

# Comunicación corta

## METODOLOGÍA PARA LA GERMINACIÓN DE ESPORAS DE *Glomus mosseae*

Kalyanne Fernández✉, F. Fernández, R. Rivera y V. Olalde

**ABSTRACT.** Germination is one of the most important processes during the life cycle of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and the successful symbiosis establishment depends greatly on it. The objective of the present work was to evaluate CO<sub>2</sub> effect on the rate and homogeneity of *Glomus mosseae* spore germination under *in vitro* conditions. An experiment was established under a Randomized Complete Design with bifactorial arrangement and three repetitions including the study of different spore disinfection methods and germination conditions, through the use of Cloramin T and antibiotics, and a CO<sub>2</sub> atmosphere (5 %) in the spore incubation chambers. Results showed the positive effect of disinfection treatments on spore germination and contamination percentages, the use of a CO<sub>2</sub> atmosphere during incubation being an important requirement to get a full germination without detecting contaminants in only three days of incubation. This study permitted to reckon with a new methodology to guarantee a quick and successful germination of *G. mosseae* spores in absence of contamination, enabling the introduction of fungal propagules as inoculum during plant micropropagation process.

**Key words:** disinfection, germination, contamination, fungi, arbuscular mycorrhizae

**RESUMEN.** La germinación es uno de los procesos más importantes durante el ciclo de vida de los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA), de la cual va a depender, en gran medida, el éxito del establecimiento de la simbiosis. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del CO<sub>2</sub> sobre la velocidad y homogeneidad de la germinación de esporas del HMA *Glomus mosseae* en condiciones *in vitro*. Con la finalidad de dar respuesta al objetivo propuesto, se realizó un experimento bajo un Diseño Completamente Aleatorizado con arreglo bifactorial y tres repeticiones, que incluyeron el estudio de diferentes métodos de desinfección de esporas y condiciones de germinación, a partir del uso de la Cloramina T y antibióticos como desinfectantes, así como del empleo de CO<sub>2</sub> (5 %) en la atmósfera de incubación de las esporas. Los resultados reflejaron el efecto positivo de los desinfectantes sobre los porcentajes de contaminación de las esporas y su germinación, constituyendo el empleo de la atmósfera de CO<sub>2</sub> durante la incubación, un requisito importante para lograr la total germinación sin detección de contaminantes, en solo tres días de incubación. Este estudio permitió contar con una nueva metodología, que garantizara la germinación rápida y exitosa de las esporas de *Glomus mosseae* en ausencia de contaminación, facilitando la posterior introducción de los propágulos fúngicos como inóculo durante el proceso de micropropagación de plantas.

**Palabras clave:** desinfección, germinación, contaminación, hongos, micorrizas arbusculares

## INTRODUCCIÓN

La germinación es uno de los procesos más importantes durante el ciclo de vida de los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA), de la cual va a depender, en gran medida, el éxito del establecimiento de la simbiosis (1).

Aunque la mayoría de las especies son capaces de germinar en ausencia de señales derivadas del hospedero (2), su crecimiento en condiciones axénicas constituye aún en

la actualidad un gran problema; primeramente, por la alta posibilidad de contaminación del inóculo micorrízico, en segundo lugar, por el comportamiento del hospedero *in vitro* y, finalmente, por la naturaleza obligada del endófito (1).

La desinfección superficial de los propágulos, en general usados como inoculantes, es un requisito de suma importancia para la exitosa formación de la micorriza en condiciones *in vitro* (3). La descontaminación se requiere tanto para evitar la proliferación de contaminantes, como para asegurar que los microorganismos asociados con las esporas de estos hongos no influyan en los resultados experimentales.

La mayoría de los investigadores prefieren soluciones de Cloramina T (2 %) con trazas de surfactante y antibióticos como la estreptomina y gentamicina, aun-

Ms.C. Kalyanne Fernández, Investigadora; Dr.C. F. Fernández, Investigador Auxiliar y Dr.C. R. Rivera, Investigador Titular del Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba, CP 32 700; Dr.C. V. Olalde, Profesor Investigador, Jefe del Departamento de Bioquímica Vegetal, CINVESTAV, Unidad Irapuato, México

✉ kalyannefs@yahoo.com

que también se han empleado el hipoclorito de sodio, formaldehído, etc. (1). El éxito en el uso de estas soluciones desinfectantes es altamente dependiente de cómo son manipuladas y sobre qué material.

Desde hace algunos años, numerosos autores comenzaron a hacer referencia al importante papel que puede jugar el CO<sub>2</sub> en la ocurrencia del proceso germinativo (4, 5, 6), resaltando principalmente cómo el CO<sub>2</sub> conjuntamente con los exudados radicales pueden estimular el crecimiento del tubo germinativo y cómo algunas especies en particular pueden fijar este compuesto como fuente mineral de carbono.

Sin embargo, aún no se incluye el CO<sub>2</sub> en las metodologías actuales de germinación de propágulos endomicorrízicos, a pesar de su posible papel como estimulador del proceso, por lo que los resultados que se obtienen son poco exitosos, pues en la totalidad de los casos se presenta una germinación poco homogénea, que depende principalmente del estado de dormancia que caracteriza a estos propágulos.

Considerando no solo la importancia sino también la utilidad práctica de este enfoque, se realizó este trabajo, con el objetivo de obtener una metodología rápida y eficaz que permitiera obtener altos porcentajes de germinación de esporas de *G. mosseae* con bajos niveles de contaminación microbiana.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La reproducción y obtención de las esporas para los experimentos se realizó a partir de la inoculación inicial de semillas de *Sorghum vulgare* con propágulos pertenecientes a la especie *Glomus mosseae* (Nicolson & Schenck), cultivados en envases de cultivo sobre un sustrato mineral estéril (7). A los 90 días de crecimiento del cultivo, se procedió a extraer el inoculante, consistente en una mezcla de sustrato, raíces, esporas y otros propágulos fúngicos, el cual fue almacenado durante 15 semanas a 4°C.

Las esporas utilizadas se aislaron del inoculante a través de la técnica de tamizado húmedo y decantado y posterior extracción por centrifugación en gradiente de sacarosa + Tween 80 a 2 000 rpm durante cinco minutos (8, 9). Una vez obtenida la interfase agua - sacarosa + Tween 80, las esporas se extrajeron empleando una pipeta Pasteur.

Este proceso se realizó 24 h antes de comenzar los estudios y tantas veces como fuera necesario. Las esporas fueron mantenidas en solución Ringer a 4°C.

Primeramente, se compararon dos metodologías de desinfección descritas en la literatura, que incluyeron el uso de la Cloramina T (2 %) como desinfectante químico combinado con Cefalexina (5 %) y diferentes tiempos de exposición. Uno de los métodos consistía (10) en que luego de obtenidas las esporas asépticas, si incubaban para germinar en medio White modificado, mientras que

en el otro método (11), las esporas se colocaban en medio Agar Agua.

Los materiales empleados fueron modificados durante el proceso, de acuerdo con las posibilidades de trabajo, de la siguiente manera: la desinfección de las esporas se realizó en tubos Eppendorf sin centrifugación a bajos tiempos (dos y seis minutos), la manipulación de las esporas y del material desinfectante (Cloramina T y Cefalexina - IMEFA-) se realizó a través de filtros (malla de acero, 40 µm) esterilizables, acoplados a las tapas horadadas de los tubos Eppendorf, en sustitución de filtros miliporo y membranas de 0.22 µm, empleando jeringas esterilizables de 15 mL.

Las esporas extraídas se colocaron en tubos Eppendorf y se lavaron durante cinco minutos en solución Ringer estéril, agitándose en vórtex para remover las impurezas.

Posteriormente, se procedió a realizar la desinfección comenzando con la solución de Cloramina T (2 %) y empleando tiempos de exposición de dos y seis minutos, de acuerdo con el tratamiento en cuestión.

Ambas soluciones (desinfectante y antibiótica) fueron preparadas a partir de la dilución del producto en agua destilada estéril.

Una vez finalizado este paso, las esporas se lavaron con agua destilada estéril dos veces consecutivas y se les añadió la solución de Cefalexina.

Las esporas tratadas se pasaron a placas Petri que contenían los medios de cultivo estudiados, empleando micropipeta Gibson de 200 µL y se incubaron durante 25 días a 28°C colocando las placas invertidas. Se inocularon 10 placas por tratamiento a razón de 50 esporas por placa.

Para el montaje de este experimento se empleó un Diseño Completamente Aleatorizado con arreglo bifactorial (2x4), en el cual los factores fueron: soluciones desinfectantes y medios de cultivo para incubación.

Los tratamientos fueron los siguientes:

- ✦ Agar Agua-(1) Cloramina T (2%) + Cefalexina (2 min.), (2) Cloramina T (2%) + Cefalexina (6 min.), (3) Cefalexina (6 min.), (4) Control (Agar Agua + esporas sin desinfectar)
- ✦ White modificado-(5) Cloramina T (2%) + Cefalexina (2 min.), (6) Cloramina T (2%) + Cefalexina (6 min.), (7) Cefalexina (6 min.) y (8) Control (White modificado + esporas sin desinfectar).

Después de evaluada la efectividad de la mezcla de Cloramina T y antibiótico como solución desinfectante, se procedió a incorporar dos aspectos importantes en el protocolo de trabajo, con vistas a acelerar la ocurrencia del proceso germinativo y a disminuir la presencia de contaminación microbiana.

Primeramente, se sustituyeron los medios sólidos de incubación (Agar Agua y White modificado) por un soporte líquido (solución Ringer), para facilitar la posterior inoculación de las esporas sobre las vitroplantas y se empleó, además, una atmósfera de CO<sub>2</sub> durante la incubación de las esporas, con el propósito de incrementar la homogeneidad y rapidez de la germinación.

En esta fase del estudio se mantuvo la desinfección química con Cloramina T (2 %), utilizando como solución antibiótica una mezcla de Sulfato de Estreptomicina y Kanamicina en sustitución de la Cefalexina.

En este caso, los antibióticos se filtraron a través de membranas miliporo (tipo HA, 4.0 cm de diámetro y 0.22 µm de poro). El proceso de desinfección se realizó en un *beaker* plástico de 250 mL a través de un tamiz de 40 µm de diámetro de poro colocado dentro de él.

Luego de realizada la desinfección de las esporas, se procedió a comprobar la eficacia del método inoculando 20 esporas por placa (cinco en total) sobre un medio rico, Agar Nutriente y se incubaron posteriormente a 28°C durante cinco días.

Los frascos con esporas se colocaron dentro de una cámara o jarra de CO<sub>2</sub> (BBL®, Gas Pack®), para garantizar la presencia del gas en la atmósfera de incubación (Figura 1).



**Figura 1. Cámara de CO<sub>2</sub> o Gas Pack® en la que se colocaron las esporas para acelerar su germinación**

Esta cámara incluye un sobre o envoltura que contiene una tableta, en la cual se combinan bicarbonato de sodio y ácido cítrico, los cuales al reaccionar con agua son capaces de generar CO<sub>2</sub> y producir una atmósfera de aproximadamente 5 % del gas en cuestión.

Las esporas, en estas condiciones, se incubaron durante tres días a 28 °C de temperatura.

**Determinaciones realizadas.** Se realizaron las determinaciones correspondientes al porcentaje de germinación y contaminación. Se consideró una espora germinada cuando esta presentaba crecimiento del tubo germinativo y, en el caso de la contaminación, se consideró el número de esporas contaminadas en una placa con respecto al número total de esporas que se sembraron en cada una.

**Análisis estadístico.** Para el procesamiento de los resultados de los experimentos de desinfección de esporas e inoculación *in vitro*, se realizó Análisis de Varianza y se empleó la prueba de Rangos Múltiples de Duncan, cuando existían diferencias significativas entre las medias, auxiliados del programa estadístico "Statgraphs 4.1".

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla I se muestra el efecto de los diferentes tratamientos de desinfección empleados en dos medios de cultivo (Agar Agua y White modificado) sobre las variables germinación (%) y contaminación (%), así como sus porcentajes de incremento y decremento, respectivamente.

De forma general, en las variables analizadas se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, denotándose un comportamiento diferenciado entre los medios de cultivo empleados, siendo en el medio Agar Agua donde se observaron los mayores valores de ellas.

El análisis de los porcentajes de germinación, en los tratamientos en los que se utilizó Cloramina T y antibiótico (Cefalexina) como agentes desinfectantes, independientemente de los tiempos empleados y de los medios en los que se incubaron las esporas, siempre indicó el mejor comportamiento de esta variable en relación con los controles sin desinfectar.

En cuanto a los tratamientos que solo contaron con la aplicación del antibiótico, aunque su comportamiento fue superior a los controles, no superaron el mejor tratamiento de desinfección en cualquiera de los dos medios estudiados.

**Tabla I. Efecto de los diferentes tratamientos de desinfección sobre los porcentajes de germinación (G) y contaminación (C), así como su incremento y decremento, respectivamente, a los 25 días de incubadas las esporas**

Tratamientos		G	Incremento	C	Decremento
Desinfección	Medios de incubación	(%)	(%)	(%)	(%)
Cl T (2%) + Cefalexina (2min.)	Agar Agua	44.0 a	1275	3.3 f	92.28
Cl T (2%) + Cefalexina (6min.)		46.4 a	1350	3.2 f	92.52
Cefalexina (6min.)		33.6 b	950	48.2 b	-12.61
Sin desinfectar		3.2 e	-	42.8 c	-
Cl T (2%) + Cefalexina (2min.)	White modificado	31.1 b	185	22.0 e	76.34
Cl T (2%) + Cefalexina (6min.)		25.8 c	136	4.8 f	94.83
Cefalexina (6min.)		31.1 b	185	33.2 d	64.3
Sin desinfectar		10.9 d	-	93.0 a	-
Es x		0.94***	-	0.97***	
CV (%)		10.61	-	9.82	

Cl T: Cloramina T

Medias con letras desiguales difieren entre sí significativamente para  $p \leq 0.05$ , según prueba de Rangos Múltiples de Duncan

Otro de los aspectos analizados fue el efecto producido por el uso de las soluciones desinfectantes sobre el porcentaje de contaminación de las esporas (Tabla I).

El comportamiento de esta variable denotó que de forma similar al porcentaje de germinación, existió una respuesta diferenciada de cada grupo de tratamientos en presencia de un determinado medio. En este caso, las variantes que estuvieron bajo la influencia de los agentes desinfectantes, mostraron los menores valores de contaminación.

En el caso del medio Agar Agua, no solo se observaron los menores valores de contaminación en los tratamientos desinfectados, sino también en el tratamiento control donde estos disminuyeron a la mitad (42.8 %) en relación con su homólogo en medio White (93.0 %). Además, no se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de contaminación (3.2 y 3.3 %) durante los distintos tiempos de exposición empleados (dos y seis minutos).

Sin embargo, en el medio White modificado solo se lograron alcanzar niveles de contaminación significativamente similares a los anteriores en el tratamiento bajo desinfección, con ambas soluciones, durante seis minutos.

La desinfección de esporas de hongos micorrízicos empleadas como inóculo es crucial para la formación y el desarrollo exitoso de la micorrización en condiciones *in vitro*, por ser la presencia de contaminantes uno de los mayores problemas que atenta contra el estudio de estos microorganismos en condiciones controladas; además, las metodologías de desinfección deben ser establecidas para cada especie de hongo en particular, pues el efecto de los desinfectantes o las combinaciones de estos varían en función de la especie utilizada (11).

En el experimento se empleó, primeramente, una dosis de Cefalexina de 200 mg.mL<sup>-1</sup>, la cual constituye una concentración suficiente para ejercer un adecuado control microbiano. Por otra parte, la Cefalexina está considerada un antibiótico de amplio espectro, presentándose su mayor efecto sobre grupos bacterianos Gram- y algunas enterobacterias Gram +, además de actuar sobre algunos hongos de la clase Deuteromycetes (12).

La efectiva acción de la Cloramina T como fuerte agente oxidante, se puso de manifiesto en los tratamientos en los que se utilizó y estuvo dada por su mayor estabilidad con respecto a otros desinfectantes como el hipoclorito de sodio, el cual libera el cloro instantáneamente. En el caso particular de la Cloramina T, se liberan lenta y gradualmente las moléculas contenidas del halógeno, evitando que actúen negativamente sobre el proceso germinativo (13).

Similares resultados fueron descritos (13) en esporas de *Gigaspora margarita* (Becker & Hall) y *Scutellospora heterogama* (Nicolson & Gerdemann - Walker & Sander) inoculadas en medio Agar Agua, con valores cercanos a 60 % de germinación en presencia de Cloramina T (2 %) y tiempos de exposición a la solución desinfectante + antibiótico entre tres y seis minutos.

En cuanto a los medios de cultivo empleados en el estudio para la incubación de las esporas y su germinación, se presenta el Agar Agua como el de mayores porcentajes de germinación con respecto al White modificado, en el que los valores oscilan entre 25.8 y 31.1 %, lo cual no debe sorprender si se tiene en cuenta la composición química de ambos medios.

El medio White es sumamente rico desde el punto de vista nutricional, lo cual origina que proliferen contaminantes indeseables presentes en las paredes de las esporas, que no se expresan en un medio tan pobre como el Agar Agua (11).

En este sentido, es bueno destacar el determinado control que pueden ejercer los medios pobres como el Agar Agua, en el cual no solo se lograron los niveles de contaminación más bajos en general, sino que inclusive en el tratamiento control, estos niveles disminuyeron a la mitad (42.8 %) en relación con su homólogo en medio White.

En otros estudios de desinfección realizados (11) a esporas de *Glomus mosseae*, se encontró que los contaminantes que crecieron alrededor de las esporas obstaculizaron la emergencia y el crecimiento del tubo germinativo, por lo que su germinación se vio limitada.

Algunos autores se han referido al papel destructor de los microorganismos cuando ocurre una exacerbación de sus poblaciones en la superficie de los propágulos de los hongos micorrizógenos arbusculares (1); inclusive algunas especies fúngicas y bacterianas, identificadas como hiperparásitos, pueden enquistarse, germinar y penetrar las paredes de las esporas hospedadoras, desarrollarse dentro de estas, evitar que germinen y provocar su destrucción, así como obstruir la emergencia y el crecimiento del tubo germinativo (11). No obstante, se debe resaltar que existen determinados grupos de microorganismos no considerados contaminantes, que habitan las paredes de las esporas y que pudieran ejercer un papel sumamente benéfico sobre la germinación y el crecimiento del tubo germinativo (14).

Sin embargo, aunque con el empleo de los mejores tratamientos de desinfección se logra realizar un buen control de la contaminación, es necesario aclarar que la metodología utilizada solo garantizó la obtención de valores medios de germinación en las esporas tratadas, aún a los 25 días de incubación.

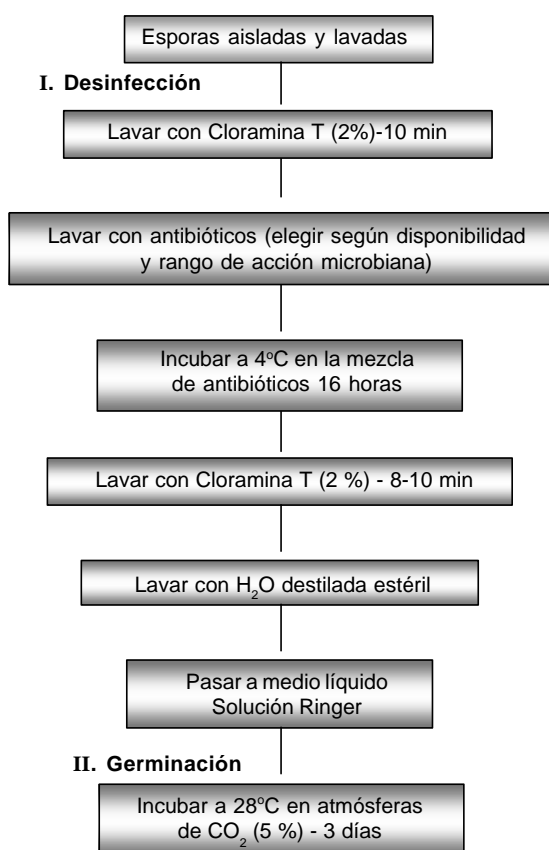
Partiendo de estos resultados, se realizaron algunas modificaciones a la metodología de desinfección, con la cual se obtuvieron las mejores respuestas, con el principal interés de garantizar no solo la homogeneidad en la germinación de las esporas, sino también de acelerar la ocurrencia del proceso.

Este nuevo procedimiento garantizó la ausencia de contaminación en las esporas, lo cual pudo ser comprobado al inocularlas sobre un medio rico (Agar Nutriente) posteriormente a la desinfección y no ocurrir crecimiento microbiano alguno a los cinco días de incubación.

En adición, el empleo de la cámara de CO<sub>2</sub> o Gas Pack<sup>®</sup>, en la cual se incubaron las esporas para su

germinación en medio líquido, garantizó no solo la homogenización del proceso germinativo, permitiendo disponer del 100 % de las esporas germinadas para ser empleadas en estudios posteriores de inoculación de plántulas en condiciones *in vitro*, sino que también posibilitó la obtención de dichas esporas a solo tres días de su incubación.

Teniendo en cuenta los resultados analizados, se propone una metodología capaz de garantizar no solo la desinfección, sino también la rápida y homogénea germinación de las esporas de *Glomus mosseae* en medio líquido (Figura 2).



**Figura 2. Diagrama de metodología propuesta de desinfección y germinación de esporas de *Glomus mosseae***

Los antibióticos Kanamicina y Sulfato de Estreptomycin tienen similar espectro de acción que la Cefalexina, fundamentalmente sobre bacterias Gram + y Gram - (15), estas últimas muy abundantes en las paredes de las esporas de los HMA; de ahí que el empleo de uno u otro antibiótico no altera en ninguna medida la información obtenida. Por otra parte, estos antibióticos son presentados por numerosos autores al desinfectar esporas para su inoculación en cultivos tripartitas, conjuntamente con la Cloramina T como agente oxidante y Tween 20 como surfactante (5, 15).

Al incubar las esporas en la cámara de Gas Pack en presencia de CO<sub>2</sub>, se logró una aceleración considerable

de la germinación, debido a su acción directa como estimulador del proceso germinativo y del crecimiento del tubo germinal, llegando a ser total a las 72 horas de incubación.

Aunque generalmente los hongos micorrizógenos no necesitan condiciones específicas o la presencia de raíces hospederas para germinar, desde hace algunos años diversos autores comenzaron a hacer referencia al importante papel que puede jugar el CO<sub>2</sub> en la ocurrencia de este proceso (6), resaltando principalmente cómo el CO<sub>2</sub> conjuntamente con los exudados radicales pueden estimular la germinación y/o el crecimiento del tubo germinativo y cómo algunas especies en particular pueden fijar CO<sub>2</sub> como fuente mineral de carbono.

Recientemente, el empleo de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> marcado en experimentos realizados *in vitro* utilizando análisis espectroscópico de resonancia magnética nuclear (NMR), ha confirmado que existe fijación de CO<sub>2</sub> en la oscuridad durante la germinación de esporas de *Glomus intraradices* (16).

Desde el punto de vista metabólico, el CO<sub>2</sub> tiene una gran importancia para la germinación de estos hongos, debido a que en este estadio su metabolismo es predominantemente dependiente del catabolismo lipídico (15) para realizar la biosíntesis de otros compuestos. El catabolismo de los lípidos conduce a la formación de acetilCoA, dos moléculas de carbono, las cuales son posteriormente oxidadas en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (CAT), lo que hace que el balance neto de carbono sea teóricamente cero.

No obstante, en los hongos micorrizógenos ocurre además el ciclo del glioxalato (CG) (16, 17) y este, a diferencia del CAT, evita la pérdida de las dos moléculas de CO<sub>2</sub>, de lo que puede deducirse que para el CG, el CO<sub>2</sub> puede representar una entrada adicional de carbono y activar significativamente el crecimiento del hongo (18).

Teniendo en cuenta lo anteriormente explicado, el CO<sub>2</sub> puede ser considerado como el primer compuesto estimulador no específico emitido por las raíces hospederas. Recientemente, otros investigadores (15) han recomendado el uso de ambientes enriquecidos con CO<sub>2</sub> (2-5 %) en estudios sobre compuestos radicales estimuladores más específicos, en los cuales la respuesta del hongo se incrementa y las variaciones se minimizan notablemente.

El desarrollo de este estudio permitió no solo poder contar con una nueva metodología que garantizara la germinación exitosa de las esporas de *Glomus mosseae* en ausencia de contaminación, sino también que estas estuvieran listas y en un medio fácilmente manipulable (líquido) para ser inoculadas en plantas *in vitro*, al cabo de solo tres días de incubación.

## CONSIDERACIONES GENERALES

Desde finales del siglo XX, el hombre ha sido capaz de desarrollar modernas biotecnologías concernientes a la micropropagación y micorrización con un probado impacto. Estas tecnologías unidas a la bacterización son

importantísimas herramientas para la biotización de plántulas micropropagadas y la reducción del estrés provocado por el transplante durante la aclimatización.

## REFERENCIAS

- Rai, M. K. Current advances in mycorrhization in micropropagation. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 2001, vol. 37, p. 158-167.
- Giovannetti, M. Spore germination and pre-symbiotic micelial growth. En: *Arbuscular mycorrhizas: Physiology and Function*. Ed. Kapulnik, Y. and Douds, D., 2000, p. 47-68.
- Breuninger, M. y Requena, N. Recognition events in AM symbiosis: analysis of fungal gene expression at the early appressorium stage. *Fungal Genetics and Biology*, 2004, vol. 41, no. 8, p. 794-804.
- Chabot, S.; Bel Rhild, R.; Chenevert, R. *et al.*. Hyphal growth promotion *in vitro* of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker and Hall, by activity of structurally specific flavonoid compounds under CO<sub>2</sub>-enriched conditions. *New Phytol.*, 1992, vol. 122, p. 461-467.
- Elmeskaoui, A; Damont, J-J. P.; Piché, Y. *et al.*. A culture system for endomycorrhizal inoculation of micropropagated strawberry plantlets *in vitro*. *Mycorrhiza*, 1995, vol. 5, p. 313-319.
- Buée, M.; Rossignol, M.; Jauneau, A. *et al.* The presymbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by branching factor partially purified from plant root exudates. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2000, vol. 13, p. 693-698.
- Fernández, F.; Noval, B. M. de la; Rivera, R. *et al.*. Producto inoculante micorrizógeno. Patente # 22 641. 2000.
- Gerdemann, J. W. y Nicholson, T. H. Spore of mycorrhizae endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans Br. Mycol. Soc.*, 1963, vol. 46, p. 235-244.
- Herrera, R. A.; Ferrer, R. L. y Furrázola, E. *et al.*. Estrategia de funcionamiento de las micorrizas VA en un bosque tropical. Biodiversidad en Iberoamérica: Ecosistemas, evolución y procesos sociales. En: Programa iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo. Subprograma XII, Diversidad Biológica, Mérida, 1995.
- Barredo, F. Estudio de la asociación micorrízica de dos cactáceas silvestres del estado de Yucatán. [Tesis de grado]; Universidad Autónoma de Yucatán, 1995.
- Walley, F. L y Germida, J. J. Failure to decontaminate *Glomus clarum* NT4 spores is due to wall associated bacteria. *Mycorrhiza*, 1996, vol. 6, p. 43-49.
- Loyola-Vargas, V. M. y Miranda, M. L. Root culture as a source of secondary metabolites of economic importance. En: *Phytochemistry of medicinal plants*. New York : Plenum Press. 1995, p. 217-248.
- Colozzi-Filho, A. *et al.*. Fectacao superficial do esporos de fungos micorrízicos vesículo arbusculares. I Efeitos da concentracao e tempo de exposicao de agentes desinfestantes e antibioticos. *Pesq. Agrop. Bras., Brasilia*, 1994, vol. 29, no. 7, p. 1119-1127.
- Bianciotto, V.; Genre, A.; Jargeat, P. *et al.*. Vertical transmission of endobacteria in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* through generation of vegetative spores. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, vol. 70, no. 6, p. 3600-3608.
- Fortin, J. A.; Bécard, G.; Declerck, S. *et al.*. Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. *Can. J. Bot.*, 2002, vol. 80, p. 1-20.
- Bago, B.; Pfeffer, P. E.; Douds, D. *et al.*. Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiol.*, 1999, vol. 121, p. 263-271.
- Bago, B.; Pfeffer, P. E.; Abubaker, J. *et al.*. Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. *Plant Physiology*, 2003, vol. 131, no. 3, p. 1496-1507.

Recibido: 29 de marzo de 2004

Aceptado: 7 de marzo de 2005