

Evaluación de un sistema para la micorrización *in vitro* en plantas de mora de castilla (*Rubus glaucus*, Benth)

Urley Adrian Pérez-Moncada¹, María Margarita Ramírez-Gómez¹, Víctor Manuel Núñez-Zarante²,
Marcela Franco-Correa³, Gabriel Roveda-Hoyos⁴

¹Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB), Laboratorio de Microbiología Molecular, ²Laboratorio de Genética Molecular Vegetal, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), Cundinamarca., Colombia.

³Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA), Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia.

⁴Facultad de Agronomía, Universidad Nacional, Bogotá D.C., Colombia.

* urleyadrian@gmail.com

Recibido: 15-03-2012; Aceptado: 03-07-2012

Resumen

Objetivo. Obtener un sistema de micorrización *in vitro* en sistemas de cultivo autotrófico para plantas de mora de castilla (*Rubus glaucus*, Benth). **Materiales y métodos.** Se utilizaron esporas y fragmentos de raíces con vesículas del Hongo Formador de Micorriza Arbuscular (HFMA) *Glomus* sp. (GEV02). Se estableció un sistema de cultivo autotrófico para plántulas de mora, comparando dos métodos de inoculación directa con el HFMA. Se cuantificó el número de esporas producidas, la longitud del micelio extraradical; así como el porcentaje de colonización del HFMA. Adicionalmente se midió la longitud aérea y radical, el peso fresco y seco de la parte foliar y radical para determinar el desarrollo de las plantas. **Resultados.** El sistema de cultivo autotrófico fue exitoso para plantas de mora de castilla (*Rubus glaucus*, Benth); observándose un óptimo crecimiento de la parte aérea y radical de la planta. Adicionalmente en este estudio se pudo obtener un sistema que permitió el desarrollo de *Glomus* sp (GEV02) bajo condiciones *in vitro*, con formación de estructuras típicas de la simbiosis como una buena colonización intraradical, con producción de arbuscúlos y vesículas, así como el desarrollo de micelio extraradical con hifas ramificadas y la formación de nuevas esporas. **Conclusión.** Las plantas de mora micropropagadas se asociaron con éxito, por primera vez, con un hongo formador de micorriza arbuscular bajo condiciones *in vitro*, permitiendo el desarrollo del sistema simbiótico HFMA *Glomus* sp., asociado a las raíces de plántulas de mora castilla micropropagadas.

Palabras clave: hongos formadores de micorriza arbuscular (HFMA), cultivo autotrófico, *Rubus glaucus* Benth, *Glomus* sp (GEV02), micorrización *in vitro*.

Abstract

Evaluation of an *in vitro* mycorrhization system of blackberry plants (*Rubus glaucus*, Benth). Objective. Obtain an *in vitro* mycorrhization system in autotrophic culture systems of blackberry plants (*Rubus glaucus*, Benth). **Materials and methods.** We used spores and root fragments with vesicles of Arbuscular Mycorrhizal Fungus (AMF) *Glomus* sp (GEV02). We established an autotrophic culture system of blackberry plantlets comparing two methods of direct inoculation of the AMF. We measured the number of spores produced, the length of the extraradical mycelium as well as the percentage of colonization of the AMF. Additionally, we measured the shoot and root length, and the fresh and dry weight of the leaf and root parts to determine the plant development. **Results.** The autotrophic culture system was successful for blackberry plants (*Rubus glaucus*, Benth); an optimal shoot and root growth was observed. Additionally, we obtained a system that allowed the development of *Glomus* sp. in *in vitro* conditions, with the formation of structures typical of the symbiosis as well as a good intraradical colonization, with the production of arbuscules and vesicles, development of extraradical mycelium with branched hyphae, and formation of new spores. **Conclusion.** For the first time, micropropagated blackberry plants associated successfully with an AMF under *in vitro* conditions, enabling the development of the symbiotic system AMF *Glomus* sp. associated to roots of micropropagated blackberry plantlets.

Key words: arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), autotrophic culture, *Rubus glaucus* Benth, *Glomus* sp. (GEV02), *in vitro* mycorrhization.

Resumo

Avaliação de um sistema para micorrização *in vitro* em plantas de amora-preta (*Rubus glaucus*, Benth). **Objetivo.** Obter um sistema de micorrização *in vitro* em sistemas de cultura autotróficos para plantas de amora-preta (*Rubus glaucus*, Benth). **Materiais e métodos.** Foram usados esporos e fragmentos de raízes com vesículas do Fungo Formador Micorrízico Arbuscular (FFMA) *Glomus* sp. (GEV02). Foi estabelecido um sistema de cultivo autotrófico para mudas de amora-preta, comparando dois métodos de inoculação direta com o FFMA. Foi quantificado o número de esporos produzidos, o comprimento do micélio extra radicular; bem como a porcentagem de colonização do FFMA. Além disso, foi medido o comprimento e o peso fresco e seco da parte folhar e radicular para determinar o desenvolvimento das plantas. **Resultados.** O sistema de cultivo autotrófico foi bem-sucedido para as plantas de amora-preta (*Rubus glaucus*, Benth), onde foi observado um crescimento ótimo da parte aérea e da radicular da planta. Além disso, neste estudo foi obtido um sistema que permitiu o desenvolvimento de *Glomus* sp (GEV02) sob condições *in vitro*, com formação de estruturas típicas da simbiose como uma boa colonização intra radicular, com produção de arbúsculos e vesículas, assim como o desenvolvimento de micélio extra radicular com hifas ramificada e a formação de novos esporos. **Conclusão.** As plantas de amora-preta micropropagadas associaram-se com sucesso, pela primeira vez, com um fungo formador micorrízico arbuscular em condições *in vitro*, permitindo o desenvolvimento do sistema simbiótico FFMA *Glomus* sp., associado às raízes das plântulas de amora-preta micropropagadas.

Palavras-chave: fungos formadores micorrízicos arbusculares (FFMA), o cultivo autotrófico, *Rubus glaucus* Benth, *Glomus* sp (GEV02), micorrização *in vitro*.

Introducción

La mora de castilla (*Rubus glaucus*, Benth), pertenece a la familia Rosácea, es una especie originaria de los Andes Tropicales de América. Esta especie se distribuye ampliamente en el país, se encuentra en forma silvestre, desde el departamento del Putumayo hasta el Valle del Magdalena y es posible cultivarla en altitudes entre 2.000 y 3.200 metros (1). De acuerdo con el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, la producción de mora en Colombia creció de 59.406 toneladas/año en 1999 a 82.135 toneladas/año en 2010; en este mismo período de tiempo, aumentó el área sembrada de mora de 7.062 hectáreas a 11.883 hectáreas. Siendo los departamentos de Cundinamarca, Santander y Antioquia, los mejor posicionados en aérea y producción (2). A pesar de la riqueza y del gran potencial de la mora, esta especie no ha adquirido el grado de importancia esperado, lo cual puede atribuirse a varias limitaciones dentro de las que se destaca, la propagación asexual mediante acodos o estacas que frecuentemente, transmiten enfermedades fúngicas, bacterianas y virales que dejan grandes pérdidas al agricultor (3), por cuanto se hace necesario el desarrollo de técnicas alternativas de propagación, mediante el cultivo de tejidos para garantizar una semilla vegetativa de alta calidad fisiológica, fitosanitaria y genética. El cultivo de tejido vegetal *in vitro* o micropropagación, constituye dentro de la biotecnología moderna, la técnica que mayor aporte práctico ha brindado en el sector (4). A pesar de los múltiples beneficios que genera la micropropagación, existen limitantes para un uso más extendido de esta técnica tales como transferencia de plántulas en condiciones *in vitro* a condiciones *ex vitro*, que constituye uno de los pasos más críticos de la micropropagación debido al alto grado de mortalidad de plántulas (entre 50 y 90%). Estas pérdidas se producen por problemas de aclimatación, como consecuencia

de una cutícula poco desarrollada, estomas no funcionales con un inadecuado control del estado hídrico de la planta y un sistema radical débil, que facilita la deshidratación (5-8). Las nuevas propuestas biotecnológicas sugieren aprovechar el recurso de la micropropagación, acompañada de la inoculación con Hongos Formadores de Micorriza Arbuscular (HFMA). La estrategia de la inoculación con HFMA se ha implementado con éxito para reducir el estrés durante el trasplante y garantizar un crecimiento rápido tanto del material vegetal propagado en condiciones de vivero o invernadero, como en plantas originadas en cultivo *in vitro*, debido a los efectos benéficos de esta asociación sobre la nutrición y el crecimiento de las plantas (8, 9-12).

Voets *et al.*, (2005) desarrollaron un sistema de micorrización *in vitro* que podría ser adaptado a mora de castilla (13). Este sistema, permitió la asociación exitosa de HFMA a plántulas de papa micropropagadas; las raíces y los HFMA se desarrollaron bajo estrictas condiciones de cultivo *in vitro*, mientras que la parte aérea se desarrollaba al aire libre, con una intensidad lumínica alta que permitía la fotosíntesis de la planta, las hifas que emergían de las esporas eran capaces de colonizar las raíces, de desarrollar micelio extraradical y producir nuevas esporas.

En el presente estudio se adaptó y evaluó un sistema de cultivo autotrófico para la micorrización *in vitro* de plántulas micropropagadas de mora de castilla (*Rubus glaucus*, Benth), este tipo de sistema (13), permite observar en forma directa, no destructiva, la dinámica de la simbiosis incluyendo producción de esporas, la colonización intraradical de las raíces y su capacidad de reproducir el ciclo de vida del hongo, mientras la planta se desarrolla al aire libre con una intensidad lumínica que permite la fotosíntesis de esta.

Materiales y métodos

Producción de plántulas de mora *in vitro*

Las plántulas de mora de castilla (*Rubus glaucus*, Benth) variedad sin espinas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Micropropagación de Plantas del Centro de Biotecnología y Bioindustria - CBB de CORPOICA, provenientes de una etapa de multiplicación. El material vegetal se enraizó en el medio basal Lepoivre modificado (14), el cual se preparó a partir de soluciones madre de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y FeNaEDTA, suplementado con 0,4 mg de tiamina, 100 mg de inositol, 0.1 mg de Ácido Indol Butírico y 20 g de sacarosa. Después de ajustar el pH a 5,8; se añadieron 7 g de agar. A continuación se repartieron 30 ml de medio en tubos y se introdujeron en autoclave (120°C durante 20 min). Las plántulas se mantuvieron en un cuarto de crecimiento con una temperatura promedio de 22°C, fotoperíodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad y una intensidad lumínica de 200 lux.

Obtención del inóculo de HFMA

Se utilizaron esporas de *Glomus* sp. (GEV02), provenientes de un cultivo de mora de castilla (*Rubus glaucus*, Benth). La multiplicación del HFMA se realizó bajo condiciones de invernadero utilizando como hospedero cebolla de bulbo (*Allium cepa* L). La producción de plantas de cebolla se hizo a partir de semillas sexuales del híbrido Yellow Granex F1PRR; las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2% y sembradas en turba Canadiense Growing Mix F15. A las 16 semanas de crecimiento, se procedió a extraer el inoculante, consistente en una mezcla de sustrato, esporas y raíces micorrizados. Las esporas utilizadas se aislaron del inoculante a través de la técnica de tamizado húmedo y decantación (15). Adicionalmente, se seleccionaron bajo un estéreo microscopio (Olympus SZ60) y se cortaron fragmentos de raíces de 1 cm de longitud, que contenían gran cantidad de vesículas. Estos dos tipos de propágulos infectivos (esporas y fragmentos de raíces con vesículas) fueron desinfectados (16) y colocados en placas de Petri que contenían medio Modificado Strullu – Romand (MSR) (17) y se incubaron en oscuridad durante 2 semanas a 25 °C en posición invertida, hasta su posterior germinación.

Sistema de cultivo autotrófico para la micorrización *in vitro* de plántulas de mora

Se estableció un sistema de cultivo autotrófico para plántulas de mora (13), comparándose dos métodos de inoculación directa con el HFMA *Glomus* sp. (GEV02). En el primero, se utilizaron fragmentos de raíces con vesículas y en el

segundo se utilizaron esporas individuales. Se realizaron dos orificios en un extremo de una placa de Petri (± 2 mm de diámetro), uno en la base y otro en la tapa, las placas contenían 30 ml de medio MSR sin sacarosa ni vitaminas y solidificado con 3 g / L de Phytigel (17). A continuación se transfirieron plántulas de mora de castilla micropropagadas de 8 semanas de edad (de 3 cm de longitud aproximadamente) que estaban creciendo en sistemas de cultivo *in vitro*. Las raíces se colocaron en contacto con la superficie del medio, mientras que el tallo sobresalía a través del orificio de la placa. Se tomaron 5 esporas y 5 fragmentos de raíces con vesículas previamente desinfectados y germinados de *Glomus* sp. (GEV02) y fueron colocados en las proximidades de las raíces de las plántulas de mora en cada placa de Petri, estas se sellaron con papel parafilm y el orificio se cubrió con grasa de silicona (E Merck, D-6100 Darmstadt, F R. Germany) para evitar contaminaciones. Los sistemas autotróficos se ubicaron verticalmente en una cámara húmeda y toda la estructura se mantuvo en un cuarto de crecimiento con una intensidad lumínica de 16 h luz / 8 h oscuridad y una temperatura de 22 °C día/ 18 °C noche. Periódicamente, dependiendo de la necesidad de las plantas, se añadió medio MSR sin sacarosa ni vitaminas, esterilizado a 120°C durante 20 minutos, a las placas de Petri para mantener un nivel adecuado de nutrientes a las plantas.

Diseño experimental

Se realizó un diseño completo al azar, con tres tratamientos y 5 repeticiones. Cada sistema de cultivo *in vitro* autotrófico fue considerado como una unidad experimental. Los tratamientos evaluados fueron: un tratamiento sin inocular (control), un tratamiento inoculado con fragmentos de raíces con vesículas y un tratamiento inoculado con esporas individuales. A partir de la cuarta semana, se realizaron observaciones de contacto entre las hifas fúngicas y las raíces de las plántulas de mora utilizando un estéreo microscopio (Olympus SZ60). A partir de la quinta y hasta la novena semana se evaluaron variables a nivel simbiótico y fisiológico. Para las variables a nivel simbiótico se cuantificó el número de esporas producidas con el fin de determinar el desarrollo fúngico y en la novena semana, se midió la longitud del micelio extraradical con el método de intersección en placa (18); así como el porcentaje de colonización de HFMA, empleando la metodología de tinción con azul de tripán (19). Adicionalmente, se tomaron las medidas de la colonización radical, donde se cuantifica la frecuencia de micorrización (%F), que considera el número de raíces colonizadas con relación al total de raíces por planta e intensidad de micorrización (%I), que indica el porcentaje de colonización por raíz; asignando a cada fragmento un número de 0 a 5 en función del nivel de infección por el hongo, así como un valor A0 hasta A3 con base en la riqueza de arbuscúlos del fragmento estudiado

(20). Posteriormente empleando un programa informático se calculó la frecuencia de colonización, la intensidad de la misma y la riqueza de arbusculos (21). A nivel fisiológico, se evaluó la longitud de las raíces y de la parte aérea. A la novena semana se midió el peso fresco y seco de la parte foliar y radical, para determinar el desarrollo de las plantas.

Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó utilizando el paquete estadístico SAS System. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para los datos registrados con una distribución normal y homogeneidad de varianzas. Posteriormente, los datos fueron sometidos a una prueba de medias con Tukey para observar diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre tratamientos.

Resultados

Sistema de cultivo autotrófico para la micorrización *in vitro* de plántulas de mora

En este estudio se pudo obtener un sistema que permitió el desarrollo del HFMA *Glomus* sp. (GEV02) bajo condiciones *in vitro*, con formación de estructuras típicas de la simbiosis como una buena colonización intraradical, observándose los primeros puntos de contacto entre las hifas del hongo y las raíces de las plantas a la cuarta semana después de la inoculación, con producción de arbusculos y vesículas, así como el desarrollo de micelio extraradical con hifas ramificadas, BAS (del inglés *Branched Absorbing Structures*, Estructuras Ramificadas de Absorción), cuya hipotética función es la absorción de nutrientes del suelo (22). Esta hipótesis está respaldada por las modificaciones estructurales que ocurren a nivel del BAS; una disminución progresiva de la pared hacia el ápice de las hifas, lo que facilitaría la absorción de nutrientes y un aumento en el número de mitocondrias en la base del mismo, que aumenta la disponibilidad de energía para el transporte (23) y finalmente la formación de nuevas esporas (**Figura 1**); tal y como se describen en el desarrollo de cultivos monoxénicos de HFMA utilizando fragmentos de raíces de zanahorias transformadas empleando *Agrobacterium rhizogenes* (24, 25); sin la necesidad de realizar muestreos destructivos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por varios autores en plantas autótrofas bajo condiciones de cultivo *in vitro* (13, 26-29), donde ocurrió asociación exitosa de *Glomus intraradices* (MUCL 41833, 43194) y *Glomus* sp. (MUCL 43195) con las plantas micropropagadas. Adicionalmente, el sistema autotrófico fue exitoso para plántulas de mora de castilla (*Rubus glaucus*, Benth) variedad sin espinas;

observándose un óptimo crecimiento de la parte aérea y radical de las plantas (**Figura 2**). Las plantas se asociaron con *Glomus* sp. (GEV02) en medio MSR, utilizado para el cultivo de órganos de raíces de zanahoria transformadas (30). El medio carecía de sacarosa y vitaminas, el cual fue utilizado en trabajos realizados para la micorrización *in vitro* de papa (13), vid (27), *Medicago truncatula* (26, 29) y banano (28).

Resultados experimentales

A nivel simbiótico según el análisis de varianza (GLM), no se observaron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0,05$) en los dos tratamientos inoculados con *Glomus* sp. (GEV02) en cuanto a los indicadores de asociación simbiótica como la frecuencia de micorrización (%F), intensidad de la micorrización (%I), intensidad de arbusculos (%a), micelio extraradical y formación de nuevas esporas (**Tabla 1**). Las raíces de las plantas de mora fueron colonizadas por *Glomus* sp. (GEV02) observándose un 100% en la frecuencia de micorrización (%F). Las micorrizas arbusculares observadas fueron de tipo *Arum*, en que las hifas crecen en los espacios intercelulares del córtex de la raíz, y los arbusculos se desarrollan como ramificaciones terminales intracelulares (30) (**Figura 3**). La colonización fue observada principalmente en las raíces primarias y secundarias.

A nivel fisiológico, las plantas inoculadas con fragmentos de raíces con vesículas o con esporas individuales de *Glomus* sp. (EV02) tuvieron una mayor producción de biomasa aérea y radical, observándose diferencias significativas en estos tratamientos con respecto al control de acuerdo con la prueba de Tukey (**Figura 4**), y en el momento de la cosecha (novena semana) las raíces ocupaban casi todo el volumen de la placa de Petri. Estos incrementos en biomasa bajo el sistema autotrófico puede asociarse a efectos nutricionales favorables vinculados con la asociación simbiótica *in vivo*, aunque también puede verse reflejado un efecto hormonal y/o fisiológicos de las especies de HFMA sobre las plantas que colonizan (31). Para las variables longitud aérea y radical, no se observaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos inoculados con respecto al control, de acuerdo con el análisis de varianza (GLM). Sin embargo, los valores obtenidos en promedio de la longitud aérea y radical en los tratamientos inoculados con esporas (6,7 y 171,5 cm) y fragmentos de raíces con vesículas (6,5 y 204,5 cm) de *Glomus* sp. (GEV02) fueron más altos que el control (5,7 y 149,8 cm) a la novena semana de ser evaluados, y estos tratamientos inoculados se pudieron cosechar una semana antes que el control (**Figura 5**).

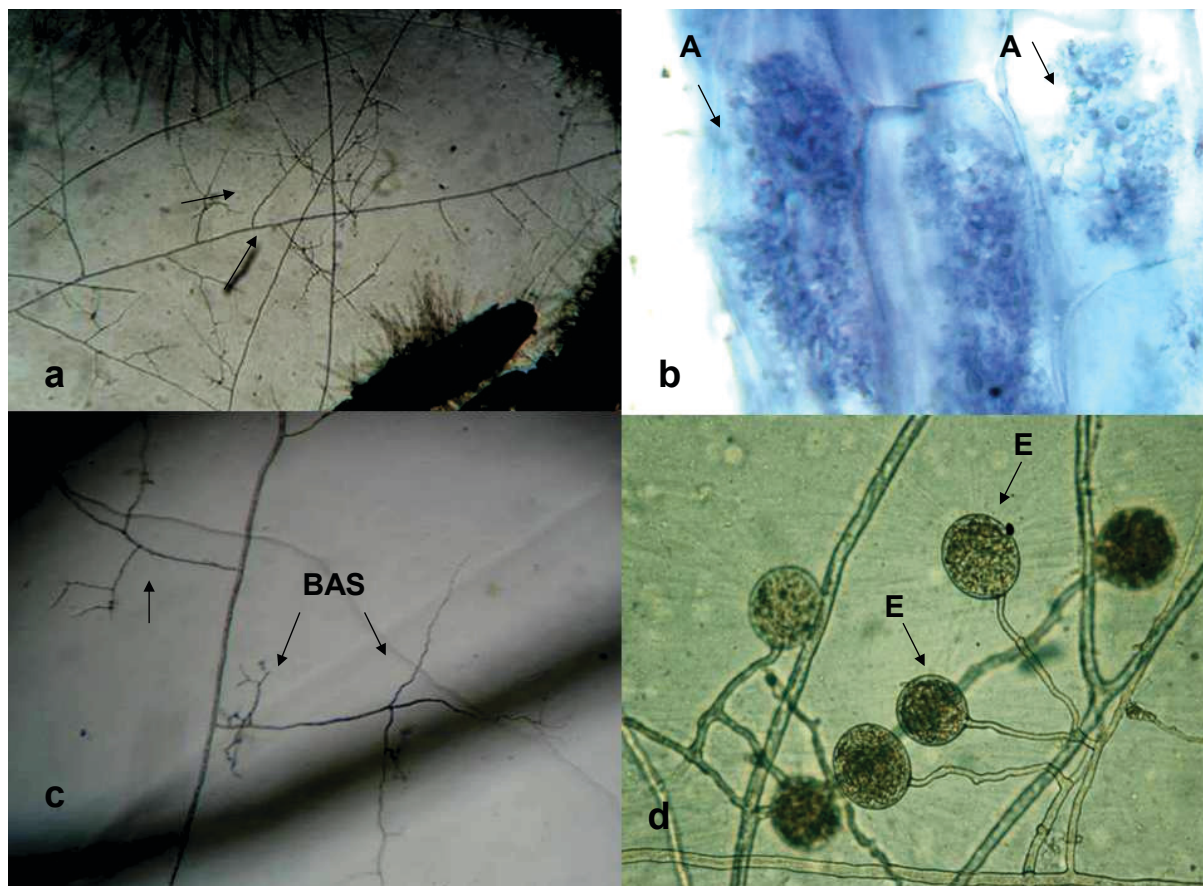


Figura 1. Desarrollo de estructuras típicas de la simbiosis entre *Glomus* sp (GEV02) y plántulas de mora bajo un sistema de cultivo autotrófico. **a.** Micelio extraradical **b.** formación de arbuscúlos; **c.** Formación de BAS; **d.** formación de nuevas esporas. **A:** Arbuscúlo, **E:** Espora.

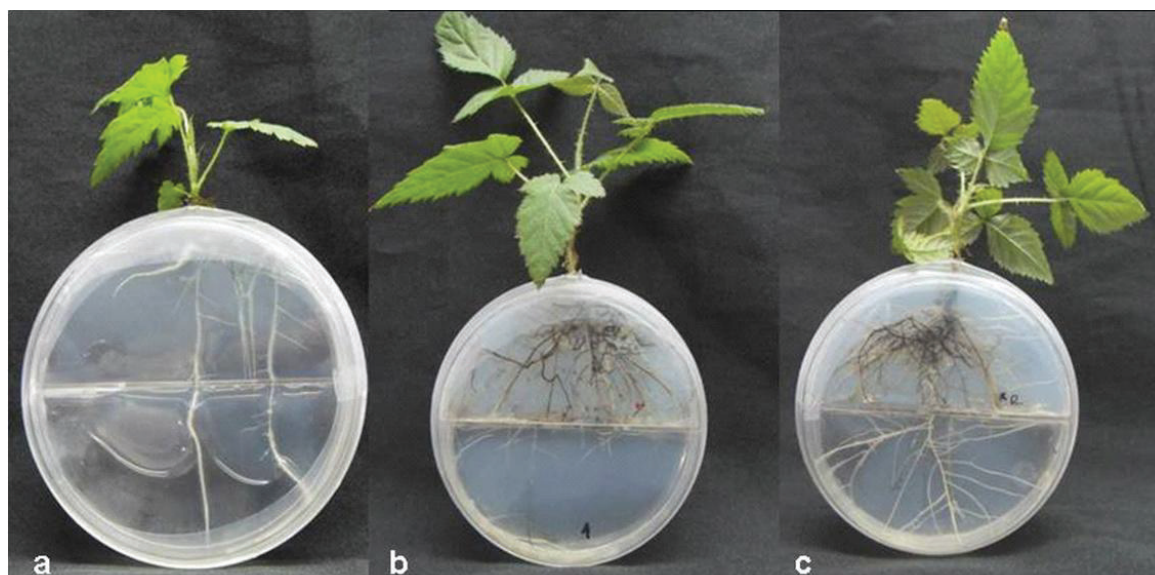


Figura 2. Imagen de plántulas de mora de castilla (*Rubus glaucus*, Benth) creciendo en un sistema de cultivo autotrófico con diferentes tratamientos durante nueve semanas. **a.** Control; **b.** Inoculado con esporas libres; **c.** Inoculado con fragmentos de raíces con vesículas. La imagen fue tomada al momento de la cosecha (novena semana).

Tabla 1. Indicadores de asociación simbiótica entre el HFMA *Glomus* sp. (GEV02) – mora de castilla (*Rubus glaucus*, Benth) al momento de la cosecha, 9 semanas después de la inoculación (%F: Frecuencia de micorrización; %I: Intensidad de micorrización; %a: Intensidad de arbúsculos).

Fuente de variación	%F	%I	%a	Longitud del micelio extraradical	Número de esporas formadas
Tratamientos					
Control	-	-	-	-	-
Esporas	100a	7,8a	1,93a	471,56a	1078,0a
Raíces con vesículas	100a	7,4a	2,2a	538,33a	1351,5a
Coeficiente de variación	0	21,32	12.1	15.36	13,30
GML	ns	ns	ns	ns	ns

ns: Diferencias no significativas ($P \leq 0,05$), de acuerdo con el ANAVA

Letras diferentes indican: Diferencias significativas ($P \leq 0,05$), de acuerdo con la prueba de Tukey.

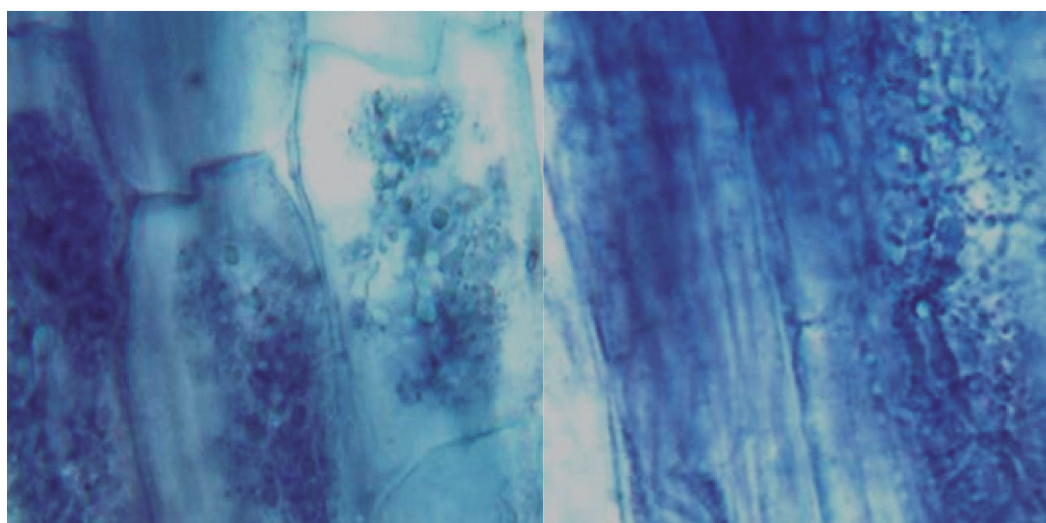


Figura 3. Formación de arbúsculos de *Glomus* sp (GEV02) en raíces de mora bajo condiciones *in vitro*.

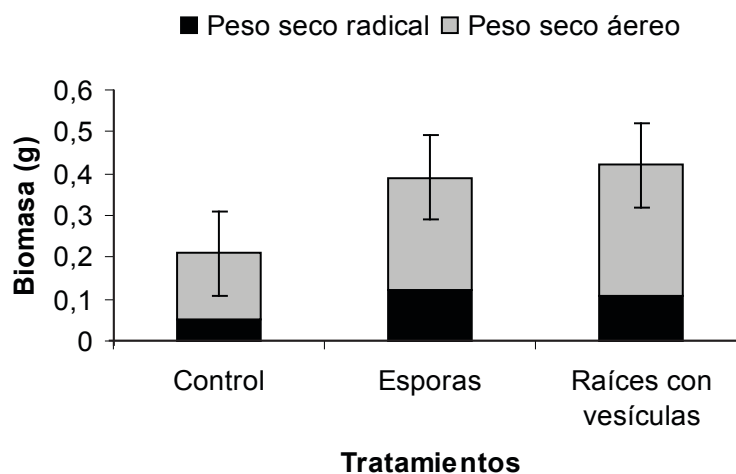


Figura 4. Biomasa en plantas de mora de castilla (*Rubus glaucus*, Benth) inoculadas con *Glomus* sp. (GEV02) al momento de la cosecha (novena semana).

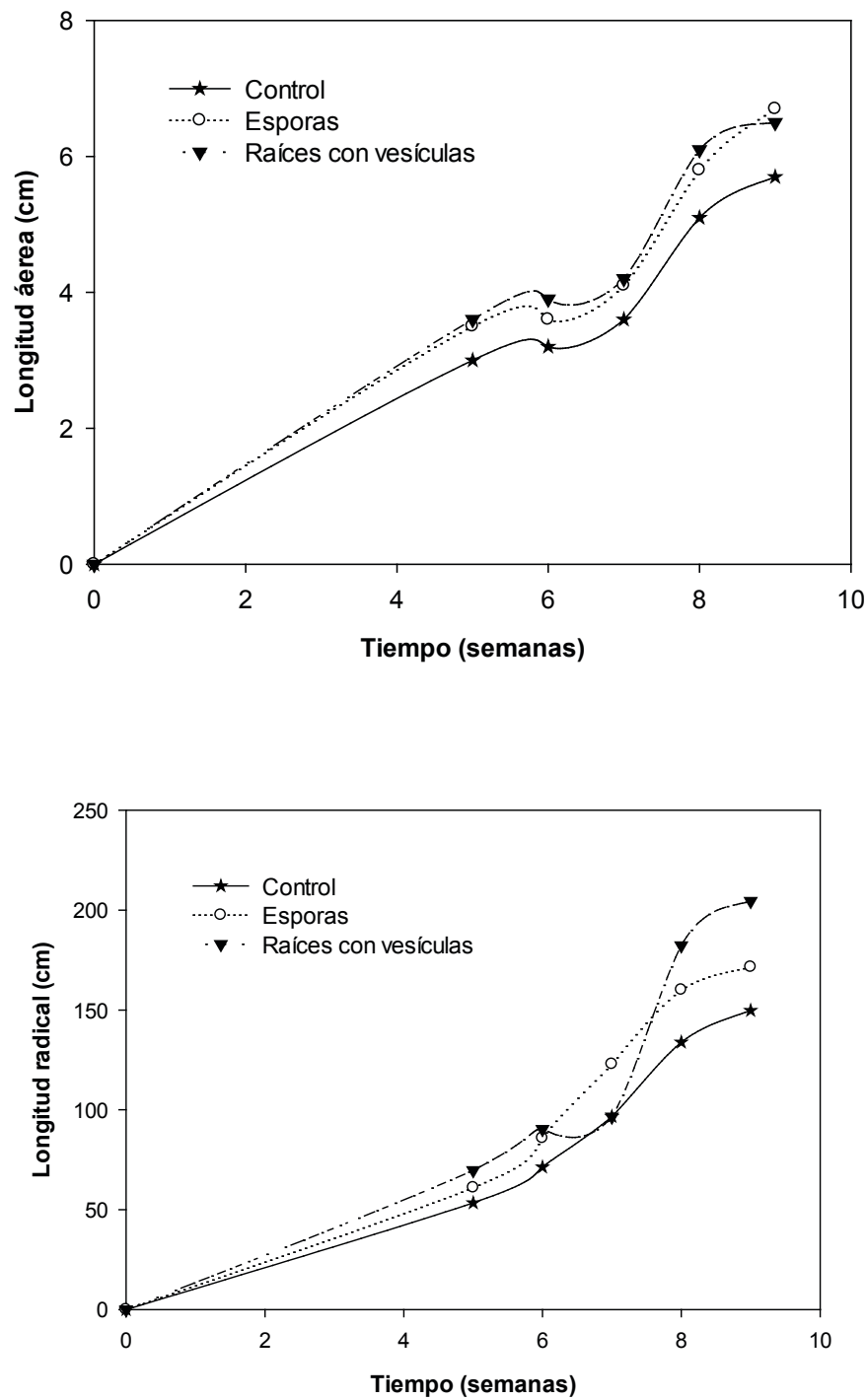


Figura 5. Crecimiento de la parte aérea y radical de las plantas de mora de castilla (*Rubus glaucus*, Benth) en sistema de cultivo autotrófico (N=5).

Discusión

En este estudio se demostró que el sistema de cultivo autotrófico era adecuado para la micorrización *in vitro* de plántulas de mora. La longitud del micelio extraradical y la producción de esporas después de 6 semanas fueron similares a las obtenidas en plantas de papa (13). Nueve semanas después el HFMA *Glomus* sp. (GEV02) había producido una gran cantidad de micelio extraradical y de esporas. En presencia de las raíces de mora *Glomus* sp. (GEV02) desarrolló un abundante micelio extraradical con valores promedio de 471.56 cm para el tratamiento inoculado con esporas libres y 538.33 cm para el tratamiento inoculado con fragmentos de raíces con vesículas (Tabla 1). En el sistema de cultivo con plantas autótroficas se pudo detallar la arquitectura del micelio extraradical, donde se observaron las hifas principales y secundarias con una gran ramificación, así como la formación de BAS (del inglés *Branched Absorbing Structures*, Estructuras Ramificadas de Absorción); estas últimas estructuras se han propuesto como sitios preferentes para la producción de esporas (23). Los resultados observados en la arquitectura del micelio fueron similares a los observados en los primeros estudios que se realizaron bajo condiciones *in vitro* en cultivo monoxénico con raíces de zanahoria transformadas (23, 32). Según el análisis de varianza (GLM) no se observaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) en el número de esporas

entre los dos métodos de inoculación (esporas libres y fragmentos de raíces micorrizadas) (Tabla 1), sin embargo, el tratamiento inoculado con fragmentos de raíces presentó un mayor número de esporas (1351, 5), en comparación con el tratamiento inoculado con esporas libres (1078,0) durante las semanas evaluadas hasta la cosecha (Figura 6). Las esporas se formaron en hifas terminales en forma individual o en agrupaciones, fueron de un color blanco-amarillo y contenían numerosas gotas de lípidos (Figura 7), su tamaño promedio varió de 60 a 90 μm

Estos estudios concuerdan con algunos realizados en cultivos monoxénicos donde utilizaron fragmentos de raíces de *Allium porrum* con vesículas o vesículas aisladas como inóculo (17, 25, 33, 34). Declerck *et al.*, 1996a, demostraron que los fragmentos de raíces micorrizadas presentaban un mayor potencial de inóculo que las esporas. Los fragmentos de raíz que contienen vesículas, producen múltiples hifas germinadas aumentando el número de puntos de penetración en la raíz. La esporulación en subcultivos es mayor con fragmentos de raíces micorrizadas que con esporas (17). Por el contrario, las esporas germinadas producen un número limitado de hifas infectivas y en consecuencia una tasa de colonización limitada (29).

A pesar que la composición mineral del medio MSR (Modificado Strullu – Romand) es más baja con respecto

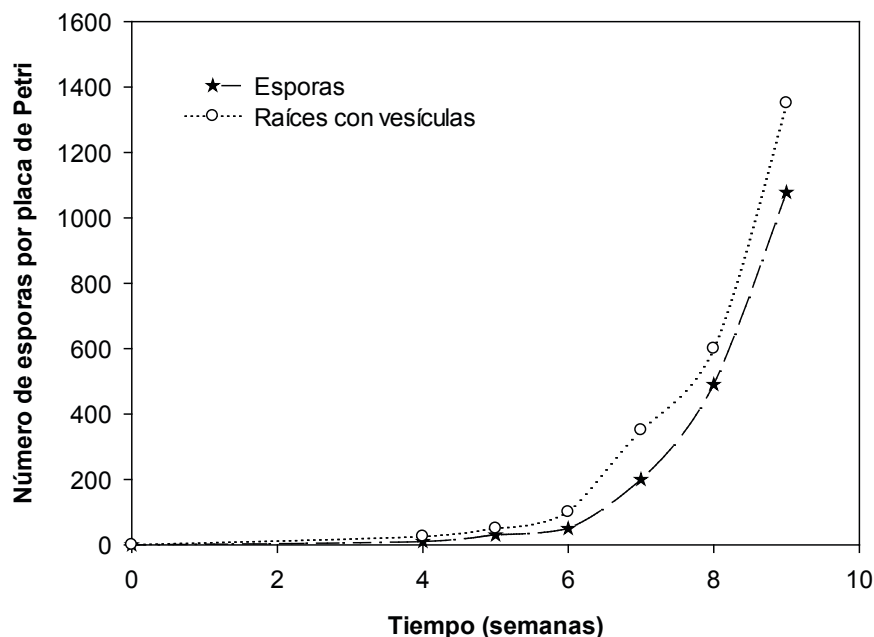


Figura 6. Dinámica de la producción de esporas de *Glomus* sp. (GEV02) asociadas a plantas autótroficas de mora de castilla (*Rubus glaucus*, Benth) en medio MSR libre de azúcar y vitaminas (N=5).

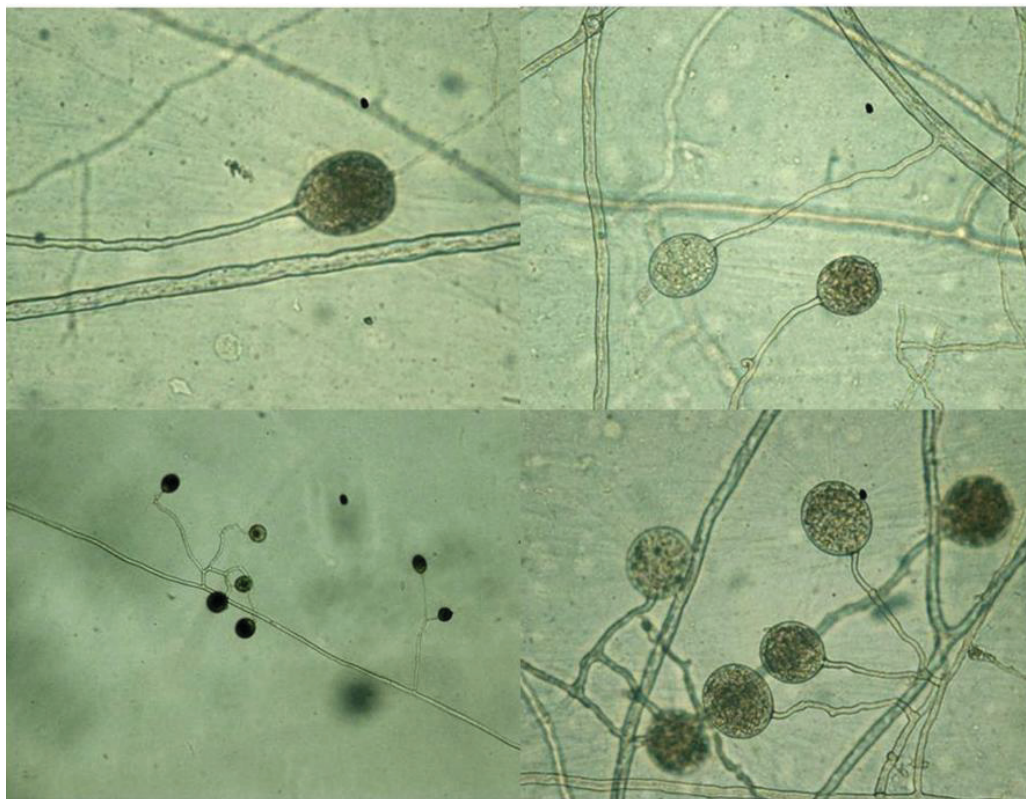


Figura 7. Formación de nuevas esporas de *Glomus* sp. (GEV02) individualmente o en agrupaciones bajo condiciones *in vitro*. Imagen tomada en microscopio óptico (40X). a y b. esporas formadas individualmente; c y d. esporas formadas en agrupaciones

al medio Lepoivre utilizado en la micropropagación de plántulas de mora de castilla (*Rubus glaucus*, Benth) (17, 14), este medio libre de vitaminas y sacarosa permitió tanto el crecimiento de plántulas de mora, como la multiplicación de *Glomus* sp (GEV02), debido a que la actividad fotosintética de las plantas le proporcionaron carbono al HFMA para completar su ciclo de vida. Estos resultados demuestran el efecto positivo que puede tener el sistema de micropropagación autotrófica con respecto al sistema de micropropagación convencional. Se ha reportado (35) que la micropropagación con plantas autótrofas tiene muchas ventajas sobre la micropropagación convencional con respecto en la mejora de la fisiología de la planta en los cuales incluyen: aumento en el crecimiento y la tasa fotosintética; altos porcentajes de supervivencia a condiciones *ex vitro*; eliminación de trastornos morfológicos y fisiológicos, sin la formación de callos en la base de los explantes (35). La micropropagación autótrofa se define estrictamente como la micropropagación sin sacarosa en el medio de cultivo, en los que el crecimiento o la acumulación de carbohidratos de los cultivos dependen por completo de la fotosíntesis y de la absorción de nutrientes inorgánicos (36–38).

El sistema de micorrización *in vitro* con plantas autótrofas pueden mejorar la condición física de las plantas *in vitro* y *ex vitro*, reflejado en un mayor crecimiento y desarrollo de estas, aumentando la capacidad fotosintética al expandir sus hojas, mientras que los HFMA mejoran el crecimiento y desarrollo de la planta al modificar la morfología de la raíz y el fortalecimiento en su función de absorción (39). Todos estos beneficios del sistema de cultivo autotrófico se vieron reflejados en este estudio, en donde los incrementos en biomasa de las plántulas de mora fueron mayores en los tratamientos inoculados con *Glomus* sp (GEV02) con respecto al tratamiento no inoculado al cabo de las nueve semanas del experimento; resultados similares obtuvo Nogales (2009), en sistemas de cultivo autotrófico en plantas de vid inoculados con *Glomus intraradices*, en donde al cabo de la sexta – séptima semana las plantas produjeron una gran biomasa aérea y radical, y las raíces ocuparon casi la totalidad de la caja de Petri no dejando casi espacio para seguir creciendo (27). Así mismo, en sistemas descritos por diversos autores (13, 26, 28), para cuando las plantas alcanzaron un nivel alto de colonización micorrícica, estaban prácticamente desarrolladas. En estudios realizados *in vivo*

con mora de castilla (*Rubus glaucus*, Benth) y *Glomus* sp (MA4) en la etapa de endurecimiento, se obtuvo una mayor acumulación de biomasa foliar y radical, área foliar y mejor estado nutricional (P, N, Ca y Mg) de las plantas micropropagadas (40). Este estudio abre las puertas para investigar varios aspectos de la simbiosis, en donde plantas activas fotosintéticamente son necesarias.

Conclusiones

En el presente estudio, las plántulas de mora micropropagadas se asociaron con éxito, por primera vez, con un Hongo Formador de Micorriza Arbuscular bajo condiciones *in vitro*. El sistema de cultivo autotrófico permitió el desarrollo del sistema simbiótico HFMA- *Glomus* sp. asociado a las raíces de plántulas de mora castilla micropropagadas en condiciones *in vitro*. Los resultados experimentales confirman la formación de estructuras típicas de la simbiosis, sin la necesidad de realizar muestreos destructivos. Además de la alta producción de propágulos (como esporas), donde a partir de 5 esporas inoculadas se obtuvieron más de 1000 esporas en la novena semana después del establecimiento en sistema de cultivo autotrófico con plantas de mora, lo que indica que esta técnica puede ser una herramienta útil para la multiplicación de HFMA bajo condiciones *in vitro*, con fines de investigación.

Financiación

Esta investigación fue realizada con el apoyo del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, en el marco del proyecto “Producción de ecotipos de mora (*Rubus* spp) evaluados y certificados para las principales zonas productoras de Colombia”. Código MADR: 2008L7642

Conflicto de intereses

Los autores expresan que no existen más que intereses científicos alrededor de los resultados de esta investigación.

Referencias

1. Asohofrucol. Fondo Nacional de fomento Hortofrutícola, Departamento Administrativo Nacional de Estadística, SISAC, Ministerio de Agricultura y desarrollo Rural. I Censo Nacional de 10 frutas agroindustriales y promisorias. Bogotá, D.C., Colombia. 2004, 63p.
2. AGRONET. Anuario Estadístico, Secretario de la cadena de la mora. <http://www.sioc.gov.co/AREAPRODUCCION/AreaProduccion46.pdf>. Consultado el 20 de Enero de 2012.
3. Angulo R. Frutales exóticos de clima frío moderado. Bayer Crop Science S.A. Bogotá, D.C., Colombia. 2003; 99-118.
4. Cetz J. Micropropagación de chile dulce (*Capsicum annuum* L. var. Najera.) y chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) con miras al mejoramiento genético del cultivo. **Trabajo de Grado de Maestría**. CATIE, Turrialba, Costa Rica, 2005, 86 p.
5. Vestberg M, Estaún V. Micropropagated plants, an opportunity to positively manage mycorrhizal activities. En: Vestberg M, Estaún V. (eds). Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems. Birkhäuser, Basel. 1994; 217-226.
6. Elmeskaoui A, Damont J, Poulin M, Piché Y, Desjardins Y. A tripartite culture system for endomycorrhizal inoculation of micropropagated strawberry plantlets *in vitro*. *Mycorrhiza* 1995; **5**, 313-319.
7. Alarcón A, Ferrera-Cerrato R. Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular. IRENAT-Colegio de Postgraduados. Montecillo. Mundi Prensa, México. 2000; 141-148.
8. Kapoor R, Sharma D, Bhatnagar A. Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications. *Scientia Horticulturae* 2008; **116**, 227-239.
9. Declerck S, Jean-Michel R, Bruno D. Greenhouse response of micropropagated bananas inoculated with *in vitro* monoxenically produced arbuscular mycorrhizal fungi. *Scientia Horticulturae* 2002; **93**, 301-309
10. Andrés A, Estrada-Luna, Fred T, Davies J. Arbuscular mycorrhizal fungi influence water relations, gas exchange, abscisic acid and growth of micropropagated chile ancho pepper (*Capsicum annuum*) plantlets during acclimatization and postacclimatization. *Journal of Plant Physiology* 2003; **160**, 1073-1083.
11. Duponnois R, Plenchette C. Helper bacterium enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of Australian Acacia species. *Mycorrhiza* 2003; **13**, 85-91.
12. José N, Mentreddy SR, Anand KY. Mycorrhizal fungi and growth and development of micropropagated *Scutellaria integrifolia* plants. *Industrial Crops and Products* 2007; **25**, 169-177.
13. Voets L, Dupré de Boulois H, Renard L, Strullu Désire-Georges, Declerck, S. Development of an autotrophic culture system for the *in vitro* mycorrhization of potato plantlets. *FEMS Microbiology Letters* 2005; **248**, 111-118.
14. Valderrama Ana Milena, Álvarez Roberto, Barrero Luz Stella, Robayo Mónica, Núñez Víctor. Validación y escalamiento de plántulas de mora *in vitro* y manejo *ex vitro* para entrega a agricultores de Silvana. En: Barrero

- Luz Stella. (eds). Caracterización, Evaluación y Producción de material limpio de mora con alto valor agregado. Corporación Colombiana de Investigación agropecuaria. Cundinamarca, Colombia. 2009; 84p.
15. Gendermann JW, Nicholson TH. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*. 1963; **46**, 235-244.
16. Pérez Moncada UA, Ramírez Gómez MM, Moreno Conn LM, Franco Correa M. Metodología para la desinfección y germinación de esporas y fragmentos de raíces micorrizadas con *Glomus* sp. (GEV02) para su uso bajo condiciones in vitro. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 2011; 12 (2): 143-150.
17. Declerck S, Strullu DG, Plenchette C. *In vitro* mass-production of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus versiforme*, associated with Ri T-DNA transformed carrot roots. *Mycological Research*. 1996a ; **100** (10): 1237–1242.
18. Newman EI. A method of stimating the total length of root in a sample. *Journal of Applied Ecology* 1963; **3**, 139.
19. Phillips JM, Hayman DS. Improved procedure of clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transaction of the British Mycological Society* 1970; **55**, 159-161.
20. Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V. Mesure du taux de mycorrhization VA d' un système racinaire. Recherche de méthodes d' estimation ayant une signification fonctionnelle. In : Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S. (eds). *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*. Paris, INRA Press. 1986; 217-221
21. Mycocal.exe. (<http://www.dijon.inra.fr/mychintec/Mycocalc-prg/download.html>). Consultado el 01 de Julio de 2011.
22. Bago B. Putative sites for nutrient uptake in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plan and Soil* 2000; **226**, 263-274.
23. Bago B, Azcón-Aguilar C, Piché Y. Architecture and development dynamics of the external mycelium at the arbuscular mycorrhizal *Glomus intraradices* grown under monoxenic conditions. *Mycologia* 1998a; **90**, 52-62.
24. Bécard G, Fortin J. Early events of arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed root. *New Phytologist* 1988; **108**, 211-218.
25. Declerck S, Strullu D, Plenchette C. Monoxenic culture of the intraradical forms of *Glomus* sp. Isolated from a tropical ecosystem: a proposed methodology for germonplasm collection. *Mycologia* 1998; **90**, 579-585.
26. Dupré de Boulois H, Voets L, Delvaux B, Jakobsen I, Declerck S. Transport of radiocaesium by arbuscular mycorrhizal fungi to *Medicago truncatula* under *in vitro* conditions. *Environmental Microbiology* 2006; **8**, 1926-1934.
27. Nogales García AM. Estudio de la interacción entre el Hongo Formador de Micorrizas Arbusculares *Glomus intraradices* Schenck y Smith y el hongo patógeno *Armillaria mellea* (Vahl:fr) P. Kuhn en Vid. **Tesis Doctoral**. Facultad de Biología. Universitat de Barcelona, España, 2009, 222p.
28. Koffi MCh, Enrique de la Providencia I, Elsen A, Declerck S. Development of an *in vitro* culture system adapted to banana mycorrhization. *African Journal of Biotechnology* 2009; **8** (12): 2750-2756.
29. Voets L, Enrique de la Providencia I, Fernández K, Ijdo M, Cranenbrouck S, Declerck S. Extraradical mycelium network of arbuscular mycorrhizal fungi allows fast colonization of seedlings under *in vitro* conditions. *Mycorrhiza* 2009; **19**, 347-356.
30. Gallaud I. Études sur les mycorrhizes endotrophes. *Revue Générale de Botanique* 1905 ; 17, 5–48, 66–83, 123–135, 223–239, 313–325, 425–433, 479–500.
31. Ludwig LM. Hormonal balance in plants during colonization of mycorrhizal fungi. In: Kapulnick Y and Douds DD (eds). *Arbuscular mycorrhizas: Physiology and Function*. Kluwer Academic Press. 2000; 263-286.
32. Bago B, Cano C, Azcón-Aguilar C, Samson J, Coughlan AP, Piché Y. Differential morphogenesis of the extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus grown monoxenically on spatially heterogeneous culture media. *Mycologia* 2004; **96**, 452-462.
33. Declerck S, Cranenbrouck S, Dalpé Y, Séguin S. *Glomus proliferum* sp. nov.: a description based on morphological, biochemical, molecular and monoxenic cultivation data. *Mycologia* 2000; **92** (6): 1178-1187.
34. Diop TA, Plenchette C, Strullu DG. Dual axenic culture of sheared-root inocula of vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi associated with tomato roots. *Mycorrhiza* 1994a; **5**, 17–22.
35. Kozai T, Kubota C. Concepts, definitions, ventilation methods, advantages and disadvantages. In: Kozai T, Afreen F, Zobayed SMA (eds). *Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system*. Springer, Dordrecht. 2005; 19–30.
36. Kozai T. Acclimatization of micropropagated plants. In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*.

- High-Tech and Micropropagation I. Springer-Verlag, Berlin, Germany. 1991; 127–141.
37. Zobayed SMA, Afreen F, Xiao, Kozai T. Recent Advancement in Research on Photoautotrophic Micropropagation Using Large Culture Vessels with Forced Ventilation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant*. 2004; **40** (5): 450-458.
38. Xiao Y, Niu G, Kozai T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 2010; **105** (2) 149-158.
39. Liu Wen-Ke, Yang Qi-Chang. Integration of mycorrhization and photoautotrophic micropropagation *in vitro*: feasibility analysis for mass production of mycorrhizal transplants and inoculants of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 2008; **95**, 131–139.
40. Roveda G, Cabra L, Ramírez M, Peñaranda A. Efecto de las micorrizas Arbusculares sobre la aclimatación y endurecimiento de microplántulas de mora (*Rubus glaucus*). *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 2007; **8**(1): 28-36.