

esporas estuvo en correspondencia con el desarrollo micelial y alrededor de 100 esporas por placa Petri ya habían sido producidas en ambas especies de plantas durante la primera semana de muestreo.

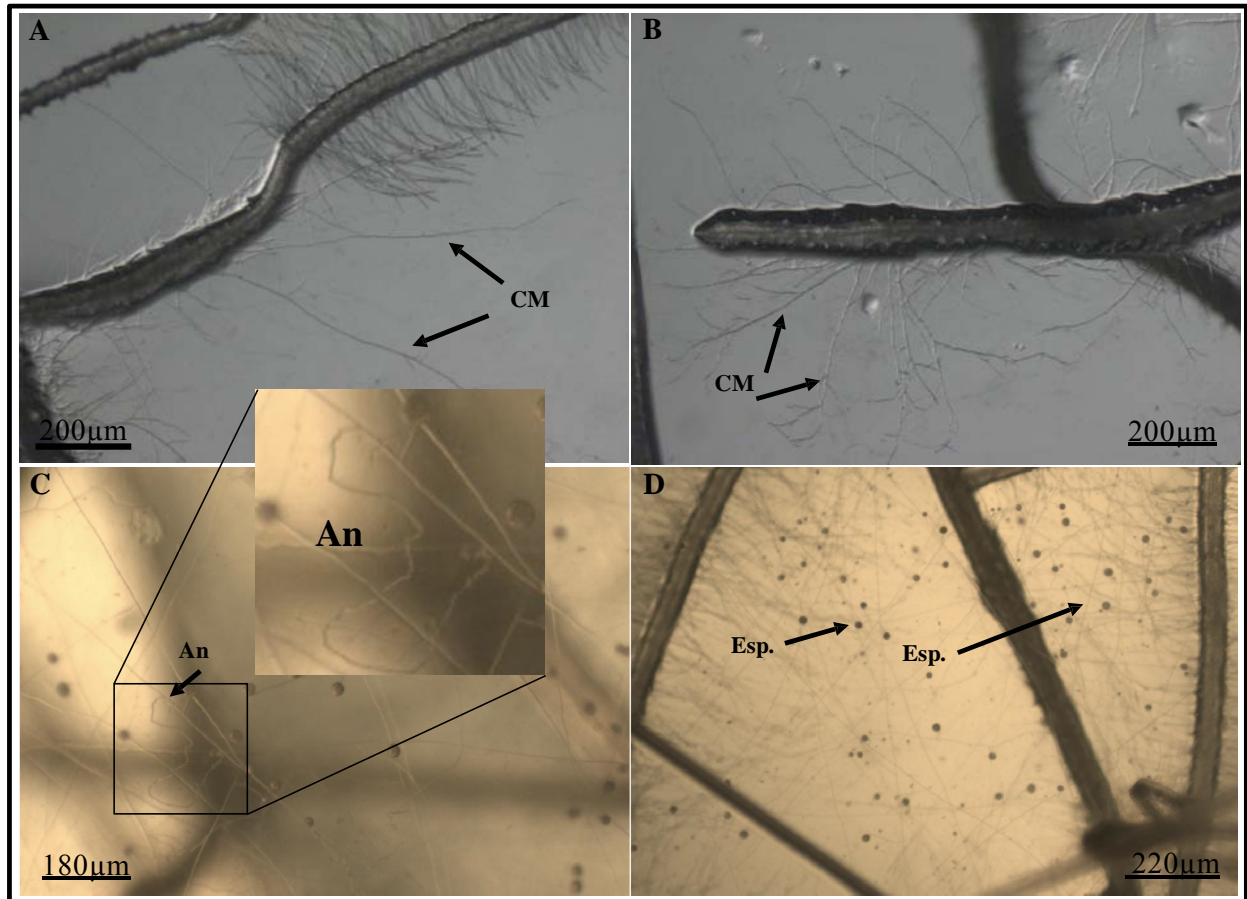


Figura 25. A y B: Crecimiento micelial (CM) a partir de raíces de plántulas de *S. tuberosum* de nueve días de asociadas a las redes de micelio extrarradical, después de transcurridas 48 horas de transferidas al nuevo medio (E). C y D: Micelio desarrollado y esporas producidas (Esp.) en plantas de papa después de nueve días asociadas con las RME, a las 4 semanas de transferidas al nuevo medio. An: anastomosis interconectando hifas en la colonia. Fotos tomadas al microscopio de disección (10-40x).

Transcurridas cuatro semanas, el micelio mostraba el crecimiento típico de una colonia de *G. intraradices*, observándose numerosas anastomosis (Figura 25 C) y un considerable número de esporas por placa Petri (Figura 25 C y D y Figura 24), con valores cercanos a 5 000 para el caso de las plántulas de papa y 7 500 para *M. truncatula*.

Las plántulas que estuvieron 12 días en contacto con las RME mostraron un patrón de crecimiento del nuevo micelio similar al antes descrito para las plántulas de nueve días, aunque produjeron un menor número de esporas por placa Petri. En el caso de las plántulas de *M. truncatula* que tuvieron contacto durante 12 días produjeron al menos tres veces más micelio y esporas que las que estuvieron 6 y 9 días (Figura 24) y dos veces más micelio que las plántulas de papa en el mismo periodo.

Estos resultados muestran el potencial del sistema de producción de plantas micorrizadas *in vitro* a partir de una Planta Donante de Micelio que se propone en este estudio, en el cual, con simplemente nueve días para el caso de *S. tuberosum* y 12 para *M. truncatula*, se alcanzan niveles de colonización en las plántulas lo suficientemente altos como para reproducir la colonia fúngica, a sólo 48 horas de su transferencia a medios frescos.

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

4.3.1. Desarrollo fúngico y de las plantas

En ambas especies micorrízicas, *G. clarum* y *G. intraradices*, las esporas comenzaron a germinar a partir del quinto día de su inoculación en raíces de plántulas de *M. truncatula*. Transcurridos diez días ya se observaban los primeros puntos de contacto entre los tubos germinativos, provenientes de las esporas de ambas especies, y las raíces de las plántulas y el micelio comenzaba a dispersarse dentro del medio con un profuso crecimiento. Después de ocho semanas el micelio colonizaba completamente el compartimento radical (CR) y comenzaba a cruzar sobre la pared divisoria entre éste y el compartimento hifal (CH). En ambos compartimentos el micelio se caracterizó por presentar hifas corredoras e hifas de bajo orden portando esporas, estructuras ramificadas de absorción y sus esporas asociadas; no obstante, en el CH estas estructuras fueron menos abundantes. Al finalizar el experimento, las plántulas de *M. truncatula* presentaban un crecimiento activo evidenciado por la emergencia de raíces secundarias y la producción de nuevas hojas. Como puede apreciarse en la tabla 8 no se encontraron diferencias significativas entre las variables masa fresca

foliar, masa fresca radical y longitud radical; sin embargo la longitud micelial, la producción de esporas y el número de hifas cruzando del CR al CH, fue mayor significativamente en los sistemas en que se inoculó la especie *G. intraradices*. La colonización de las plántulas difirió entre las dos especies micorrízicas con valores de frecuencia e intensidad significativamente mayores en el caso de *G. intraradices*.

Tabla 8. Crecimiento de las plantas de *M. truncatula* y comportamiento micorrízico evaluados a través de la longitud radical, longitud del micelio, número de esporas e hifas cruzando la pared divisoria (a las 10 semanas de cultivo) y de la masa fresca del vástago, masa fresca radical, frecuencia e intensidad de la colonización (posterior al marcaje radioisotópico, 12 semanas). Valores en una misma fila con igual letra no difieren significativamente a $p < 0.05$, según Test de Tukey para desigual número de muestras.

VARIABLES	<i>G. intraradices</i>	<i>G. clarum</i>
Masa fresca vástago	414 a	639 a
Masa fresca radical (mg)	992 a	1 091 a
Masa fresca total (mg)	1 406 a	1 730 a
Longitud radical (cm)	189 a	163 a
Longitud micelial (cm): CR	1 324 a	581 b
Número de esporas: CR	3 771 a	977 b
Frecuencia (%)	83 a	71 b
Intensidad (%)	41 a	16 b
Longitud micelial (cm): CH	893 a	118 b
Número de esporas: CH	3 264 a	207 b
Número de hifas cruzando sobre la pared	88 a	36 b

CR: Compartimento radical, CH: Compartimento hifal

En el tratamiento control con formaldehído se detectaron cantidades trazas de ^{86}Rb en la biomasa fúngica presente en el CH y en el medio sólido conteniendo la biomasa fúngica en el CR, las cuales fueron menores que el 0,01 % del ^{86}Rb añadido en el CH; pero no se detectó actividad de ^{86}Rb en los vástagos de *M. truncatula*, independientemente de la especie de HMA utilizada.

En el tratamiento control, inmediatamente después de la adición de formaldehído en el CH, se detuvo la actividad metabólica del micelio de ambas especies de HMA, apreciable fácilmente en las hifas que cruzaban sobre la pared divisoria entre el CH y el CR, las cuales mostraban ausencia de flujo citoplasmático.

4.3.2. Transporte de rubidio

El rubidio (^{86}Rb) suministrado en el CH fue absorbido por el micelio extrarradical de ambas especies, translocado a las raíces desarrolladas en el CR y transferido a los vástagos de *M. truncatula* (Figura 26).

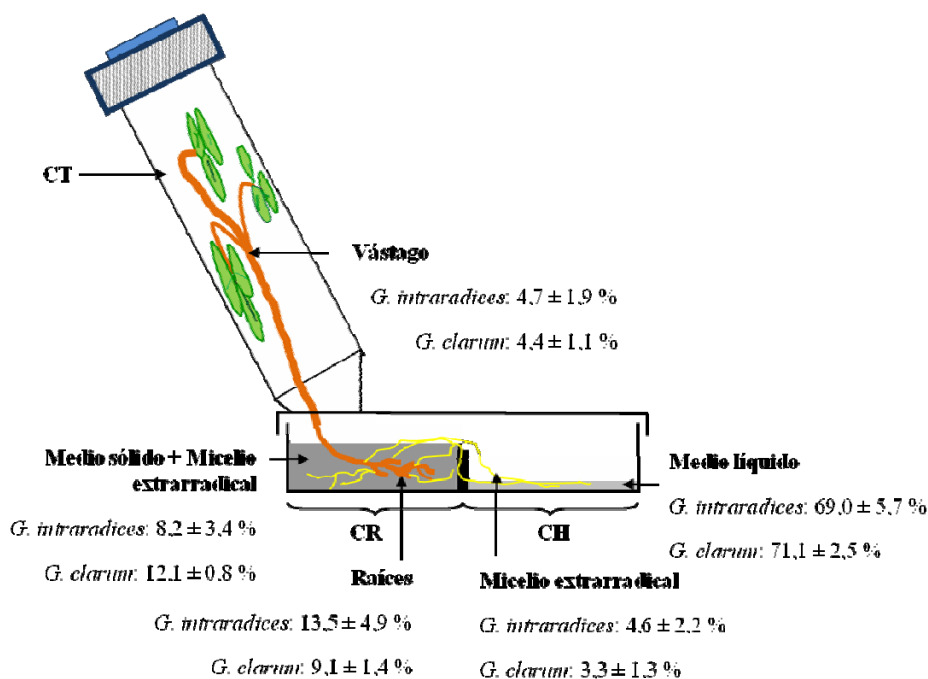


Figura 26. Distribución de ^{86}Rb (%) en el sistema totalmente *in vitro* (AM-P) utilizado en este experimento, después de dos semanas de contacto entre el micelio extrarradical de *G. intraradices* o *G. clarum* y el medio (SRM) líquido marcado en el CH. Este sistema consta de un compartimento del tallo (CT), un compartimento radical (CR) y un compartimento hifal (CH). Los valores corresponden a los porcentajes \pm error estándar del ^{86}Rb suministrado inicialmente en el CH.

La distribución del ^{86}Rb en las diferentes partes del sistema y las actividades específicas, después de dos semanas de contacto entre las RME y el ^{86}Rb presente en el CH, se muestran en la figura 26 y la tabla 9, respectivamente.

No se encontraron diferencias significativas entre las cantidades de ^{86}Rb absorbido por las hifas extrarradicales de ambas especies o en la distribución del elemento en las plantas. La absorción de ^{86}Rb por el micelio extrarradical de *G. intraradices* y *G. clarum* representó el 31 % y 28,9 % del ^{86}Rb inicialmente suministrado en el CH, respectivamente.

La distribución del rubidio en las plantas (raíces y vástagos) representó el 58,7 % y el 46,7 % del ^{86}Rb absorbido por las especies fúngicas, mientras que el 41,3 % (*G. intraradices*) y el 53,3 % (*G. clarum*) permaneció en la biomasa fúngica extrarradical.

Tabla 9. Actividad de ^{86}Rb y actividad específica del vástago en el compartimento del tallo (CT), de la raíz (CR), medio sólido SRM y micelio extrarradical en el compartimento radical y medio líquido SRM y micelio extrarradical en el compartimento hifal (CH). Valores en una misma fila seguidos por letras distintas difieren significativamente a $p < 0,05$ según Test de Tukey para desigual número de muestras.

	<i>G. intraradices</i>	<i>G. clarum</i>
Actividades (Bq placa Petri⁻¹)		
Vástagos	2 100	1 970
Raíces	6 009	4 042
Medio sólido + ME (CR)	3 624	5 363
Micelio extrarradical (CH)	2 071	1 457
Medio líquido (CH)	30 481	31 451
Actividad específica (Bq mg masa seca⁻¹)		
Vástagos	3,9	2,9
Raíces	5,4	3,7
Actividad específica (Bq cm hifa⁻¹)		
ME	5,04 b	21,57 a

Leyenda: ME-micelio extrarradical

no difirió significativamente entre ellos. No obstante, la actividad específica (Bq cm hifa⁻¹) del micelio extrarradical en las diferentes partes del sistema fue significativamente mayor para *G. clarum* comparado con *G. intraradices*.

De todo el ^{86}Rb transportado a las plantas, el 74,2 % y el 67,4 % se localizó en las raíces inoculadas con *G. intraradices* y *G. clarum* y por tanto, el 25,8 % y el 32,6 % se encontró en los vástagos, respectivamente.

La actividad de ^{86}Rb medida en la biomasa extrarradical presente en el CH y el CR, correspondió al 4 % y al 10 % del ^{86}Rb suministrado en el CH para ambas especies y

V. DISCUSIÓN

5.1. Importancia de la composición nutricional de los medios de cultivo para la micorrización de plántulas de *S. tuberosum* en el sistema autotrófico parcialmente *in vitro* (SA-PIV)

Según los principios de la ecología, el éxito de la simbiosis micorrízica arbuscular depende no sólo del genotipo de la planta y del hongo involucrado, sino también del ambiente en el cual se desarrollan (Herrera-Peraza *et al.*, 2011).

En condiciones axénicas el medio de cultivo constituye un eslabón clave para garantizar el establecimiento de la simbiosis, pues involucra a organismos con requerimientos nutricionales diferentes. Según Bressan (2002), los componentes del medio de cultivo controlan la fisiología de la planta hospedera y consecuentemente, las relaciones con el hongo huésped.

En el primer ensayo realizado durante esta investigación quedó demostrado que el medio $\frac{1}{2}$ MS fue donde, de manera conjunta, plantas y propágulos fúngicos mostraron un mejor comportamiento (Figura 8). Lo más probable es que las plantas se hayan desarrollado mejor en medio $\frac{1}{2}$ MS que en MS debido a las condiciones en las cuales se llevó a cabo el estudio. Al parecer, las condiciones autotróficas presentes en el experimento condicionaron de manera diferenciada la respuesta de las plantas al medio de cultivo MS. Este resultado podría parecer contradictorio, teniendo en cuenta que el medio MS es el que comúnmente se utiliza para la micropropagación de plantas de papa en sistemas heterotróficos, por lo que debería esperarse un mejor crecimiento de las plántulas en ese medio. Sin embargo, los sistemas heterotróficos utilizados convencionalmente para el cultivo *in vitro* de plantas se caracterizan por tener alta humedad relativa, temperatura constante, baja densidad de flujo de fotones fotosintéticamente activos y alta concentración de azúcares en el medio de cultivo. Estas condiciones ocasionan frecuentemente bajas tasas de transpiración y de fotosíntesis, así como de absorción de nutrientes y agua (Aitken-Christie *et al.*, 1995), por lo que es de esperar que las plantas respondan de manera diferente al medio de cultivo cuando se varían tanto sus condiciones de crecimiento.

En las condiciones autotróficas en las cuales se desarrolló el experimento, la pérdida de agua en las plantas debe haber sido mayor que en los sistemas convencionales (heterotróficos), producto de una mayor diferencia en la concentración de vapor de agua entre el interior y el exterior de la planta, lo cual facilita la salida del agua a través de los estomas. Por su parte, el pobre desarrollo cuticular que presentan las plántulas micropropagadas (Hazarika *et al.*, 2006), pudo haber contribuido, también, a una mayor pérdida de agua.

La demanda de agua del medio de cultivo por parte de las plantas en los sistemas autotróficos, también debe ser mayor que en los sistemas convencionales. Como el medio MS posee mayor

Tabla 10. Valores aproximados de potencial osmótico de los medios MS, ½MS y SRM

Medios de cultivo	Potencial osmótico (MPa)
MS	- 0,084
½MS	- 0,042
SRM	- 0,026

contenido de sales que ½MS y SRM, su potencial osmótico es más negativo (Tabla 10) y por tanto el potencial hídrico es menor, contribuyendo a que las plantas desarrolladas autotróficamente en este medio enfrentaran condiciones de estrés hídrico, con el consiguiente efecto negativo observado en el crecimiento (Figura 8). En consecuencia, si debido a

una mayor pérdida de agua se ocasionó estrés hídrico en las plantas, pudo haberse producido cierre estomático para controlar la salida del agua, lo cual entonces reduciría la tasa fotosintética, provocando a su vez la disminución del crecimiento de las plantas desarrolladas en medio MS.

En relación con este análisis, Hopkins (1995) asegura que la transpiración frecuentemente produce déficit hídrico cuando la temperatura del aire y la humedad relativa favorecen el proceso, y cuando el sustrato es deficiente en agua.

Las esporas de *G. clarum* no germinaron en MS debido, probablemente, a la alta concentración de P presente en el medio (Anexo 1). El KH_2PO_4 , portador de este elemento en el medio MS, está considerado como un inhibidor de la germinación de esporas cuando se añade en altas concentraciones a los medios de cultivo (Pons & Gianinazzi-Pearson, 1984 y Siqueira *et al.*, 1985).

Aunque algunos autores ya habían utilizado el medio MS en experimentos de micorrización *in vitro* (Elmeskaoui *et al.*, 1995; Bressan, 2002 y Fortin *et al.*, 2002), este es el primer informe que se realiza sobre ausencia de germinación de esporas de *G. clarum* en un sistema de cultivo autotrófico. Dichos autores obtuvieron, igualmente, que el medio MS no garantizaba un adecuado desarrollo de los propágulos micorrízicos y además, se refirieron al efecto negativo que tienen los altos niveles de fósforo y sacarosa en los medios de cultivo, sobre la germinación y el establecimiento fúngico.

El pobre desarrollo de las plantas observado en el medio SRM se debió probablemente a la baja concentración de nutrientes presente en el medio, en relación con la alta concentración que poseen los nutrientes en MS (Anexo 1). La diferencia en las concentraciones de los macronutrientes P, N y K, es evidente entre ambos medios. El fósforo presente en SRM es sólo el 3 % del que se encuentra en MS, el potasio es el 8 % y el nitrógeno el 11 %. En consecuencia, la germinación de las esporas se vio favorecida en medio SRM, lo cual es deducible ya que este medio está diseñado precisamente para el establecimiento *in vitro* de los HMA en cultivos monoxénicos (Declerck *et al.*, 2005).

En el medio $\frac{1}{2}$ MS el comportamiento micorrízico también se vio influenciado, al parecer, por la concentración de nutrientes, la cual aunque es superior a la del medio SRM, permitió la germinación de las esporas y la colonización de las plantas, si bien no con la misma intensidad. Por tanto, al ser en el medio $\frac{1}{2}$ MS donde plantas y propágulos fúngicos mostraron un mejor comportamiento, fue este el medio escogido como base para elaborar otros medios, modificando las concentraciones de P y N, con el objetivo de establecer de forma rápida y eficiente la asociación micorrízica en plántulas de papa.

Las variaciones de concentración realizadas al medio MS permitieron estudiar varios medios de cultivo con diferentes proporciones de P, N y K (Tabla 1), que tuvieron una influencia diferenciada tanto en el desarrollo de las plántulas como en el comportamiento de los propágulos micorrízicos.

La diferencia entre las proporciones de estos nutrientes debe ser la razón fundamental del comportamiento observado en esta fase del experimento, siendo el medio E ($\frac{1}{4}$ P- $\frac{1}{4}$ N- $\frac{1}{4}$ K) el que

ofreció las mejores condiciones para el establecimiento de la asociación. En este medio se obtuvieron, de forma conjunta, los mayores valores tanto en las variables fúngicas estudiadas (Figura 13), como en las relacionadas con el crecimiento del vegetal (Figura 11).

El positivo comportamiento observado en el medio E está relacionado con la concentración de nutrientes, específicamente de P y N, elementos que se variaron en igual proporción ($\frac{1}{4}P$ - $\frac{1}{4}N$), a diferencia del resto de los medios estudiados (A, B, F y G).

El efecto sobre el desarrollo de las plantas de los medios A y B fue negativo (Figura 10 y 11), si se compara con el observado en los medios E, F y G, probablemente por presentar solamente reducciones de P y K, no así de N.

En estos medios (A y B) debe haberse producido una disminución en la absorción de N producto de la reducción de la concentración de P, respecto al medio control MS, lo cual provocó un desbalance entre estos elementos, tal como informaron de Groot *et al.* (2003) al suministrar diferentes dosis de P y N a plantas de tomate.

Como se conoce, la deficiencia de P y N afecta numerosos procesos relacionados con el crecimiento y desarrollo del vegetal, así como con el metabolismo, pues ambos se encuentran formando parte de biomoléculas esenciales para que las plantas completen su ciclo de vida como: enzimas, material genético, proteínas estructurales, fosfolípidos, entre otras. Esto hace que todos los medios utilizados para el cultivo *in vitro* de plantas incluyan el P y el N en su composición, así como también a todos los minerales y vitaminas necesarios para el crecimiento y la diferenciación del vegetal.

Por tanto la presencia de P, N y K en los medios de cultivo es vital para el desarrollo de las plantas, por lo que estos elementos se van a encontrar en las proporciones adecuadas para que no existan interacciones entre ellos que dificulten su asimilación o funcionamiento (Cassells & Gahan, 2006).

Un exceso o reducción en el medio de cultivo de alguno de estos elementos puede ocasionar dificultades en la absorción de otros, o impedir que tengan el efecto esperado (Adams, 1980).

El fósforo, por ejemplo, influencia o es influenciado por la disponibilidad o el uso de otros elementos, ya sean o no esenciales (Adams, 1980), dentro de los que se pueden señalar N y K.

Como se conoce, la absorción y asimilación de N son procesos altamente dependientes de energía, por lo que algunos autores (Rufty *et al.*, 1993 y de Groot *et al.*, 2003) relacionan la disminución de la absorción de N con reducción en la disponibilidad energética, observada por el escaso crecimiento radical y la disminución en las concentraciones de ATP; aunque también sugieren que el proceso puede estar mediado por citoquininas (de Groot *et al.*, 2003).

Los conocimientos actuales reflejan el efecto sinérgico que se establece entre P y N cuando son aplicados al suelo conjuntamente, pero siempre debe existir un balance entre ellos. La interacción que existe entre P y K también es vital para el desarrollo de los cultivos ya que estos elementos son esenciales en la fotosíntesis, en las reacciones que requieren de energía, en la formación y calidad de la semilla, la tolerancia al estrés, la madurez de los cultivos, la formación de raíces, etc. Según Adams (1980), la interacción entre ambos elementos se manifiesta en el sistema de balance de aniones - cationes en el cual los ácidos orgánicos juegan un papel significativo.

En los medios A, B y SRM, además del reducido crecimiento de las plantas, se encontró un marcado cambio de coloración en el envés de las hojas, las cuales se tornaron purpúreas al finalizar el experimento (Figura 8 y 10). Por las características que presentó la afección no parece estar relacionada con ninguna deficiencia nutricional simple, pues las variaciones de color observadas y el estado de las plantas no coinciden con ninguno de los síntomas provocados por el déficit individual de los elementos esenciales en el cultivo de la papa (Wallace, 1970 y Westermann, 2005). No obstante, si bien esta modificación pudiera atribuirse a deficiencia de fósforo por la presencia de coloración purpúrea en las hojas y el hecho de ser encontrada como sintomatología típica en otros cultivos como la col (*Brassica oleracea*) y el colinabo (*Brassica napus*), no se informa para el caso específico de la papa (Wallace, 1970; Van der Zagg *et al.*, 1996 e IICA, 2004).

Teniendo en cuenta que estos medios se encontraban deficitarios de más de un elemento y las proporciones de P, N y K se encontraban desbalanceadas, es probable que el cambio de coloración esté relacionado con una deficiencia múltiple de elementos, de lo cual indudablemente pueden resultar patrones más complejos y no ajustarse a los síntomas individuales.

La marcada reducción del crecimiento y la delgadez de los tallos pudiera estar provocada por el desbalance ocasionado al reducir las concentraciones de P; al respecto se pronunciaron Wallace (1970) y Van der Zagg *et al.* (1996), quienes señalaron que la deficiencia de fósforo en plantas de papa podría ocasionar crecimiento reducido, tallos delgados y oscurecimiento de las hojas.

Por otra parte, también se encontró en los medios A y B un efecto negativo sobre la germinación de esporas y por tanto de la colonización, a pesar de encontrarse reducidas las concentraciones de P en estos medios. De este análisis puede deducirse que la interacción entre P y N afecta, en mayor o menor medida, no sólo el crecimiento de las plántulas de papa, sino también la germinación de las esporas de *G. clarum* y el establecimiento y extensión de la colonización, similar a lo obtenido por Bressan (2001), pero en esporas de *G. etunicatum* inoculadas en embriones somáticos de boniato (*Ipomoea batata* L.). Este autor informó que la adición de N al medio con reducidas concentraciones de P, ocasionaba una disminución marcada en la germinación de esporas de esa otra especie micorrízica.

Por tanto, para el desarrollo y el funcionamiento simbiótico es tan importante contar con un nivel adecuado de nutrientes en el medio como el balance de esos nutrientes. Los estudios de Liu *et al.* (2000) y Fitzsimons *et al.* (2008), aunque desarrollados en condiciones de campo, coinciden con este análisis. Estos autores, al estudiar la influencia de diferentes niveles de P y N en suelo, también concluyeron que el desbalance nutricional puede alterar el funcionamiento de los hongos micorrízicos arbusculares, no sólo de las especies inoculadas, sino también de las nativas.

Aunque en el medio E se alcanzan valores de colonización en las plántulas de papa de 60 % (Figura 13), superiores a los que se informan para el cultivo en condiciones de campo (Niemira *et al.*,

1996), se produce un bajo número de estructuras extrarradicales. Los valores de número de esporas (74) y de longitud de micelio (63 cm) promedio, por placa Petri, se consideran bajos si se comparan con los que potencialmente puede alcanzar la cepa en asociación con raíces transformadas (Ri-T-DNA) de zanahoria, aunque superan estadísticamente a los del resto de los tratamientos. *Glomus clarum* MUCL 46238 bajo tales condiciones, es capaz de producir entre 1 500 y 2 000 esporas a los 45 días de cultivo en medio SRM (de la Providencia *et al.*, 2007).

Los bajos valores del número de esporas producidos por *G. clarum* en asociación con plántulas de papa en el medio E, también difieren de los informados por Voets *et al.* (2005) al micorrizar plántulas de papa en el mismo sistema, aunque con otra especie micorrízica. Dichos autores obtuvieron una producción de 12 000 esporas de *G. intraradices* (MUCL 43194) al cabo de 22 semanas de cultivo, comparable con la obtenida con la misma cepa y con dos cepas diferentes de la misma especie en asociación con raíces transformadas de zanahoria en medio SRM (Declerck *et al.*, 2001 y de la Providencia *et al.*, 2005).

La diferencia entre los resultados de este trabajo y los de Voets *et al.* (2005), en cuanto al comportamiento de los simbiontes, pudiera ser resultado de la estrecha interacción que existe entre los hongos micorrizógenos, su hospedero y el medio en el cual ambos se desarrollan. La especie *G. clarum*, utilizada en los cuatro ensayos del primer estudio, posee un menor grado de infectividad (de Souza y Berbara, 1999 y de la Providencia *et al.*, 2005) que *G. intraradices*, especie empleada por Voets, lo cual sin dudas influyó en el comportamiento observado en cuanto a niveles de colonización y producción de estructuras extrarradicales (micelio y esporas). Según Smith *et al.* (2004), aunque el resultado de la asociación micorrízica beneficia a ambos simbiontes, la efectividad varía en dependencia de la combinación individual hongo-planta.

En adición, Voets *et al.* (2005) no realizaron ninguna valoración sobre el estado fisiológico de las plantas de papa después de transcurrir 22 semanas creciendo en el sistema y en medio SRM (no idóneo para el desarrollo de plantas de papa por la baja concentración de nutrientes que posee,

teniendo en cuenta los resultados que se han derivado de esta tesis). Por tanto, su propuesta resultó adecuada para la producción de estructuras fúngicas en presencia de plantas de papa *in vitro*, pero no para producir plantas micorrizadas que posteriormente pudiesen ser utilizadas con otros propósitos. Esta es la principal razón por la que en esta tesis se descarta el empleo del medio SRM para la micorrización *in vitro* de plantas, cuando el objetivo sea producir plantas micorrizadas de forma eficiente y no solamente inóculo micorrízico en sistemas que incluyan plantas completas.

Sin embargo, a pesar de las potencialidades que ofrece el medio E a diferencia del resto de los medios estudiados, en él no se garantiza una abundante producción de estructuras fúngicas (Figuras 13 y 14) y las plantas muestran un crecimiento excesivo, debido al tiempo tan prolongado necesario para establecer la micorrización. Esto impide que las plantas micorrizadas obtenidas puedan ser utilizadas con otros fines, como el de ser trasladadas a invernadero para la producción de tubérculos. Por tanto, el medio de cultivo E se considera no idóneo para la obtención de plantas de papa micorrizadas *in vitro*, cuando se utilicen esporas de *G. clarum* como inóculo, debido a que en éste, el hongo micorrizógeno no alcanza el desarrollo esperado, en relación con la expansión de la colonia y la cantidad de estructuras fúngicas producidas (esporas y micelio extrarradical).

Por otra parte, en el SA-PIV se encontró que la micorrización con esporas de *G. clarum* no produjo efecto en el crecimiento de las plantas de papa, después de 40 días de cultivo (Tabla 5). Esto pudo deberse, no solo al poco tiempo de duración del experimento, sino también a que las raíces tenían acceso total a los nutrientes, los cuales estaban igualmente disponibles en los medios utilizados (E y G) y en mayores concentraciones que en los medios empleados para el crecimiento *in vitro* de los HMA (SRM y Mínimo - M). Además, la adición frecuente de medio fresco en las placas evitó el agotamiento progresivo de los nutrientes, de forma tal que su absorción por parte de las raíces de las plántulas de papa no se vio afectada en las condiciones en que se llevó a cabo el estudio.

Esta falta de respuesta a la micorrización *in vitro* por parte de las plántulas de papa probablemente está fundamentada en la estrecha relación existente entre el comportamiento de las cepas y la

riqueza nutricional del sustrato, que en este caso fueron los medios E y G, los cuales presentaban alta concentración de nutrientes. En condiciones de campo se ha demostrado que frente a un suministro óptimo de nutrientes no se encuentra respuesta a la micorrización (Rivera *et al.*, 2007 y Herrera-Peraza *et al.*, 2011).

En correspondencia con esta consideración, Elmeskaoui *et al.* (1995), utilizando un sistema de cultivo tripartita totalmente *in vitro*, informaron mayor altura y largo radical en las plántulas inoculadas con respecto a las controles, pero solo en los sistemas que recibieron un suministro alto de CO₂ y utilizando medio M, el cual presenta bajas concentraciones de nutrientes (Bécard & Piché, 1992).

Como ha quedado demostrado en los análisis realizados hasta el momento, tanto la composición nutricional de los medios de cultivo como la proporción de los elementos que los componen, influyen en el desarrollo de la micorrización en plántulas de papa en el SA-PIV. Un papel fundamental juega también la fuente de inoculante utilizada, que en este caso fueron esporas, pues de ella depende la velocidad de ocurrencia de los eventos involucrados en el reconocimiento y la colonización de las plántulas.

El medio E resultó ser el que por su composición nutricional brindó las mejores condiciones tanto para el establecimiento de la colonización micorrízica y la producción de propágulos extrarradicales, como para el crecimiento de las plántulas de papa, comparado con el resto de los medios estudiados. Sin embargo, no fue totalmente eficiente debido a la demora en la germinación de las esporas y al poco número de estructuras fúngicas producidas por la especie de HMA utilizada.

5.2. Comportamiento de la micorrización de *S. tuberosum* en los sistemas autotróficos totalmente *in vitro* (SA-TIV)

Los sistemas de cultivo totalmente *in vitro* se utilizan de forma convencional para la producción de plántulas a través de la micropropagación, como es el caso de *S. tuberosum*. Lograr establecer la

micorrización de plantas en sistemas de cultivos cerrados brindaría la posibilidad de introducir los hongos micorrizógenos en sistemas de producción de plantas *in vitro*. Esto permitiría aumentar la calidad de las plántulas obtenidas debido al incremento de las tasas de sobrevivencia durante el trasplante, garantizando una mejor adaptación a las condiciones edafoclimáticas y el enfrentamiento a patógenos de las raíces.

El análisis de los resultados en el SA-PIV permitió corroborar que los factores nutricionales afectan significativamente el establecimiento de la micorrización *in vitro* en plántulas de papa, teniendo en cuenta algunas variables de crecimiento de las plantas y las relacionados con la colonización fúngica. Por su parte, en los estudios realizados en los diferentes sistemas totalmente *in vitro* (Magentas[®] y microcajas) se encontraron respuestas diferenciadas en función del envase y del manejo efectuado en los sistemas, más que del propio medio de cultivo.

La falta de germinación de las esporas de *G. clarum* observada en los dos primeros ensayos en Magentas[®] fue independiente del medio de cultivo utilizado y de la presencia o no de carbón activado en los medios. Al parecer, el carbón activado, a la concentración utilizada, no provocó el efecto de oscuridad esperado, permitiendo que la luz incidiera directamente sobre las esporas durante un tiempo tan prolongado (30 días), pudiendo ser ésta una de las causas de ausencia de germinación.

La exposición a la luz influye negativamente en la germinación de esporas de *G. macrocarpum* y la exposición prolongada aumenta la intensidad del efecto, ya que solo 12 h son suficientes para eliminar totalmente el potencial germinativo, incluso en esporas de mayor madurez (Varela-Castejón *et al.*, 1998); un efecto similar pudo haber ocurrido en la especie estudiada en este experimento.

Por otra parte, cuando se inocularon las esporas de *G. clarum* contenidas en perlas de alginato en el mismo envase (Ensayo 3), si se obtuvo germinación de las esporas transcurridos 30 días. Además, a los 45 días, más del 97 % de las esporas se encontraban germinadas (Figura 18), hecho que no

ocurrió cuando se inocularon las esporas directamente sobre el medio de cultivo (Ensayos 1 y 2). Esto se debió probablemente a la posición en que se inocularon las esporas, las cuales se encontraban embebidas en las perlas y depositadas en el interior del medio de cultivo, en una zona intermedia. La ubicación de las esporas, conjuntamente con la presencia de una capa exterior de medio de cultivo mezclado con carbón activado, al doble de la concentración (1 g L^{-1}) que en el caso antes descrito, pudo haber contribuido a evitar la incidencia directa de la iluminación sobre las esporas, facilitando la germinación y el crecimiento de los tubos germinativos hasta alcanzar las raíces de las plántulas de papa.

De forma similar, pero utilizando cultivo de raíces en placas Petri, Declerck *et al.* (1996) también obtuvieron altos porcentajes de germinación de las esporas contenidas en perlas de alginato sin ningún tratamiento previo, así como altos niveles de colonización en raíces transformadas de zanahoria, bajo condiciones controladas de cultivo *in vitro* en oscuridad.

La opción de utilizar esporas contenidas en perlas de alginato, como alternativa de inoculación en los SA-TIV, permitió demostrar que variando las condiciones de cultivo se podían lograr considerables porcentajes de germinación en sistemas totalmente *in vitro*, que a la postre podrían derivar en procesos de colonización.

Estas consideraciones se reforzaron al utilizar microcajas de cultivo (Ensayo 4) como nuevo SA-TIV y evaluar sus potencialidades para la micorrización de plántulas de papa.

En este sistema se encontró colonización de las plantas a los 30 días de cultivo, alcanzando valores entre 25 y 30 % (Figura 20), a diferencia de lo ocurrido en Magentas[®] (Ensayo 3), en las que a los 45 días se comenzaron a observar los primeros puntos de contacto entre las hifas y las raíces de las plántulas de papa, al inocular las esporas embebidas en perlas de alginato.

Estos valores de colonización se consideran bajos, sin embargo son similares a los que alcanza el cultivo de la papa en condiciones de campo, a pesar de mostrar una alta respuesta a la micorrización, como afirman Niemira *et al.* (1996).

Por otra parte, las microcajas tienen un volumen mayor que las Magentas[®] y a diferencia de éstas contenían vermiculita en sustitución del agente gelificante (Gel Gro[®]), por lo que probablemente proporcionaron mejores condiciones para facilitar el intercambio de gases y la aireación en el medio de cultivo.

La presencia de vermiculita en el medio contribuyó a la germinación más rápida de los propágulos, en comparación con los otros sistemas *in vitro*, y por consiguiente al establecimiento de la asociación micorrízica ya que con este sustrato se puede aumentar la aireación en el medio de cultivo al tener mayor porosidad y permitir mayor difusión de los gases, condiciones que facilitan el crecimiento de las plantas, la germinación de los propágulos y la colonización micorrízica (Kirdmanee *et al.*, 1995 y Kozai *et al.*, 1997). Este sustrato también favoreció la colonización de embriones somáticos de boniato con esporas de otra especie micorrízica, *G. etunicatum* (Bressan *et al.*, 2000 y Bressan, 2001).

Otro aspecto interesante a destacar cuando se emplearon las microcajas fue la diferencia encontrada en la respuesta de las plantas, en comparación con los SA-PIV, independientemente de los medios de cultivo utilizados.

Las modificaciones morfológicas observadas en las plántulas de papa (Figura 19) pudieron ser provocadas por una acumulación de etileno en estos envases, debido a que son similares a las descritas por Perl *et al.* (1988), también en *S. tuberosum* y por Geil *et al.* (2001) en plántulas de *Pisum sativum* L. (chícharo), cultivadas en envases cerrados y expuestas a altas concentraciones de etileno.

Estos resultados confirman la hipótesis planteada al comienzo de la investigación relacionada con el papel que juegan la composición nutricional de los medios y los sistemas de cultivo en el éxito de la micorrización *in vitro* de plántulas.

En los sistemas totalmente *in vitro*, el desarrollo de las plantas y el establecimiento micorrízico puede verse afectado no sólo por la composición de los medios, sino también por la incidencia de la

iluminación sobre los propágulos y la posible acción del etileno, como sugieren las valoraciones realizadas. Así mismo, los resultados analizados hasta el momento indican que el empleo de esporas de *G. clarum* como inóculo para establecer la micorriza en raíces de plántulas de papa, no garantiza la colonización del sistema radical en un periodo corto de tiempo, ni la producción de un elevado número de estructuras extrarradicales, debido a que estos propágulos requieren de un tiempo prolongado para germinar y colonizar y se ven influenciados por diversos factores.

5.3. Producción rápida de plantas micorrizadas a partir de las Redes de Micelio Extrarradical (RME)

Teniendo en cuenta las dificultades que se presentaron en las diferentes variantes de sistemas de cultivo estudiados anteriormente, con relación al retardo (SA-PIV, Magentas[®] y microcajas) o la ausencia (Magentas[®]) de germinación de esporas de *G. clarum* y las modificaciones morfológicas encontradas en las plantas de papa (microcajas), se realizó otro experimento utilizando la fase simbiótica del hongo micorrizógeno arbuscular *G. intraradices* como inóculo, para producir plántulas micorrizadas de forma eficiente y acelerada. Esta variación en el esquema experimental se basó en las potencialidades que tiene el micelio extrarradical como una posible fuente de inóculo, partiendo de la baja especificidad que tienen los HMA con relación a su hospedero (Rivera *et al.*, 2007 y Herrera-Peraza *et al.*, 2011), al ser capaz un mismo individuo de colonizar plantas de iguales o diferentes especies. Las esporas, por su parte, demoran más en colonizar las raíces de su hospedero ya que requieren de un mayor tiempo para la germinación (tal como ha quedado demostrado en este estudio), el crecimiento micelial presimbiótico, la colonización y el establecimiento micorrízico.

Con el sistema de Planta Donante de Micelio (PDM) se explota por vez primera la capacidad colonizativa del micelio extrarradical para acelerar el proceso de micorrización de plántulas *in vitro* en condiciones autotróficas, teniendo en cuenta que en la naturaleza, las hifas que emergen de raíces

micorrizadas vivas son capaces de conectar plantas a través de redes de micelio, según afirman Giovannetti *et al.* (2004), Hart & Reader (2005), Voets *et al.* (2006) y de la Providencia (2007).

Tanto las plántulas de papa como las de *M. truncatula* que se emplearon en el experimento se colonizaron a solo tres días de contacto con las RME. Las que estuvieron seis días en asociación fueron capaces de reproducir la colonia fúngica después de haber sido transferidas a medios frescos, con la consiguiente producción de una densa red de micelio y un número elevado de nuevas esporas, que osciló entre 1 000 y 2 000 al cabo de 4 semanas (Figura 24). Esto trajo consigo que se alcanzaran valores altos de colonización, entre 55 y 80 %, en tan sólo 12 días de contacto entre las RME y las raíces de las plántulas de papa y *M. truncatula*, respectivamente.

Según el análisis realizado a la literatura científica especializada, tan altos valores de colonización no habían sido obtenidos hasta este momento para ninguno de los dos cultivos en condiciones *in vitro* y en el caso específico de *S. tuberosum*, son superiores a los alcanzados por el cultivo en condiciones de campo (Niemira *et al.*, 1996), los cuales oscilan alrededor del 25 %.

Los altos porcentajes de colonización alcanzados en las plántulas de *S. tuberosum* y *M. truncatula* se deben a la densa red de micelio compuesto por cientos de hifas en crecimiento activo que emergían de las raíces previamente colonizadas (Figura 21 A) y se dispersaban alrededor de las raíces de las plántulas asociadas, provocando una colonización uniforme. En el sistema de experimentación utilizado, el micelio proveniente de las raíces de las plantas donantes ocupó casi completamente el compartimento hifal, produciendo alrededor de 4 000 cm de hifas, por lo que el acceso de estas hifas a las raíces de las plántulas recién asociadas resultó extremadamente sencillo. Como es conocido, la alta densidad de propágulos, en este caso de micelio en activo crecimiento, acorta el tiempo de la fase previa al proceso de colonización o estadio presimbótico, en la curva de porcentaje de colonización contra tiempo (Smith & Read, 1997), lo cual sin dudas influyó en la rápida distribución del hongo micorrizógeno en las raíces de las plántulas asociadas.

Recientemente, Cano *et al.* (2008) utilizaron micelio extrarradical desarrollado en un compartimento radical para colonizar fragmentos de raíces jóvenes, pero este provenía de un sistema de cultivo de raíces micorrizadas y no de una planta donante. Dichos autores solo lograron niveles de colonización radical de 25 % transcurridas varias semanas, valores inferiores a los alcanzados con el sistema PDM en este trabajo de tesis, los cuales oscilaron entre 55 % y 80 % en solo 12 días.

Los resultados también difieren de los publicados previamente por Voets *et al.* (2005) y Dupré de Boulois *et al.* (2006), en sistemas de cultivo *in vitro* en los que inocularon plantas de *S. tuberosum* y *M. truncatula*, respectivamente, utilizando una dosis elevada de esporas (100 por placa Petri) como fuente de inóculo. Dichos autores informaron niveles de colonización cercanos a 50 %, transcurridas 8 semanas de cultivo, poniendo de manifiesto lo inconveniente de emplear esporas como inóculo en estos sistemas.

Como se analizó en los acápites anteriores, cuando se utilizan esporas como fuente de inóculo el proceso de colonización puede retardarse, no solo en ocurrir, sino también, en extenderse en el sistema radical. Esto puede deberse a que las esporas presentan falta de homogeneidad en la germinación, limitada capacidad de crecimiento independiente y los puntos de colonización que originan son locales y van a estar condicionados por la proximidad a la raíz (Declerck *et al.*, 2005).

Al analizar los valores de intensidad de la colonización, caracterizada por la presencia de vesículas y arbusculos se evidenció, que el estado en que se encuentre la micorrización es de vital importancia para garantizar un abundante recrecimiento del micelio. Dichas estructuras solo se observaron en las plantas que estuvieron más de seis días asociadas con la red de micelio y por su parte, los valores de intensidad fueron significativamente mayores a partir de los 12 días de asociación (Figura 23).

Actualmente no está claro en qué estado debe estar la colonización en el interior radical para garantizar el recrecimiento micelial, sin embargo, algunos autores han realizado diversas consideraciones al respecto. Mosse & Hepper (1975) y Hepper (1981) observaron tempranamente

un considerable recrecimiento del micelio después de la formación de apresorios, por lo que al parecer, en sus condiciones, la presencia de arbusculos no fue vital para iniciar el recrecimiento fúngico. Sin embargo, Bécard & Piché (1989) encontraron que los arbusculos son absolutamente necesarios para garantizar el recrecimiento hifal.

En las plántulas de *S. tuberosum* y *M. truncatula* que se asociaron a las RME en el experimento de PDM, no se puede relacionar el recrecimiento hifal con la exclusiva presencia de arbusculos, debido a que las primeras vesículas también se observaron después de seis días de haber entrado en contacto las raíces de las plántulas con las redes de micelio. Estas estructuras de paredes gruesas son importantes órganos de almacén que juegan un significativo rol como propágulos en fragmentos de raíces (Declerck *et al.*, 1998) y posiblemente también en raíces vivas.

Por otra parte, no debe descartarse la posibilidad de que también haya ocurrido recrecimiento micelial a partir de las hifas intrarradicales, ya que según Bago & Cano (2005) las hifas de los HMA tienen la capacidad de crecer hacia el exterior de las raíces y explorar nuevos ambientes.

En las plántulas que se asociaron con las redes de micelio se observó, además, que las hifas extrarradicales unidas a las raíces (removidas del medio inicial para su transferencia a medios frescos), fueron capaces de continuar creciendo a través de secciones intactas o dañadas. Esto podría representar otro mecanismo de importancia para el nuevo crecimiento fúngico en plántulas trasplantadas y puede estar relacionado con las “hifas emergentes”, definidas por Friese & Allen (1991), de las raíces colonizadas, así como con las hifas extrarradicales intactas y dañadas que se encontraban físicamente unidas a las raíces. Estas hifas son capaces de volver a crecer, repararse, explorar el ambiente circundante y además colonizar nuevas raíces, debido a que cuentan con eficientes mecanismos de reparación (de la Providencia *et al.*, 2007).

Con la técnica “Cut”ngo” (cortar y continuar) de Cano *et al.* (2008) se demostró también que al cortar y extraer el medio de cultivo del compartimento hifal y añadir medio fresco, se propicia el

crecimiento de nuevo micelio de forma sincronizada, a través del recrecimiento de las hifas cortadas o de la formación de nuevas hifas.

El abundante número de esporas (entre 5 000 y 7 000) producido por *G. intraradices* al colonizar plántulas de *S. tuberosum* y *M. truncatula* (Figura 24), respectivamente, también refleja las ventajas del sistema PDM, al informarse en este estudio la mayor cantidad de esporas obtenidas *in vitro* en un periodo de cuatro semanas, en relación con el resto de los sistemas de cultivo que han sido publicados hasta el momento.

Exceptuando algunos estudios de inoculación de cultivos de raíces (Declerck *et al.*, 2001 y Elsen *et al.*, 2003), en el resto de los trabajos consultados, la producción de esporas fue por lo general más baja que la obtenida en esta tesis, tanto con cultivos de raíces (Declerck *et al.*, 1996 y Rufyikiri *et al.*, 2003) como con plantas (Dupré de Boulois *et al.*, 2005; 2006 y Voets *et al.*, 2005), en similares periodos de tiempo.

Las plántulas jóvenes y en activo crecimiento presentaban un sistema radical homogéneamente colonizado, con la presencia de abundantes hifas internas, así como arbusculos y vesículas, perfectamente adaptables como inóculo para la producción masiva de esporas. Además, es importante reconocer la alta infectividad de la especie *G. intraradices* utilizada en este experimento y su capacidad para producir un alto número de esporas en condiciones de cultivo *in vitro* (Voets *et al.*, 2005 y de la Providencia *et al.*, 2005).

Con el sistema Planta Donante de Micelio se demuestra que un hongo micorrizógeno arbuscular, simbióticamente unido a una planta donante en condiciones autotróficas, es una efectiva fuente de inóculo para micorrizar plántulas de manera rápida y eficiente.

Cuando se utiliza el sistema Planta Donante de Micelio, se pueden obtener plántulas micorrizadas a los pocos días de asociadas al micelio (entre 9 y 12 días), con elevados niveles de colonización, capaces de reproducir las colonias fúngicas cuando son trasplantadas a nuevos medios. Además, si se realiza un manejo cuidadoso de los sistemas, evitando posibles contaminaciones microbianas,

éstos pueden ser reutilizados permitiendo asociar dos nuevas plántulas en cada sistema. Estas plántulas micorrizadas a tan corta edad se encuentran en un estadio fisiológico que permite su trasplante a invernadero con el consiguiente beneficio que representa la micorrización en esa fase y/o la producción masiva de inóculo micorrízico en placas de cultivo o en biorreactores.

5.4. Transporte de K por las especies de HMA *G. clarum* y *G. intraradices* utilizando ^{86}Rb como trazador

Los hongos micorrizógenos juegan un rol fundamental en la fertilidad del suelo y en la nutrición de los cultivos, producto de la simbiosis que establecen con la mayoría de las plantas. Los HMA suministran P a su hospedero a través de la interfase arbuscular, lo cual estimula la respuesta de las plantas transportando productos carbonados a regiones cercanas a los arbusculos (Fitter, 2006), que son incorporados en las hifas a través de transportadores de hexosas. Por otra parte, las plantas reciben a cambio, otros nutrientes minerales y agua a través de las hifas (Avio *et al.*, 2006). No obstante, la participación que puedan tener los HMA en la absorción y el transporte de K hacia las plantas aún no ha sido explícitamente demostrada, aunque es razonable asumir que dada la importancia que tiene el K para las plantas y la probada capacidad que tienen los HMA de transportar otros nutrientes como P y N (Smith & Read, 1997 y George, 2000), puedan también absorber y transportar este elemento.

En el experimento se trabajó solo con plántulas de *M. truncatula* por ser una especie modelo para realizar estudios relacionados con las simbiosis en raíces (Harrison *et al.*, 2002). Además, fue la planta utilizada por Dupré de Boulois *et al.* (2006) al publicar el sistema autotrófico empleado en este estudio, por lo que se desarrolla bien en esas condiciones y se micorriza con facilidad.

Es en este experimento donde por vez primera se utiliza el ^{86}Rb para realizar estudios *in vitro* de transporte de K por los hongos micorrizógenos arbusculares, teniendo en cuenta que la mayoría de las investigaciones realizadas sobre el transporte de este elemento en plantas y otros hongos han sido llevadas a cabo con ^{86}Rb como trazador de K (Drobner & Tyler, 1998 y Rodríguez-Navarro,

2000). El Rb se ha empleado para estimar el transporte de K ya que posee numerosas similitudes con K y utilizan los mismos transportadores al ser absorbidos por las plantas (Baligar, 1995 y Drobner & Tyler, 1998).

En este estudio quedó demostrada primeramente, la funcionalidad de la simbiosis en un sistema autotrófico de cultivo totalmente *in vitro*, a través del transporte de ^{86}Rb por parte de las hifas extrarradicales de *G. clarum* y *G. intraradices*, hasta el sistema aéreo de plantas de *M. truncatula*. En segundo lugar, que estas especies de HMA son capaces de absorber, translocar y transferir ^{86}Rb desde un compartimento marcado, libre de raíces, hasta el sistema aéreo de su hospedero. Por tanto, estos resultados también indican que los HMA tienen la capacidad de absorber y transportar K, al ser ^{86}Rb un trazador de K en las plantas (Drobner & Tyler, 1998 y Rodríguez-Navarro, 2000).

Los valores de colonización radical que se alcanzaron, entre 70 y 80 %, y la extensa red de micelio extrarradical portando cientos de esporas (Tabla 8) desarrollada en los sistemas, sugirió que los compuestos carbonados producidos por las plantas de *M. truncatula* fueron transferidos de su hospedero hasta ambas especies de HMA, debido a la naturaleza biotrófica obligada de estos microorganismos (Smith & Read, 1997). Por tanto, la evidencia demuestra la existencia de transporte entre los simbiontes, al menos de P y C, ya que según Fitter (2006), las plantas localizan los compuestos carbonados cerca de los arbusculos en respuesta a un suministro previo de P en la membrana periarbuscular.

La absorción, translocación y transferencia de ^{86}Rb a plantas de *M. truncatula* fue similar en las dos especies de hongos estudiadas (Figura 26). Este es un aspecto interesante a analizar si se tiene en cuenta que el desarrollo del micelio extrarradical, caracterizado por la longitud de las hifas y el número de esporas producidas, fue significativamente diferente en ambas especies fúngicas (Tabla 8). De igual forma, el número de hifas que cruzaban sobre la pared divisoria entre los dos compartimentos fue aproximadamente 2,5 veces mayor para *G. intraradices* que para *G. clarum*.

En el acápite 5.1 se hizo referencia a las diferencias que muestran estas especies en cuanto al desarrollo de la colonia y la producción de estructuras extrarradicales por placa Petri (de Souza & Berbara, 1999 y Koch *et al.*, 2004), siendo *G. intraradices* más infectiva que *G. clarum* al colonizar raíces transformadas de zanahoria (de la Providencia *et al.*, 2005).

De las valoraciones realizadas al respecto se podría inferir que ambas especies difieren en su eficiencia para transportar ^{86}Rb , como sugieren los valores de actividad específica (Tabla 9) en las hifas, determinados para *G. clarum* (21,57 Bq cm^{-1} hifa) y *G. intraradices* (5,04 Bq cm^{-1} hifa); aunque no se puede realizar una aseveración concluyente con la información que se dispone.

También es importante considerar otros factores que pueden variar entre diferentes especies fúngicas y que pudiesen haber influido en que *G. clarum* presentara una mayor actividad de ^{86}Rb por cm de hifa, como el diámetro de las hifas para la translocación el cual es mayor en *G. clarum* (18 - 24 μm) que en *G. intraradices* (11 - 18 μm), la velocidad del flujo citoplásmico y la motilidad de las vacuolas tubulares (de la Providencia *et al.*, 2005 y Ashford & Allaway, 2002). Se podría tener en cuenta, además, que existan diferencias en cuanto a los transportadores involucrados en la absorción de ^{86}Rb desde el medio cercano al micelio extrarradical y los responsables de la salida de Rb desde las estructuras intrarradicales al apoplasto interfacial, que estos tengan diferentes afinidades por Rb o que estén presentes en distintas densidades, como ocurre para el caso del P en otras especies micorrízicas (Smith *et al.*, 2003).

De forma natural, la magnitud de la respuesta de diferentes especies de HMA puede variar, aún cuando la densidad de inóculo utilizada sea similar, como ocurrió con las especies *G. clarum* y *G. intraradices* utilizadas en el experimento, debido a que originan mayor o menor colonización por unidad de propágulo (Smith *et al.*, 2004). No obstante, las diferencias encontradas en cuanto al desarrollo y expansión de la colonia entre ambas especies no ocasionó diferencias en la absorción y translocación de ^{86}Rb a su hospedero, contrario a lo informado por Koide (2000) y Munkvold *et al.* (2004), en estudios de absorción de P, quienes sí hallaron variaciones, no sólo en los patrones de

crecimiento micelial entre varias especies de HMA, sino también en el P absorbido por longitud de hifa. En estudios con otros elementos, Rufyikiri *et al.* (2002) encontraron que un incremento en el número de hifas que cruzaban del compartimento radical al hifal, podía ocasionar mayor translocación de uranio a raíces de zanahoria inoculadas con *G. intraradices*.

La translocación de ^{86}Rb hacia las plantas representó alrededor del 50 % del Rb absorbido por las especies *G. intraradices* y *G. clarum*, desde el compartimento hifal marcado con el radioisótopo (Figura 26). Sin embargo, aún no se conocen los mecanismos a través de los cuales el K y/o el Rb es absorbido y translocado a las plantas por los HMA.

En cuanto a los sitios de absorción de estos elementos en las hifas, es probable que estén localizados, al menos parcialmente, a nivel de las estructuras ramificadas de absorción que se encuentran en el micelio extrarradical, como ha sido sugerido por Bago *et al.* (2000) para otros elementos como P y N. Estas estructuras fueron identificadas y caracterizadas por Bago *et al.* (1998) como los sitios preferenciales en los que debe ocurrir la absorción de nutrientes por el micelio extrarradical de los HMA.

Los transportadores y/o canales relacionados con el transporte de K en los HMA aún no han sido localizados (Dupré de Boulois *et al.*, 2006); sin embargo, existe amplia información sobre la habilidad de otros hongos como *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pombe* y *S. occidentalis* para transportar este elemento (Rodríguez-Navarro, 2000). En esos hongos se reconocen dos tipos de transportadores de K, conocidos como HAK y TRK (Haro *et al.*, 1999 y Rodríguez-Navarro, 2000) con diferencias en la discriminación entre K^+ y Rb^+ . Los transportadores HAK son considerados de alta afinidad por K^+ y tienen baja selectividad entre K^+ y Rb^+ (Rodríguez-Navarro, 2000), incrementando su expresión marcadamente a bajas concentraciones externas de K ($[\text{K}^+_{\text{ext.}}]$) (Santa – María *et al.*, 1997 y Hampton *et al.*, 2004). Este tipo de transportador podría haber mediado la absorción de Rb^+ en las condiciones del experimento, en el que las $[\text{K}^+_{\text{ext.}}]$ fueron bajas en los CR y nulas en los CH, con acceso solo a las hifas de los HMA y en los que estaba presente el

^{86}Rb , el cual pudo haber sido absorbido en sustitución del K. Sin embargo, la presencia de los transportadores HAK en los HMA debe ser verificada ya que, según Durell *et al.* (1999) y Rodríguez-Navarro y Rubio (2006), éstos no se encuentran presentes en todas las especies de hongos.

Una vez que el ^{86}Rb fue absorbido por el micelio extrarradical de *G. clarum* y *G. intraradices*, fue translocado a través de las hifas a las raíces y de ahí al sistema aéreo de las plantas de *M. truncatula* (Figura 26). El alto grado de similitud química entre K y Rb sugiere una posible translocación de ambos elementos a través de mecanismos similares.

Para las posibilidades de translocación se consideran dos mecanismos: el movimiento citoplásmico “per se” y/o las vacuolas tubulares de rápido movimiento, las cuales por lo general están acopladas con los movimientos citoplasmáticos. Los movimientos de contracción citoplasmática fueron observados al microscopio óptico en las hifas que cruzaban del compartimento radical al hifal. Sin embargo, los sistemas de rápida translocación en vacuolas tubulares, no pueden ser observados de igual forma, pero son considerados por varios autores una posible ruta para el movimiento de otros elementos en los HMA (Uetake *et al.*, 2002; Burleigh & Jakobsen, 2002 y Bago *et al.*, 2002), fundamentalmente para el P.

En adición, existen numerosas evidencias que sugieren que entre K y P pudieran existir interacciones electrostáticas, para mantener el balance de cargas durante el transporte de este elemento a grandes distancias. Al respecto Orlovich & Ashford (1993) en un estudio con el hongo ectomicorrizógeno *Pisolithus tinctorius*, reconocieron no solo la interacción entre ambos elementos en las hifas extrarradicales, sino también que la translocación ocurrió en el interior de las hifas a través de vacuolas tubulares interconectadas. El movimiento de K a largas distancias dependiente de la translocación simultánea de P fue observado, además, por Jentschke *et al.* (2001) en el hongo ectomicorrizógeno *Paxillus involutus*. Estos autores informaron que la translocación de K mostró un

orden de magnitud similar al del P, confirmando el rol potencial que pueden tener las ectomicorrizas en el transporte de K.

La translocación de Rb y/o K por las hifas de *G. clarum* y *G. intraradices* en vacuolas tubulares es posible que haya ocurrido en el experimento de la tesis, partiendo de la existencia de un sistema móvil de vacuolas tubulares interconectadas, similar al descrito en *P. tinctorius*, vinculado con la translocación del P en los tubos germinativos y el micelio intra y extrarradical de *Gigaspora margarita* (Uetake *et al.*, 2002) y *G. intraradices* (Olsson *et al.*, 2002).

En este experimento ha quedado demostrado que las hifas de *G. clarum* y *G. intraradices* son capaces de absorber y transportar Rb hasta el sistema aéreo de plantas de *M. truncatula* y por tanto, que también son capaces de absorber y transportar K, aspecto novedoso y relevante en los estudios de transporte entre HMA y plantas, ya que hasta el momento no se contaba con evidencia directa de la absorción de potasio por los HMA. La combinación de estudios fisiológicos y moleculares encaminados a la identificación de los transportadores, con ^{86}Rb como trazador de K, representará un paso de avance para esclarecer el papel de los HMA en el transporte de este elemento.

5.5. Consideraciones generales

Desde hace más de dos décadas se han venido desarrollando en nuestro país líneas de investigación encaminadas al estudio y la introducción de los HMA en los diferentes sistemas de producción agrícola, basados en el amplio espectro de la simbiosis micorrízica arbuscular (Rivera *et al.*, 2007). Producto de la importancia de este tema, la búsqueda de nuevas vías de inoculación es objetivo prioritario, siendo la micorrización de plántulas *in vitro* una de las mayores aspiraciones.

Como se había mencionado anteriormente, una de las críticas más frecuentes que ha recibido el cultivo monoxénico de hongos micorrizógenos arbusculares, utilizando el cultivo de raíces como hospedero, es la falta de tejido fotosintético. Aunque tal sistema aún se considera válido para el estudio de la biología de los HMA, así como para algunos aspectos relacionados con la interacción hongo-raíz (Bago *et al.*, 2006), los investigadores deben tener en cuenta la ausencia de la planta

como un todo a la hora de interpretar los resultados. Por ejemplo, los estudios de influencia del sistema aéreo sobre los HMA no son posibles utilizando ese sistema, tampoco los de respuesta sistémica inducida en las plantas por la micorrización, o los relacionados con el transporte de nutrientes desde la planta hasta las estructuras fúngicas y viceversa.

Contar con un sistema de micorrización *in vitro* que incluya la planta y en el que puedan obtenerse altos niveles de colonización en un corto periodo de tiempo, constituye actualmente uno de los retos de la biotecnología agrícola, tanto por su importancia en el campo de la micropropagación de plantas como en el estudio de la simbiosis micorrízica arbuscular.

La micorrización *in vitro* es un proceso altamente complejo, como ha quedado demostrado a través de este estudio, que depende de garantizar las necesidades de plantas y hongos, organismos con

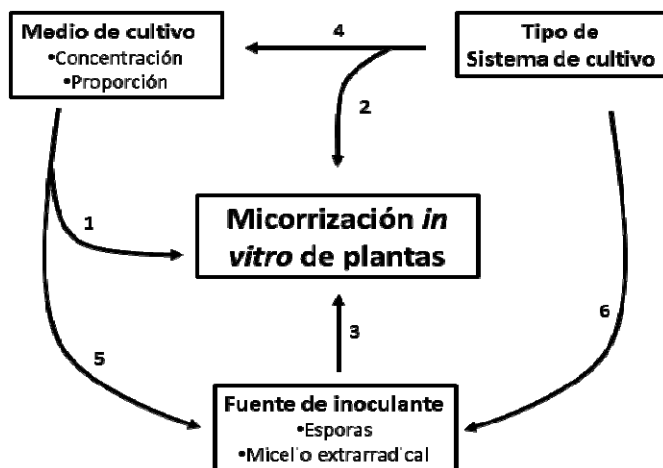


Figura 27. Interacción entre los principales factores que influyen en el éxito de la micorrización de plantas *in vitro*.

requerimientos nutricionales diferentes, y en el caso específico de los HMA, sólo se cuenta con escasa información.

Como resultado de esta investigación se demostró (Figura 27) que la composición de los medios de cultivo (1), los sistemas de cultivo (2) y la fuente de inoculante empleada (3), influyen directamente en el establecimiento de la micorrización *in vitro* de plántulas de papa. Estos factores

resultaron estar estrechamente relacionados entre sí, como se aprecia en la figura 27, de forma tal que la eficiencia de los medios de cultivo está influenciada por el sistema de cultivo en el cual se empleen (4) e influye, a su vez, sobre el comportamiento de la fuente de inoculante utilizada (5), la cual también va a estar condicionada al tipo de sistema de cultivo (6). La correcta interacción entre

estos factores garantiza la micorrización rápida, eficiente y homogénea de las plántulas de *Solanum tuberosum* en condiciones *in vitro*.

En este estudio se informa por vez primera sobre la respuesta de plántulas de *Solanum tuberosum* a la micorrización *in vitro* con esporas de *G. clarum* utilizando diferentes medios y sistemas de cultivo. El sistema de Planta Donante de Micelio, utilizando como fuente de inóculo micelio extrarradical proveniente de una planta donante, resultó ser, dentro de los sistemas estudiados, el más conveniente para micorrizar plántulas de *S. tuberosum* y *M. truncatula* de forma rápida y homogénea. Por otra parte, es la primera vez que se explota la capacidad colonizativa del micelio extrarradical para micorrizar plantas *in vitro*, partiendo del conocimiento de que en la naturaleza, las redes de micelio son una importante fuente de inóculo, capaces de interconectar plantas de iguales o diferentes especies (Hart & Reader, 2005; Voets *et al.*, 2006 y de la Providencia, 2007).

El micelio extrarradical demostró ser un inóculo altamente infectivo, capaz de acelerar el proceso de micorrización de plantas *in vitro*. Los niveles de colonización alcanzados (55 % en *S. tuberosum* y 80 % en *M. truncatula*) en 12 días, nunca habían sido logrados en otro sistema *in vitro* estudiado anteriormente.

Según las experiencias alcanzadas en esta tesis, consideramos que para que un sistema de micorrización *in vitro* de plantas sea efectivo, debe cumplir con las ocho premisas que se listan a continuación:

- Sea fácilmente reproducible
- Garantice el normal crecimiento y desarrollo de las plantas
- Facilite la obtención de plantas micorrizadas de forma acelerada y homogénea
- Permita alcanzar niveles de colonización comparables o superiores a los obtenidos en los sistemas *in vivo*
- Facilite producir un alto número de esporas, comparables o superiores a las obtenidas en cultivos de raíces
- Permita obtener plantas micorrizadas capaces de reproducir la colonia fúngica de manera

eficiente cuando son trasplantadas a nuevos medios

- Sea aplicable a diversas especies vegetales y fúngicas
- Sea de fácil introducción en los procedimientos convencionales de producción de plantas *in vitro*

El sistema de Planta Donante de Micelio (PDM) cumple con los siete primeros criterios, y como fue demostrado a través del estudio realizado: es fácilmente reproducible y en él se pueden obtener plantas sanas, micorrizadas de forma rápida (Figura 22 E), interconectar raíces de plantas de igual o diferente especie (Figura 7), alcanzar niveles de colonización superiores a los obtenidos *in vivo* (Figura 23), aplicar a otras especies vegetales (Figura 23), obtener plantas capaces de reproducir la colonia fúngica de manera eficiente cuando son trasplantadas a nuevos medios (Figuras 24 y 25), e incluso servir de base para la producción de inóculo micorrízico en biorreactores (Declerck *et al.*, 2010). Sin embargo, su introducción en los procedimientos convencionales de producción de plantas *in vitro* continúa siendo un reto, por lo que es necesario continuar profundizando en los aspectos que limitan ampliar el uso de los hongos micorrizógenos arbusculares a tales sistemas productivos.

Como ha quedado expuesto a través de este estudio el sistema PDM es funcional y puede ser aplicado en diversos campos de investigación relacionados con los hongos micorrizógenos arbusculares, no sólo desde el punto de vista de la investigación básica, sino también práctica, en las cuales es necesaria tanto la micorrización rápida y homogénea de las plantas, como la producción masiva de inóculo micorrízico. Por otra parte, el sistema PDM constituye la base para el desarrollo de un futuro sistema de micorrización de plantas *in vitro* que permita la introducción de los HMA en las prácticas actuales de producción vegetal y la obtención de plántulas *in vitro* eficientemente micorrizadas, las cuales probablemente estarán más aptas para enfrentar el estrés que representa la adaptación a las condiciones edafoclimáticas.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

1. El sistema Planta Donante de Micelio constituye un modelo factible para los estudios de la interacción Hongo Micorrizógeno Arbuscular – planta y permite la producción de plántulas micorrizadas *in vitro* con utilidad práctica.
2. La inoculación de plántulas con micelio extrarradical de *Glomus intraradices* proveniente de una planta donante, permite obtener elevados niveles de colonización *in vitro* y acortar el tiempo del proceso colonizativo de *Solanum tuberosum* cv. Desirée y *Medicago truncatula* cv. Jemalong.
3. Las plántulas micorrizadas en el sistema Planta Donante de Micelio son capaces, en solo cuatro semanas después del trasplante, de reproducir la colonia fúngica cuando son trasplantadas a medios frescos y producir un elevado número de estructuras extrarradicales (micelio y esporas); el número de esporas producidas es de aproximadamente 100 por centímetro cúbico en *S. tuberosum* cv. Desirée y 150 en *M. truncatula* cv. Jemalong.
4. La asociación Hongo Micorrizógeno Arbuscular–planta es funcional en condiciones autotróficas totalmente *in vitro*; las cepas empleadas de *G. clarum* y *G. intraradices* son capaces de absorber, transportar y translocar ^{86}Rb a plantas de *M. truncatula* en estas condiciones, lo cual indica su participación en la adquisición y translocación de K a las plantas.
5. Los medios de cultivo con concentraciones bajas de fósforo, nitrógeno y potasio (comparadas con el medio MS) y con un balance entre ellos, permiten simultáneamente, el crecimiento eficiente de las plántulas de *S. tuberosum* cv. Desirée y la colonización a partir de esporas de *G. clarum*, en el sistema autotrófico parcialmente *in vitro*.

6.2. Recomendaciones

1. Utilizar el sistema Planta Donante de Micelio para realizar estudios relacionados con la asociación HMA – planta, la producción *in vitro* de plántulas micorrizadas de forma rápida, homogénea y eficiente, o para la producción masiva de inóculo micorrízico.
2. Evaluar las tasas de sobrevivencia y el desarrollo fisiológico de plántulas de *S. tuberosum*, previamente micorrizadas *in vitro* en el sistema de Planta Donante de Micelio, después de su trasplante para la adaptación en casas de cultivo.
3. Profundizar en los estudios relacionados con el intercambio de gases en los Sistemas Autotróficos Totalmente *in vitro*, para determinar el papel del etileno en el establecimiento de la simbiosis micorrízica arbuscular en tales condiciones.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abeles, F. B.; Morgan, P. W. & Saltveit, M. E. 1992. Ethylene in plant biology, (Second Edition). Academic Press, New York.
2. Adams, F. 1980. Interactions of phosphorus with other elements in soils and in plants. En: The role of phosphorus in agriculture. Khazawneh, F. E.; Sample, E. C. y Kamprath, E. J. (Eds.) American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin, EUA. Pp. 655-680.
3. Aitken-Christie, J., Kozai, T. & Smith, M. A. 1995. Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 500 P.
4. Akiyama, K.; Matzusaki, K. & Hayashi, H. 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 435: 824–827.
5. Ashford, A. E. & Allaway, W. G. 2002. The role of the motile tubular vacuole system in mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 244: 177–187.
6. Avio, L.; Pellegrino, E.; Bonari, E. & Giovannetti, M. 2006. Functional diversity of arbuscular mycorrhizal fungal isolates in relation to extraradical mycelial networks. *Journal compilation © New Phytologist*.
7. Azcón-Aguilar, C.; Bago, B. & Barea, J. M. 1998. Saprophytic growth of AMF. En: *Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. Varma, A. & Hock, H. (Eds.), Second Edition. Springer-Verlag, Berlin. Pp. 391-408.
8. Bago, B. & Cano, C. 2005. Breaking myths on arbuscular mycorrhizas *in vitro* biology. En: *In vitro culture of mycorrhizas*. Declerck, S.; Strullu, D. G. & Fortin, J. A. (Eds). Springer, Berlin. Pp. 111–138.
9. Bago, B.; Vierheilig, H.; Piché, Y. & Azcón-Aguilar, C. 1996. Nitrate depletion and pH changes induced by extraradical mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown in monoxenic culture. *New Phytologist*, 133: 273–280.
10. Bago, B.; Azcón-Aguilar, C.; Goulet, A. & Piché, Y. 1998. Branched Absorbing Structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 139: 375-388.
11. Bago, B.; Pfeffer, P. E. & Shachar-Hill, Y. 2000. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology*, 124:949-958.

12. Bago, B.; Pfeffer, P. E.; Zipfel, W.; Lammers, P. & Shachar-Hill, Y. 2002. Tracking metabolism and imaging transport in arbuscular mycorrhizal fungi. *Metabolism and transport in AM fungi. Plant and Soil*, 244: 189–197.
13. Bago, B.; Cano, C.; Toussaint, J-P.; Smith, S. & Dickson, S. 2006. Interactions between the arbuscular mycorrhizal (AM) fungus *Glomus intraradices* and non-transformed tomato roots of either wild-type or AM-defective phenotypes in monoxenic cultures. *Mycorrhiza*, 16: 429-436.
14. Baligar, V. C. 1995. Potassium uptake by plants as characterized by root density, species and potassium to rubidium ratio. *Plant and Soil*, 85:43–54.
15. Barker, S. J & Larkan, N. J. 2002. Molecular approaches to understanding mycorrhizal symbioses. *Plant and Soil*, 244: 107–116.
16. Bécard, G. & Fortin, J. A. 1988. Early events of vesicular–arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist*, 108: 211–218.
17. Bécard, G. & Piché, Y. 1989. Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular - arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 2320-2325.
18. Bécard, G. & Piché, Y. 1992. Establishment of vesicular–arbuscular mycorrhiza in root organ culture: review and proposed methodology. En: *Techniques for the study of mycorrhiza*. Norris, J.; Read, D. & Varma, A. (Eds.) Academic Press, New York. Pp. 89–108.
19. Bécard, G.; Douds, D. D. y Pfeffer, P. E. 1991. Extensive *in vitro* hyphal growth of vesicular arbuscular mycorrhizal fungus in the presence of CO₂ and flavonols. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 821-825.
20. Bécard, G.; Kosuta, S.; Tamasloukht, M.; Séjalon-Delmas, N. y Roux, C. 2004. Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. *Canadian Journal of Botany*, 82: 1186-1196.
21. Besserer, A.; Puech-Pages, V.; Kiefer, P.; Gómez-Roldán, V.; Jauneau, A.; Roy, S.; Portais, J. C.; Roux, C.; Bécard, G. & Séjalon-Delmas, N. 2006. Strigolactonas stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biology*, 4: 1239–1247.
22. Bierman, B. & Linderman, G. 1983. Use of vesicular arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles as inoculum. *New Phytologist*, 95: 97-105.
23. Bonfante - Fassolo, P. & Perotto, S. 1992. Plants and endomycorrhizal fungi: The cellular and molecular basis of their interaction. En: *Molecular signals in plant-microbe communications*. Verma D. P. (Ed.) CRC press, Boca Ratón. Pp. 445-470.

24. Brandsaeter, I. O.; Olsmo, A.; Tronsmo, A. M. & Fykse, H. 2002. Freezing resistance of winter annual and biennial legumes at different developmental stages. *Crop Science*, 42: 437-443.
25. Bressan, W. 2001. The interactive effect of phosphorus and nitrogen on *in vitro* spore germination of *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann, root growth and mycorrhizal colonization. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32: 276-280.
26. Bressan, W. 2002. Factors affecting *in vitro* plant development and root colonization of sweet potato by *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33: 31-34.
27. Bressan, W.; De Carvalho, C. H. & Sylvia, D. M. 2000. Inoculation of somatic embryos of sweet potato with an arbuscular mycorrhizal fungus improves embryo survival and plantlet formation. *Canadian Journal of Microbiology*, 46: 741-743.
28. Brundrett, M. 2009. Mycorrhizas in Natural Ecosystems. En: *Advances in Ecological Research*. 1991. Begon, M.; Fitter, A. H. & Macfadyen, A. (Eds.). Academic Press Limited, ISBN 0-12-013921-9.21: 171-313.
29. Budi, S. W.; Blal, B. & Gianinazzi, S. 1999. Surface-sterilization of *Glomus mosseae* sporocarps for studying endomycorrhization *in vitro*. *Mycorrhiza*, 9: 65-68.
30. Buée, M.; Rossignol, M. & Jauneau, A. 2000. The presymbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by branching factor partially purified from plant root exudates. *Molecular and Plant - Microbe Interaction*, 13: 693-698.
31. Burleigh, S. H. & Jakobsen, I. 2002. Mycorrhizal research on the move. *Trends Plant Science*, 7: 6-7.
32. Butcher, D. N. 1980. The culture of isolated roots. En: *Tissue culture methods for plant pathologists*. D.S. Ingram & J.P. Helgelson (Eds.) Blackwell Scientific, Oxford. Pp. 13-17.
33. Butcher, D. N. & Street, H.E. 1964. Excised root culture. *Botany Revue*, 30: 513-586.
34. Cano, C.; Dickson, S.; González-Guerrero, S. & Bago, A. 2008. *In vitro* cultures open new prospects for basic research in arbuscular mycorrhizas. En: *Mycorrhiza. State of the art, Genetics and molecular biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics*. Varma, A. (Ed.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Pp. 627-654.
35. Cassells, A. C. & Gahan, P. B. 2006. *Plant Tissue Culture Dictionary*. 265 P.

36. Castillo, J. G. 2010. Estimación de la variabilidad genética del germoplasma de papa (*Solanum* L. secc. Petota) en Cuba, para caracteres de interés agrícola. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Cuba. 149 P.
37. Corratgé, C.; Zimmermann, S.; Lambilliotte, R.; Plassard, C.; Marmeisse, R.; Thibaud, J. B.; Lacombe, B. & Sentenac, H. 2007. Molecular and functional characterization of a Na⁺-K⁺ transporter from the TRK family in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *The Journal of Biological Chemistry*, 282: 26057–26066.
38. Cranenbrouck, S.; Voets, L.; Bivort, C.; Renard, L.; Strullu, D. G. & Declerck, S. 2005. Methodologies for *in vitro* cultivation of arbuscular mycorrhizal fungi with root organs. En: *In vitro* culture of mycorrhiza. Declerck, S.; Strullu, D. G. & Fortin, J. A. (Eds.) Springer, Berlin. Pp. 341–348.
39. Cruz, A. F.; Ishii, T. & Kadoya, K. 2000. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on tree growth, leaf water potential, and levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and ethylene in the roots of papaya under water-stress conditions. *Mycorrhiza*, 10: 121–123.
40. Dalpé, Y. 2001. *In vitro* monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi: a major tool for taxonomical studies. En: Proceedings of the 3rd National Symposium on Mycorrhizal Symbioses. Guanajuato, Mexico, September, 2000. Olalde, V (Ed.). Comité Nacional de Investigación y enseñanza de la micorriza, México.
41. Dalpé, Y.; Cranenbrouck, S.; Séguin, S. & Declerck, S. 2005. The monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi as a tool for systematics and biodiversity. En: *In Vitro Culture of Mycorrhizas*. Declerck, S.; Strullu, D.G. & Fortin, J.A. (Eds.) Springer, Heidelberg. Pp. 31–48.
42. de la Providencia, E. I.; de Souza, F. A.; Fernández, F.; Séjalón Delmas, N. & Declerck, S. 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi reveal distinct patterns of anastomosis formation and hyphal healing mechanisms between different phylogenetic groups. *New Phytologist*, 165: 261–271.
43. de la Providencia, I. E. 2007. Contribution of anastomosis and Hyphal Healing Mechanism to the extraradical mycelium architecture of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Université catholique de Louvain. Belgique. 179 P.
44. de la Providencia, I. E.; Fernández, F. & Declerck, S. 2007. Hyphal healing mechanism in the arbuscular mycorrhizal fungi *Scutellospora reticulata* and *Glomus clarum* differ in response to severe physical stress. *FEMS Microbiology Letter*, 268: 120–125.

45. de Groot, C. C.; Marcelis, L. F.; van den Boogaard, R.; Kaiser, W. M. & Lambers, H. 2003. Interaction of nitrogen and phosphorus nutrition in determining growth. *Plant and Soil*, 248: 257–268.
46. de Souza, F. A. & Berbara, R. L. L. 1999. Ontogeny of *Glomus clarum* in Ri T-DNA transformed roots. *Mycologia*, 91: 343–350.
47. de Souza, F. A. & Declerck, S. 2003. Mycelium development and architecture, and spore production of *Scutellospora reticulata* in monoxenic culture with Ri T-DNA transformed carrot roots. *Mycologia*, 95: 1004–1012.
48. de Souza, F. A.; Dalpé, Y.; Declerck, S.; de la Providencia, I. E. & Séjalon-Delmas, N. 2005. Life history strategies in *Gigasporaceae*: insight from monoxenic culture. En: *In vitro* culture of Mycorrhizas. Declerck, S.; Strullu, D. G. & Fortin, J. A. (Eds.) Heidelberg, Springer-Verlag. Pp. 73-94.
49. Declerck, S.; Strullu, D. G.; Plenchette, C. & Guillemette, T. 1996. Entrapment of *in vitro* produced spores of *Glomus versiforme* in alginate beads: *in vitro* and *in vivo* inoculum potentials. *Journal of Biotechnology*, 48: 51-57.
50. Declerck, S.; Strullu, D. G. & Plenchette, C. 1998. Monoxenic culture of the intraradical forms of *Glomus* sp. isolated from a tropical ecosystem: a proposed methodology for germplasm collection. *Mycologia*, 90: 579-585.
51. Declerck, S.; D'Or, D.; Cranenbrouck, S. & Le Boulengé, E. 2001. Modelling the sporulation dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi in monoxenic culture. *Mycorrhiza* 11:225–230.
52. Declerck, S.; Strullu, D. G. & Fortin, J. A. 2005. *In vitro* culture of mycorrhizas. Springer, Berlín. 375 P.
53. Declerck, S.; Ijdo, M.; Fernández, K.; de la Providencia, I. & Voets, L. 2010. Patent No. WO/2009/090220. Method and system for *in vitro* mass production of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Published: 29.09.2010.
54. Desjardins, Y. 1995a. Factors affecting CO₂ fixation in striving to optimized photoautotrophy in micropropagated plantlets. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 1: 13-25.
55. Desjardins, Y. 1995b. Overview of factors influencing photosynthesis of micropropagated plantlets and their effect on acclimatization. En: *Ecophysiology and photosynthetic in vitro* cultures. Carré, F. & Chagvardief, P. (Eds.). Aix-en-Provence (France): CEA. Pp. 145-160.

56. Desjardins, Y. 1995c. Photosynthesis *in vitro* on the factors regulating CO₂ assimilation in micropropagation systems. *Acta Horticola*, 393: 45-61.
57. Diop, T. A. 2003. *In vitro* culture of arbuscular mycorrhizal fungi: Advances and future prospects. *African Journal of Biotechnology*, 12: 692-697.
58. Diop, T. A.; Bécard, G. & Piché, Y. 1992. Long-term *in vitro* culture of an endomycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*, on Ri T-DNA transformed root of carrot. *Symbiosis*, 12: 249–259.
59. Diop, T. A.; Plenchette, C. & Strullu, D. G. 1994a. Dual axenic culture of sheared root inocula of vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi associated with tomato roots. *Mycorrhiza*, 5: 17–22.
60. Diop, T. A.; Plenchette, C. & Strullu, D. G. 1994b. *In vitro* culture of sheared mycorrhizal roots. *Symbiosis*, 17: 217–227.
61. Doner, L. W. & Bécard, G. 1991. Solubilisation of gellan gels by chelation of cations. *Biotechnology Technique*, 5: 25–28.
62. Douds, D. D.; Pfeffer, P. E. & Shachar-Hill, Y. 2000. Carbon partitioning, cost, and metabolism of arbuscular mycorrhizas. En: *Arbuscular mycorrhizas: Physiology and Function*. Kapulnik, Y. & Douds, D. D. (Eds). Kluwer, Dordrecht. Pp. 107–129.
63. Drobner, U. & Tyler, G. 1998. Conditions controlling relative uptake of potassium and rubidium by plants from soils. *Plant and Soil*, 201: 285-293.
64. Dupré de Boulois, H. 2007. Role of arbuscular mycorrhizal fungi on the accumulation of radiocaesium by plants. Université catholique de Louvain. Belgique. 292 P.
65. Dupré de Boulois, H.; Delvaux, B. & Declerck, S. 2005. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on the root uptake and translocation of radiocaesium. *Environmental Pollution*, 134: 515-524.
66. Dupré de Boulois, H.; Voets, L.; Delvaux, B.; Jakobsen, Y. & Declerck, S. 2006. Transport of radiocaesium by arbuscular mycorrhizal fungi to *Medicago truncatula* under *in vitro* conditions. *Environmental Microbiology*, 11: 1926-1934.
67. Durell, S. R.; Hao, Y. L.; Nakamura, T.; Bakker, E. P. & Guy, H. R. 1999. Evolutionary relationship between K⁺ channels and symporters. *Biophysic Journal*, 77: 775–788.
68. Elmeskaoui, A; Damont, J - J. P.; Piché, Y. & Desjardins, Y. 1995. A culture system for endomycorrhizal inoculation of micropropagated strawberry plantlets *in vitro*. *Mycorrhiza*, 5: 313 - 319.

69. Elsen, A.; Declerck, S. & De Waele, D. 2003. Use of root organ cultures to investigate the interaction between *Glomus intraradices* and *Pratylenchus coffeae*. *Applied Environmental Microbiology*, 69: 4308–4311.
70. FAOSTAT. 2008. Boletín especial de la FAO. No. 24. 27 de Agosto de 2008.
71. Fitter, A. H. 2006. What is the link between carbon and phosphorus fluxes in arbuscular mycorrhizas? A null hypothesis for symbiotic function. *New Phytologist*, 172: 3–6.
72. Fitter, A. H. & Moyersoen, B. 1996. Evolutionary trends in root microbe symbiosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, 351. Pp. 1367-1375.
73. Fitzsimons, M. S.; Miller, R. M. y Jastrow, J. D. 2008. Scale-dependent niche axes of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia*, 158: 117–127.
74. Fortin, J. A.; Bécard, G.; Declerck, S.; Dalpé, Y.; St-Arnaud, M.; Coughlan, A. P. & Piché, Y. 2002. Arbuscular mycorrhiza on root organ cultures. *Canadian Journal of Botany*, 80:1-20.
75. Friese, C. F. & Allen, M. F. 1991. The spread of VA mycorrhizal fungal hypha in the soil–inoculum types and external hyphal architecture. *Mycologia*, 83: 409–418.
76. Gallou, A.; de Jaeger, N.; Cranenbrouck, S. & Declerck, S. 2009. Fast track *in vitro* mycorrhization of potato plantlets allow studies on gene expression dynamics. *Mycorrhiza* 16: 123-125.
77. Geil, R. D.; Peterson, R. L. & Guinel, F. C. 2001. Morphological alterations of pea (*Pisum sativum* cv. Sparkle) arbuscular mycorrhizas as a result of exogenous ethylene treatment. *Mycorrhiza*, 11: 137–143.
78. Geil, R. D. & Guinel, F. C. 2002. Effects of elevated substrate-ethylene on colonization of leek (*Allium porrum*) by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus aggregatum*. *Canadian Journal of Botany*, 80: 114-119.
79. George, E. 2000. Nutrient Uptake. In: *Arbuscular Mycorrhizal: Physiology and Function*. Eds.: Kapulnik, Y & David, D. Pp. 53-67.
80. George, E.; Hausler, K. U.; Vetterlein, D.; Gorgus, E. & Marschner, H. 1992. Water and nutrient translocation by hyphae of *Glomus mosseae*. *Canadian Journal of Botany*, 70: 2130-2137.
81. George, E.; Marschner, H. & Jakobsen, I. 1995. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in uptake of phosphorus and nitrogen from soil. *Critical Reviews in Biotechnology*, 15: 257–270.

82. Gianinazzi, S.; Gollotte, A.; Binet, M-N.; van Tuinen, D.; Redecker, D. & Wipf, D. 2010. Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza*, 20: 519-530.
83. Gianinazzi-Pearson, V.; Smith, S. E.; Gianinazzi, S. & Smith, F. A. 1991. Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizas V. Is H⁺-ATPase a component of ATP-hydrolysing enzyme activities in plant–fungus interfaces? *New Phytologist*, 117: 61–76.
84. Giovannetti, M. 2000. Spore Germination and Pre-Symbiotic Micelial Growth. En: *Arbuscular mycorrhizas: Physiology and Function*. Kapulnik, Y. & Douds, D. (Eds.). Chapter 3. Pp: 47-68.
85. Giovannetti, M. & B. Mosse. 1980. An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular infection in roots. *New Phytologist*, 84: 489-500.
86. Giovannetti, M.; Sbrana, C.; Avio, L. & Strani, P. 2004. Patterns of below ground plant interconnections established by means of arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytologist*, 164: 175–181.
87. Govindarajulu, M.; Pfeffer, P. E.; Jin, J. R.; Abubaker, J.; Douds, D. D.; Allen, J. W.; Bücking, H.; Lammers, P. J. & Shachar-Hill, Y. 2005. Nitrogen transfer in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Nature*, 435: 819-823.
88. Hamel, C. 2007. Extraradical arbuscular mycorrhizal mycelia: Shadowy figures in the soil. En: *Mycorrhizae in Crop Productions*. Hamel, C. & Plenchette, C. (Eds.). The Haworth Press, Inc. USA. Pp. 1-25.
89. Hampton, C. R.; Bowen, H. C.; Broadley, M. R.; Hammond, J. P.; Mead, A.; Payne, K. A.; Pritchard, J. & White, P. J. 2004. Cesium toxicity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 136: 3824–3837.
90. Haro, R.; Sainz, L.; Rubio, F. & Rodríguez-Navarro, A. 1999. Cloning of two genes encoding potassium transporters in *Neurospora crassa* and expression of the corresponding cDNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 31: 511-520.
91. Harrier, L. A. 2001. The arbuscular mycorrhizal symbiosis: a molecular review of the fungal dimension. *Journal of Experimental Botany*, 52: 469-478.
92. Harrison, M. J. & van Buuren, M. L. 1995. A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature*, 378: 626–629.

93. Harrison, M.; Dewbre, G. R. & Liu, J. 2002. A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *The Plant Cell*, 14: 2413-2429.
94. Hart, M. M. & Reader, R. J. 2002. Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 153: 335–344.
95. Hart, M. M. & Reader, R. J. 2005. The role of the external mycelium in early colonization for three arbuscular mycorrhizal fungal species with different colonization strategies. *Pedobiología (Jena)*, 49: 269–279.
96. Hazarika, B. N. 2006. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*, 108: 105-120.
97. Hause, B & Fester, T. 2005. Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Planta*, 221: 184–196.
98. Hepper, C. 1981. Techniques for studying the infection of plants by vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi under axenic conditions. *New Phytologist*, 88: 641–647.
99. Herrera-Peraza, R.; Hamel, Ch.; Fernández, F.; Ferrer, R: y Furrázola, E. 2011. Soil-strain compatibility: the key to effective use of arbuscular mycorrhizal inoculants? *Mycorrhiza*, 21: 183–193.
100. Hildebrandt, U.; Janetta, K. & Bothe, H. 2002. Towards growth of arbuscular mycorrhizal fungi independent of a plant host. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1919-1924.
101. Hodge, A.; Campbell, C. D. & Fitter, A. H. 2001. An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature*, 413: 297–299.
102. Hopkins, W. G. 1995. Water relation of the whole plant. En: *Introduction to Plant Physiology*. John Wiley and Sons, INC. New York. Pp. 41-64.
103. IICA. 2004. *Vademecum del cultivo de la papa*. Federación Colombiana de productores de papa (FEDEPAPA), 172 P.
104. IJdo, M.; Cranenbrouck, S. & Declerck, S. 2010. Methods for large-scale production of AM fungi: past, present and future. *Mycorrhiza* 19: 316-328.
105. Ishii, T.; Shrestha, Y. H.; Matsumoto, I. & Kadoya, K. 1996. Effect of ethylene on the growth of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi and on the mycorrhizal formation of trifoliolate orange roots. *Journal of Japanese Society Horticultural Science*, 65: 525-529.

106. Jakobsen, I. 1999. Transport of phosphorus and carbon in VA mycorrhizas. En: *Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*, 2nd Edition. Varma, A. y Hock, B. (Eds.). Springer, Berlin. Pp. 305–332.
107. Jeffries, P.; Gianinazzi, S.; Perotto, S.; Turnau, K. & Barea, J. M. 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of soils*, 37: 1-16.
108. Jentschke, G.; Brandes, B.; Kuhn, A. J.; Schroder, W. H. & Goldbold, D. L. 2001. Interdependence of phosphorus, nitrogen, potassium and magnesium translocation by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytologist*, 149: 327–337.
109. Jeong, B. R; Fujiwara, K. & Kozai, T. 1995. Environmental control and photoautotrophic micropropagation. *Horticultural Revue*, 17: 125-172.
110. Joner, E. J.; Ravnskov, S. & Jakobsen, I. 2000. Arbuscular mycorrhizal phosphate transport under monoxenic conditions using radio-labelled inorganic and organic phosphate. *Biotechnology Letters*, 22: 1705-1708.
111. Kaldorf, M.; Schmelzer, E. & Bothe, H. 1998. Expression of maize and fungal nitrate reductase genes in arbuscular mycorrhiza. *Molecular and Plant Microbe Interaction*, 11:439–448.
112. Karandashov, V. & Bucher, M. 2005. Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Trends in Plant Science*, 1: 1360-1385.
113. Khasa, D.; Piché & Coughlan, A. P. 2009. *Advances in Mycorrhizal Science and Technology*. Co-published by CABI Publishing, (Ed) P.B. Cavers. Canada.
114. Kirdmanee, C.; Kitaya, Y. & Kozai, T. 1995. Effects of CO₂ enrichment and supporting material *in vitro* on photoautotrophic growth of *Eucalyptus* plantlets *in vitro* and *ex vitro*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 31: 144-149.
115. Klironomos, J. N. & Hart, M. N. 2002. Colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi using different sources of inoculum. *Mycorrhiza*, 12: 181-184.
116. Koch, A. M.; Kuhn, G.; Fontanillas, P.; Fumagalli, L.; Goudet, J. & Sanders, I. R. 2004. High genetic variability and low local diversity in an arbuscular mycorrhizal fungal population. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 101: 2369–2371.
117. Koide, R. T. 2000. Functional complementarity in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 147: 233-235.

118. Koide, R. T. & Mosse, B. 2004. A history of research on arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza*, 14:145–163.
119. Kosuta, S.; Chabaud, M.; Loughon, G.; Gough, C.; Denarie, J.; Barker, D. G. & Bécard, G. 2003. A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 131: 952-962.
120. Kozai, T.; Kubota, Ch. & Jeong, B. R. 1997. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ culture*, 51: 49-56.
121. Lambais, M. R. & Mehddy, M. C. 1993. Suppression of endochitinase, β -1,3 glucanase and chalcone isomerase in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. *Molecular and Plant Microbe Interaction*, 6: 75–83.
122. Lambais, M. R. 2006. Unraveling the signaling and signal transduction mechanisms controlling arbuscular mycorrhiza development. *Scientia Agricola*, 63: 405–413.
123. Leake, J. R.; Johnson, D.; Donnelly, D. Muckle, G. E.; Boddy, L. & Read, D. J. 2004. Networks of power and influence: The role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agro-ecosystem functioning. *Canadian Journal of Botany*, 82: 1016-1045.
124. Liu, A.; Hamel, C.; Hamilton, R. I. y Smith, D. L. 2000. Mycorrhizae formation and nutrient uptake of new corn (*Zea mays* L.) hybrids with extreme canopy and leaf architecture as influenced by soil N and P levels. *Plant and Soil*, 221: 157–166.
125. Lovato, P. E.; Gianinazzi - Pearson, V.; Trouvelot, A. & S, Gianinazzi. 1996. The state of mycorrhizas and micropropagation. *Advances in Horticultural Science*, 10: 46-52.
126. Majada, J. P.; Fal, M. S. & Sánchez – Tomés, R. 1995. Influence of the *in vitro* environment on the stomatal physiology and morphology of micropropagated *Dianthus caryophyllus* cv. Nelken. En: *Ecophysiology and photosynthetic in vitro cultures*. Carré, F. & Chagvardieff, P. (Eds.) Aix-en-Provence (France): CEA. Pp. 141-144.
127. Maldonado-Mendoza, I. E.; Dewbre, G. R. & Harrison, M. J. 2001. A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Molecular and Plant Microbe Interaction*, 14: 1140–1148.
128. Manso, F. 2009. Informe final de la campaña de papa 2008-2009. MINAGRI, 32 P.

129. Marschner, H. & Dell, B. 1994. Nutrient-uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil*, 159: 89-102.
130. Matthijs, D.; Pascat, B. & Demeester, J. 1995. Factors controlling the evolution of the gaseous atmosphere during *in vitro* culture. En: *Ecophysiology and Photosynthetic in vitro cultures*. Carré, F. y Chagvardieff, P. (Eds.). Aix-en-Provence (France): CEA. Pp. 129-140.
131. Mirabal, L.; Kleiner, D. & Ortega, E. 2008. Spores of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* host yeasts that solubilize phosphate and accumulate polyphosphates. *Mycorrhiza*, 18: 197-204.
132. Mohammadi, G. E.; Rezaee, D. Y.; Prasad, R. & Varma, A. 2008. Mycorrhizal fungi: What we know and what should we know? En: *Mycorrhiza. State of the art, Genetics and molecular biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics*. Varma, A. (Ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 3-28.
133. Mosse, B. & Hepper, C. 1975. Vesicular arbuscular mycorrhizal infections in root organ cultures. *Physiology and Plant Pathology*, 5: 215–223.
134. Munkvold, L.; Kjoller, R.; Vestberg, M.; Rosendahl, S. & Jakobsen, I. 2004. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 164: 357-364.
135. Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15: 473-497.
136. Nagy, R.; Karandashov, V.; Chague, W.; Kalinkevich, K.; Tamasloukht, M.; Xu, G. H.; Jakobsen, I.; Levy, A. A.; Amrhein, N. & Bucher, M. 2005. The characterization of novel mycorrhiza-specific phosphate transporters from *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum* uncovers functional redundancy in symbiotic phosphate transport in solanaceous species. *Plant Journal*, 42: 236–250.
137. Nägeli, C. 1842. Pilze im Innern von Zellen. *Linnaea*, 16: 278–285.
138. Nantais, L. 1997. Optimization of arbuscular mycorrhizal inoculum through selection and increased production of *Glomus intraradices* propagules. M.Sc. Thesis, Université de Montréal, Montréal.
139. Newman, E. I. 1966. A method of estimating the total length of root in a sample. *Journal of Applied Ecology*, 3: 136-145.
140. Nguyen, Q. T.; Kozai, T.; Jeongwook, H. & Thai, D. X. 2001. Photoautotrophic growth response of *in vitro* cultured coffee plantlets to ventilation methods and photosynthetic photon

- fluxes under carbon dioxide enriched condition. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 66: 217–225.
141. Niemira, B. A.; Hammerschmidt, R. & Safir, G. R. 1996. Postharvest suppression of potato dry rot (*Fusarium sambucinum*) in pre-nuclear minitubers by arbuscular mycorrhizal fungal inoculum. *American Potato Journal*, 73: 509 - 515.
142. Nowak, J. & Shulaev, V. 2003. Priming for transplant resistance in *in vitro* propagation. In *Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 39: 107–124.
143. Olsson, P. A.; van Aarle, I. M.; Allaway, W. G.; Ashford, A. N. & Rouhier, H. 2002. Phosphorus Effects on Metabolic Processes in Monoxenic Arbuscular Mycorrhiza Cultures. *Plant Physiology*, 130: 1162–1171.
144. Orlovich, D. A. & Ashford, A. E. 1993. Polyphosphate granules are an artifact of specimen preparation in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Protoplasma*, 173: 91–102.
145. Paneque, V. M. 2002. Manual: Análisis de suelo y planta. La Habana, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. 42 P.
146. Parniske, M. 2004. Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 414–421.
147. Paszkowski, U. 2006. A journey through signaling in arbuscular mycorrhizal symbioses *New Phytologist*, 172: 35–46.
148. Pawlowska, T. E.; Douds, D. D. & I. Charvat. 1999. *In vitro* propagation and life cycle of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum*. *Mycological Research*, 103: 1549-1556.
149. Perl, A.; Aviv, D. & Galun, E. 1988. Ethylene and *in vitro* culture of potato: suppression of ethylene vastly improves protoplast yield, plating efficiency and transient expression of an alien gene. *Plant Cell Report*, 7: 403-406.
150. Petryk, N. E. 2005. Entre papas y patatas. Disponible en: www.alimentaciónsana.com.ar. (verificado, 20 de Abril de 2010).
151. Pfeffer, P. E.; Douds, D. D.; Bécard, G.; & Shachar-Hill, Y. 1999. Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology*, 120: 587–598.
152. Phillips, J. M. & Hayman, D. E. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55: 158-161.

153. Piniór, A.; Wyss, U.; Piché, Y. & Vierheilig, H. 1999. Plants colonized by AM fungi regulate further root colonization by AM fungi through altered root exudation. *Canadian Journal of Botany*, 77: 891-897.
154. Plenchette, C. & Morel, C. 1996. External phosphorus requirements of mycorrhizal and non-mycorrhizal barley and soybean plants. *Biology and Fertility of Soils*, 21: 303-308.
155. Pons, F. & Gianinazzi-Pearson, V. 1984. Influence du phosphore, du potassium, de l'azote et du pH sur le comportement in vitro de champignons endomycorrhizogènes à vésicules et arbuscules. *Cryptogamie: Mycologie*. 5: 87-100.
156. Preece, J. E. & Sutter, E. G. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. En: *Micropropagation, technology and application*. Debergh, P. C. & Zimmerman, R. H. (Eds.) Dordrecht (NL): Kluwer Acad. Publ. Pp. 71-93.
157. Pretty, K. M. & Stangel, P. J. 1985. Current and future use of world potassium. En: *Potassium in agriculture*. Munson, R. D. (Ed.). Madison, Wisconsin, USA: American Society of Agronomy. Pp. 99-128.
158. Rai, M. K. 2001. Current advances in mycorrhization in micropropagation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 37: 158-167.
159. Ramos, A. C.; Façanha, A. R. & Feijó, J. A. 2008. Ion dynamics during the polarized growth of arbuscular mycorrhizal fungi: from presymbiosis to symbiosis. En: *Mycorrhiza. State of the art, Genetics and molecular biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics*. Third Edition. Varma, A. (Ed). Pp. 241-260.
160. Redecker, D.; Kodner, R. & Graham, L. E. 2000. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science*, 289:1920–1921.
161. Remy, W.; Taylor, T. N.; Hass, H. & Kerp, H. 1994. Four hundred million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizas. *Proceeding of National Academic of Science. USA* 91. Pp.11841–11843.
162. Requena, N.; Serrano, E.; Ocon, A. & Breuninger, M. 2007. Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry*, 68: 33–40.
163. Rillig, M. 2004. Arbuscular mycorrhizae, glomalin and soil aggregation. *Canadian Journal of Soil Science*, 84: 355-363.
164. Rivera, R.; Fernández, F.; Fernández, K.; Ruiz, L.; Sánchez, C. & Riera, M. 2007. Advances in the Management of Effective Arbuscular Symbiosis in Tropical Ecosystems. En:

- Mycorrhizae in Crop Productions. Hamel, C. & Plenchette, C. (Eds.). The Haworth Press, Inc. USA. Pp. 151-195.
165. Rodríguez-Navarro, A. 2000. Potassium transport in fungi and plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1469: 1-30.
166. Rodríguez-Navarro, A. & Rubio, F. 2006. High affinity potassium and sodium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany*, 57: 1149-1160.
167. Rufty, T. W. Jr.; Israel, D. W.; Volk, R. J.; Qiu, J. & Sa, T. 1993. Phosphate regulation of nitrate assimilation in soybean. *Journal of Experimental Botany*, 44: 879–891.
168. Rufyikiri, G.; Thiry, Y.; Wang, L.; Delvaux, B. & Declerck, S. 2002. Uranium uptake and translocation by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*, under root organ culture conditions. *New Phytologist*, 156: 275-281.
169. Rufyikiri, G.; Thiry, Y. & Declerck, S. 2003. Contribution of hyphae and roots to uranium uptake and translocation by arbuscular mycorrhizal carrot roots under root-organ culture conditions. *New Phytologist*, 158: 391–399.
170. Ryan, M. H.; McCully, M. E. & Huang, C. X. 2003. Location and quantification of phosphorus and other elements in fully hydrated, soil-grown arbuscular mycorrhizas: a cryo-analytical scanning electron microscopy study. *New Phytologist*, 160: 429-441.
171. Ryan, M. H.; McCully, M. E. & Huang, C. X. 2007. Relative amounts of soluble and insoluble forms of phosphorus and other elements in intraradical hyphae and arbuscules of arbuscular mycorrhizas. *Functional Plant Biology*, 34: 457-464.
172. Santa – María, G. E.; Rubio, F.; Dubcovsky, J. & Rodríguez-Navarro, A. 1997. The HAK1 gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. *Plant Cell*, 9: 2281–2289.
173. Schüßler, A. & Walker, C. 2011. Evolution of the „Plant-Symbiotic“ Fungal Phylum, Glomeromycota. *Evolution of fungi and fungal-like organisms, The Mycota XIV*. Pöggeler, S. & Wöstemeyer, J. (Eds.)[©] Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 163-185.
174. Seiffert, S.; Kaselowsky, J.; Jungk, A. & Claassen, N. 1995. Observed and calculated potassium uptake by maize as affected by soil water content and bulk density. *Agronomy Journal*, 87: 1070-1077.
175. Selosse, M. A. & Le Tacon, F. 1998. The land flora: a phototroph fungus. partnership? *Trends Ecology and Evolution*, 13:15–20.

176. Serret, M. D.; Trillas, M. I.; Matas, J. & Araus, J. L. 1997. The effect of different closure types, light and sucrose concentrations on carbon isotope compositions and growth of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation and subsequent acclimation *ex vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 47: 217-230.
177. Siqueira, J. O. & A. A. Franco. 1988. *Biotechnology do solo. Fundamentos e Perspectiva*. MEC-ESAL-FAEPE-ABEAS. Brasilia, D. F. 235 P.
178. Siqueira, J. O.; Gibson, J. & Hubbell, D. H. 1985. Spores, germination, and germ tubes of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Florida Agriculture Station Journal Series No. 5588*.
179. Smith, S. E. & Read, D. J. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. Second Edition. Academic Press, London.
180. Smith, S. E.; Dickson, S. & Smith, F. A. 2001. Nutrient transfer in arbuscular mycorrhizas: how are fungal and plant processes integrated? *Australian Journal of Plant Physiology*, 28: 683-694.
181. Smith, S. E.; Smith, F. A. & Jakobsen, I. 2003. Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiology*, 133:16–20.
182. Smith, S. E.; Smith, F. A. & Jakobsen, I. 2004. Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. *New Phytologist*, 162: 511–524.
183. Smith, S. E.; Barker, S. J. & Zhu, Y. G. 2006. Fast moves in arbuscular mycorrhizal symbiotic signaling. *Trends in Plant Science*, 11: 369-371.
184. Sparks, D. L. & Huang, P. M. 1985. Physical chemistry of soil potassium. En: *Potassium in agriculture*. Munson, R. D. (Ed). Madison, Wisconsin, USA: American Society of Agronomy. Pp. 201-276.
185. St-Arnaud, M.; Hamel, C.; Vimard, B.; Caron, M. & Fortin, J. A. 1996. Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots. *Mycological Research*, 100: 328–332.
186. StatSoft, Inc. 2001. *Statistica*® release 6. Statsoft Incorporation, Tulsa.
187. Struik, P. C.; van der Putten, P. E.; Caldiz, D. O. & Scholte, K. 2006. Response of Stored Potato Seed Tubers from Contrasting Cultivars to Accumulated Day-Degrees. *Crop Science*, 46:1156-1168.

188. Strullu, D. G. & Romand, C. 1986. Méthode d'obtention d'endomycorhizes à vésicules et arbuscules en conditions axéniques. *Comptes Rendus de l'Académie Des Sciences Paris*, 303: 245-250.
189. Strullu, D. G. & Plenchette, C. 1991. The entrapment of *Glomus* sp. in alginate beads and their use as root inoculum. *Mycological Research*, 95: 1194-1196.
190. Suriyapperuma, S. P. & Koske, R. E. 1995. Attraction of germ tubes and germination spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora gigantea* in the presence of roots of maize exposed to different concentrations of phosphorus. *Mycologia*, 87: 772-778.
191. Suzuki, H.; Kumagai, H.; Oohashi, K.; Sakamoto, K.; Inubushi, K. & Enomoto, S. 2001. Transport of trace elements through the hyphae of and arbuscular mycorrhizal fungus into Marigold determined by the multitracer technique. *Soil Science of Plant Nutrition*, 1:131-137.
192. Torres, W. & García, D. 1987. Estimación del área foliar en plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Cultivos Tropicales*, 1: 66-70.
193. Treseder, K. K. & Cross, A. 2006. Global distributions of arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecosystems*, 9: 305-316.
194. Uetake, Y.; Kojima, T.; Ezawa, T. & Saito, M. 2002. Extensive tubular vacuole system in an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytologist*, 154: 761-768.
195. Van Aarle, I. M. & Olsson, P. A. 2008. Resource partitioning between extraradical and intraradical AM fungal mycelium. En: *Mycorrhiza. State of the art, Genetics and molecular biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics*. Varma, A. (Ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 321-336.
196. Van der Heijden, M. G. A.; Klironomos, J. N.; Ursic, M.; Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R.; Boller, T.; Wiemken, A. & Sanders, I. R. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant diversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, 396: 69-72.
197. Van der Heijden, M. G. A.; Streitwolf-Engel, R.; Riedl, R.; Siegrist, S.; Neudecker, A.; Ineichen, K.; Boller, T.; Wiemken, A. & Sanders, I. R. 2006. The mycorrhizal contribution to plant productivity, plant nutrition and soil structure in experimental grassland. *New Phytologist*, 172: 739-752.
198. Van der Zagg, D. E.; Asscheman, E. & Brinkman, H. 1996. *Potato diseases*. The Netherlands: NIVAA, 179 P. ISBN 90-802036-2-9.

199. Van Huylenbroeck, J. M. & Debergh, P. C. 1996. Physiological aspects in acclimatization of micropropagated plantlets. *Plant Tissue Culture Biotechnology*, 2: 136-141.
200. Varela-Castejón, C.; González-Penalta, B.; Vilariño, A. & Sainz, M. J. 1998. Fluorescent light inhibits the germination of propagules of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus macrocarpum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 30: 1845-1847.
201. Vierheilig, H.; Iseli, B.; Alt, M.; Raikhel, N.; Wiemken, A. & Boller, T. 1996. Resistance of *Urtica dioica* to mycorrhizal colonization: a possible involvement of *Urtica dioica* agglutinin. *Plant and Soil*, 183:131-136.
202. Vierheilig, H.; Coughlan, A. P.; Wyss, U. & Piché, Y. 1998. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 5004-5007.
203. Voets, L.; Dupré de Boulois, H.; Renard, L.; Strullu, D. G. & Declerck, S. 2005. Development of an autotrophic culture system for the *in vitro* mycorrhization of potato plantlets. *FEMS Microbiology Letters*, 248: 111–118.
204. Voets, L.; de la Providencia, I. E. & Declerck, S. 2006. *Glomeraceae* and *Gigasporaceae* differ in their ability to form hyphal networks. *New Phytologist*. 172: 185-188.
205. Wallace, T. 1970. Las deficiencias minerales en las plantas: su diagnóstico a través de los síntomas visuales. Barcelona: Editorial Ariel, 169 P.
206. Walley, F. L. & Germida, J. J. 1996. Failure to decontaminate *Glomus clarum* NT4 spores is due to wall associated bacteria. *Mycorrhiza*, 6: 43-49.
207. Wardle, D. A. 1992. A comparative assessment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 67: 321-358.
208. Westermann, D. T. 2005. Nutritional requirements of potatoes. *American Journal of Potato Research*. Pp. 11-19.
209. White, P. R. 1943. A handbook of plant tissue culture. J. Cattell, Lancaster, Pa.
210. Wolf, S.; Kalman-Rotem, N.; Yakir, D. & Ziv, M. 1998. Autotrophic and heterotrophic carbon assimilation of *in vitro* grown potato (*Solanum tuberosum* L.) plants. *Journal of Plant Physiology*, 15: 574-580.

)

ANEXO 1

Composición nutricional de los medios de cultivo utilizados. Los medios A, B, E, F, G, I y J fueron elaborados a partir de modificaciones realizadas en la composición del medio MS.

Componentes (μM)	SRM	MS	MS/2	A	B	E	F	G	I	J
N (NO_3^-)	3 800	38 200	19 100	19 100	19 100	4 775	4 775	1 193,7	9 550	19 100
N (NH_4^+)	180	20 100	10 050	10 050	10 050	5 025	5 025	2 515,5	5 025	10 050
P	30	1 200	600	300	150	300	150	300	600	300
K	1 650	19 700	9 850	19 700	19 700	4 925	3 940	1 970	4 925	9 850
Ca	1 520	3 960	1 980	1 980	1 980	1 980	1 980	1 980	1 980	1 980
Mg	3 000	1 490	745	745	745	745	745	745	745	745
S	3 013	1 740	870	870	870	870	870	870	870	870
Cl	870	3 960	1 980	1 980	1 980	1 980	1 980	1 980	1 980	1 980
Na	20	91	45,5	45,5	45,5	45,5	45,5	45,5	45,5	45,5
Fe	20	100	50	50	50	50	50	50	50	50
Mn	11	130	75	75	75	75	75	75	75	75
Zn	1	29,8	14,9	14,9	14,9	14,9	14,9	14,9	14,9	14,9
B	30	90	45	45	45	45	45	45	45	45
I	-	5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Mo	0,22	0,90	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
Cu	0,96	0,098	0,049	0,049	0,049	0,049	0,049	0,049	0,049	0,049
Co	-	0,19	0,095	0,095	0,095	0,095	0,095	0,095	0,095	0,095
pH (antes de esterización)	5,5	5,7	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5
Gel Gro® (g L⁻¹)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Fuentes nitrogenadas: NH_4NO_3 , KNO_3 ; Fuente fosfórica: KH_2PO_4 . A: $\frac{1}{4}\text{P}$; B: $\frac{1}{8}\text{P}$; E: $\frac{1}{4}\text{P}-\frac{1}{4}\text{N}-\frac{1}{4}\text{K}$; F: $\frac{1}{8}\text{P}-\frac{1}{4}\text{N}-\frac{1}{5}\text{K}$; G: $\frac{1}{4}\text{P}-\frac{1}{8}\text{N}-\frac{1}{10}\text{K}$; I: $\frac{1}{2}\text{P}-\frac{1}{4}\text{N}-\frac{1}{4}\text{K}$; J: $\frac{1}{4}\text{P}-\frac{1}{2}\text{N}-\frac{1}{2}\text{K}$. Todos los cálculos son respecto al medio MS. El resto de los elementos están disminuidos a la mitad con respecto a MS.

ANEXO 2

Estimación de la Frecuencia y la Intensidad de la colonización micorrízica arbuscular (Plenchette & Morell, 1996)

Frecuencia de la colonización (F %): porcentaje de fragmentos de raíces que presentan cualquier tipo de estructura indicadora de colonización (hifas, vesículas y/o arbusculos).

$$F(\%) = \left(\frac{N - n}{N} \right) \times 100$$

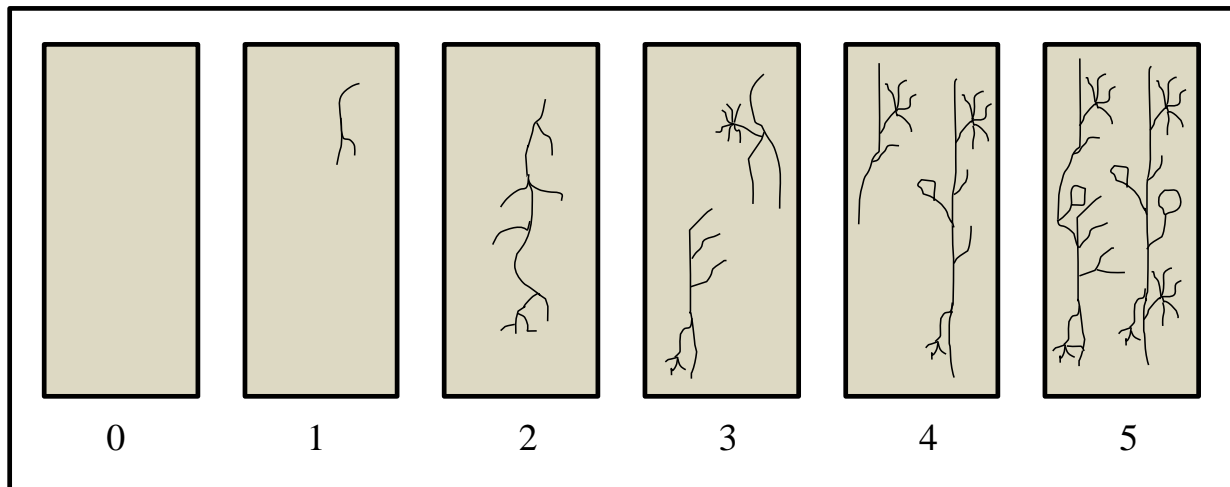
Donde N: número total de fragmentos de raíces observados

n: número de fragmentos de raíces no micorrizadas

Intensidad de la colonización (I%): abundancia relativa de estructuras intrarradicales del hongo micorrízico arbuscular.

$$I(\%) = \left(\frac{0,1v + 0,3w + 0,5x + 0,7y + 0,9z}{v + w + x + y + z} \right) \times 100$$

Donde v, w, x, y, z: niveles de colonización micorrízica estimada siguiendo la representación esquemática que se muestra a continuación



0 = no infección

1 = infección entre 1 y 20 % (v)

2 = infección entre 21 y 40 % (w)

3 = infección entre 41 y 60 % (x)

4 = infección entre 61 y 80 % (y)

5 = infección entre 81 y 100 % (z)