento ultrasónico, según la metodología de Declerck *et al.* (1998); éste método ha sido empleado para el cultivo de numerosas especies de HMA (Strullu *et al.*, 1997; Declerck *et al.*, 1998; 2001 y Dalpé, 2001).

Por otra parte, las vesículas aisladas del interior de raíces micorrizadas también pueden ser utilizadas para comenzar cultivos *in vitro*, aunque esta metodología no se emplea con frecuencia. Las vesículas están menos contaminadas que la superficie de las raíces, por lo que podrían representar una mejor fuente de inóculo. El método de extracción de vesículas (Strullu & Plenchette, 1991 y Nantais, 1997) es complejo y engorroso, por lo que raramente se utiliza para inoculaciones de rutina.

Dentro de éstos propágulos, el micelio extrarradical es considerado la “mitad oculta” (Leake *et al.*, 2004) de la simbiosis y al parecer es el componente más dinámico y funcionalmente diverso de la asociación (Hamel, 2007 y de la Providencia, 2007). El micelio extrarradical de los HMA consiste en un entremezclado de hifas cenocíticas multinucleadas y altamente ramificadas que se interconectan a través de fusiones de hifas o anastomosis (de la Providencia, 2007), formando redes de micelio extrarradical (RME). En la naturaleza las RME pueden interconectar plantas diferentes, teniendo en cuenta la baja especificidad de los HMA (Van der Heijden *et al.*, 1998 y Voets *et al.*, 2006), representando una importante fuente de inóculo para la colonización de plantas vecinas debido a la abundante cantidad de ápices hifales que se ramifican de la colonia (Friese & Allen, 1991 y Giovannetti *et al.*, 2004). Las RME están directamente involucradas en la absorción de los nutrientes (Jeffries *et al.*, 2003 y Munkvold *et al.*, 2004), la estabilización de los agregados del suelo (Rillig, 2004 y Van der Heijden *et al.*, 2006), la composición de las plantas y el funcionamiento de los ecosistemas (Van der Heijden *et al.*, 1998).

2.3.2. Medio de cultivo

El medio de cultivo constituye un eslabón clave para asegurar el establecimiento de la simbiosis micorrízica arbuscular *in vitro*, pues debe garantizar simultáneamente las necesidades de organismos con diferentes requerimientos nutricionales.

Las plantas obtenidas a través de las técnicas de cultivo de tejidos se producen sobre medios sólidos, semisólidos y líquidos, cuya composición varía dependiendo de la especie de planta que se esté cultivando y de los propósitos del productor; pero en general son ricos en nutrientes minerales. En cambio, los cultivos duales de raíces y hongos micorrizógenos son establecidos en medios sólidos, particularmente en los medios White modificado (Mínimo, M) y Strullu & Romand modificado (SRM) (Bago *et al.*, 1996 y Pawloska *et al.*, 1999), los cuales presentan una concentración de macroelementos mucho más baja que las encontradas en el medio Murashige & Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962), comúnmente utilizado para la micropropagación de plantas. Esto se debe a que las altas concentraciones de sulfato de sodio, fósforo y sacarosa en el medio de cultivo tienen un efecto negativo en el establecimiento de los hongos micorrizógenos (Bécard & Fortin, 1988; Bécard & Piché, 1992 y Elmeskaoui *et al.*, 1995), por lo que se encuentran disminuidos en los medios en los que éstos se cultivan.

La composición del medio M es incluso más pobre que el medio SRM y fue desarrollado comparando el efecto de la concentración de diferentes elementos sobre la formación de micorrizas (Bécard & Fortin, 1988). Por su parte, el medio SRM fue desarrollado empíricamente (Declerck *et al.*, 1998) para optimizar la fase intrarradical del hongo *in vitro*. La composición de macroelementos es similar en ambos y las diferencias mayores se encuentran en la composición de oligoelementos y vitaminas.

2.3.3. Intercambio de gases

El intercambio de gases en los sistemas utilizados para el establecimiento de la micorrización de plantas *in vitro* es de relevante importancia para garantizar el éxito de la asociación debido a los requerimientos de los organismos involucrados, sobre todo de los propágulos fúngicos, cuyo establecimiento depende, fundamentalmente, de las concentraciones existentes de CO₂ y etileno (Kozai *et al.*, 1997).

En los sistemas comúnmente utilizados para establecer los cultivos de plantas *in vitro* se reconocen numerosas desventajas, asociadas con la heterotrofia o la fotomixotrofia de las plantas. Dentro de éstas se encuentra la adición de azúcares en los medios de cultivo como fuente de carbono, lo cual incrementa la proliferación de contaminantes biológicos, el tamaño pequeño de los envases y la hermeticidad de los mismos (Kozai *et al.*, 1997). Por otra parte, estos autores también refieren que el aire en el interior de los envases se satura casi completamente con vapor de agua y que se alteran las concentraciones de CO₂ y etileno.

Todas estas condiciones medioambientales producen desórdenes morfofisiológicos, retardo en el crecimiento y mutaciones y han contribuido a que la micropropagación fotoautotrófica aumente las potencialidades de aplicación sobre los métodos convencionales.

En cuanto al desarrollo fúngico, se conoce que las raíces pueden estimular a los HMA a utilizar las reservas de sus esporas por dos acciones que pueden ser simultáneas: cambios en el medio o cambios en la composición de los gases en el ambiente de cultivo (Bécard & Piché, 1989). Esto ocurre antes de establecerse la simbiosis (estadio presimbótico), momento en que las esporas germinantes necesitan ciertos factores para promover el crecimiento de las hifas. En este estadio el hongo es tróficamente dependiente de las reservas de la espora y algunos exudados provenientes de la raíces regulan la habilidad del hongo para utilizar dichas reservas (Bécard *et al.*, 1991).

Dentro de estas sustancias se han identificado los compuestos fenólicos, con los cuales se han realizado numerosas investigaciones relacionadas con su comportamiento en presencia de CO₂ (Bécard *et al.*, 1991). Estos estudios han demostrado el efecto estimulador sinérgico entre el CO₂ y determinados flavonoides como la quercetina, similar al obtenido anteriormente por Bécard & Piché (1989) entre el CO₂ y exudados radicales. Estos autores también demostraron que el CO₂, por sí solo, (a 0,5%) es capaz de reemplazar los compuestos volátiles liberados por las raíces en la activación del crecimiento fúngico, a partir de las reservas de las esporas.

Poco se conoce acerca de cómo el etileno puede influenciar en el suelo la formación de micorrizas. La evolución del etileno es provocada no sólo por la actividad física de las raíces en respuesta a varios estímulos (Ishii *et al.*, 1996), sino también por la presencia de infecciones microbianas (Abeles *et al.*, 1992). Las infecciones fúngicas simbióticas en ciertas plantas pueden estar asociadas con incrementos en la síntesis de etileno y éste a su vez, puede ser producido por los hongos micorrizógenos e influir en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Ishii *et al.*, 1996).

En raíces micorrizadas se ha descrito una reducción en la producción de etileno (Cruz *et al.*, 2000), conjuntamente con la actividad de las enzimas quitinasas y β -1,3-glucanasas (Lambais & Mehddy, 1993). Por otra parte, se ha informado también que la aplicación de etileno exógeno suprime el establecimiento de la colonización micorrízica, aunque según Geil & Guinel (2002), en bajas concentraciones puede promover su formación.

Por su parte, las condiciones de crecimiento *in vitro* en las que se producen determinadas especies de plantas pueden provocar incrementos en la producción de etileno debido al estrés que ocasionan, relacionado principalmente con la hermeticidad de los envases de cultivo (Perl *et al.*, 1988).

2.4. Los sistemas de micropropagación de plantas

En la última década, los sistemas de producción de vitroplantas han sido la herramienta más poderosa para la clonación y rápida multiplicación de numerosas especies de plantas, fundamentalmente las que revisten mayor importancia económica.

El cultivo de tejidos de plantas es el cultivo *in vitro* de células, tejidos y/u órganos de una planta sobre un medio nutritivo. A diferencia de las células animales, muchas células vegetales son totipotentes, hecho en el cual se basa el cultivo de tejidos. Por su parte, la micropropagación es la regeneración de plantas completas, a partir de pequeñas secciones de material vegetal conocidos como explantes. Éstos crecen en medios estériles y las plantas producidas pueden ser trasplantadas al suelo directamente o transferidas a casas de cultivo (Kozai *et al.*, 1997). Varias partes de la planta pueden ser cultivadas, como por ejemplo: hojas, tallos, raíces, meristemos, flores e incluso polen y

óvulos. Cada uno de estos explantes es utilizado con diferentes propósitos. El objetivo de la micropropagación es la producción masiva de plantas genéticamente idénticas, fisiológicamente uniformes, con un desarrollo normal y libre de patógenos, que pueden ser aclimatizadas en un corto periodo de tiempo con un bajo costo de producción (Aitken-Christie *et al.*, 1995). No obstante las exitosas aplicaciones de estas técnicas, presentan algunos inconvenientes que limitan la distribución de su uso (Hazarika *et al.*, 2006).

2.4.1. Limitaciones

En estos sistemas, los explantes asépticos crecen en condiciones de baja intensidad luminosa en pequeños potes o envases, sobre medios de cultivo artificiales que contienen azúcares, sales minerales, vitaminas y reguladores del crecimiento, en concentraciones que exceden los niveles encontrados en los ambientes naturales, por lo que presentan desórdenes morfológicos, fisiológicos y anatómicos (Lovato *et al.*, 1996; Nowak & Shulaev, 2003 y Hazarika *et al.*, 2006).

La presencia de azúcares reduce su necesidad de fotosintetizar y, a su vez, las condiciones asépticas reducen el estrés relacionado con la presencia de organismos patogénicos (Preece & Sutter, 1991 y Kozai *et al.*, 1997). La combinación de estos factores constituye un inconveniente para la sobrevivencia de las plantas tanto en casas de cultivo como en campo.

Según Matthijs *et al.* (1995) y Kozai *et al.* (1997), las condiciones de cultivo *in vitro* no permiten un adecuado intercambio de gases, lo cual produce alteraciones en el desarrollo de los explantes, así como modulación o represión de algunas vías metabólicas. Además se observa un mal funcionamiento estomático y cutículas que muestran pobre desarrollo con reducidos contenidos de ácidos grasos (Preece & Sutter, 1991; Majada *et al.*, 1995 y Hazarika *et al.*, 2006). Por otra parte, se produce una reducción de las tasas de transpiración y de fotosíntesis (Kozai *et al.*, 1997). La alta mortalidad observada frecuentemente durante el transplante es debida, entre otros factores, a la reducida capacidad fotosintética (Desjardins, 1995b; Preece & Sutter, 1991 y Van Huylenbroeck & Debergh, 1996).

Numerosos son los factores que influyen en el normal desarrollo de las plantas en condiciones de cultivo *in vitro*, tanto dentro como fuera de los envases. Entre éstos se encuentran: la luz (distribución del espectro, longitud del fotoperiodo, la densidad de flujo de fotones fotosintéticos y la dirección de la iluminación); temperatura (cambios de temperatura durante el fotoperiodo y su fluctuación); la humedad relativa en los envases (el intercambio de agua en sus fases líquida y gaseosa entre la planta, el aire y el medio, así como las características del aire fuera de los envases de cultivo); el material de soporte (se considera que la mayor porosidad, mayor difusión de los gases y por tanto, mayores concentraciones de oxígeno en el medio contribuyen a incrementar el crecimiento de las plantas *in vitro*) y el intercambio de gases en los envases de cultivo (el tipo de cierre afecta la composición de los gases - etileno, CO₂ y O₂ -, la iluminación, la hiperhidricidad y el crecimiento de las plantas en esas condiciones) (Kozai *et al.*, 1997).

2.4.2. Importancia de los sistemas fotoautotróficos

Algunos estudios informan que el adecuado control de los microambientes podría promover el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como reducir los desórdenes morfofisiológicos que se ocasionan durante el estadio *in vitro* (Jeong *et al.*, 1995; Nowak & Shulaev, 2003 y Hazarika, 2006). Otras investigaciones también han demostrado que las plantas que son producidas *in vitro* pueden expresar su capacidad fotosintética si se cultivan sobre un medio libre de azúcares y en presencia de CO₂ atmosférico como principal fuente de carbono (Desjardins, 1995a y Nguyen *et al.*, 2001); es decir, en condiciones fotoautotróficas (Kozai *et al.*, 1997). La fuente carbonada con la que se suplementa a los medios de cultivo es, según Wolf *et al.* (1998), el principal factor que afecta el desarrollo y la acumulación de biomasa de las plántulas que crecen *in vitro*. Estas plantas son fundamentalmente heterotróficas con una limitada tasa de actividad fotosintética. Por tanto, las nuevas tecnologías desarrolladas en el cultivo *in vitro* están encaminadas a producir plantas en sistemas fotoautotróficos (Kozai *et al.*, 1997), en los cuales se incrementa la tasa fotosintética y se reduce la dependencia de las plantas de una fuente externa de azúcar (Serret *et al.*, 1997). Algunas

de las ventajas que le confieren estos sistemas a las plantas son: crecimiento y desarrollo *in vitro* más rápido y uniforme, menos desórdenes fisiológicos y morfológicos, menor contaminación biológica, mayores porcentajes de sobrevivencia durante la aclimatización *ex vitro* (Desjardins, 1995c y Kozai *et al.*, 1997).

Por otra parte, Rai (2001) y Nowak & Shulaev (2003) aseguran que la introducción de determinados inoculantes microbianos por la vía de la micropropagación (acción conocida como “bioprimering” por sus siglas en inglés), como los HMA, podría contribuir también a disminuir los problemas ocasionados durante el trasplante, al actuar no sólo como inductores de resistencia al estrés, sino al ocupar micrositios en la rizosfera de las plantas hospederas haciendo a éstas inaccesibles al ataque de patógenos.

2.5. *Solanum tuberosum* y *Medicago truncatula* como plantas modelo para los estudios *in vitro*

2.5.1. *Solanum tuberosum* L. (papa)

La papa común (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los cultivos no cereales más importantes para la humanidad, produciendo más calorías, proteínas, vitaminas y sales minerales por unidad de superficie y de tiempo que los principales cereales y que otras plantas con tubérculos y raíces comestibles (Petryk, 2005 y Struik, *et al.*, 2006). Es cultivada en todo el mundo exceptuando las tierras bajas de los trópicos. Su centro de origen es la región Andina de Suramérica, donde ha sido cultivada desde el año 8 000 ANE.

Presenta una amplia capacidad de adaptación a condiciones variables de clima y suelo, por lo que se planta en más de 130 países (FAOSTAT, 2008). Se considera el producto no cereal número uno en el mundo y su producción en 2007 alcanzó la cifra récord de 320 millones de toneladas (Castillo, 2010).

En nuestro país se considera un cultivo priorizado, no sólo por las bondades antes expuestas sino por la posibilidad de almacenar sus tubérculos durante varios meses y garantizar un suministro estable a la población (Manso, 2009).

El desarrollo industrial de este cultivo se ha incrementado durante los últimos 50 años, especialmente con respecto a la producción de semillas y los sistemas de multiplicación. La producción de vitroplantas, microtubérculos y minitubérculos se han convertido en tecnologías que son fácilmente adaptables a las posibilidades y necesidades locales.

La papa presenta características distintivas que hacen factible su empleo en estudios de micorrización en condiciones *in vitro*, como por ejemplo: tiene un ciclo de vida corto, es de fácil micropropagación (Castillo *et al.*, 2010), se coloniza rápidamente (Voets *et al.*, 2005), tiene una alta respuesta a la micorrización en condiciones de campo (Niemira *et al.*, 1996) y ya ha sido utilizada, conjuntamente con *Solanum lycopersicum* L. y *Medicago truncatula* Gaertn., para realizar estudios genéticos y de transporte relacionados con los HMA (Nagy *et al.*, 2005 y Gallou *et al.*, 2009).

2.5.2. *Medicago truncatula* Gaertn.

M. truncatula es una leguminosa forrajera con un alto valor nutritivo, común en países del oeste de Asia, África, Australia y de climas similares al del Mediterráneo. Se adapta fácilmente a diferentes tipos de suelos, desde arenosos hasta arcillosos, pero en áreas bien drenadas y donde el pH oscile de neutro a alcalino (Brandsaeter *et al.*, 2002).

Es ampliamente utilizada en numerosos laboratorios como planta modelo para estudios de biología de las leguminosas (principalmente genéticos) y ha permitido realizar significativos avances en estudios moleculares relacionados con interacciones mutualistas planta-microorganismo y especialmente en la interacción micorrízica arbuscular (Hause & Fester, 2005). Esta especie es utilizada como planta modelo debido a que es diploide, presenta un pequeño genoma (450 Mb), es fácil de transformar, tiene un ciclo de vida corto y una amplia diversidad natural. Su genoma ya ha sido mapeado física y genéticamente (Hause & Fester, 2005) y actualmente su secuencia aparece en el siguiente sitio de internet <http://www.genome.ou.edu/medicago.html>.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Teniendo en cuenta los objetivos propuestos, se llevaron a cabo un conjunto de experimentos conducentes al desarrollo de un sistema de cultivo *in vitro* Hongo Micorrizógeno Arbuscular – planta, que permitiera la micorrización eficiente de plántulas en un corto periodo de tiempo y con probada utilidad práctica.

3.1. Aspectos generales de los experimentos

3.1.1. Material biológico

Se utilizaron vitroplantas de *Solanum tuberosum* L (papa) cv. Desirée suministradas por los laboratorios de la Estación de Haute, Libramont, Bélgica. Las vitroplantas adquiridas fueron multiplicadas para contar con material vegetal suficiente para las investigaciones. La multiplicación se realizó por micropropagación de los cortes nodales y se colocaron 20 explantes en cajas de cultivo (90 x 60 x 50 mm) estériles conteniendo 50 mL de medio sólido MS (Murashige y Skoog, 1962) (Duchefa, Biochemie, Haarlem, The Netherlands) suplementado con 20 g L⁻¹ de sacarosa, 3 g L⁻¹ Gel Gro[®] (ICN, Biomedicals, Inc., Irvine, USA) como agente gelificante, ajustado a pH 5,7 antes de la esterilización. Las cajas de cultivo fueron transferidas a cámara de crecimiento bajo condiciones controladas (22°C, fotoperíodo de 16 h día⁻¹ y flujo de fotones fotosintéticos de 225 μmol m⁻² s⁻¹), para garantizar el desarrollo de los explantes.

Se trabajó además con semillas de *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong, cepa A-17 (SARDI, Australia), las que fueron esterilizadas por inmersión en hipoclorito de sodio con 8% de cloro activo, durante 10 minutos. Se lavaron con agua desionizada estéril y se germinaron en placas Petri de 90 mm diámetro, conteniendo 35 mL de medio SRM (Strullu y Romand modificado) (Declerck *et al.*, 1998) sin azúcares y sin vitaminas, solidificado con 3 g L⁻¹ de Gel Gro[®]. En cada placa se colocaron 25 semillas y se incubaron en la oscuridad a 27°C. Las semillas germinaron a partir del primer día de incubación y las plántulas se utilizaron al transcurrir cuatro días.

Los inóculos fúngicos utilizados (*Glomus clarum* Nicolson & Schenck, MUCL 46238, aislada en ecosistema cubano y *G. intraradices* Schenck & Smith, MUCL 41833), de cuatro meses de cultivo, se adquirieron en GINCO (Colección *in vitro* de Glomeromycota, BCCM/MUCL, Unidad de Microbiología, Universidad católica de Lovaina, Lovaina la Nueva, Bélgica, <http://www.mbla.ucl.ac.be/ginco-bel>). Ambas cepas fueron suministradas en placas Petri de 90 mm diámetro, en asociación con raíces transformadas (Ri T-DNA) de zanahoria (*Daucus carota* L.) en medio SRM, solidificado con 3 g L⁻¹ de Gel Gro[®]. Los inóculos se subcultivaron utilizando la metodología descrita por Cranenbrouck *et al.* (2005) y se incubaron a 27°C en la oscuridad en posición invertida. Se obtuvo un promedio de 3 000 (*G. clarum*) y 5 000 (*G. intraradices*) esporas por placa Petri en un periodo de 5 meses.

3.2. Estudio de diferentes medios y sistemas de cultivo para el establecimiento de la micorrización *in vitro* de plántulas de *S. tuberosum*

En este experimento se desarrollaron cuatro ensayos encaminados a la búsqueda de un medio de cultivo en el que se garantizara la micorrización rápida y eficiente de plántulas de papa. Se ensayaron medios de cultivo conocidos con variaciones en la concentración de algunos elementos, en dos sistemas autotróficos de cultivo *in vitro*, con el propósito de establecer la micorrización. Se utilizó el sistema autotrófico parcialmente *in vitro* diseñado por Voets *et al.* (2005) para la micorrización de plantas de papa y un sistema autotrófico totalmente *in vitro* utilizando Magentas[®] y microcajas de cultivo.

3.2.1. Ensayo 1. Potencialidades de los medios MS, ½MS y SRM para la germinación y colonización de esporas de *Glomus clarum* en plántulas de papa, en dos sistemas autotróficos de cultivo (parcialmente *in vitro* SA-PIV y totalmente *in vitro* SA-TIV).

En este estudio se evaluaron de forma cualitativa las posibilidades de los medios de cultivo Murashige & Skoog (MS), ½MS y Strullu & Romand modificado (SRM) (Anexo 1) para garantizar

la germinación y colonización de esporas de HMA en plántulas de papa, en los dos sistemas autotróficos de cultivo.

Sistema Autotrófico Parcialmente *in vitro* (SA-PIV): El sistema se caracteriza porque la planta se desarrolla en dos condiciones diferentes (Figura 4 A, cuadro 3), el sistema radical se encuentra dentro de una placa Petri (90 mm diámetro) creciendo en medio de cultivo sólido bajo condiciones estrictas de cultivo *in vitro* y el sistema aéreo se desarrolla totalmente fuera, expuesto a condiciones ambientales de cuarto de crecimiento (Figura 4 B).

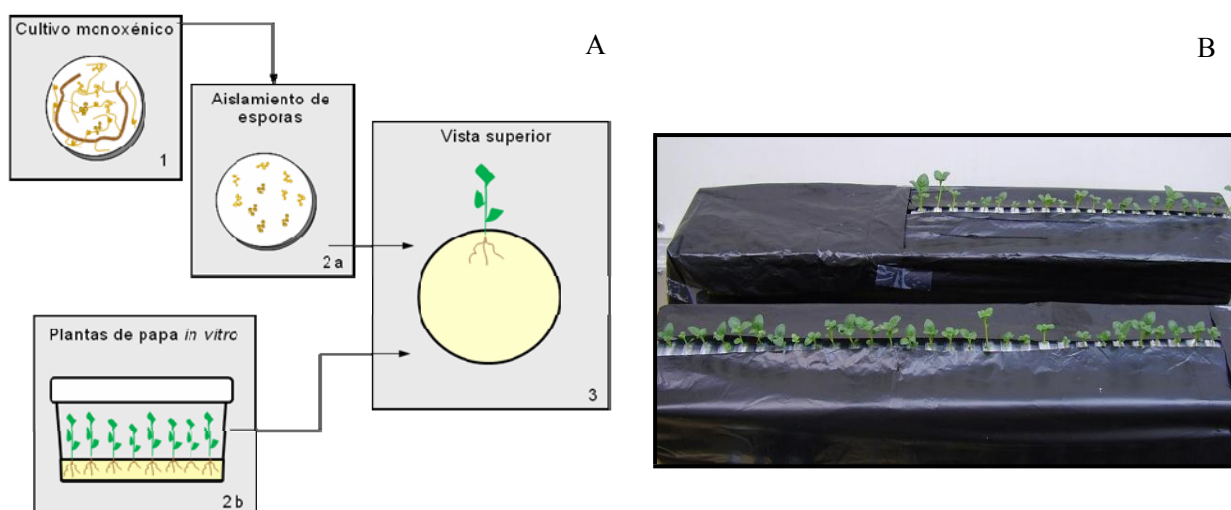


Figura 4. A. Diagrama representativo del sistema autotrófico parcialmente *in vitro* propuesto por Voets *et al.* (2005) para la asociación de esporas de HMA con plántulas de papa. (1) cultivo monoxénico del HMA, (2a) aislamiento de esporas para su inoculación en raíces de plántulas de papa de siete días de subcultivo (2b), previamente transferidas a los sistemas (3). B. Establecimiento del sistema autotrófico parcialmente *in vitro*. Las placas Petri conteniendo las raíces se cubren con polietileno negro para disminuir la incidencia de la luz.

Para establecer los sistemas se procedió a desarrollar la metodología descrita por Voets *et al.* (2005) la cual consistió en realizar un orificio (≈ 2 mm diámetro), en el borde de la base y la tapa de placas Petri de 90 mm de diámetro y adicionar 30 mL del medio de cultivo correspondiente (MS, $\frac{1}{2}$ MS y SRM) en cada placa. Estos medios y todos los utilizados en el resto de los experimentos se prepararon sin azúcar y sin vitaminas, asegurando que el desarrollo de las plantas ocurriera de manera autotrófica. Como las placas se incuban en posición vertical se añadieron 4 g L^{-1} de Gel Gro[®] para solidificar los medios y evitar su desprendimiento. Plántulas de papa de 7 días de

subcultivadas, que tenían entre dos y tres hojas y entre tres y cuatro raicillas, se transfirieron a las placas con ayuda de pinzas, depositándolas en los orificios y colocando suavemente las raíces sobre la superficie del medio de cultivo (Figura 4, cuadro 3).

Las esporas de *G. clarum* empleadas como inóculo fueron extraídas de un cultivo monoxénico (Figura 4 A, cuadro 1) de 4 meses de edad después de solubilizar el medio SRM con una solución de ácido cítrico (1,92 g/100 mL) y citrato de sodio (2,94 g/100 mL) (Doner & Bécard, 1991) y mantenidas en agua desionizada estéril. Se inocularon 50 esporas sobre las raíces de cada plántula con ayuda de una micropipeta Eppendorf (200 µL) y se destinaron 10 placas para cada medio de cultivo. Posteriormente, las placas fueron selladas con Parafilm (Pechiney, Plastic Packaging, Chicago, IL 60631) y el orificio fue cubierto con grasa de silicona (VWR International, Belgium) estéril, para evitar contaminación. Seguidamente, las placas fueron cubiertas con bolsas de polietileno negro para mantener a los propágulos del HMA y a las raíces en la oscuridad (Figura 4 B). Los sistemas fueron transferidos a cámara de crecimiento bajo condiciones controladas (22°C, 70% de humedad relativa, fotoperiodo de 16 h día⁻¹ y flujo de fotones fotosintéticos de 225 µmol m⁻² s⁻¹) y mantenidos en posición vertical durante los 30 días de duración del ensayo. El ensayo se realizó en dos ocasiones.

Semanalmente, partiendo del día 15 de establecidos los sistemas, se añadieron en las placas 5 mL de medio con 4 g L⁻¹ de Gel Gro[®], sin azúcar ni vitaminas, refrescado en baño de agua (35°C). Este suministro de medio fresco fue necesario debido a la rápida disminución del volumen de medio que ocurrió en las placas producto del activo crecimiento de las plantas.

Sistema Autotrófico Totalmente *in vitro* (SA-TIV): En este estudio se utilizaron Magentas[®] (0,12 L) como envases para establecer la micorrización de las plántulas de papa (Figura 5). Las Magentas[®] se emplean comúnmente para el cultivo *in vitro* de plantas. En este caso se le realizaron algunas modificaciones con el objetivo de garantizar la asociación entre las raíces de plántulas de papa y los propágulos fúngicos inoculados. Primeramente se colocaron discos adhesivos de microfiltración

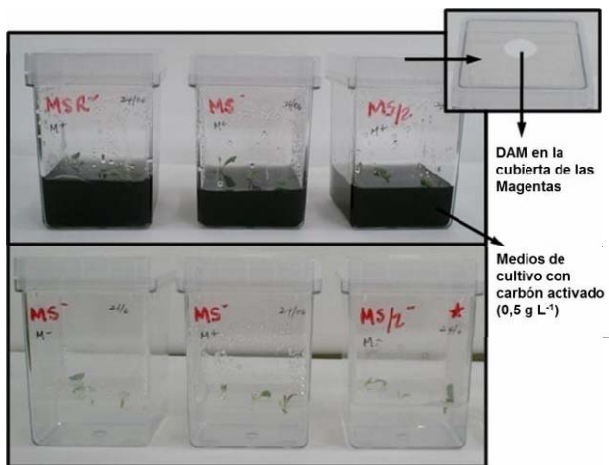


Figura 5. Sistema autotrófico totalmente *in vitro* (Magentas®) conteniendo los medios de cultivo MS, SRM y ½MS. Imagen superior derecha mostrando el disco adhesivo de microfiltración (DAM) colocado en la cubierta de las Magentas®.

(DAM – 18,6 mm diámetro) en las cubiertas de las Magentas®, para facilitar el intercambio gaseoso. Se utilizaron los medios SRM, MS y ½MS sin azúcares ni vitaminas (3 g L^{-1} de Gel Gro®). Se combinaron con carbón activado (C6289, Sigma-Aldrich) ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) con el objetivo de proporcionar oscuridad en el medio y facilitar la germinación de las esporas. Se añadieron 100 mL de medio por envase.

Se utilizaron cortes nodales (0,8 - 1,0 cm de longitud) como explantes, en lugar de la planta

completa como en el SA-PIV descrito anteriormente, debido a la poca altura de los envases. Se plantaron tres cortes por envase y se inocularon 50 esporas en la vecindad del explante. Las esporas se obtuvieron al solubilizar el medio de cultivo y la inoculación se realizó de la misma manera que fue explicada anteriormente (Acápite 3.2.1). Se utilizaron 5 envases por tratamiento. Los envases se cerraron completamente y se trasladaron a cámara de crecimiento en las mismas condiciones de humedad relativa, temperatura, fotoperiodo y flujo de fotones fotosintéticos que el SA-PIV.

3.2.1.1. Observaciones realizadas

En este ensayo se realizaron observaciones sistemáticas con el fin de evaluar el comportamiento fúngico y de las plántulas de papa en cada medio de cultivo. En las esporas utilizadas como inóculo se valoró el tiempo de ocurrencia de la germinación y la colonización de las raíces de las plántulas de papa. Se consideraron las esporas germinadas al observar crecimiento de los tubos germinativos a través de un microscopio de disección (10-40X, Olympus SZ40, Olympus Optical GmbH, Alemania).

3.2.2. Ensayo 2. Efecto de la inoculación con esporas de *G. clarum* en plántulas de papa en los dos sistemas de cultivo (SA-PIV y SA-TIV), utilizando diferentes medios elaborados a partir de MS.

Teniendo en cuenta los resultados del ensayo anterior, se estudiaron cinco variaciones del medio MS nombradas A, B, E, F y G, cuyas características se presentan en la tabla 1 y su composición en

Tabla 1. Relación entre los diferentes nutrientes modificados (P, N y K) en cada variante de medio de cultivo (A, B, E, F y G) y sus porcentajes respecto al medio MS. Medio ½ MS y SRM, controles.

Medio de cultivo	Porcentaje (%) respecto a MS			Relación P-N-K
	P	N	K	
A	25	100	100	1/4-1-1
B	12,5	100	100	1/8-1-1
E	25	25	25	1/4-1/4-1/4
F	12,5	25	20	1/8-1/4-1/5
G	25	12,5	10	1/4-1/8-1/10
½MS	50	50	50	1/2-1/2-1/2
SRM	3	11	8	-

el Anexo 1. Los medios SRM y ½MS se utilizaron como controles del desarrollo micorrízico y de las plantas, respectivamente.

En este estudio se evaluó el comportamiento de la colonización micorrízica en cada medio de cultivo, los cuales presentaban variaciones en las concentraciones de fósforo y nitrógeno del medio MS y por consiguiente de potasio, al encontrarse este elemento formando parte de los portadores de P (KH_2PO_4), y de N (KNO_3)

en mayor medida (Tabla 1). Se variaron las concentraciones de estos elementos por el efecto que pueden tener sobre la germinación de las esporas y la colonización micorrízica.

SA-PIV: Se utilizaron nuevamente esporas de *G. clarum* provenientes de un cultivo monoxénico de 4 meses de edad y los sistemas se manejaron de la misma forma que la descrita en el ensayo anterior (Acápito 3.2.1). Cada placa Petri conteniendo una plántula constituyó una unidad experimental y se destinaron 8 unidades experimentales para cada medio de cultivo. Los sistemas fueron transferidos a cámara de crecimiento bajo similares condiciones (Acápito 3.2.1). Semanalmente, se añadieron en cada placa 5 mL de medio con 4 g L⁻¹ de Gel Gro[®] sin azúcar ni vitaminas, para mantener un nivel adecuado de medio.

SA-TIV: En este ensayo se utilizaron igualmente Magentas[®] (0,12 L) como envases para establecer la micorrización de las plántulas de papa, con DAM en las cubiertas. Se añadieron 100 mL de los medios de cultivo antes mencionados sin azúcar ni vitaminas y 3 g L⁻¹ de Gel Gro[®] como agente gelificante. Se destinaron cuatro Magentas[®] por tratamiento.

Se plantaron 3 cortes nodales de 0,8 – 1,0 cm de longitud en cada envase y se inocularon 50 esporas en la vecindad del explante. Las esporas se obtuvieron al solubilizar el medio de cultivo y la inoculación se realizó de la misma manera que fue explicada anteriormente (Acápite 3.2.1). Después de inoculadas las esporas y antes de transferir los cortes nodales, se colocó en el interior de cada envase una pieza de papel aluminio de 25 cm² para cubrir los propágulos y reducir la incidencia de la luz. Los envases se cubrieron con papel aluminio hasta la altura del medio de cultivo para proporcionar mayor oscuridad a las esporas, se cerraron completamente y se trasladaron a cámara de crecimiento en las mismas condiciones de humedad relativa, temperatura, fotoperiodo y flujo de fotones fotosintéticos que las descritas en el acápite 3.2.1.

3.2.2.1. Evaluaciones realizadas

El desarrollo fúngico y de las plantas fue evaluado a los 20, 30 y 40 días de realizada la inoculación. En los casos en que hubo germinación de las esporas y colonización de las plántulas de papa se evaluaron las siguientes variables: altura de la planta (cm), número de hojas, área foliar (cm²), longitud micelial (cm) y número de esporas por placa Petri. Al finalizar el ensayo (40 días) se evaluaron la masa seca aérea (g), las concentraciones foliares de P, N y K (%) y la frecuencia e intensidad de la colonización (%). La altura de las plantas se midió desde la base del tallo hasta la yema apical. La estimación del área foliar se realizó utilizando la metodología publicada por Torres & García (1987) para plantas de papa. Las concentraciones foliares de P, N y K se determinaron por digestión húmeda (H₂SO₄ + Se). Se evaluó N por el método de Nessler, P por formación de azul de molibdeno y K por fotometría de llama, según metodologías descritas por Paneque (2002).

El número de esporas y la longitud del micelio fueron evaluados utilizando un microscopio de disección (10-40X, Olympus SZ40, Olympus Optical GmbH, Alemania) y una plantilla con el fondo dividido en cuadrículas de 1 cm², según Voets *et al.* (2005). Se contaron las esporas presentes en cada celda o cuadrícula, formada por las líneas que dividen el fondo de la placa Petri y se sumaron, informándose el número total de esporas por placa Petri. En el caso del micelio, se contaron todas las hifas que cruzaban las líneas divisorias horizontales y verticales y se empleó la siguiente fórmula de Newman (1966), modificada por Giovannetti & Mosse (1980), para calcular su longitud total:

$$R = \pi NA / 2H$$

N: número de veces que las hifas intersectan las líneas que dividen el fondo de la placa
 A: área de la placa de cultivo
 H: largo total de las líneas rectas que dividen el fondo de la placa
 R: longitud del micelio

Para determinar la frecuencia e intensidad de la colonización se colectaron todas las raíces y se clarificaron con KOH (10%) a 80°C durante 15 minutos. Seguidamente se lavaron con agua destilada y se tiñeron con una solución de tinta azul (1% HCL : 1% de tinta azul Parker; Vierheilig *et al.*, 1998) a 80°C durante 15 min. Los porcentajes de ambas variables se estimaron utilizando el método de Plenchette & Morell (1996) (Anexo 2). Las observaciones se ejecutaron bajo microscopio compuesto de campo brillante (50-250X, Olympus BH-2, Olympus Optical GmbH, Alemania).

3.2.3. Ensayo 3. Efecto de la micorrización en el crecimiento de plántulas de papa utilizando los medios seleccionados y los dos sistemas de cultivo (SA-PIV y SA-TIV)

En este ensayo se evaluó el efecto de la micorrización sobre el crecimiento y desarrollo de plántulas de papa utilizando los dos sistemas y dos medios de cultivo seleccionados (E y G), teniendo en cuenta los resultados del ensayo anterior. Se utilizó el medio ½MS sin inocular como control del desarrollo de las plántulas.

SA-PIV: En este sistema se estudiaron los siguientes tratamientos: (1) medio $\frac{1}{2}$ MS; (2) medio E + *G. clarum*; (3) medio E; (4) medio G + *G. clarum* y (5) medio G.

De igual forma que en el experimento anterior se inocularon 50 esporas en la vecindad del tallo de cada plántula y se utilizaron 10 sistemas por tratamiento. Las placas se sellaron adecuadamente y se incubaron en posición vertical en cámara de crecimiento con el sistema radical en la oscuridad y condiciones ambientales similares a las descritas en el acápite 3.2.1. En cada placa se añadieron semanalmente 5 mL de medio con 4 g L⁻¹ de Gel Gro[®] sin azúcar ni vitaminas.

SA-TIV: Para el estudio en Magentas[®], a diferencia del caso anterior, se incluyeron las esporas en perlas de alginato, utilizando la metodología descrita por Declerck *et al.* (1996). Diez perlas, conteniendo entre cinco y seis esporas de *G. clarum*, fueron suavemente depositadas en el medio de cultivo, el cual fue adicionado a los envases en varios pasos: (1) 30 mL del medio correspondiente seguido por las perlas de alginato conteniendo las esporas; (2) otra capa de la misma cantidad de medio (refrescado a 35°C en baño de agua) y (3) una capa menor de medio (15 mL) combinado con carbón activado (C6289, Sigma-Aldrich) a mayor concentración (1,0 g L⁻¹) que en el caso anterior (Acápite 3.2.1), para garantizar oscuridad en la parte superior del medio. De esta forma las esporas quedaban totalmente embebidas dentro del medio de cultivo, a diferencia del estudio anterior utilizando el mismo envase. Cuando la última capa de medio estuvo totalmente gelificada se colocaron dos cortes nodales en cada envase. Los envases fueron cubiertos con papel aluminio hasta la altura del medio de cultivo para proporcionar más oscuridad a las esporas en la parte inferior y lateral de los envases. En este sistema se estudiaron los siguientes tratamientos: medio $\frac{1}{2}$ MS + *G. clarum*; medio $\frac{1}{2}$ MS; medio E + *G. clarum*; medio E; medio G + *G. clarum* y medio G. Los envases se incubaron en cámara de crecimiento, en condiciones ambientales similares a las antes mencionadas (Acápite 3.2.1).

3.2.3.1. Evaluaciones realizadas

El desarrollo fúngico y de las plantas fue evaluado a los 20, 30 y 40 días de comenzado el experimento en el SA-PIV, a través de las siguientes variables: altura de la planta (cm), número de hojas, área foliar (cm²), longitud micelial (cm) y número de esporas por placa Petri. Las metodologías empleadas fueron descritas en el acápite 3.2.2.1. En el caso de las Magentas[®] se monitoreó la germinación de las esporas durante el periodo de estudio utilizando un microscopio de disección (10-40X, Olympus SZ40, Olympus Optical GmbH, Alemania). Se consideraron las esporas germinadas al observar los tubos germinativos emergiendo de las perlas de alginato.

3.2.4. Ensayo 4. Factibilidad del uso de microcajas (SA-TIV) para la micorrización de plántulas de papa con esporas del HMA *G. clarum*

En esta etapa se continuó con la búsqueda de un sistema totalmente *in vitro* que permitiera la micorrización de plántulas de papa con altos niveles de colonización, sin afectar el desarrollo de las plantas.

Se emplearon como envases microcajas de polipropileno para cultivo *in vitro* (Combiness n.v. Industriezone Eke, Bélgica) de mayor capacidad que las Magentas[®] (1,32 L -11 veces más volumen), para facilitar el intercambio de gases con el exterior, aspecto de relevante importancia para garantizar un mejor desarrollo de las plantas y del hongo en esas condiciones. Se estudiaron dos nuevas variaciones en las concentraciones de nutrientes del medio MS y se utilizó vermiculita estéril como sustrato, suplementada con medio líquido, en lugar del agente gelificante Gel Gro[®].

En este experimento, las vitroplantas de papa fueron suministradas por el Laboratorio de Genética y Mejoramiento Vegetal, INCA, en tubos de cristal (22 mm diámetro). Para el subcultivo, los cortes nodales se colocaron también en tubos similares que contenían 15 mL de medio MS suplementado con 10 g L⁻¹ de sacarosa y 4 g L⁻¹ de Gel Gro[®]. El pH fue ajustado a 5,7 antes de la esterilización. Los tubos, conteniendo un explante cada uno, se incubaron en cámara de crecimiento (22°C, fotoperíodo de 16 h día⁻¹ y flujo de fotones fotosintéticos de 220 μmol m⁻² s⁻¹).

SA-TIV (microcajas): En este ensayo se estudiaron dos nuevos medios de cultivo (I y J), resultado de nuevas variaciones en las concentraciones de N y P del medio MS que no habían sido contempladas en los ensayos anteriores (Tabla 2; Anexo 1). Se empleó además el medio más

Tabla 2. Relación entre los diferentes nutrientes modificados (P, N y K) en las variantes de medio de cultivo I y J y sus porcentajes respecto al medio MS. Medio ½ MS y SRM, controles.

Medio de cultivo	Porcentaje (%) respecto a MS			Relación P-N-K
	P	N	K	
I	50	25	25	1/2-1/4-1/4
J	25	50	50	1/4-1/2-1/2
½MS	50	50	50	1/2-1/2-1/2

adecuado para el establecimiento de la micorrización de plántulas de papa, resultante de la etapa anterior del experimento, en combinación con vermiculita estéril. Se utilizó el medio ½MS como control para el desarrollo de las plántulas.

En cada microcaja se añadieron 50 mL del medio de cultivo correspondiente, sin azúcares, vitaminas o agente gelificante, mezclados con vermiculita estéril en proporción 1:2 v:v y el pH se ajustó a 5,5 antes de la esterilización. Las microcajas presentaban filtros en las tapas que permitían realizar el intercambio gaseoso, con una tasa de recambio de 13,09 GE/día, según datos del fabricante. La vermiculita fue utilizada para aumentar la aireación dentro del medio de cultivo y facilitar el crecimiento de la planta y el desarrollo del hongo. Se plantaron dos cortes nodales (0,8 – 1,0 cm) por microcaja, provenientes de plántulas micropropagadas. Se destinaron siete microcajas por tratamiento, inoculándose 50 esporas en la vecindad de cada corte nodal. Los sistemas se incubaron en cámara de crecimiento con las siguientes condiciones ambientales: 22°C, fotoperíodo de 16 h día⁻¹ y flujo de fotones fotosintéticos de 220 μmol m⁻² s⁻¹.

3.2.4.1. Evaluaciones realizadas

Transcurridos 35 días de cultivo se muestrearon cinco microcajas al azar (10 plantas por tratamiento), colectándose todas las plantas para evaluaciones de altura (cm), número de hojas, masas fresca y seca (foliar y radical) (g) y colonización micorrízica (intensidad y frecuencia). La colonización intrarradical fue observada y evaluada bajo un Microscopio compuesto de campo

brillante (250-500X, Olympus BH-2, Olympus Optical GmbH, Alemania), después de realizar la clarificación de las raíces con KOH (10%) y la tinción con Azul de tripano, según metodología descrita por Phillips & Hayman (1970). Los porcentajes de ambas variables se estimaron utilizando el método de Plenchette & Morell (1996).

3.3. Sistema de cultivo *in vitro* para la producción rápida de plantas micorrizadas a partir de las Redes de Micelio Extrarradical (RME)

Este experimento se diseñó con el objetivo de obtener plántulas micorrizadas en un periodo corto de tiempo, que fueran capaces de reproducir la colonia fúngica al ser transferidas a un nuevo medio.

3.3.1. Procedimiento para establecer la Planta Donante de Micelio (PDM)

Para establecer la PDM se utilizó como base el sistema diseñado por Voets *et al.* (2005) con la inclusión de algunas modificaciones. A diferencia del mismo, en éste se utilizaron placas Petri bi-compartimentadas con el propósito de separar el sistema radical del micelio extrarradical. Estas placas presentan una pared plástica que permite dividir la placa en dos compartimentos, uno para la raíz o compartimento radical (CR) y otro para el conjunto de hifas extrarradicales o compartimento hifal (CH).

Primeramente se realizó un orificio (± 2 mm diámetro) en el borde de la base de la placa correspondiente al CR. Los compartimentos se llenaron de forma independiente con 20 mL de medio SRM sin azúcar y sin vitaminas y 4 g L^{-1} de Gel Gro[®]. Para adicionar el medio de cultivo en los compartimentos se colocaron las placas Petri sobre aditamentos de madera que presentaban una inclinación de 4° , permitiendo que el medio de cultivo alcanzara el borde superior de la pared divisoria de la placa, mientras se mantenía bajo en el sitio de la abertura del CR, como se muestra en la figura 6.

Una plántula de *M. truncatula* de 4 días de germinada fue transferida a cada placa Petri, insertando suavemente el sistema radical en el orificio realizado en el CR, con las pequeñas raíces colocadas en la superficie del medio de cultivo y el sistema aéreo extendiéndose fuera de la placa (Figura 7A).

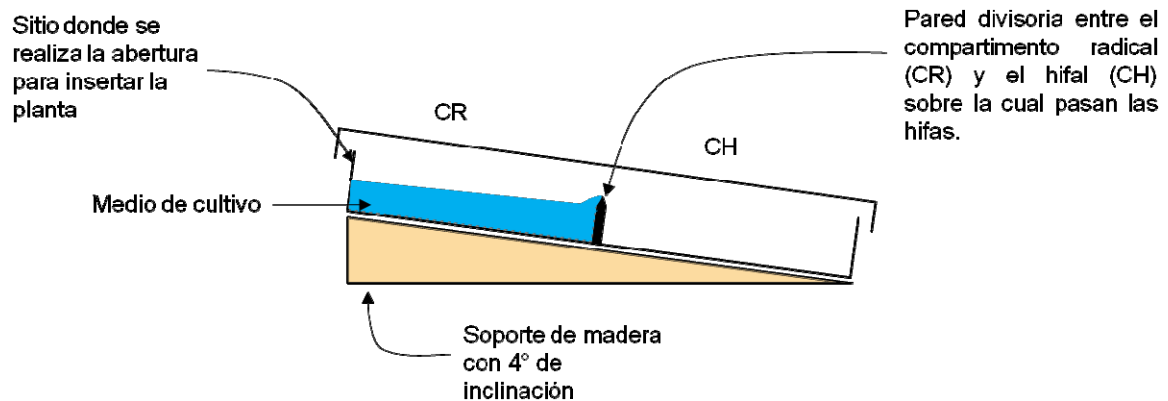


Figura 6. Esquema que representa el proceso de preparación de las placas Petri (90 mm diámetro) utilizadas para establecer el sistema de planta donante de micelio (PDM). Las placas se colocan sobre un soporte de madera de 4° de inclinación para añadir el medio de cultivo y garantizar que el nivel de medio quede bajo en la zona del CR en la cual se realiza la abertura para insertar la planta donante de micelio. En el lado opuesto del CR el medio debe alcanzar el borde superior de la pared divisoria para asegurar que las hifas puedan pasar del CR al CH.

Se inocularon 50 esporas de *G. intraradices* sobre las raíces, previa extracción de un cultivo monoxénico de cuatro meses de edad, por solubilización del gel, utilizando la metodología descrita en el acápite 3.2.1. Se continuó con el procedimiento propuesto por Voets *et al.* (2005) para el cierre y sellado de los sistemas. Los mismos fueron transferidos a cámara de crecimiento, con similares condiciones ambientales a las anteriormente descritas (Acápite 3.2.1) y mantenidos en posición vertical.

Semanalmente, se añadieron 5 mL de medio SRM a una temperatura aproximada de 35°C con 4 g L⁻¹ de Gel Gro[®], para abastecer los sistemas con nuevos nutrientes y evitar la disminución del nivel del medio. De esta manera se garantizó también un nivel adecuado del medio de cultivo sobre la pared divisoria (± 2 mm), para facilitar el paso de las hifas hacia el CH. Cuando fue necesario se cortaron las raíces que cruzaban hacia el CH, manteniéndolas todas en el CR.

Después de ocho semanas de cultivo se determinó el número de hifas cruzando sobre la pared divisoria entre el CR y el CH, la longitud del micelio y el número de esporas producidas en el CH.

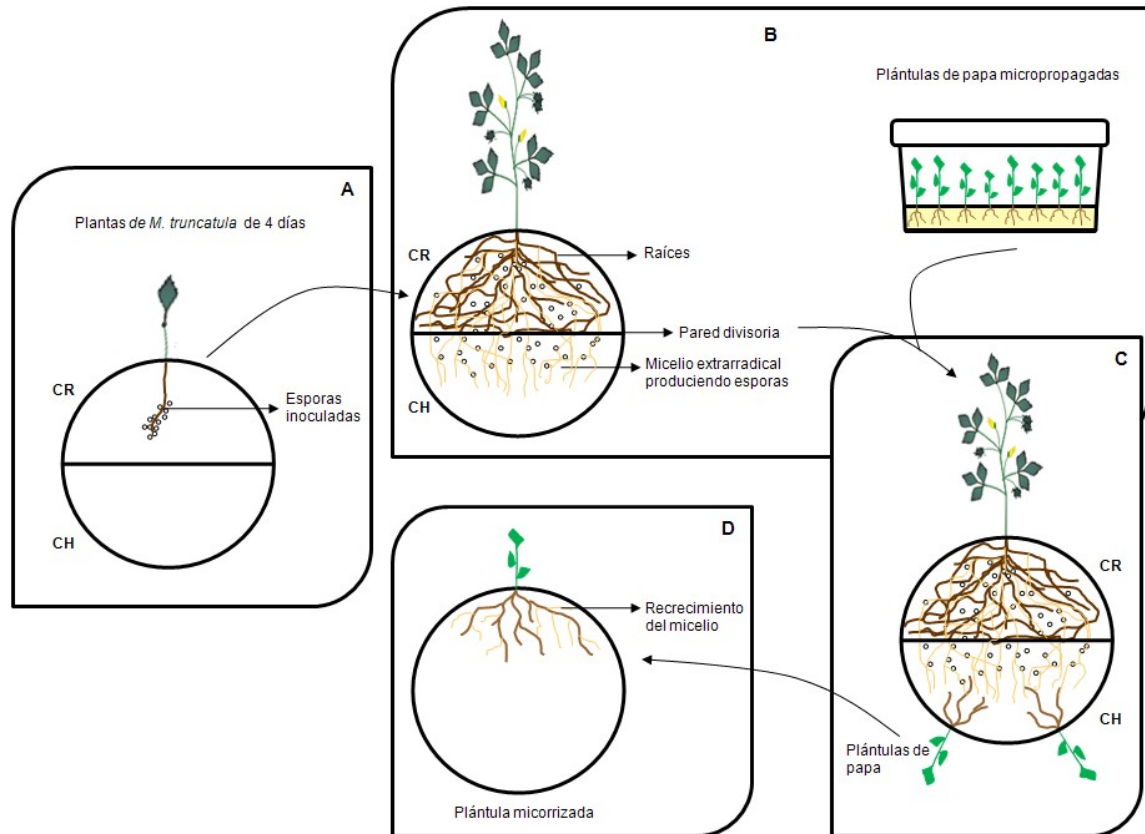


Figura 7. Representación esquemática del sistema de cultivo *in vitro* a partir de una planta donante de micelio (PDM), desarrollado para la producción rápida de plantas micorrizadas. A: plántula de *M. truncatula* asociada con *G. intraradices* en el sistema *in vitro* autotrófico a partir de una PDM en el medio SRM, sin azúcares ni vitaminas. B: Planta de *M. truncatula* después de dos meses de asociación mostrando una red profusa de micelio extrarradical en el CH. C: Dos plántulas de papa de siete días de cultivo fueron introducidas en el CH para provocar el contacto de sus raíces con la red de micelio. D: Recrecimiento del micelio en las plantas de papa trasplantadas a medio fresco E. CR (compartimento radical), CH (compartimento hifal).

El número de hifas cruzando sobre la pared divisoria fue cuantificado utilizando un microscopio compuesto de campo brillante (125-250X, Olympus BH-2, Olympus Optical GmbH, Alemania). El largo del micelio y el número de esporas desarrollados en el CH se evaluaron utilizando la metodología detallada por Voets *et al.* (2005), empleando un microscopio de disección (10-40X, Olympus SZ40, Olympus Optical GmbH, Alemania).

Se tomaron dos grupos de 30 unidades experimentales (cada sistema es considerado una unidad experimental) para continuar con la siguiente fase del estudio. Posteriormente, se realizaron dos

nuevos orificios (± 2 mm diámetro) en el CH de los sistemas, separados alrededor de 4,5 cm uno del otro, utilizando el mismo procedimiento que en el caso anterior.

Las placas se abrieron cuidadosamente y se colocaron dos plántulas de papa de 7 días de subcultivo, presentando aproximadamente 3 cm de longitud y de tres a cuatro hojas (Figura 7 B y C), ó dos plántulas de *M. truncatula* de 4 días de germinadas. Las raíces se colocaron suavemente sobre el medio de cultivo y el vástago se ubicó hacia el exterior de la placa. Todos los sistemas fueron sellados cuidadosamente, las placas se cubrieron con bolsas de polietileno negro, e incubaron bajo las mismas condiciones de cámara de crecimiento que las mencionadas anteriormente (Acápite 3.2.1), pero en posición horizontal.

3.3.2. Evaluación de la dinámica de la colonización radical en plántulas de *S. tuberosum* y *M. truncatula* asociadas a la red de micelio extrarradical proveniente de la PDM

En este momento del estudio, las 30 unidades experimentales pertenecientes a cada especie de planta se dividieron en cinco grupos, de manera que cada grupo compuesto por seis unidades sólo se mantuvo en contacto con la red de micelio los días correspondientes para completar la dinámica. Transcurridos 3, 6, 9, 12 y 15 d, de acuerdo a la dinámica establecida, se extrajeron de sus sistemas seis plantas de cada especie (una planta por unidad experimental), las 6 plantas restantes se utilizaron en el siguiente estudio (Acápite 3.3.3). Posteriormente, se procedió a estimar la frecuencia e intensidad de la colonización, según la metodología descrita en el acápite 3.2.2.1.

3.3.3. Producción de esporas y desarrollo del micelio extrarradical en plantas de *S. tuberosum* y *M. truncatula* previamente asociadas a la red de micelio

A los 3, 6, 9, 12 y 15 d de haber entrado en contacto con la red de micelio, las plantas restantes de las 6 réplicas se extrajeron cuidadosamente y se transfirieron a placas Petri de 90 mm diámetro. En el caso de las plántulas de papa se transfirieron a medio E (Figura 7 D) y las de *M. truncatula* a medio SRM, en ambos casos sin azúcares ni vitaminas. La producción de esporas por placa Petri y

el desarrollo del micelio extrarradical, se midieron semanalmente durante cuatro semanas, según Voets *et al.* (2005).

3.4. Transporte de potasio utilizando ^{86}Rb como trazador

Este experimento se realizó con el objetivo de evaluar la funcionalidad de la simbiosis bajo condiciones *in vitro* y demostrar la capacidad de las hifas de HMA de absorber y translocar potasio a su hospedero. Se utilizó ^{86}Rb como trazador y plántulas de *M. truncatula* inoculadas con esporas de *G. clarum* y *G. intraradices*.

El experimento fue llevado a cabo bajo condiciones estrictas de cultivo *in vitro*, utilizando un sistema autotrófico totalmente *in vitro* (conocido como AM-P, por sus siglas en inglés, Arbuscular Mycorrhizal-Plant) diseñado por Dupré de Boulois *et al.* (2006) (Figura 3 C). Este sistema fue desarrollado para realizar estudios de transporte en la simbiosis micorrízica arbuscular y consta de tres compartimentos: (1) un compartimento para el tallo (CT), (2) un compartimento radical (CR) y (3) un compartimento hifal (CH). El CT fue fabricado con un tubo Falcon de 50 mL (Sarstedt Aktiengesellschaft y Co, Nümbrecht, Alemania), el cual presenta un DAM (18,6 mm diámetro) fijo en la tapa. En el CR se desarrollan el HMA y las raíces de la planta en medio SRM con 3 g L^{-1} de Gel Gro[®], sin azúcar y sin vitaminas. Por su parte, en el CH sólo se desarrolla el micelio extrarradical en medio líquido SRM con las mismas características pero, en este caso, sin K. El CR y el CH están separados físicamente por una pared de plástico.

En los sistemas se insertaron cuidadosamente plántulas de *M. truncatula* de 7 días de germinadas (aproximadamente 30 mm de largo y raíces primarias de alrededor de 50 mm de longitud), ubicando las raíces en la superficie del medio de cultivo en el CR y el tallo dentro del CT, en el interior del tubo Falcon.

Las raíces se inocularon con aproximadamente 50 esporas de *G. intraradices* y *G. clarum* en sus sistemas correspondientes, previa solubilización del medio SRM, siguiendo la metodología publicada por Doner & Bécard (1991).

Posteriormente se sellaron las placas utilizando rollos de celofán (2 cm de ancho) y se envolvieron (CR y CH) con bolsas de polietileno negro para mantener los propágulos de los HMA y las raíces en la oscuridad, mientras que los vástagos quedaron expuestos a condiciones de iluminación. Los sistemas fueron transferidos a cámara de crecimiento con condiciones ambientales similares a las descritas en el acápite 3.2.1.

Cada dos semanas fue necesario añadir medio de cultivo fresco en las placas para evitar la disminución del medio y garantizar el paso de las hifas sobre la pared divisoria hasta el compartimento hifal. Después de ocho semanas de cultivo se añadieron 15 mL de medio líquido SRM en el CH, sin azúcares, vitaminas y K, para garantizar el crecimiento del micelio en este compartimento.

Cada sistema, consistente en una planta de *M. truncatula* asociada con una de las dos cepas de *Glomus*, constituyó una unidad experimental. Se utilizaron siete unidades experimentales en el caso de *G. intraradices* y seis para *G. clarum*.

3.4.1. Marcaje radioisotópico

Transcurridas diez semanas de haber introducido las plantas en los sistemas (dos semanas después que el micelio estaba desarrollándose en el CH), se removió cuidadosamente el medio líquido del CH tratando de no dañar la integridad del micelio y se añadió inmediatamente 15 mL de medio líquido fresco marcado con 20 μL de una solución filtrada de $^{86}\text{RbCl}$ (Acrodisc[®]SyringeFilters, PALL Corporation, Ann Arbor, MI, USA), correspondiente a una actividad en el medio de 2 250 Bq mL^{-1} . El micelio extrarradical fue mantenido en contacto con la solución de Rb durante dos semanas.

Dos días antes de realizar el marcaje con ^{86}Rb se introdujo un tratamiento control con formaldehído (2%) para cada una de las especies de HMA utilizadas, con el objetivo de bloquear la actividad metabólica de las hifas que estaban presentes en el CH. Este tratamiento permitiría determinar si la

translocación del elemento desde el CH hasta el CR y el CT está mediada por procesos activos que involucren las hifas.

3.4.2. Evaluaciones realizadas

Antes de proceder al marcaje radioisotópico se estimaron las siguientes variables en todas las placas: longitud radical (cm), longitud micelial (cm) y número de esporas en el CR y el CH, según la metodología referida por Voets *et al.* (2005). Se estimó además el número de hifas cruzando sobre la pared divisoria utilizando el mismo procedimiento que en los casos descritos anteriormente (Acápite 3.3.1). Durante el conteo de estas hifas se verificó la presencia de flujo citoplasmático en las mismas, utilizando un microscopio de disección (40X, Olympus SZ40, Olympus Optical GmbH, Alemania).

Al finalizar el experimento, se colectaron individualmente los vástagos, las raíces, el medio sólido contenido en el compartimento radical incluyendo el micelio y el medio líquido y el micelio extrarradical en el compartimento hifal, utilizando la metodología de Dupré de Boulois *et al.* (2006). Se evaluó la masa fresca de las raíces y tallos en cada muestra. Posteriormente, se les realizó, conjuntamente con el resto de las fracciones colectadas, un conteo de ^{86}Rb (Bq) con un medidor de rayos gamma (Wallace 1480, Turku, Finlandia).

Finalmente, se tiñeron las raíces de *M. truncatula* utilizando la misma metodología descrita en el acápite 3.2.2.1, para estimar los porcentajes de intensidad y frecuencia de la colonización.

3.5. Análisis estadístico

Después de comprobada la normalidad y la homogeneidad de varianza (Test de Brown-Forsythe), utilizando el paquete estadístico Statistica (StatSoft Inc., 2001), los datos fueron sometidos a Análisis de Varianza de clasificación simple y posterior Test de Tuckey, con el fin de identificar las diferencias significativas entre los tratamientos a $p < 0,05$.

En el segundo ensayo (Acápite 3.2.2) se realizó un Análisis Multivariado de Componentes Principales a los valores de las variables obtenidos al finalizar el estudio (40 días) en el SA-PIV,

con el propósito de realizar una valoración integral del efecto de los diferentes medios de cultivo y elegir el más adecuado, teniendo en cuenta todas las variables evaluadas. Se utilizó el programa STATGRAPHICS Plus, Versión 5.1 de Microsoft®.

Los valores de las variables frecuencia e intensidad fueron transformados según la expresión $\arcsen\sqrt{x}/100$ y comprobada su distribución normal. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el paquete Statistica (StatSoft Inc., 2001).

En el experimento 3, acápite 3.3.1 se realizó Análisis de Varianza y Test de Tuckey para formar los dos grupos de 30 sistemas de Planta Donante de Micelio que serían utilizados posteriormente para colonizar las plántulas de *Solanum tuberosum* y *Medicago truncatula*, teniendo en cuenta que no existieran diferencias significativas para $p < 0,05$ en las tres variables evaluadas (número de hifas cruzando la pared divisoria entre compartimentos, longitud micelial en el compartimento hifal y número de esporas en el compartimento hifal).

En el acápite 3.3.3, con los valores de producción de esporas y de longitud del micelio en los distintos tiempos de muestreo (3 a 12 días), en las diferentes semanas después de la asociación, se calcularon los intervalos de confianza de la media al 95% de probabilidad, atendiendo al número de repeticiones y la reproducibilidad de los datos. Se utilizó el paquete estadístico Statistica (StatSoft Inc., 2001).

IV. RESULTADOS

4.1. Estudio de diferentes medios y sistemas de cultivo para el establecimiento de la micorrización *in vitro* de plántulas de *S. tuberosum*

4.1.1. Ensayo 1. Potencialidades de los medios MS, $\frac{1}{2}$ MS y SRM para la germinación y colonización de esporas de *Glomus clarum* en plántulas de papa, en dos sistemas autotróficos de cultivo (parcialmente *in vitro* SA-PIV y totalmente *in vitro* SA-TIV).

SA-PIV: En el sistema autotrófico parcialmente *in vitro* las plántulas de papa revelaron, de manera general, un comportamiento diferenciado dependiendo del medio de cultivo en el cual se desarrollaron (Figura 8).

Las plantas que crecieron en el medio de cultivo $\frac{1}{2}$ MS presentaron una mejor respuesta, exhibiendo tallos de mayor tamaño y vigor, mayores hojas y un profuso crecimiento del sistema radical, en comparación con las plantas crecidas en SRM y MS. Las plantas desarrolladas en medio MS mostraron un reducido crecimiento del sistema aéreo y radical, observándose hojas más pequeñas y tallos más delgados, comparadas con $\frac{1}{2}$ MS, así como un escaso número de raíces que oscilaron entre 5 y 10 por planta.

En el medio SRM las plantas mostraron una

altura algo similar a la observada en las plantas desarrolladas en MS, pero se caracterizaron por hojas más pequeñas, dispuestas paralelas a los tallos, que se revelaron delgados y poco vigorosos, mostrando cambios marcados de coloración de verde a púrpúreo. El sistema radical mostró un

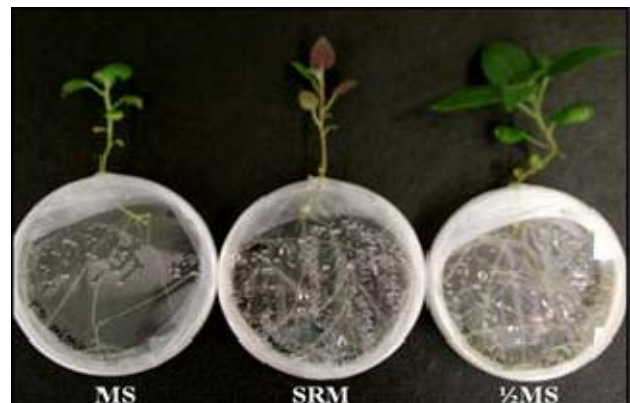


Figura 8. Comportamiento diferenciado de plántulas de papa inoculadas con 50 esporas del HMA *G. clarum* en los medios de cultivo MS (Murashige y Skoog), SRM (Strullu y Romand modificado) y $\frac{1}{2}$ MS, transcurridos 20 días de asociación en el sistema autotrófico parcialmente *in vitro* (SA-PIV). Placas Petri, 90 mm diámetro.

desarrollo menos intenso en este medio, comparado con el observado en $\frac{1}{2}$ MS, pero superior al encontrado en el medio MS.

El comportamiento fúngico, en relación con los diferentes medios de cultivo, no estuvo en correspondencia con el desarrollo de las plántulas de papa, de tal forma que en el medio SRM fue donde se observaron mayor número de esporas germinadas (70 %), así como mayor número de puntos de contacto (aproximadamente el 50 % de las esporas germinadas) entre los tubos germinativos y las raíces, indicadores de acción colonizadora. En el caso del medio $\frac{1}{2}$ MS se observó germinación de algunas esporas (15-20 %) y el contacto de los tubos germinativos con las raíces después de 20 días de cultivo, no siendo así en el medio MS en el que no hubo germinación.

SA-TIV: En el sistema autotrófico totalmente *in vitro* no se observó germinación en las esporas, transcurridos 30 días de asociadas, en los tres medios de cultivo utilizados. No obstante, en el crecimiento de las plantas sí se observó, de manera general, un comportamiento diferente en función de los medios de cultivo empleados, notándose un mayor desarrollo en las plántulas crecidas en

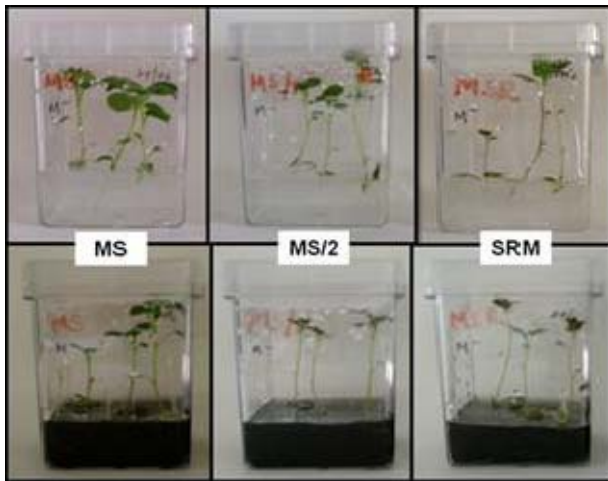


Figura 9. Comportamiento de plántulas de papa inoculadas con 50 esporas del HMA *G. clarum* en los diferentes medios de cultivo estudiados (MS, SRM y $\frac{1}{2}$ MS), combinados o no con carbón activado, después de 20 días de cultivo en Magentas[®] (V = 0, 12 L), sistema autotrófico totalmente *in vitro* (SA-TIV).

medio MS, en relación con $\frac{1}{2}$ MS y SRM, a diferencia de lo encontrado en el SA-PIV.

Por otra parte, en este sistema las plántulas mostraron menor vigor, tallos más delgados y un ligero alargamiento de los entrenudos (Figura 9), sobre todo en medio $\frac{1}{2}$ MS y SRM.

El comportamiento observado, tanto de las plantas como de los propágulos fúngicos, en los dos sistemas y medios de cultivo estudiados, dejó claro dos aspectos fundamentales a tener en cuenta en el

transcurso de la investigación. Primeramente, las potencialidades que ofrece el medio de cultivo $\frac{1}{2}$ MS al garantizar un adecuado crecimiento de las plántulas de papa y permitir, aunque no de forma eficiente, la germinación de los propágulos micorrízicos en el SA-PIV, por lo que se hace necesario reducir las concentraciones de algunos nutrientes como P y N de este medio, por su influencia en la germinación y el establecimiento micorrízico y valorar su efecto en el desarrollo de la simbiosis.

En segundo lugar, la necesidad de modificar las condiciones de cultivo en el SA-TIV con el fin de lograr, al menos, la germinación de los propágulos y la consecuente colonización del sistema radical de las plántulas de papa. En este caso ha de tenerse en cuenta que el sistema debe garantizar oscuridad en el medio de cultivo o al menos, disminuir la incidencia de la luz sobre las esporas después de inoculadas.

4.1.2. Ensayo 2. Efecto de la inoculación con esporas de *G. clarum* en plántulas de papa en los dos sistemas autotróficos de cultivo (SA-PIV y SA-TIV), utilizando diferentes medios elaborados a partir de MS.

En este estudio se evaluaron diferentes medios de cultivo, a partir de variaciones realizadas en las concentraciones de N, P y K del medio MS, en los dos sistemas autotróficos de cultivo.

SA-PIV: Se obtuvo un efecto significativo de los tratamientos sobre el desarrollo de las plántulas, apreciable a partir del primer muestreo y hasta la conclusión del ensayo (40 días) (Figuras 10 y 11).

Los mayores valores de altura se alcanzaron en las plantas desarrolladas en los medios $\frac{1}{2}$ MS, E ($\frac{1}{4}$ P- $\frac{1}{4}$ N- $\frac{1}{4}$ K) y G ($\frac{1}{4}$ P- $\frac{1}{8}$ N- $\frac{1}{10}$ K) (Figura 11). Sin embargo, para el caso del área foliar y la masa seca aérea de la plantas, los mayores valores se encontraron en el medio $\frac{1}{2}$ MS, seguidas por las que crecieron en medio E y G, con una diferencia de aproximadamente el 50 % en el caso de la masa seca aérea. En los medios A ($\frac{1}{4}$ P), B ($\frac{1}{8}$ P) y SRM se alcanzaron los valores más bajos de todas las variables, siendo la masa seca aérea y el área foliar 90 % y 45 % menores, respectivamente, que en el medio $\frac{1}{2}$ MS.

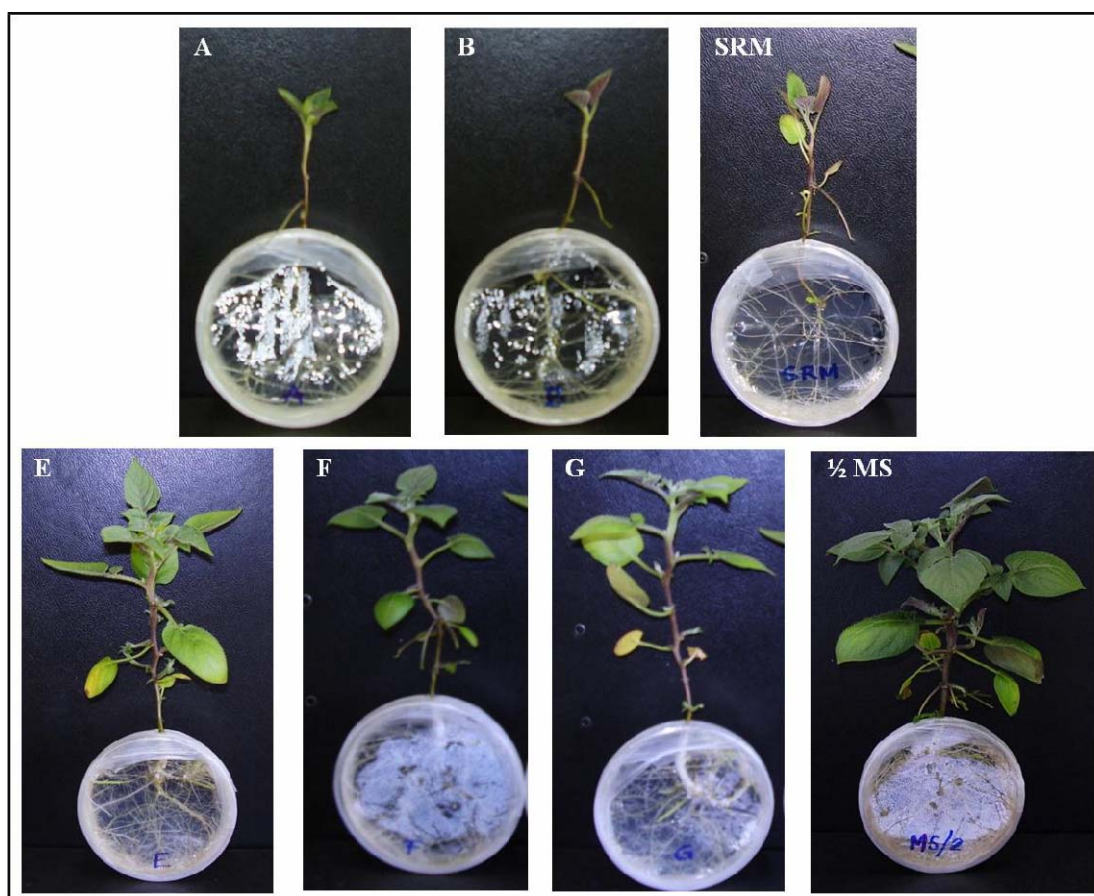


Figura 10. Efecto de los diferentes medios de cultivo obtenidos a partir de la disminución de las concentraciones de P, N y K en el medio MS (A: $\frac{1}{4}$ P; B: $\frac{1}{8}$ P; E: $\frac{1}{4}$ P- $\frac{1}{4}$ N- $\frac{1}{4}$ K; F: $\frac{1}{8}$ P- $\frac{1}{4}$ N- $\frac{1}{10}$ K; G: $\frac{1}{4}$ P- $\frac{1}{8}$ N- $\frac{1}{10}$ K) en el crecimiento de plántulas de papa, después de 40 días de cultivo en el SA-PIV (Placas Petri 90 mm diám.).

En cuanto a la absorción por las raíces de los elementos N, P y K, pudo observarse que las que crecieron en el medio $\frac{1}{2}$ MS realizaron una extracción significativamente mayor de los tres nutrientes, comparado con el resto de los tratamientos (Figura 12), lo cual se ve reflejado en las variables de crecimiento evaluadas (Figura 11).

Se apreció un efecto positivo de la reducción conjunta de P y N sobre la extracción de los elementos P, N y K. Los medios A, B y SRM fueron en los que ocurrió una menor extracción, con valores prácticamente similares en los tres casos.

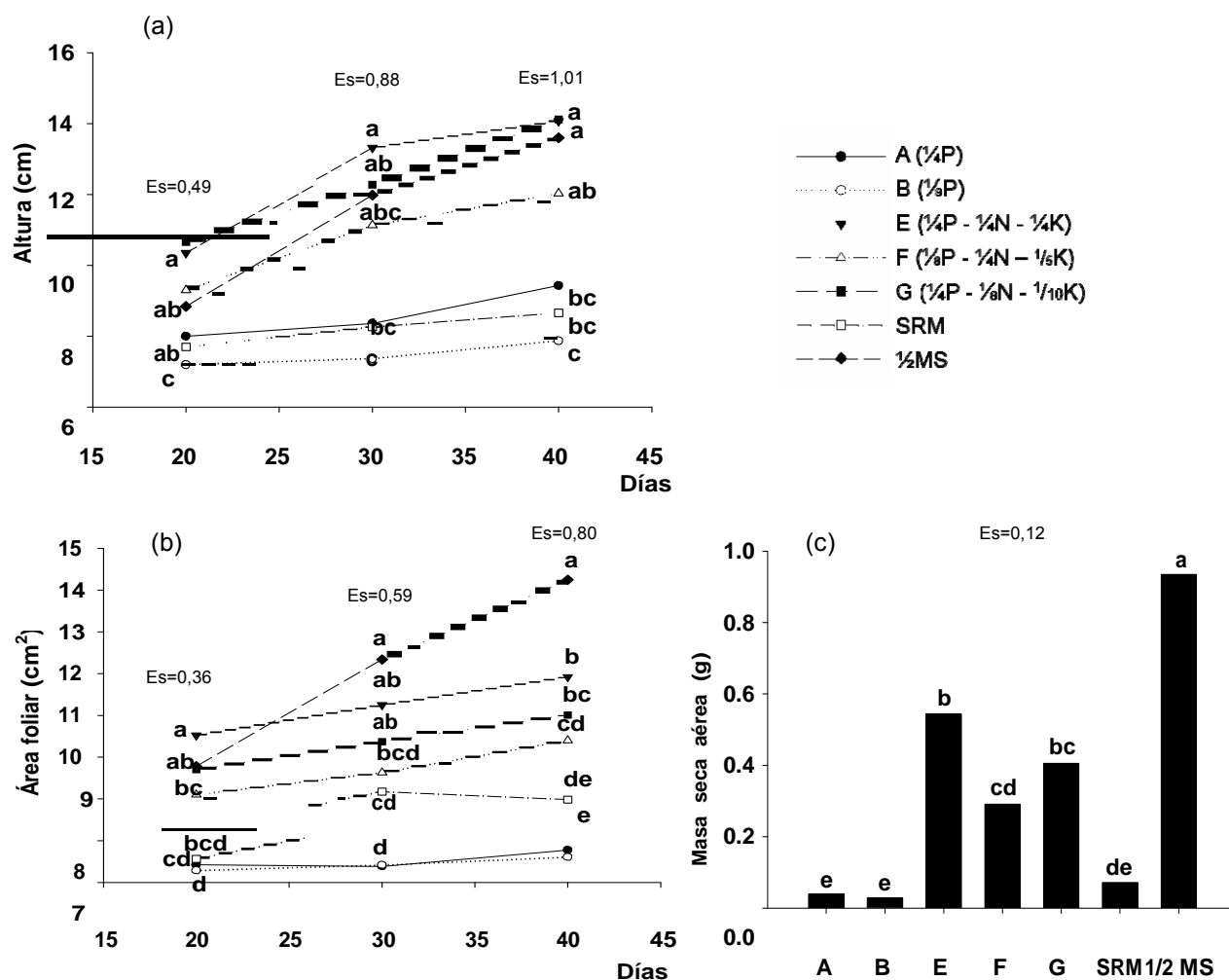


Figura 11. Efecto de los medios de cultivo (A, B, E, F, G, 1/2MS y SRM) en el desarrollo de plántulas de papa cultivadas en el sistema autotrófico parcialmente *in vitro* a través de las variables (a) altura de la planta y (b) área foliar en los tres momentos de muestreo y (c) masa seca aérea a los 40 días. Diferencias significativas para $p < 0,05$ según Test de Tukey, $n=7$.

El contenido nutricional de los medios influyó no sólo sobre el crecimiento de las plántulas, sino también sobre el establecimiento micorrízico (Figura 13).

En el medio E las esporas comenzaron a germinar a partir de los diez primeros días de inoculadas. Las primeras esporas se produjeron a partir de la cuarta semana de comenzado el experimento e incrementaron su número paulatinamente, apreciándose vesículas y arbuscúlos en el interior de las células corticales de las raíces de las plántulas de papa.

A partir de los 30 días de cultivo las hifas comenzaron a crecer activamente dentro del medio y a expandirse hasta explorar toda el área de las placas que integran los sistemas, permitiendo observar

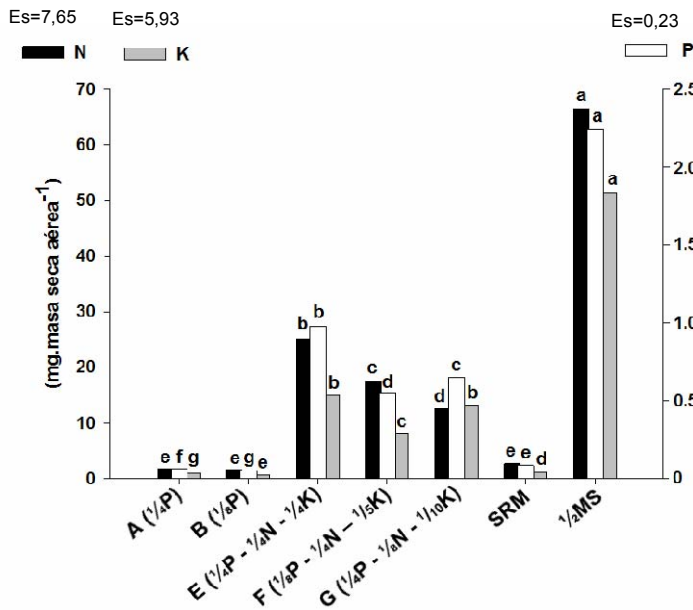


Figura 12. Extracción de nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) (mg masa seca aérea⁻¹) realizada por las plántulas de papa en los diferentes tratamientos en el sistema autotrófico parcialmente *in vitro*. Diferencias significativas para $p < 0,05$ según Test de Tukey, $n=7$.

la avanzada dispersión del micelio y la formación de algunas estructuras ramificadas de absorción (ERA) (Figura 14).

Los valores obtenidos de número de esporas (74) por placa Petri y de longitud de micelio (63 cm), en las colonias que se desarrollaron en medio E, superaron estadísticamente a los del resto de los tratamientos (Figura 13) que no sobrepasaron las 15 esporas por placa y los 25 cm de longitud micelial.

En el medio 1/2MS las esporas se comportaron de la misma forma que en el ensayo anterior, en el que germinaron sólo un pequeño grupo (15 %) y los tubos germinativos mostraron un crecimiento lento y errático.

El análisis de Componentes Principales realizado con los valores de las variables evaluadas al finalizar el experimento, permitió definir cuáles de las variables estudiadas estaban más relacionadas con el desigual comportamiento observado en el crecimiento de las plántulas de papa y en el desarrollo del HMA inoculado, en función de los medios de cultivo empleados; así como diferenciar el medio de cultivo que ofrecía las mejores condiciones para el desarrollo de la asociación micorrízica en las plántulas de papa, de forma general. Se encontraron dos componentes que explican un 63,53 % y un 31,40 % de la variabilidad total del experimento (Tabla 3), respectivamente, para una varianza acumulada de 94,93 %.

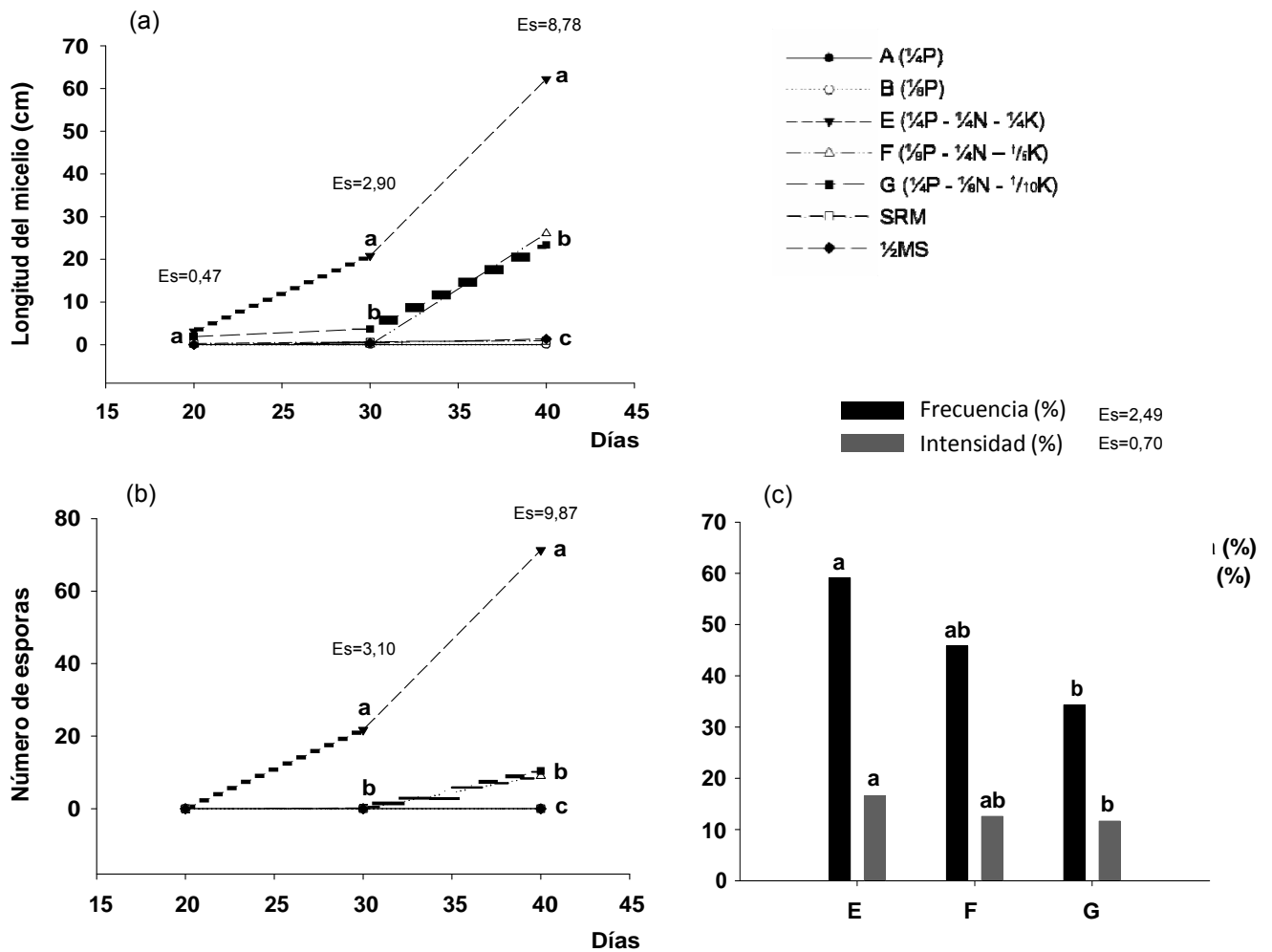


Figura 13. Influencia de la composición nutricional de los medios de cultivo (A, B, E, F, G, 1/2MS y SRM) en el comportamiento micorrízico en raíces de plántulas de papa cultivadas en el sistema autotrófico parcialmente *in vitro*. (a) longitud del micelio extraradical, (b) número de esporas por placa Petri (90 mm diámetro) y (c) intensidad y frecuencia de la colonización a los 40 días; solamente en los tratamientos E, F y G en que hubo colonización micorrízica. Diferencias significativas para $p < 0,05$ según Test de Tukey, $n=7$.

Dentro de las variables que muestran mayores valores de correlación con la componente 1 se hallan las variables indicativas del crecimiento (altura, número de hojas, masa seca aérea y área foliar) y del estado nutricional y fisiológico (extracción de N, P y K) de las plántulas de papa. Sin embargo, la componente 2 está caracterizada por las variables relacionadas con el comportamiento micorrízico (número de esporas, longitud del micelio y frecuencia e intensidad de la colonización).

En la tabla 4 pueden apreciarse las variables que mayores coeficientes de correlación mostraron con las componentes. La representación gráfica, obtenida a partir de la aplicación del análisis

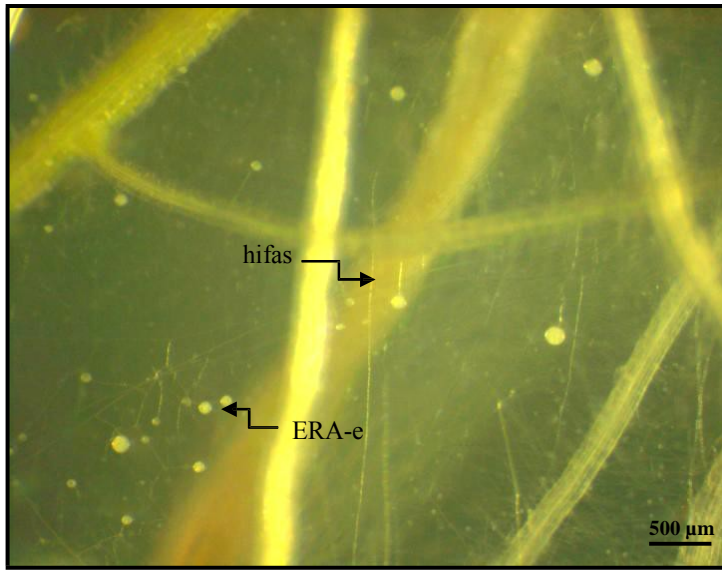


Figura 14. Crecimiento activo de las hifas dentro del medio E a los 35 días de cultivo en el sistema autrófico parcialmente *in vitro* (SA-PIV). Estructuras ramificadas de absorción portando esporas (ERA-e).

Tabla 3. Representación de los valores propios y la varianza explicada

Componentes	Valor propio	Varianza explicada (%)	Varianza acumulada (%)
1	6,98	63,53	63,53
2	3,45	31,40	94,93

Tabla 4. Correlaciones entre las variables iniciales y las dos primeras componentes

Variables	Componente 1	Componente 2
Altura (cm)	0,943	0,165
Área de hojas	0,957	0,017
Peso seco aérea (g)	0,942	-0,330
Área foliar (cm ²)	0,953	-0,295
Acción N (mg planta ⁻¹)	0,830	-0,530
Acción P (mg planta ⁻¹)	0,877	-0,470
Acción K (mg planta ⁻¹)	0,799	-0,599
Área de esporas	0,534	0,695
Extensión del micelio (cm)	0,599	0,783
Humectancia (%)	0,567	0,801
Acidez (%)	0,571	0,796

multivariado (Figura 15), muestra al medio E ($\frac{1}{4}P-\frac{1}{4}N-\frac{1}{4}K$) como el que brinda mayores posibilidades para el desarrollo de la micorrización *in vitro* de plántulas de papa en este sistema, al encontrarse situado en los extremos positivos de ambas componentes, seguidos por los medios G ($\frac{1}{4}P-\frac{1}{8}N-\frac{1}{10}K$) y F ($\frac{1}{8}P-\frac{1}{4}N-\frac{1}{5}K$).

El medio $\frac{1}{2}MS$, es el de mejor comportamiento con relación a la componente 1, la cual sólo está altamente correlacionada con las variables que reflejan el crecimiento y desarrollo del vegetal, no así con las indicativas del comportamiento micorrízico.

SA-TIV: En este caso tampoco hubo germinación de las esporas en el sistema, transcurridos 30 días de su inoculación. Debido a estas consideraciones no se realizaron evaluaciones en las plantas de modificaciones al SA-TIV, por la

importancia que tiene para esta investigación establecer la micorrización en los sistemas convencionales de micropropagación de plantas. Las modificaciones que se realizaron posteriormente estuvieron encaminadas a garantizar mayor oscuridad a las esporas para facilitar su germinación, bien a través de su inclusión en perlas de alginato de calcio o empleando el sustrato vermiculita combinado con el medio de cultivo.

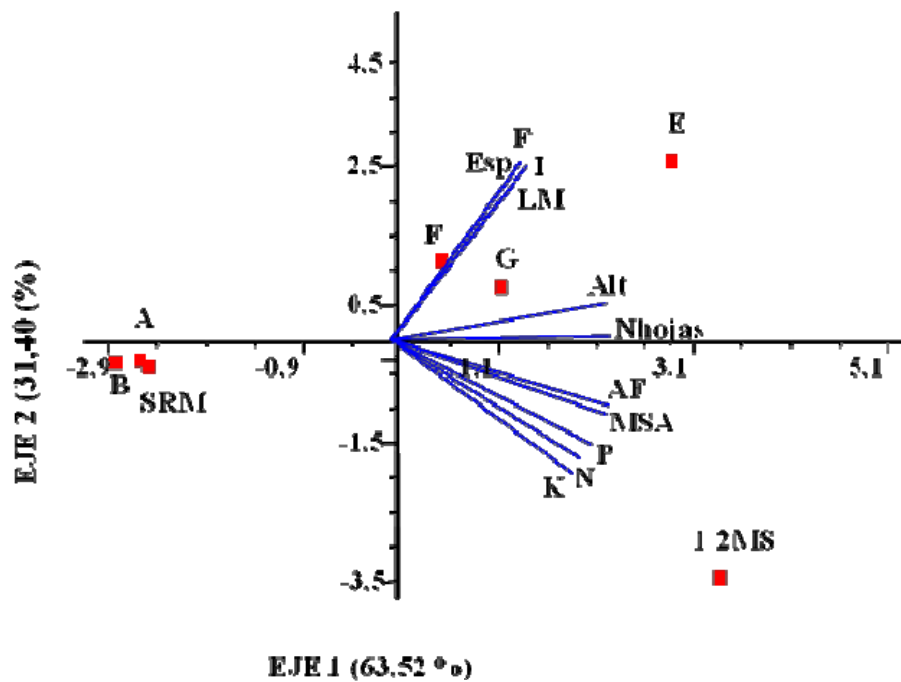


Figura 15. Representación gráfica del análisis de Componentes Principales que muestra la relación entre las variables evaluadas y los diferentes medios de cultivo A, B, E, F, G, $\frac{1}{2}$ MS y SRM. Esp.: número de esporas, LM: longitud del micelio, F: frecuencia de la colonización, I: intensidad de la colonización, Alt.: altura, Nhojas: número de hojas, AF: área foliar, MSA: masa seca aérea, P: fósforo, N: nitrógeno y K: potasio.

4.1.3. Ensayo 3. Efecto de la micorrización en el crecimiento de plántulas de papa en los medios E y G y los dos sistemas de cultivo (SA-PIV y SA-TIV)

El propósito de este ensayo fue evaluar el efecto de la micorrización sobre el crecimiento y desarrollo de las plántulas de papa en los dos sistemas de cultivo *in vitro* y en los medios E ($\frac{1}{4}$ P- $\frac{1}{4}$ N- $\frac{1}{4}$ K) y G ($\frac{1}{4}$ P- $\frac{1}{8}$ N- $\frac{1}{10}$ K). El medio E es el que posee las mejores condiciones para el establecimiento de la asociación en el SA-PIV y G también es un medio en el que se favorece el proceso, teniendo en cuenta los resultados del ensayo anterior (Figura 14).

SA-PIV: En la tabla 5 se observa que en las variables de crecimiento altura de la planta y área foliar no existieron diferencias significativas entre las plantas micorrizadas y las controles, durante los 40

Tabla 5. Crecimiento de plántulas de papa cultivadas en el sistema autotrófico parcialmente *in vitro* (SA-PIV), inoculadas o no con esporas de *G. clarum* en los medios E, G y $\frac{1}{2}$ MS, expresado por las variables altura de la planta y área foliar. Evaluaciones realizadas a los 20, 30 y 40 días. Valores seguidos por la misma letra en la misma variable y muestreo no difieren para $p < 0,05$, según Test de Tukey, $n=7$.

Tratamientos		Altura de la planta (cm)	Área foliar (cm ²)
		20 días	
E ($\frac{1}{4}$ P- $\frac{1}{4}$ N- $\frac{1}{4}$ K)	+	9,18	10,33 b
	-	10,65	10,41 b
G ($\frac{1}{4}$ P- $\frac{1}{8}$ N- $\frac{1}{10}$ K)	+	9,90	10,27 b
	-	10,71	10,33 b
$\frac{1}{2}$ MS	-	10,37	12,21 a
30 días			
E ($\frac{1}{4}$ P- $\frac{1}{4}$ N- $\frac{1}{4}$ K)	+	10,72	11,01 b
	-	11,62	11,07 b
G ($\frac{1}{4}$ P- $\frac{1}{8}$ N- $\frac{1}{10}$ K)	+	11,12	10,79 b
	-	12,20	10,64 b
$\frac{1}{2}$ MS	-	11,80	12,83 a
40 días			
E ($\frac{1}{4}$ P- $\frac{1}{4}$ N- $\frac{1}{4}$ K)	+	13,04 ab	11,89 b
	-	13,60 ab	11,69 bc
G ($\frac{1}{4}$ P- $\frac{1}{8}$ N- $\frac{1}{10}$ K)	+	12,28 b	11,00 c
	-	12,68 b	11,14 c
$\frac{1}{2}$ MS	-	15,05 a	14,07 a

Leyenda: + (con inoculación micorrízica), - (sin inoculación).

días de duración del experimento, independientemente de los medios de cultivo utilizados. No obstante, fueron menores estadísticamente que las desarrolladas en medio $\frac{1}{2}$ MS.

Por otra parte, también se aprecia que en el caso del medio E a los 40 días, los valores de la variable altura de la planta fueron similares estadísticamente a los alcanzados por las plantas controles en medio $\frac{1}{2}$ MS.

En cuanto al comportamiento fúngico se observó un patrón similar al encontrado en el ensayo anterior (Acápite 4.1.2). Las esporas comenzaron a germinar a partir de los diez primeros días de inoculadas, estableciendo contacto con las raíces de las plántulas de papa. A partir de los 30 días las hifas comenzaron a crecer y a expandirse

dentro del medio hasta abarcar toda la placa (medios E y G), con la producción de nuevas esporas (Figura 16) y estructuras ramificadas de absorción. En ambos medios de cultivo, las variables longitud del micelio y número de esporas por placa Petri aumentaron gradualmente a lo largo del ensayo (Figura 17), hasta alcanzar valores similares a los obtenidos en el medio E en el ensayo anterior, sin existir en este caso diferencias significativas entre ambos medios.

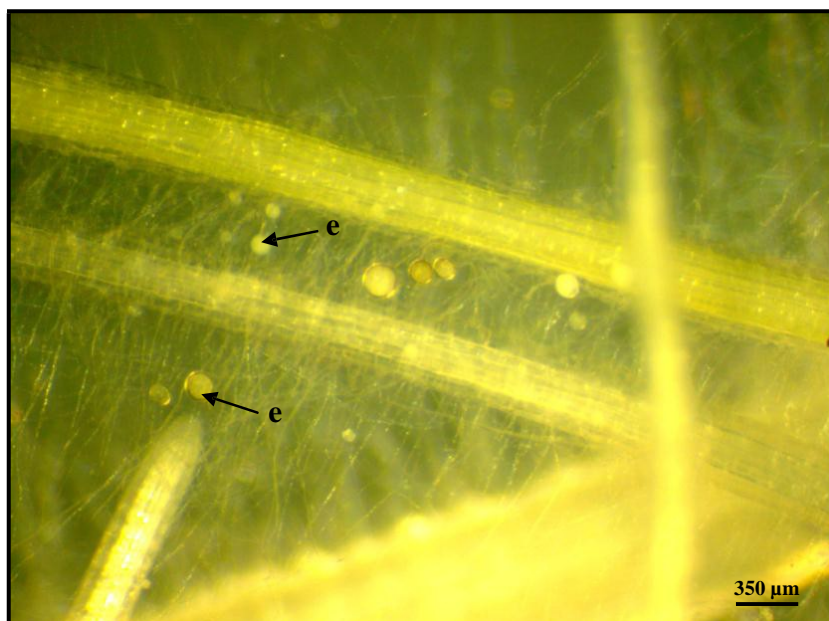


Figura 16. Crecimiento *in vitro* del HMA *G. clarum* en asociación con raíces de plántulas de papa inoculadas con 50 esporas, en medio E ($\frac{1}{4}$ P- $\frac{1}{4}$ N- $\frac{1}{4}$ K de MS), transcurridos 40 días de cultivo en el SA-PIV. e: nuevas esporas.

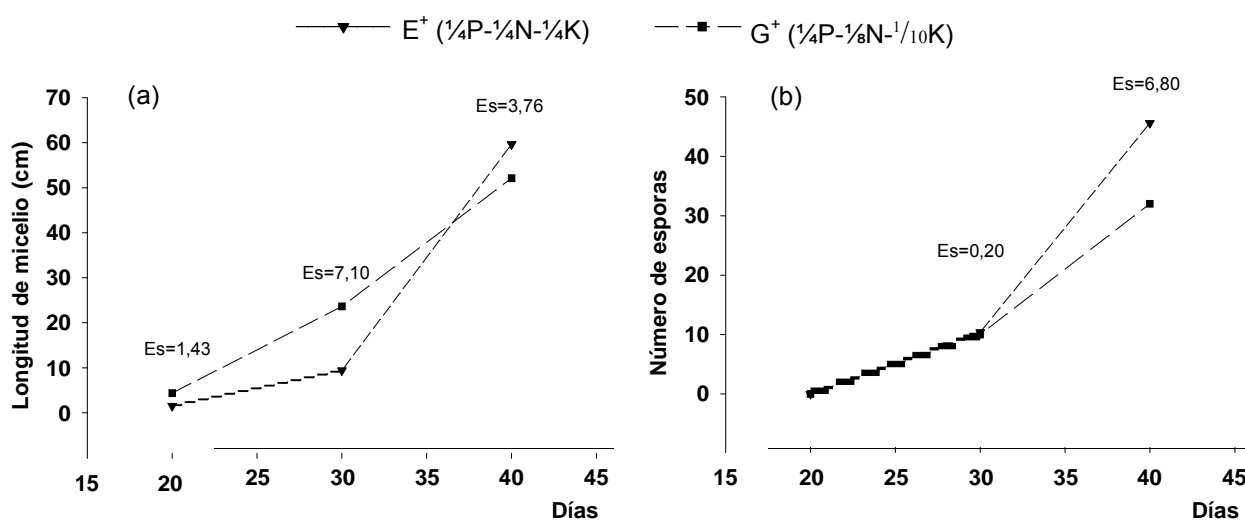


Figura 17. Comportamiento micorrízico en raíces de plántulas de papa cultivadas en el SA-PIV durante 40 días. (a) longitud del micelio y (b) número de esporas por placa Petri (90 mm diámetro), en los medios evaluados durante el ensayo 3. Diferencias significativas para $p < 0,05$ según Test de Tukey, $n=7$.

SA-TIV: La inoculación de las esporas en perlas de alginato tuvo como objetivo atenuar el efecto negativo de la iluminación sobre los procesos relacionados con la germinación y la colonización micorrízica.

En este experimento se observaron numerosos tubos germinativos emergiendo de las perlas de alginato a partir de los 30 días de cultivo, los que fueron superiores estadísticamente en las esporas que se encontraban en el medio E (Figura 18). Sin embargo, en el medio $\frac{1}{2}$ MS no se observó

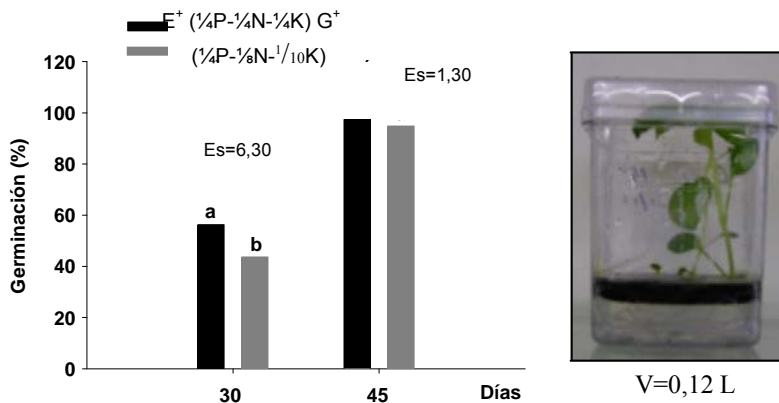


Figura 18. Porcentaje de perlas de alginato mostrando tubos germinativos de esporas de *G. clarum* emergiendo de sus paredes en los medios E ($\frac{1}{4}$ P- $\frac{1}{4}$ N- $\frac{1}{4}$ K) y G ($\frac{1}{4}$ P- $\frac{1}{8}$ N- $\frac{1}{10}$ K), modificados a partir de MS, en el sistema autotrófico totalmente *in vitro*, a los 30 y 45 días de cultivo. Se grafican solo estos medios pues en $\frac{1}{2}$ MS no hubo germinación. Diferencias significativas entre tratamientos para $p < 0,05$ según Test de Tukey, $n=7$. A la derecha, imagen de los sistemas a los 30 días de cultivo.

germinación transcurridos 30 días.

Los tubos germinativos se observaron brotando de las perlas y avanzando recto dentro del medio de cultivo, correspondiente con el comportamiento característico de *G. clarum*.

Después de cinco días (35 días después de la inoculación) se observaron los primeros puntos de contacto entre las hifas y las

raíces de las plántulas de papa y se produjeron nuevos tubos germinativos.

Al cabo de 30 días se observó que el 54 % de las perlas, en el medio E, mostraban tubos germinativos de las esporas emergiendo de sus paredes, mientras que en G fue significativamente menor, con valores cercanos a 44 %. Transcurridos 45 días de cultivo los porcentajes de germinación de las esporas se elevaron de manera gradual hasta alcanzar niveles estadísticamente similares, detectándose el 97,4 % y el 94,8 % de las perlas mostrando tubos germinativos en los medios E y G, respectivamente.

En ese momento (45 días después de la inoculación), se observó contacto directo entre las hifas de germinación y algunas de las raíces de las plántulas de papa desarrolladas en los medios E y G y se apreciaron hifas emergiendo de las raicillas portando pequeñas esporas.

Aunque los resultados de este ensayo para el sistema autotrófico totalmente *in vitro* fueron considerados satisfactorios en relación con el ensayo anterior utilizando el mismo envase de cultivo, al obtenerse germinación de las esporas en los medios estudiados y en algunos casos colonización de las raicillas de papa, se hace necesario continuar realizando modificaciones al sistema para disminuir el tiempo de colonización de las plántulas y el de establecimiento de la colonia fúngica, así como aumentar la capacidad de producción de nuevos propágulos.

4.1.4. Ensayo 4. Factibilidad del uso de microcajas (SA-TIV) para la micorrización de plántulas de papa con esporas del HMA *G. clarum*

La figura 19 muestra la microcaja de polipropileno utilizada en este estudio como SA-TIV. Este envase es de mayor capacidad que la Magenta® y fue utilizado con el propósito de facilitar el



Figura 19. Comportamiento de las plantas de papa cultivadas en Microcajas (V = 1,32 L) después de 30 días. Obsérvese las ramificaciones presentes en los tallos y la delgadez de los mismos.

crecimiento de las plántulas de papa y el establecimiento de la micorrización.

En la tabla 6 se observan los valores alcanzados por las variables relacionadas con el crecimiento de las plántulas de papa (altura, número de hojas y masas fresca y seca totales) en el sistema y en los medios de cultivo estudiados (E, I, J y ½MS). En relación con estas variables se puede apreciar que las plantas que se desarrollaron en los medios I, J y ½MS, alcanzaron los mayores valores de masas fresca y seca totales, precisamente en los medios de mayor concentración de los macronutrientes P, N y K. Sin embargo, esta correspondencia

no se vió reflejada para el caso de la variable altura de las plantas, la cual alcanzó los mayores valores estadísticamente en los medios E e I.

Por otra parte, y de manera general en todos los tratamientos, las plantas mostraron un comportamiento diferente a las desarrolladas en Magentas®. En este sistema las plantas se

caracterizaron por presentar hojas pequeñas, tallos delgados con abundantes ramificaciones y cubiertos de raíces adventicias (Figura 19).

Tabla 6. Influencia de la composición nutricional de los medios E, I, J y $\frac{1}{2}$ MS en el crecimiento en altura, número de hojas y masas fresca y seca totales de plántulas de papa inoculadas con esporas de *G. clarum* durante 30 días, utilizando Microcajas como sistema autotrófico totalmente *in vitro*. Valores en una columna seguidos por la misma letra no difieren a $p < 0,05$ según Test de Tukey, $n=10$.

Medios de cultivo	Altura de la planta (cm)	Número de hojas	Masa fresca total (mg)	Masa seca total (mg)
E ($\frac{1}{4}$ P- $\frac{1}{4}$ N- $\frac{1}{4}$ K)	12,6 a	11	388 b	23,7 b
I ($\frac{1}{2}$ P- $\frac{1}{4}$ N- $\frac{1}{4}$ K)	11,1 ab	13	672 a	27,4 a
J ($\frac{1}{4}$ P- $\frac{1}{2}$ N- $\frac{1}{2}$ K)	10,6 b	12	583 a	29,1 a
$\frac{1}{2}$ MS	10,4 b	13	620 a	28,9 a

Al analizar el comportamiento micorrízico en el interior de las células corticales de las raíces de las plántulas de papa (Figura 20), expresado por las variables frecuencia e intensidad de la colonización, se pudo observar que los mayores valores de frecuencia se obtuvieron en los medios E

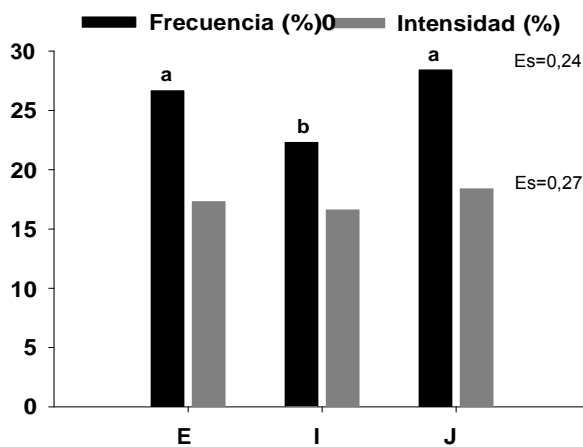


Figura 20. Influencia de la composición de los medios de cultivo E ($\frac{1}{4}$ P- $\frac{1}{4}$ N- $\frac{1}{4}$ K), I ($\frac{1}{2}$ P- $\frac{1}{4}$ N- $\frac{1}{4}$ K) y J ($\frac{1}{4}$ P- $\frac{1}{2}$ N- $\frac{1}{2}$ K) en la colonización micorrízica de plántulas de papa en el sistema autotrófico totalmente *in vitro* en Microcajas, expresado por las variables frecuencia e intensidad, a los 30 días de la inoculación. Diferencias significativas para $p < 0,05$ según Test de Tukey, $n=10$.

J, difiriendo estadísticamente del medio I. Los valores de frecuencia oscilaron entre 26,6 y 28,4 %. En el caso de la variable intensidad de la colonización, los valores oscilaron alrededor de 17 % y no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

En este sistema de cultivo y de inoculación de hongos micorrizógenos se estableció una respuesta diferenciada en relación con los resultados descritos en los ensayos anteriores, pero se reflejó igualmente cómo los factores nutricionales y el manejo realizado en los diferentes sistemas afectan el establecimiento de la

colonización micorrízica en condiciones de cultivo *in vitro*, al influir directamente sobre el crecimiento de las plántulas y el comportamiento fúngico. Estos resultados son positivos, en comparación con el resto, al lograrse el establecimiento de la micorrización en microcajas, sistema autotrófico totalmente *in vitro*.

4.2. Sistema de cultivo *in vitro* para la producción rápida de plantas micorrizadas a partir de las Redes de Micelio Extrarradical (RME)

En este experimento se utilizó la fase simbiótica del hongo micorrizógeno como inóculo, específicamente las RME proveniente de una planta donante de micelio (PDM), para producir plántulas micorrizadas *in vitro* de forma eficiente y acelerada. Se tuvo en cuenta que las esporas para establecer la micorrización en estas condiciones requieren de un tiempo prolongado para garantizar la germinación y la posterior colonización de las raíces, así como del control de otros factores (ej. nutricionales, ambientales) que hacen complejo el manejo de los sistemas *in vitro*.

4.2.1. Establecimiento de la Planta Donante de Micelio (PDM)

A los diez días de comenzada la primera fase del experimento se observaron los primeros puntos de contacto entre las hifas de germinación provenientes de las esporas y las raíces de las plantas y el micelio comenzó a desarrollarse de manera profusa dentro del medio en los compartimentos radicales.

Transcurridas seis semanas las hifas comenzaron a cruzar sobre la pared divisoria entre el compartimento radical (CR) y el compartimento hifal (CH) (Figura 21 A y B), contabilizándose alrededor de 335 ± 35 hifas que habían cruzado al CH al final de este periodo.

En ambos compartimentos el micelio se caracterizó por presentar abundantes hifas primarias o corredoras e hifas de bajo orden portando esporas, estructuras ramificadas de absorción (ERA) y esporas asociadas a ERA.

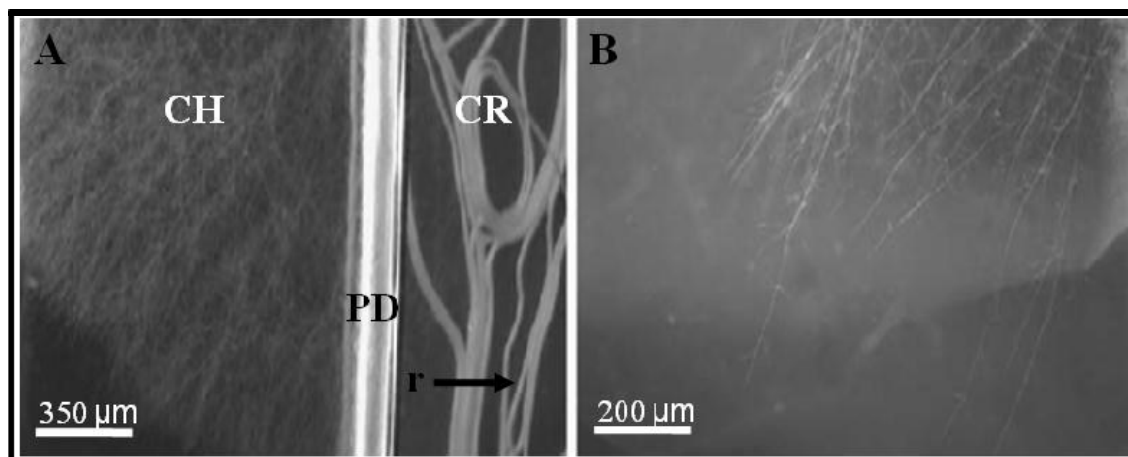


Figura 21. Patrón de crecimiento micelial obtenido con el sistema *in vitro* PDM (Planta Donante de Micelio) antes de asociar las plántulas de *S. tuberosum* y *M. truncatula*. A: densa red de micelio extrarradical desarrollada en el compartimento hifal (CH) proveniente del compartimento radical (CR), cruzando sobre la pared divisoria (PD). Raíces (r) de *M. truncatula* desarrolladas en el CR. B: Acercamiento al frente de micelio, numerosas hifas se extienden sobre la superficie del CH.

Dos semanas más tarde, el micelio extrarradical había colonizado intensamente casi la totalidad del CH y se habían producido un promedio de $4\,109 \pm 207$ cm de hifas y más de 7 000 esporas ($7\,442 \pm 658$). En las 30 unidades experimentales que se seleccionaron para asociar cada especie de planta (papa y *M. truncatula*), divididas en cinco grupos de seis sistemas, no se observaron diferencias significativas entre los grupos para las diferentes variables analizadas (Tabla 7), apreciable en los valores de p. Las plántulas de *M. truncatula* que serían utilizadas posteriormente como donantes de micelio continuaron su desarrollo, caracterizado por la producción de nuevas hojas, flores y con frecuencia se produjeron frutos.

Tabla 7. Valores de significación (p) determinados por Test de Tukey para las variables relacionadas con el desarrollo fúngico presente en los sistemas de Planta Donante de Micelio antes de asociar las plántulas de *S. tuberosum* y *M. truncatula* a las redes de micelio extrarradical ya establecidas. CH: compartimento hifal, CR: compartimento radical

Variables	Sistemas destinados a asociar plántulas de <i>S. tuberosum</i>	Sistemas destinados a asociar plántulas de <i>M. truncatula</i>
Número de hifas cruzando sobre la pared divisoria entre el CH y el CR	0,173	0,086
Longitud micelial en el CH	0,235	0,135
Número de esporas en el CH	0,487	0,179