

MICORRIZACIÓN *In Vitro* DE PLÁNTULAS DE *Coffea canephora* VAR. ROBUSTA: ¿UNA REALIDAD?

Kalyanne Fernández[✉], F. Fernández, María E. González, E. Pérez, Lorelí Mirabal y Mabel Pazos

ABSTRACT. A survey of current literature reveals that inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in the roots of micropropagated plantlets plays a beneficial role. The objective of this investigation was to evaluate inoculation effects of AMF *Glomus clarum* upon *in vitro* development of coffee plantlets (*Coffea canephora* var. Robusta). Two types of propagules (spores and external mycelium) and a noninoculated control treatment were studied under a Randomized Complete design, evaluating stalk height, leaf and root fresh weight, leaf pair number, root number, microbial contamination percentage, embryo counting and classification, presence of fungal structures and enzymatic activities of Peroxidase and Polyphenoloxidase. After 30 days of root inoculation, plantlets showed higher altitude and more leaf pair number and root number than noninoculated plants. Besides, a new embryogenic callus production, was found in these plants. Finally, significant differences were observed in the enzymatic activities of inoculated plantlets, demonstrating host presence inside roots.

RESUMEN. Una incursión en la literatura más reciente revela que la inoculación de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) en las raíces de plántulas micropropagadas juega un papel beneficioso. Por lo que este estudio se realizó con el objetivo de evaluar los efectos provocados por la inoculación del HMA *Glomus clarum* sobre el desarrollo *in vitro* de *Coffea canephora* var. Robusta. Se estudiaron dos tipos de propágulos (esporas y micelio externo) y un tratamiento control sin inocular bajo un diseño Completamente Aleatorizado, evaluándose: altura, peso fresco foliar y radical, número de pares de hojas, número de raíces, porcentaje de contaminación microbiana, conteo y clasificación de embriones, presencia de estructuras fúngicas y actividades enzimáticas de Peroxidasa y Polifenoloxidasa. Se encontraron efectos positivos con la inoculación de este hongo, alcanzándose una colonización micorrízica temprana. Siempre que se inoculó se obtuvieron incrementos, tanto en el sistema radical como en la altura y en el número de pares de hojas de las vitroplantas. Además, se encontró en estas plantas una nueva producción de callos embriogénicos, efecto no informado anteriormente en la micorrización de plántulas micropropagadas. Finalmente, se observaron diferencias significativas en las actividades enzimáticas de las plantas inoculadas, corroborándose la presencia del simbionte en el interior radical.

Key words: robusta coffee, *Coffea canephora*, *Glomus clarum*, *in vitro* culture, inoculation

Palabras clave: café robusta, *Coffea canephora*, *Glomus clarum*, cultivo *in vitro*, inoculación

INTRODUCCIÓN

Los métodos actuales de micropropagación constituyen una importante herramienta biotecnológica para la obtención acelerada de numerosas especies de plantas (1), puesto que permiten regionalizar en corto tiempo genotipos promisorios y, por lo tanto, mantener colecciones específicas de variedades deseadas, así como manejar especies de alta variabilidad genética, acortando los ciclos de selección a través de la multiplicación de semillas híbridas.

Las técnicas de cultivo de tejidos incluyen condiciones ambientales artificiales, como baja intensidad luminosa, alta humedad relativa y acumulación de etileno en

la atmósfera de los frascos de cultivo, entre otras, las cuales contribuyen a que las plantas derivadas sean más susceptibles durante el transplante (2).

Numerosos autores aseguran que estas condiciones de cultivo no permiten un adecuado intercambio de gases, lo cual produce alteraciones en el desarrollo de los explantes, así como también modulación o represión de algunas vías metabólicas (3, 4, 5). Además, la capacidad fotosintética se ve reducida, se observa un mal funcionamiento estomático, el sistema radical es deficitario de pelos radicales y las cutículas muestran muy pobre desarrollo con reducidos contenidos de ácidos grasos (6, 7).

En la actualidad, algunos investigadores (8, 9) informan índices de supervivencia en la fase adaptativa mayores del 90 %, en plántulas de cafeto obtenidas por embriogénesis somática; sin embargo, varios son los que se pronuncian a favor de realizar determinadas modificaciones durante el proceso, con el fin de garantizar altos índices de supervivencia y un mejor estado fisiológico de las plántulas (6, 10, 11).

Kalyanne Fernández y E. Pérez, Investigadores; Dr.C. F. Fernández, Investigador Auxiliar; Ms.C. María E. González y Ms.C. Mabel Pazos, Investigadores Agregados y Lorelí Mirabal, Reserva Científica del Departamento de Biofertilizantes de Nutrición de las Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

✉ kalyanne@inca.edu.cu

Una incursión en la literatura más reciente revela que la inoculación de HMA en las raíces de plántulas micropropagadas juega un papel beneficioso (6, 12, 13). Durante la etapa adaptativa se ha procedido a inocular las plantas con biopreparados de determinados grupos microbianos (hongos micorrizógenos y bacterias rizosféricas) con resultados muy alentadores.

No obstante, los efectos positivos encontrados en las plantas inoculadas generalmente no se observan hasta después de concluido el proceso adaptativo (3), por lo cual estos mismos autores proponen realizar la inoculación de hongos micorrizógenos durante los períodos de enraizamiento de las vitroplantas.

Son bien conocidas las bondades atribuidas a estos hongos, no solo por su incidencia directa sobre la nutrición de las plantas a partir de un aumento de la capacidad de absorción de éstas, sino también por la posibilidad de incrementar la resistencia a enfermedades de las raíces, aumentar la tolerancia a la sequía, entre otras. Además, se ha demostrado que la inoculación de plantas micropropagadas con hongos endomicorrizicos, durante los estadios *in vitro*, produce incrementos significativos sobre las tasas de crecimiento, enraizamiento y supervivencia (13).

En la naturaleza, el café es una planta micorrizica-dependiente (14), necesitando de esta asociación para lograr un eficiente funcionamiento y óptimo rendimiento.

El empleo de los HMA *in vitro* en la actualidad es un reto, constituyendo no solo un paso decisivo en el conocimiento del sistema hongo-planta en condiciones controladas, sino también la implantación de uno de los factores bióticos más importantes que inciden de manera natural en el desarrollo de las plantas, por lo que este trabajo se propuso evaluar los efectos provocados por la micorrización sobre el desarrollo *in vitro* de plántulas de café.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para dar cumplimiento a los objetivos propuestos, se diseñó un experimento con dos repeticiones, el cual consistió en la inoculación de vitroplantas de café (*Coffea canephora* var. Robusta) obtenidas por embriogénesis somática, con diferentes propágulos del hongo micorrizógeno arbuscular *Glomus clarum*.

Los tratamientos consistían en esporas pregerminadas en medio M (mínimo) previamente desinfectadas, micelio externo aséptico y un tratamiento control sin inocular. Se empleó un diseño Completamente Aleatorizado, a razón de 20 plántulas por tratamiento bajo un arreglo bifactorial, en el cual los factores analizados fueron las variantes de inoculación y las repeticiones del experimento.

Las esporas empleadas como propágulos fueron extraídas de un cultivo de *Sorghum vulgare*, en etapa de cosecha, previamente inoculado con la cepa *Glomus clarum*, utilizando la técnica de tamizado húmedo y decantado (15).

Posteriormente, las esporas colectadas fueron desinfectadas (16) e inoculadas en medio M para su germinación (modificado por los autores). Al cabo de 30 días de incubación (26-28°C), se extrajeron listas para ser empleadas en la biotización de vitroplantas de café, presentando un porcentaje de germinación del 100 % y tubos germinativos cuyo largo oscilaba entre 20 y 40 µm.

Igualmente, el micelio se obtuvo de un cultivo puro de *G. clarum* de 30 días, empleando la técnica de extracción de micelio (17), modificada por los autores. Posteriormente, el micelio extraído fue sometido a un proceso de desinfección consistente en lavados sucesivos con Cloramina T (2 %).

En el experimento se utilizaron plántulas de café pertenecientes a la especie *Coffea canephora* var. Robusta, obtenidas por embriogénesis somática en estadio de enraizamiento, las cuales presentaban dos pares de hojas como promedio y un pobre sistema radical compuesto de tres a cuatro raicillas.

Antes de proceder a la inoculación de las vitroplantas, se prepararon frascos estériles conteniendo medio M para resembrar las plantas y garantizar de esta forma un mejor desarrollo del hongo. Seguidamente, se extrajeron las esporas del medio de cultivo, en el cual se sembraron para germinar auxiliados por una aguja enmangada y se colocaron sobre las raíces a razón de 10 esporas por plántula. En el caso de los tratamientos que se inocularon con micelio previamente desinfectado, se procedió de manera similar, colocando el micelio extraído con la aguja sobre las raíces de las vitroplantas.

Luego de la inoculación, se colocaron todas las plantas en la oscuridad durante 20 días, a partir de los cuales se situaron en un cuarto de crecimiento con un fotoperíodo de 16 horas.

A los 30 días de inoculadas las plantas, se procedieron a realizar las siguientes evaluaciones:

- ⇒ altura (cm), masa fresca foliar y radical (g), número de pares de hojas y número de raíces
- ⇒ aislamientos microbiológicos para determinar la presencia de contaminantes en las plántulas bajo estudio. Para esto se sembraron macerados de embriones y raíces sobre diferentes medios de cultivo (Agar Nutriente, NFB, King B y LGI)
- ⇒ conteo y clasificación de embriones (estadios globular, acorazonado, torpedo y cotiledonar), empleando Estereomicroscopio CETI
- ⇒ presencia o no de estructuras fúngicas en el interior del sistema radical (Microscopio óptico, Olympus)
- ⇒ actividades enzimáticas Peroxidasa (PO) y Polifenoloxidasas (PPO). Para la determinación de peroxidases se utilizaron como sustratos el guayacol y el peróxido de hidrógeno. La velocidad de oxidación del guayacol fue determinada en espectrofotómetro (*Ultrospec Plus Spectrophotometer, Pharmacia LKB*), registrándose los valores de absorbancia a 470 nm. Se tomó la variación de densidad óptica (DO) en el tiempo durante dos minutos a intervalos de 15 segundos.

El cálculo de actividad enzimática se realizó según la expresión:

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{\Delta D.O \text{ 1 Vens. dil.}}{\Delta t \text{ k Venz.}}$$

donde k es el coeficiente de extinción molar del guayacol; Vol. Ens. es el volumen del ensayo y Vol. Enz. el volumen de la enzima. La actividad se expresó como $\mu\text{moles de producto formado/min/mL de enzima}$.

Para la actividad polifenoloxidasas se empleó como sustrato el pyrogalol, cuya velocidad de oxidación fue leída a 420 nm. La variación de densidad óptica en el tiempo ($*D.O)/(t)$ se registró durante dos minutos a intervalos de 15 segundos. La actividad se calculó de la misma forma que en el caso anterior y se expresó como UDO/min/mL de enzima.

La interpretación de los resultados se realizó mediante un Análisis de Varianza de Clasificación Simple con posterior prueba de Duncan ($p < 0.05$), en caso de existir diferencias significativas entre las medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A pesar de las dificultades que presentan los hongos micorrizógenos para completar su ciclo de vida en medio axénico, se logró desarrollar un cultivo dual sobre el medio M entre propágulos de la especie *G. clarum* y plántulas de café.

Los resultados se discutirán partiendo de los valores medio obtenidos en ambos momentos del experimento, debido a que no se encontró interacción significativa al analizar este factor.

Como es conocido, el establecimiento de los hongos micorrizógenos depende fundamentalmente de las concentraciones de fósforo, sacarosa y sulfato de sodio, en el medio de cultivo (18). El medio de enraizamiento MS contiene estos elementos en altas concentraciones, por lo que los autores antes mencionados sugieren un cambio al medio M antes de establecer el cultivo dual. Estos también aseguran que el cambio de medio podría crear condiciones favorables para el establecimiento de las especies micorrízicas sobre las plantas micropropagadas.

En la Figura 1 aparecen los resultados relacionados con la variable altura de las plantas, pudiéndose apreciar un efecto positivo de la inoculación con cualquiera de los propágulos empleados respecto al control no inoculado. Por otra parte, la altura de las plantas previamente inoculadas con micelio fue significativamente mayor que las inoculadas con esporas pregerminadas, evidenciándose la alta capacidad infectiva de este propágulo.

De igual forma, si se observan las Figuras 2 y 3, donde se muestran el número de raíces, de pares de hojas y la masa fresca radical y foliar respectivamente, también puede notarse el efecto antes mencionado. En cuanto al número de pares de hojas y raíces, no se encontraron diferencias significativas entre los propágulos empleados y sí entre estos y el control no micorrizado.

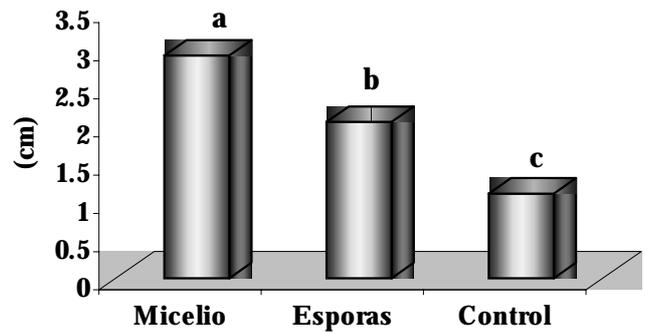


Figura 1. Efecto de los tratamientos sobre la variable altura de las plantas

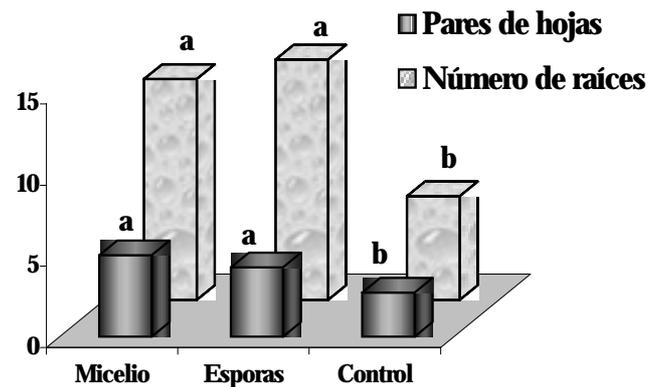


Figura 2. Efecto de los tratamientos sobre el número de pares de hojas y raíces

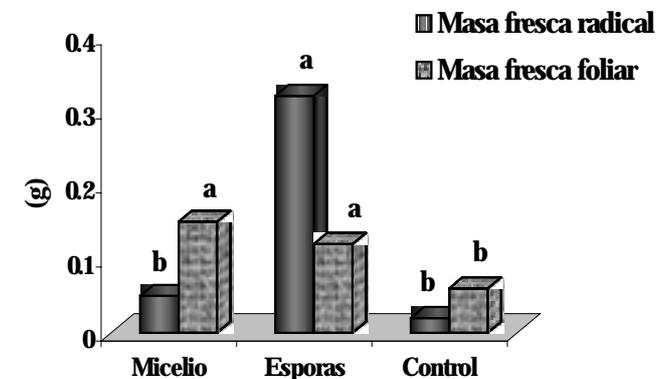


Figura 3. Efecto de los tratamientos sobre las variables masa fresca radical y foliar

Estos incrementos *in vitro* pueden asociarse a efectos nutricionales favorables vinculados con la asociación simbiótica *in vivo*, aunque también puede verse reflejado un efecto hormonal y/o fisiológico de las especies micorrízicas sobre las plantas que colonizan (19).

Los resultados coinciden con los expuestos por el grupo de Elmeskaoui, quienes realizaron el primer informe de un sistema de cultivo tripartita, en el cual inocularon plántulas micropropagadas de fresa con el hongo endomicorrízico *Glomus intraradices* durante el periodo de cultivo (18). En este estudio se enriqueció el sistema

con CO₂ y se emplearon como propágulos raíces transformadas de zanahoria y no transformadas de tomate. Se encontraron incrementos significativos en la altura de los tallos y en el número de raíces de las plantas micorrizadas respecto a los controles, no existiendo diferencias entre los propágulos empleados.

Por otra parte, en la Tabla I se muestran los valores relacionados con el efecto de la micorrización sobre la producción de embriones totales y en estadio globular, destacándose el tratamiento en que se empleó micelio con los mayores valores, aunque en ambos casos (micelio y esporas), el número de embriones fue significativamente superior al control no inoculado.

Tabla I. Efecto de la inoculación de *Glomus clarum* sobre la producción de embriones totales y en estadio globular

Tratamientos	Embriones totales	Estadío globular
Micelio	35.67 a	32.67 a
Esporas	10.67 b	9.33 b
Control	0.67 c	0.67 c
Es x	0.94***	0.94***
C.V (%)	10.42	11.48

Aunque no se recoge en la tabla, el número de embriones en estadio globular fue superior al de cualquier otro en el momento que se realizó el muestreo; no obstante, se encontraron embriones en estadios torpedo y cotiledonar. Todos los embriones se aislaron y se sembraron para continuar el estudio hasta la fase final de su desarrollo.

Si bien este efecto es común encontrarlo durante el proceso de obtención de plantas de café por embriogénesis somática, la magnitud que presentó en este estudio por acción de la micorrización resultó obviamente interesante.

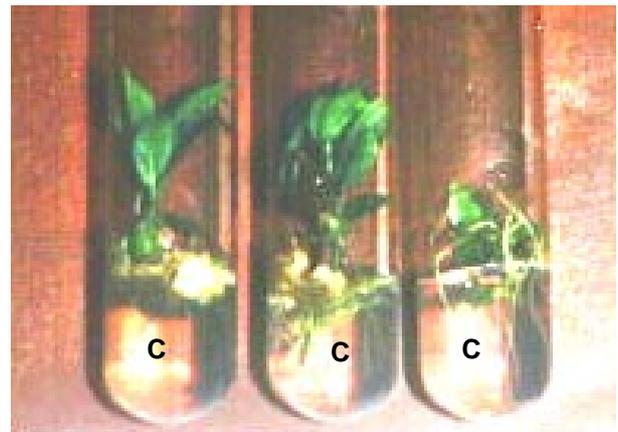
Para inducir la formación de callos embriogénicos en las fases iniciales del proceso, se le adicionan al medio de cultivo elevadas concentraciones de auxinas y se colocan los explantes en la oscuridad, por lo que no debe sorprender el hecho antes descrito si se recuerda la capacidad de producción de hormonas estimuladoras que poseen estos hongos y que las plantas en estudio se incubaron luego de la inoculación, para facilitar el desarrollo de los propágulos micorrízicos.

En la actualidad se dispone de algunos informes relacionados con la producción de hormonas durante la interacción planta-hongos micorrizógenos. Algunos autores (19) sugieren que las fitohormonas liberadas durante la colonización pueden contribuir de alguna manera al incremento del crecimiento de las plantas.

Al observar la Figura 4, se podrá apreciar claramente la formación de callos en las plantas estudiadas.

Recientemente, se ha informado la influencia positiva de los hongos micorrizógenos sobre los diferentes estadios de desarrollo de embriones somáticos de *Ipomea batata* (20). Estos autores encontraron un marcado efecto de la inoculación sobre la supervivencia de los embri-

nes y formación de plántulas. Por consiguiente, la formación de plantas tuvo más éxito cuando la inoculación se realizó en los estadios cotiledonar y torpedo elongado.



C: presencia de callos

Figura 4. Efecto de la micorrización sobre la producción de callos embriogénicos en los tratamientos estudiados

Los estudios de contaminación *in vitro* realizados a las raíces y embriones derivados de los explantes, no arrojaron datos que demostraran la presencia de algún contaminante microbiano, lo cual resultó de suma importancia para poder asegurar que los efectos encontrados en las plantas analizadas fueran solo por acción de la micorrización.

En la Tabla II se recoge de manera cualitativa la variable colonización micorrízica expresada como presencia o no de estructuras fúngicas, debido a que no se contaba con datos suficientes para realizar una valoración cuantitativa.

Tabla II. Colonización micorrízica en los diferentes tratamientos

Tratamientos	Presencia
Micelio	++
Esporas	+
Control	-

En las etapas en que se realizaron los muestreos, aún no existía un desarrollo exitoso de la micorrización en el interior radical, a pesar de que pudo observarse el micelio penetrando a través de la epidermis y la presencia de haustorios avanzando en las células de la corteza.

Como puede observarse en la tabla, se encontró mayor número de estructuras en las plantas inoculadas con micelio aséptico que en las tratadas con esporas. Si bien, la colonización se inicia al contactar con las plantas las hifas producidas por cualquiera de los propágulos fúngicos, ya sean procedentes de esporas, de micelio externo o micelio interno proveniente de fragmentos de raíces micorrizadas (21); no cabe duda que de los dos tipos de propágulos empleados en este estudio fue el micelio quien logró mayor éxito en la colonización, lo cual

podría estar condicionado por la gran capacidad infectiva que tiene, a diferencia de las esporas, quienes demoran más en colonizar a su hospedero.

Aún cuando no se realizó una dinámica de las actividades enzimáticas de PO y PPO, sí se pudieron obtener los niveles de activación que presentaban dichas enzimas en el momento de realizado el muestreo (Figuras 5 y 6), lo cual podría ser de mucha utilidad si se pretende hallar evidencias sobre la presencia del simbionte en el interior radical.

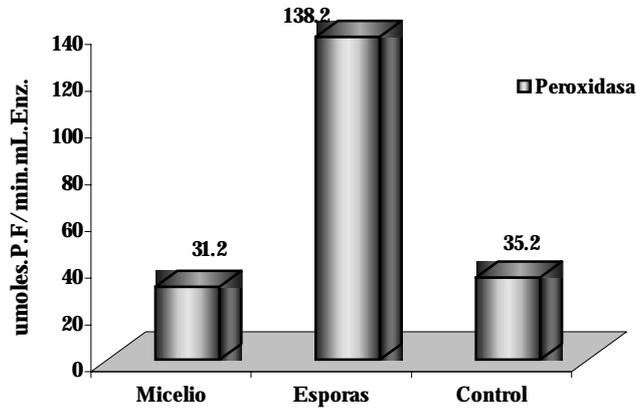


Figura 5. Actividad enzimática de Peroxidasa en cada uno de los tratamientos a los 30 días de inoculadas las plantas

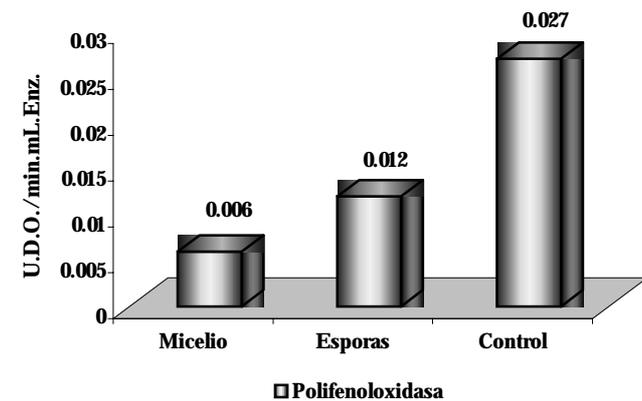


Figura 6. Actividad enzimática de Polifenoloxidasas en cada uno de los tratamientos a los 30 días de inoculadas las plantas

Anteriormente se analizaba el hecho de la mayor capacidad infectiva que tiene el micelio extramático con respecto a las esporas. En la Figura 5 se observa una mayor actividad de esta enzima en las plantas inoculadas con esporas, la cual superó marcadamente los niveles alcanzados en las plantas inoculadas con micelio y los controles no micorrizados. Obviamente, la actividad transiente que se informa en el caso de éstas y otras enzimas involucradas en la activación de mecanismos de defensa de las plantas se estaba manifestando, pero todo parece indicar que mientras en el caso del micelio ya se encontraba en su fase decreciente, en los tratamientos realizados con esporas producto de su más lenta colonización, aún mostraban altos niveles de activación.

Lo anterior coincide con el hecho de que la mayor cantidad de estructuras fúngicas se encontraron en las plantas tratadas con micelio. Obviamente, es necesario que existan bajos niveles de activación de esta enzima, debido a que ella contribuye al reforzamiento de la pared celular, producto de la formación de lignina y suberina (22); esto garantiza que los hongos micorrizógenos puedan penetrar las paredes celulares de las plantas, pues ha sido informada su incapacidad de degradar dichos compuestos. La alta actividad transitoria de PO también fue presentada por numerosos autores (23, 24).

De igual forma, al observar los valores de actividad de PPO que se muestran en la Figura 6, se podrá realizar un análisis similar. En este caso también se observa mayor actividad en el caso de las plantas tratadas con esporas; sin embargo, ambas actividades son mucho más bajas que en las plantas controles no inoculadas.

Esta enzima también participa activamente en las reacciones de defensa de las plantas, depositando compuestos fenólicos como la lignina (25), actuando como una barrera bastante efectiva y produciendo compuestos tóxicos a patógenos que pueden inhibir el crecimiento del hongo o la actividad de las enzimas secretadas por éstos (26), por lo cual los bajos niveles de activación de PPO son un requisito indispensable para facilitar la entrada del hongo a su hospedero.

Estos resultados son similares a los encontrados en plantas de tomate inoculadas con dos especies de HMA (*Glomus clarum* y *Glomus fasciculatum*) (27).

Por último, esta alta actividad observada en los controles podría estar relacionada con el hecho de que muchas de estas enzimas, además de estar involucradas en mecanismos de defensa, intervienen en el desarrollo de otros procesos fisiológicos de las plantas.

CONSIDERACIONES GENERALES

La inoculación *in vitro* de *Glomus clarum* originó efectos positivos sobre el crecimiento y desarrollo de las vitroplantas de café e incrementó asimismo la producción de embriones totales, resultando más satisfactorio el empleo de micelio externo como propágulo. La metodología de desinfección de los propágulos de HMA fue adecuada, no encontrándose contaminantes bacterianos en las vitroplantas ni en los embriones.

La información obtenida ofrece perspectivas muy favorables para futuros estudios de establecimiento de la micorrización durante los estadios *in vitro* de plantas micropropagadas, las cuales en principio deben tener una mayor capacidad de supervivencia y adaptación.

REFERENCIAS

1. Nguyen, Q. T.; Kozai, T.; Heo, J. y Thai, D. X. Photoautotrophic growth response of *in vitro* cultured coffee plantlets to ventilation methods and photosynthetic photon fluxes under carbon dioxide enriched conditions. *Plant Cell, Tissue and Culture*, 2001, vol. 66, p. 217-255.

2. Hernández, C.; Piche, Y. y Desjardins, Y. Water relations of whole strawberry plantlets *in vitro* inoculated with *Glomus intrarradices* in a tripartite culture system. *Plant Science*, 1999, vol. 143, p. 81-91.
3. Nowak, J. Benefits of *in vitro* "Biotization" of plant tissue cultures with microbial inoculants. Review. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 1998, vol. 34, p. 122-130.
4. Balla, I.; Vértesy, J. y Koves-Pechy, K. Acclimation results of micropropagated black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) improved by use of microorganisms. En: Cassells, A. L., ed. Pathogen and microbial contamination management in micropropagation. Dordrecht (NL): *Kluwer Acad. Publ.*; 1997, p. 351-354.
5. Bensalim, S.; Nowak, J. y Asiedu, S. K. Temperature and pseudomonad bacterium effects on *in vitro* and *ex vitro* performance of 18 clones of potato. *Am. Potato Journal*, 1998.
6. Vosatka, M.; Jansa, J. y Regver, M. Inoculation of mycorrhizal fungi—a feasible biotechnology for horticulture. *Plant Annu. Rev. Bot.*, 1999, vol. 39, p. 219-224.
7. Creus, C.; Sueldo, R. J. y C. A. Barassi. Water relations in *Azospirillum* inoculated wheat seedlings under osmotic stress. *Can. J. Bot.*, 1998.
8. Santana, N. Embriogénesis somática en el cultivo del café (Coffea sp.). [Tesis de Grado]; INCA, 1993.
9. González, M. E. Embriogénesis somática y respuesta a diferentes factores de cuatro clones seleccionados de la variedad robusta (*Coffea canephora* P.). [Tesis de Grado], INCA, 1999.
10. Budi, S. W.; Cordier, C. y Trouvelot, A. Arbuscular Micorrizas, a way of promoting sustainable growth of micropropagated plantlets. Symposium on plant biotechnology as a tool for the exploitation of mountain lands. 1998, vol. 457, p. 71-77.
11. Naqui, N. S. y Mukerji, K. G. Mycorrhization of micropropagated *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit. *Symbiosis*, 1998, vol. 24, p. 103-113.
12. Gange, A. C. y Aires, R. L. On the relation between arbuscular mycorrhizal colonization and plant benefit. *Oikos*, 1999, vol. 87, p. 615-621.
13. Rai, M. K. Current advances in mycorrhization and micropropagation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 2001, vol. 37, p. 158-167.
14. Fernández, F. Manejo de las asociaciones micorrízicas arbusculares sobre la producción de posturas de café (C. arabica L. var Catuai) en algunos tipos de suelos. [Tesis de Grado], INCA, 1999.
15. Herrera, J.; Herrera, R. A.; Rodríguez, M. E.; Orozco, M. O.; Furrázola, E. y Ferrer, R. L. Las micorrizas y el funcionamiento de los bosques tropicales. En: Ecología de los bosques siempre verdes de la Sierra del Rosario. Cuba. Proyecto MAB. #1. 1971-1987. Rostlac. UNESCO. 1995, Capítulo 29, p: 627-670.
16. Bécard, G. y Piché, Y. Establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza. En: Root organ culture: Review and proposed methodology. *Methods in Microbiology*, 1992, vol.24, p. 89-108.
17. Vilariño, A.; Arines, J. y Schuepp, H. Extraction of vesicular-arbuscular mycorrhizal mycelium from sand samples. *Soil. Biol. Biochem.*, 1993, vol. 25, no.1, p. 99-100.
18. Elmeskaoui, A. *et al.*. A tripartite culture system for endomycorrhizal inoculation of micropropagated strawberry plantlets *in vitro*. *Mycorrhiza*, 1995, vol. 5, p. 313-319.
19. Ludwig, L. M. Hormonal balance in plants during colonization of mycorrhizal fungi. En: Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function. 2000, p. 262-285.
20. Bressan, W.; Carvalho, Ch. de y Sylvia, D. M. Inoculation of somatic embryos of sweet potato with an arbuscular mycorrhizal fungus improves embryo survival and plantlet formation. *Canadian Journal of Microbiology*, 2000, vol. 46, no. 8, p. 741-743.
21. Bago, B.; Concepción, A. A.; Schachar-Hill, Y. y Pfeffer, P. E. The extraradical mycelium of arbuscular mycorrhizae, as a symbiotic link between the root and its environment. En: Investigación de la simbiosis micorrízica en México. México : Colegio de Posgraduados, 2000.
22. Lurié, S.; Fallik, E. y Shapira, R. The possible involvement of peroxidase in resistance to *Psothyris cinereain* heat treated tomato fruit. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1997, vol. 50, p. 141-149.
23. Blee, K. A. y Anderson, A. J. Defense responses in plants to arbuscular mycorrhizal fungi. En: Current advances in mycorrhizal research. Section II: Mycorrhizal fungi and plant defense. (eds) Podilla and Douds, APS Press USA. 2000, p. 27-44.
24. Pozo, M. J.; Azcón-Aguilar, C.; Dumas-Gaudot, E. y Barea, J. M. β -1,3 glucanase activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *Phytophthora parasitica* and their possible involvement in bioprotection. *Plant. Sc.*, 1999, vol. 141, p. 149-157.
25. Lambais, M. R. Regulation of plant defense-related genes in arbuscular mycorrhizae. En: Current advances in mycorrhizal research. Section II: Mycorrhizal fungi and plant defense. (eds) Podilla and Douds, APS Press USA, 2000, p. 45-60.
26. Cordier, C.; Trouvelot, A. y Gianinazzi, S. Arbuscular mycorrhizal technology applied to micropropagated *Prunus avium* and to protection against *Phytophthora cinnamoni*. *Agronomie*, 1998, vol. 16, p. 679-688.
27. Rodríguez, Y.; Pérez, E.; Solórzano, E.; Meneses, A. R y Fernández, F. Peroxidase and polyphenoloxidase activities in tomato root inoculated with *Glomus clarum* or *Glomus fasciculatum*. *Cultivos Tropicales*, 2001, vol. 22, no. 1, p. 11-16.

Recibido: 22 de noviembre del 2001

Aceptado: 19 de marzo del 2002