



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

Facultad de Químico Farmacobiología

**Efecto del Aluminio sobre el crecimiento y desarrollo
de *Glomus intraradices* cultivado *in vitro***

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el título de

QUIMICOFARMACOBIOLOGA

Presenta:

YOLANDA MÉNDEZ SÁNTIZ

Directoras de Tesis:

Dra. Yazmín Carreón Abud

Dra. Mayra Elena Gavito Pardo

Noviembre de 2009



EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL **LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA** DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA ASESORÍA DE LA **DRA. YAZMÍN CARREÓN ABUD**, Y CON LA COASEORÍA DE LA **DRA. MAYRA ELENA GAVITO PARDO** ADSCRITA AL CENTRO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS. CIECO. UNAM.

EL PROYECTO FUE FINANCIADO POR LA **COORDINACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA** DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todas sus bendiciones y por permitirme llegar a este momento.

A las dos personas más importantes de mi vida, mis padres: Gilberto y Amalia, a quienes les agradezco infinitamente por haberme dado la vida, por su cariño, sus consejos y por todos sus sacrificios que han hecho para que yo pudiera terminar otra etapa más en mi vida.

Y por supuesto no podría faltar mencionar a mis hermanos a quienes quiero y admiro muchísimo: Crescencio, Gabriel, Rolando, Oralia y Eloisa con los que he compartido momentos de tristeza y de felicidad, que a pesar de todas las adversidades de la vida me motivaron a seguir adelante.

Y a cada uno de los que ya forman parte de la familia Méndez Sántiz: Susana, Amalia, Irene y Edgar, a mis sobrinos que algún día llegarán a leer este escrito: Andrea Sarahi, Eduardo y José Adrian.

A mis abuelos por sus consejos, y por compartir con cada uno de sus nietos sus experiencias.

Muy en especial a la Dra. Yazmin Carreón Abud y al Dr. Miguel Martínez Trujillo por haberme brindado la oportunidad de realizar mi proyecto de tesis en su laboratorio y por compartir conmigo sus conocimientos. A la Dra. Mayra Elena Gavito Pardo, por aceptar con su amplia experiencia, ser coasesora de este trabajo.

A mi comisión revisora de tesis: Biol. María de los Ángeles Beltrán Nambo, Dra. Mayra Elena Gavito Pardo, Dr. Carlos Cortes Penagos, QFB. Ricardo Vega Tavera, por regalarme un poco de su tiempo para la revisión de mi trabajo y por sus sugerencias que me fueron de gran ayuda.

A mis compañeros y amigos del Ballet: Gerardo, Luis Ricardo, Cleo, Esteban, Agape, Adriana, Lucero, Yoshira y Karina que compartieron conmigo momentos de alegría y de tristeza durante todo este tiempo.

A cada una de las personas que forman parte de mi vida y que me han brindado su amistad incondicional: Víctor Hugo, María Virginia, Nicol, Lourdes, Darinel, Miguel Ángel, Justino, Ismael, Gloria, Ángeles, Nuria, Gamaliel, Manuel, María Fernanda, Hugo, Perla, Guillermo, Mode, Daniela y Uriel.

Y a cada uno de mis profesores que contribuyeron en mi educación.

A cada uno de ustedes les dedico con mucho cariño y amor este proyecto, porque cualesquiera que hayan sido mis logros ustedes me ayudaron siempre a alcanzarlos, de todo corazón millones de gracias.

CONTENIDO

	No. de pág.
INDICE DE FIGURAS-----	i
INDICE DE TABLAS -----	ii
RESUMEN-----	iii
1. INTRODUCCION-----	1
2. ANTECEDENTES-----	3
2.1 Características generales de los HMA-----	3
2.2 Cultivo <i>in vitro</i> de los HMA-----	4
2.2.1. Raíces de hospederos-----	4
2.2.2. Inoculo fúngico-----	5
2.2.3. Esporas-----	5
2.2.4. Selección de propágulos (raíces y hongos)-----	7
2.2.5. Reasociación de propágulos-----	8
2.2.6. Cultivo de raíces-----	8
2.2.7. Transformación de raíces-----	9

2.2.8. Medios de cultivo-----	10
2.2.9. Cultivos continuos-----	10
2.2.10. Crio preservación de esporas producidas <i>in vitro</i> -----	11
2.3 El cultivo in vitro de los HMA como una herramienta en la	
sistemática-----	12
2.3.1. Estudios filogenéticos-----	12
2.3.2. Variabilidad intraespecífica-----	13
2.4 Características fúngicas antes y después de la colonización	
de raíces-----	13
2.4.1. Germinación <i>in vitro</i> de esporas-----	13
2.4.2. Desarrollo <i>in vitro</i> de la fase extraradical-----	14
2.5 Aspectos fisiológicos de las relaciones hospedero	
hongo-----	14
2.5.1. Señalización entre integrantes-----	15
2.5.2. Metabolismo del integrante fúngico-----	16
2.6 El Aluminio como metal pesado-----	17
2.7 Los HMA y los metales pesados-----	20
 3. HIPOTESIS-----	 23
 4. OBJETIVOS-----	 23

5. MATERIAL Y METODOS	24
5.1. Preparación de medio de cultivo	24
5.1.1. Preparación de medio de cultivo con Aluminio	26
5.2 Propagación de raíces transformadas en cultivo <i>in vitro</i>	26
5.2.1. Metodología para el establecimiento de cultivo axénico	26
5.2.2. Metodología para el establecimiento de cultivo monoxénico	27
5.3 Diseño experimental	28
5.4 Variables a evaluar	28
5.5 Diseño estadístico	29
 6. RESULTADOS	 30
6.1. Cuantificación de estructuras de los HMA: <i>Glomus intraradices</i>	30
6.2. Cuantificación de la biomasa de raíz y micelio de <i>Glomus</i> <i>intraradices</i> en cultivo monoxénico	32
6.3. Cuantificación de la biomasa de las raíces transformadas en cultivo axénico	33
6.4. Crecimiento de la raíz a diferente tiempo en cultivo axénico	36
 7. DISCUSIÓN	 38

8. CONCLUSIONES	42
------------------------	-----------

9. LITERATURA CITADA	43
-----------------------------	-----------

INDICE DE FIGURAS

No. de Pág.

Figura 1. Asociación micorrizica y estructuras de los HMA -----	3
Figura 2. Extracción de esporas para iniciar cultivos <i>in vitro</i> -----	6
Figura 3. Própagulos potenciales para iniciar cultivos monoxénicos-----	7
Figura 4. Comparación de promedios obtenido por estructuras de <i>Glomus intraradices</i> a diferentes concentraciones de Aluminio-----	31
Figura 5. Comparación de biomasa de raíz y micelio a diferentes concentraciones de Aluminio ($P \geq 0.05$)-----	32
Figura 6. Comparación de cantidad de esporas a diferentes concentraciones de Aluminio-----	33
Figura 7. Biomasa de la raíz en cultivo axénico y monoxénico a diferentes tratamientos de Aluminio-----	34
Figura 8. Desarrollo de raíz en cultivos axénico y monoxénico con diferentes concentraciones de Aluminio-----	35
Figura 9. Crecimiento acumulado de la raíz a diferente tiempo con diferentes concentraciones de Aluminio-----	37

INDICE DE TABLAS

No. de Pág.

Tabla 1. Composición del medio mínimo (M)-----	24
Tabla 2. Soluciones para el medio de cultivo M-----	25
Tabla 3. Variables a evaluar en cultivos axénico y monoxénicos-----	29
Tabla 4. Crecimiento de raíz y tamaño acumulado a diferente tiempo, en las diferentes concentraciones de Aluminio-----	36

RESUMEN

En la presente investigación se abordaron puntos importantes referentes a evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Aluminio sobre el crecimiento y desarrollo de raíces transformadas de zanahoria en un sistema *in vitro* en simbiosis con el Hongo Micorrízico *Glomus intraradices*.

Dado que la contribución de los HMA a la tolerancia al metal en las plantas hospederas, esta pobremente documentada, este trabajo aportó información útil mediante el uso de sistemas de cultivos monoxénicos y axénicos que permitieron comparar la respuesta de las raíces a la presencia del Al y el efecto benéfico que tuvieron los HMA y que se mostraron en la biomasa y crecimiento de éstas aún en las concentraciones más altas de Al utilizadas. Para cada experimento se trabajo diferentes concentraciones de Al: 50, 100 y 200 μ M contando además con muestras control. Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza.

El hongo probado en nuestros experimentos aún cuando no está adaptado a suelos contaminados con Al, permitió la protección de las raíces a elevadas concentraciones del metal y estas tuvieron una buena respuesta mostrando un buen desarrollo en cultivos monoxénicos en donde la biomasa en todos los tratamientos con el metal fue mayor a la obtenida en los cultivos axénicos.

La longitud de la hifa no fue afectada por cantidades mayores de 100 μ M de Al adicionado en el medio, y se obtuvieron los valores más altos en biomasa para las hifas y esporas, a las concentraciones de 200 μ M, alcanzando hasta 0.0082 g. de biomasa de micelio, lo cual indica la tolerancia del hongo al metal.

Los resultados obtenidos corroboran lo señalado por otros investigadores referentes a los beneficios que los HMA le proporcionan a la planta en suelos contaminados por metales pesados como Mg, Zn, Cu, Cd y Al.

1. INTRODUCCIÓN

Los suelos tienen cinco componentes: materia inorgánica, materia orgánica, aire del suelo, agua del suelo y organismos vivos. Los elementos (incluyendo los nutrimentos de las plantas) pueden encontrarse en diferentes asociaciones con estos componentes. Sin embargo, las plantas pueden absorber los elementos sólo cuando éstos están disueltos en el agua del suelo. A medida que los elementos débilmente asociados con materiales sólidos son liberados a la solución del suelo pueden ser absorbidos por la planta (Berkelaar, 2008).

Los metales están presentes de manera natural en el suelo y pueden ser benéficos o tóxicos para el medio ambiente. En exceso pueden producir efectos nocivos comunes en las plantas aunque existen muchos casos de efectos específicos de metales individuales en diferentes plantas.

El Aluminio (Al) no es considerado como un nutrimento esencial, pero en bajas concentraciones algunas veces incrementa el crecimiento de las plantas o induce otros efectos favorables (Foy, 1982; Foy, et al. 1983). Sin embargo en altas concentraciones, principalmente en forma de Al^{3+} , su toxicidad es un factor limitante en el crecimiento de las plantas en suelos ácidos con pH inferior a 5.0 pero puede ocurrir en pH más altos (5.5) ya que este metal se encuentra estrechamente vinculado con materia inorgánica insoluble y por tanto no puede ser absorbido por las raíces de la planta. Generalmente, el Al interfiere con la división celular en las puntas de la raíz y en las raíces laterales, incrementa la rigidez de las paredes, reduce la replicación del DNA, interfiere en la fijación del fosforo del suelo, disminuye la respiración de la raíz, con la actividad enzimática y en la absorción, transporte y uso de muchos nutrientes esenciales como Ca, Mg, K, P y Fe (Foy, 1992).

Sin embargo se ha observado que los efectos negativos que produce este metal y otros metales pesados en las plantas pueden atenuarse incrementando la tolerancia de éstas gracias a la presencia de hongos micorrízicos que pueden

tener un efecto protector contra metales pesados (MP), aunque al igual que las plantas estos hongos exhiben niveles variables de tolerancia dependiendo del metal y de su concentración. Las células fúngicas tienen una alta capacidad de absorción de estos metales gracias a la presencia de grupos carboxilos, amino, hidroxilo, fosfato, así como quitosana y quitina (Rivera-Becerril, 2006). Sin embargo la mayoría de los trabajos con MP se han hecho con plantas no micorrízicas o no se han evaluado los niveles de colonización de las mismas; esto resulta problemático, si se considera que el 80% de los vegetales están asociados con hongos micorrízicos arbusculares (HMA), y que estos microorganismos que pueden modificar significativamente la respuesta de las plantas a estos metales.

Por ello que resulta importante realizar estudios con aislados fúngicos, para conocer la manera en que interactúan estos hongos con las raíces de las plantas y aumentar la tolerancia de estas a la acumulación de metales pesados. Así se puede lograr su establecimiento y sobrevivencia en sitios contaminados por estos metales y se pueden utilizar como herramientas fundamentales en el proceso de fitorremediación.

Dado que los HMA no pueden ser cultivados sin la planta, el uso de cultivo *in vitro*, en los cuales se puede observar el efecto del MP sobre las estructuras fúngicas y sobre las raíces tanto en cultivos axénicos como monoxénicos, es una alternativa cuando se carecen de grandes espacios y de infraestructura, utilizando sistemas que reproducen de cierta medida las condiciones naturales.

De ahí que la finalidad del presente trabajo fue analizar los cambios morfológicos y de crecimiento de raíces transformadas de zanahoria a diferentes concentraciones de Al en ausencia y presencia de un aislamiento de HMA para conocer el efecto que este hongo puede tener en la tolerancia de las raíces ante la presencia de MP, así como la respuesta de estos hongos a dicho metal.

2. ANTECEDENTES

2.1 Características generales de los HMA

La simbiosis micorrízica o micorriza es una asociación que se da entre un grupo particular de hongos y las raíces de las plantas, que tiene como escenario el suelo, y en la cual ambos organismos resultan beneficiados en aspectos fisiológicos y nutrimentales (Figura 1). La planta recibe del hongo nutrientes minerales y agua, mientras que el hongo obtiene de la planta carbohidratos y vitaminas que el por sí mismo es incapaz de sintetizar y que ella realiza gracias a la fotosíntesis y otras reacciones internas. Además de mejorar el estatus nutrimental de las plantas, las micorrizas, tienen una función importante como agentes de biocontrol al ataque de patógenos de hábito radical, desarrollo más vigoroso de la planta, resistencia a condiciones ambientales adversas y altas concentraciones de metales pesados (Harley y Smith, 1983)

Aunque la simbiosis con hongos ha sido determinante para la evolución de las plantas vasculares desde su aparición sobre la tierra debe resaltarse que el beneficio de la planta no solo se debe al establecimiento de las micorrizas en el sistema radical, sino que también intervienen diversos factores edáficos y ambientales (Dakessian et al. 1986; Abbott y Robson, 1991) e incluso el manejo de los agro ecosistemas (Trejo y Ferrera-Cerrato, 1997)

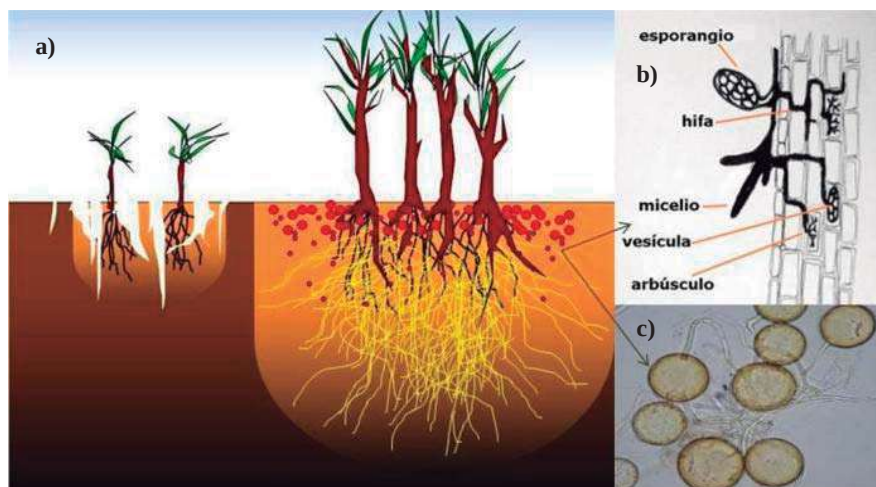


Figura 1. a) Asociación micorrízica, b) estructuras de los HMA y c) esporas de *G. intraradices*

2.2 Cultivo *in vitro* de los HMA

2.2.1 Raíces de hospederos

La naturaleza de simbiontes obligados, hace que el estudio de los Hongos Micorrízicos Arbusculares resulte complicado. Desde la década de los 80 el uso del cultivo de raíces *in vitro* ha permitido estudiar a detalle nuevos aspectos de la Simbiosis Micorrízica Arbuscular, como su biología molecular, citología genética, fisiología, sistemática y filogenia (Cranenbrouck, et al. 2005).

Los cultivos de raíces fueron desarrollados por primera vez por White y colaboradores (White, 1943; Butcher y Street, 1964; Butcher, 1980). Estos autores utilizaron trozos de raíz en medio mineral salino sintético suplementado con vitaminas y fuentes de carbohidratos. Sin embargo solo se obtuvo un crecimiento profuso de raíces, caracterizado por la formación de ramificaciones en muy pocas especies de plantas.

Un trabajo pionero lo realizaron Mosse y Hepper (1975) utilizando cultivos de raíces obtenidas de *Lycopersicum esculentum* Mill. (Tomate) y *Trifolium pratense* L. (trébol rojo) para el establecimiento *in vitro* de micorrizas con *Glomus mosseae*. Los autores demostraron por primera vez que las esporas de hongos MA podían utilizarse con éxito para colonizar cortes de raíces creciendo en medio mineral básico.

La transformación genética de planta mediante la bacteria común del suelo *Agrobacterium rhizogenes* Conn. (Riker et al. 1930) produce una condición conocida como raíces transformadas. Esta transformación (Tepfer, 1989) produce tejidos de plantas transformados Ri T-DNA que están morfológicamente programados para desarrollarse como raíces. Estas raíces transformadas han sido utilizadas para un amplio rango de estudios aplicados, uno de ellos es el estudio de la simbiosis MA. El primer cultivo de raíces transformadas colonizadas por un hongo MA fue realizado por Mugnier y Mosse (1987) que colonizaron

exitosamente raíces transformadas de *Convolvulus sepium* utilizando esporas de *G. mosseae*.

2.2.2 Inóculo Fúngico

En la mayoría de los casos se utilizan dos tipos de inóculos fúngicos para iniciar cultivos monoxénicos: con esporas extrarradicales o bien con propágulos de la fase intrarradical (como fragmentos de raíces y vesículas aisladas) del hongo. En las especies fúngicas de MA que no producen vesículas (ej. *Scutellospora* y *Gigaspora*) se utilizan esporas ya que generalmente son grandes y vigorosas. Los esporocarpos de *Glomus mosseae* también han sido utilizados para tratar de establecer cultivos *in vitro* (Budi et al. 1999).

2.2.3 Esporas

Las esporas generalmente se colectan del campo o de cultivos en macetas, por medio de tamizados húmedos. Los cultivos *in vitro* se pueden iniciar con pequeñas muestras de esporas (de diez a cien), estas pueden ser seleccionadas individualmente por medio de una lupa utilizando una micropipeta o pinzas finas. Sin embargo, con muestras grandes se deben utilizar gradientes de centrifugación para separar las esporas (Figura 2). Muchos métodos de centrifugación utilizan sustancias muy concentradas (ej. sacarosa, glicerol) (Mertz et al. 1979; Furlan et al. 1980; Hosny et al. 1996), sin embargo es importante que las esporas no se expongan por tiempos prolongados a estas sustancias.

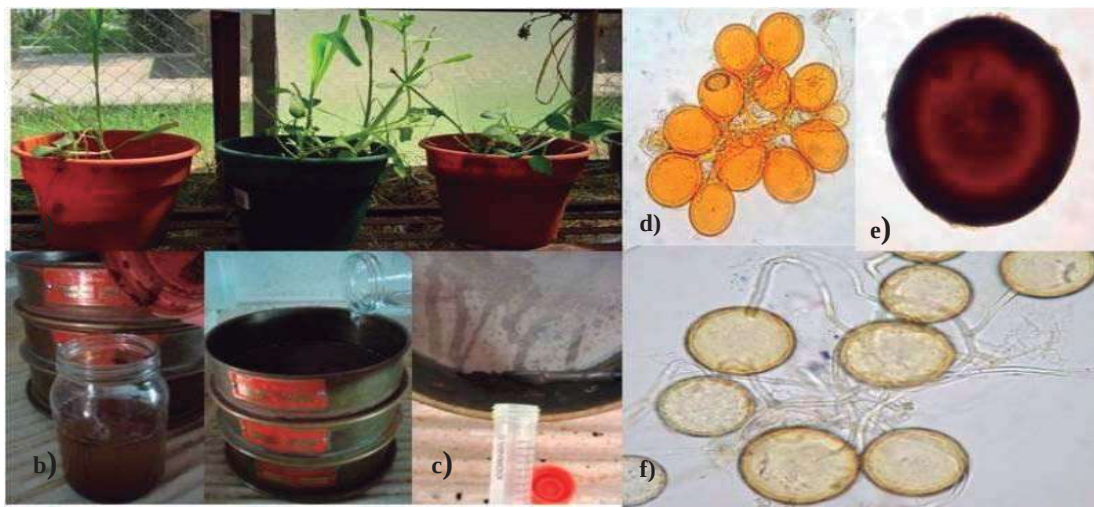


Figura 2. Extracción de esporas para iniciar cultivos *in vitro*. a) Cultivos trampa con inoculo fúngico, b) y c) Tamizado húmedo para extracción de esporas, d) esporas de *Glomus rubiforme*, e) Espora af. *Pacispora robigina* y f) espora de *G. intraradices*.

Antes de ser utilizadas como inóculos *in vitro*, las esporas se esterilizan superficialmente (Bécard y Piché, 1992), sin embargo en algunos casos las esporas pueden contener bacterias entre las capas de la pared haciendo a veces difícil la desinfección o en algunos casos imposible (Walley y Germida, 1996).

Generalmente las esporas de hongos MA no necesitan condiciones específicas o una raíz hospedera para germinar. Sin embargo, los exudados de raíz con pocas cantidades de CO₂ (2%) pueden estimular la germinación y el crecimiento de las hifas después de la germinación (Bécard y Piché, 1989a; Poulin et al. 1993; Buée, 2000). Si la germinación de las esporas no se produce en un lapso de 20 días, quizá el tratamiento de esterilización fue muy fuerte o las esporas estaban inmaduras, en latencia o muertas. Las esporas de algunas especies de hongos MA requieren estratificación en frío (4°C) previo a la germinación (Smith y Read, 1997). El tratamiento en frío (14-21 días) se aplica mejor previo al aislamiento de la espora, cuando las esporas aún están unidas al micelio extrarradical.

2.2.4 Selección de propágulos (raíces y hongos)

Se pueden utilizar 2 tipos de propágulos para iniciar cultivos monoxénicos. El primero es utilizando esporas o esporocarpos y el segundo es utilizando fragmentos de raíz micorrizadas que contengan vesículas dependiendo del HMA. Algunos tipos de propágulos pueden ser adaptados para iniciar cultivos monoxénicos, como el caso de especies de *Glomus* que producen esporas pequeñas ($<100\ \mu\text{m}$). La desinfección de las esporas es difícil sin ocasionar daño, y la tasa de germinación y de crecimiento de la hifa son muy lentas. Por esta razón las especies que producen gran número de vesículas dentro de la raíz como *Glomus intraradices*, son considerados como los mejores propágulos para iniciar los cultivos monoxénicos ya que la germinación de estas vesículas es rápida y eficiente. En el caso de los segmentos de raíz micorrizadas la germinación múltiple que se origina de los extremos de esta raíz incrementa el potencial infectivo (Figura 3). Cuando se requieren cultivos monoxénicos de fragmentos de raíces micorrizadas es necesario resembrar aislados individuales de esporas fijas con una nueva raíz.

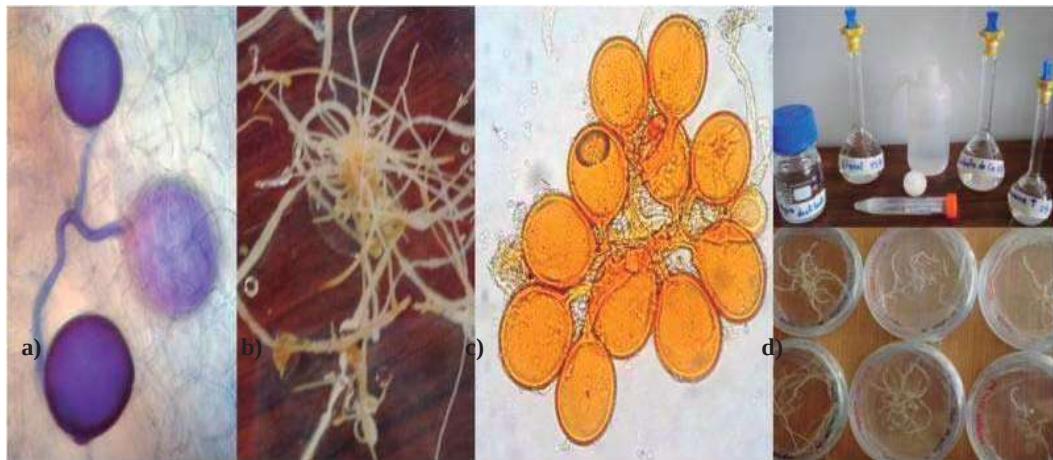


Figura 3. Própulos potenciales para iniciar cultivos monoxénicos. a) *G. intraradices*
b) Raíces transformadas en cultivo in vitro, c) *G. rubiforme* y d) Preparación de cultivos monoxénicos

2.2.5 Reasociación de propágulos

Los propágulos pueden ser extraídos del gel de diferentes formas. Para la mayoría de las especies de *Glomus* en cultivos monoxénicos simplemente se corta una pequeña pieza de gel que contenga una cantidad grande de esporas (cubos de 0.5 cm³) con aproximadamente 200 esporas y micelio extrarradical.

Alternativamente para especies que producen gran cantidad de esporas el agente gelificante puede ser removido del medio de cultivo para estimular el crecimiento del hongo. El agente gelificante puede ser disuelto con un buffer de Citrato (10 µM).

2.2.6 Cultivo de raíces

Se han utilizado varias plantas para el establecimiento de cultivos monoxénicos con Hongos Micorrízicos Arbusculares, las primeras raíces utilizadas como hospederas en cultivos monoxénicos fueron *Lycopersicum esculentum* (tomate) y *Trifolium pratense* asociados con *Glomus mosseae* Nicholson y Gerd (Mosse y Herpper, 1975) y *Fragaria ananassa* Duchense (fresa).

Una transformación genética natural de las raíces con la bacteria *Agrobacterium rhizogenes* se ha realizado desde décadas atrás (Riker et al. 1930; Ark y Thompson, 1961), pero comenzó a utilizarse para la investigación de micorrizas a mediados de 1980, con el desarrollo de líneas de raíces transformadas de zanahoria establecidas por Bécard y Fortín (1988). La transformación de las raíces de zanahoria con esta bacteria se realiza incorporando un segmento de DNA bacteriano denominado la región T (transferred DNA) del plasmido Ri (root inducing) dentro de las células de la planta hospedera.

Esta raíz ha sido la más utilizada como hospedero para cultivos monoxénicos de HMA, ya que las raíces transformadas tienen muchas ventajas sobre las no transformadas para cultivos monoxénicos, porque su balance hormonal ha sido modificado para permitir su proliferación en medios sintéticos.

Además las raíces transformadas Ri T-DNA en asociación con los HMA han mostrado mayor colonización intrarradical y desarrollo extrarradical de las hifas que cuando se usan raíces no transformadas.

2.2.7 Transformación de raíces

Agrobacterium rhizogenes es una bacteria del suelo Gram (-) que induce enfermedades en los pelos radicales de las plantas dicotiledóneas y por esta razón es utilizada para inducir pelos radicales. En las raíces transformadas con esta bacteria, un segmento del DNA bacteriano denominado la región T del plásmido Ri (inductor de raíces) es incorporado dentro de las células de la planta hospedera (Chilton et al. 1982). La integración y expresión de este ADN en el genoma de la planta produce fenotipo que desarrolla pelos radicales y la síntesis de compuestos de bajo peso molecular denominado opinas. Además dependiendo del gen incorporado en el genoma de la planta la raíz puede tener un cambio en el geotropismo. Algunos pelos radicales muestran un alto geotropismo negativo algunas otras solamente un ligero geotropismo negativo mientras que otros pueden tener un geotropismo positivo. Esto quizá es debido a la sensibilidad de las auxinas y a la redistribución de esta hormona después de la transformación de la raíz. (Legué et al. 1996). Las raíces con un geotropismo negativo deben ser incubadas en una posición invertida para mantener el crecimiento de la raíz en este medio.

2.2.8 Medios de cultivo

El medio M (Bécard y Fortín, 1988) es una modificación del medio de White inicialmente desarrollado para el cultivo de raíces de tomate (Butcher, 1980). La composición de macro elementos del medio de White es considerablemente más baja que la del medio MS y el medio B5 utilizados comúnmente para cultivos *in vitro* de plantas. (Bécard y Piché, 1992). Sin embargo, este método diluido es adecuado para el cultivo de raíces.

El medio MSR (Declerck et al. 1998) es una modificación de medio A, el cual fue desarrollado para optimizar el crecimiento de la fase intraradical de los hongos *in vitro*. La composición de macro elementos de MSR es similar a la del medio M. Las diferencias entre los dos medios se dan en las concentraciones de los oligoelementos y vitaminas: el medio MSR es escaso en yodo, mioinositol, y glicina, y el medio M es escaso en pantotenato, biotina y cianocobalamina. Ambos medios se ajustan a pH 5.5 antes de autoclavar y solidificar con goma gelante (phytagel).

2.2.9 Cultivos continuos

Los primeros cultivos continuos fueron realizados por Strullu y Romand (1986) y ahora son comúnmente utilizados para un amplio rango de *Glomus* (Strullu et al. 1997; Declerck et al. 1998). Los cultivos continuos se obtienen por la transferencia tanto de raíces micorrizadas como esporas a medio fresco (Declerck et al. 1996). Si se utilizan raíces micorrizadas viejas, es posible transferirlas a cajas de petri que contengan raíces en crecimiento activo (Declerck et al. 1996, 1998; Plenchette et al. 1996; Strullu et al. 1997).

Para aquellas especies de *Glomus* que producen pocas esporas y vesículas (ej. *Glomus macrocarpum* y *G. caledonium* (Nicholson y Gerd.) (Trappe y Gerd.)

Las raíces micorrizadas y las esporas pueden ser transferidas juntas para incrementar la probabilidad de éxito.

Para aquellas especies de hongos MA que no producen vesículas internas (*Gigaspora* y *Scutellospora* sp.) se pueden subcultivar directamente pero es difícil que tengan éxito. Las muestras subcultivadas, un cuadro (10-15 cm²) de raíces no dañadas y micelio externo, son transferidas a cajas de Petri que contengan medio fresco (M. Buée y G. Bécard, datos no publicados). Alternativamente, de los cultivos viejos, las esporas producidas pueden ser utilizadas para inocular nuevas raíces (Bécard y Fortín, 1988).

2.2.10 Criopreservación de esporas producidas *in vitro*

Los métodos de cultivos continuos permiten mantener cultivos monoxénicos por largos periodos de tiempo (Plenchette et al. 1996; Strullu et al. 1997; Declerck et al. 1998) y sirven para producir y almacenar germoplasma fúngico MA. Sin embargo, como en los cultivos en macetas, estos métodos *in vitro* no garantizan la estabilidad genética del material fúngico en generaciones. Un método consiste en almacenar cultivos a 4°C. Sin embargo no existe información a cerca de la supervivencia de los inóculos en cultivo de macetas utilizando este método (Douds y Schenck, 1990). A 4°C el metabolismo de las raíces y el hongo se reduce pero no se interrumpe. Recientemente Declerck y Angelo-van Coppenolle (2000) desarrollaron una técnica de criopreservación basada en la retención de esporas de *G. intraradices* producidas monoxenicamente en gotas de alginato (~100/gotas).

Las esporas retenidas fueron incubadas por 24 horas en tetralosa 0.5 M y criopreservadas a -100°C, siguiendo dos etapas de descenso en la temperatura: un descenso lento (1°C/min.) partiendo de la temperatura ambiente hasta alcanzar los -35°C y un descenso rápido (18°C/min.) de los -35°C a los -100°C. Después de sumergir rápidamente en un recipiente con agua a temperatura ambiente, las

esporas dentro de las gotas fueron capaces de germinar, colonizar raíces de hospederos y completar su ciclo de vida *in vitro*.

Este experimento se realizó utilizando esporas de cultivos de 5 meses de *G. intraradices*. Aunque la crio conservación es una técnica de almacenamiento a largo plazo, solo una especie ha sido probada y por periodos de tiempo cortos, por lo que se requieren más trabajos para validar este método en periodos de tiempo más largos y con otras especies de hongos.

2.3 El cultivo *in vitro* de los HMA como una herramienta en la sistemática.

La taxonomía de estos hongos se basa casi completamente en la morfología de las esporas con lo que la descripción, identificación y clasificación a nivel especie es difícil. El aislamiento de los hongos MA de cultivos en macetas a menudo produce esporas con escasas hifas de sostén y/o con las capas de las paredes de la espora dañadas. Como consecuencia se han generado descripciones incompletas e inútiles de especies. Sin embargo con los sistemas de cultivo de raíces se obtiene material mucho más apropiado para el estudio de la morfología, ultraestructura, fisiología, bioquímica y para estudios moleculares.

2.3.1 Estudios Filogenéticos

La producción de esporas monoxénicos en cultivos de raíces permitió la primera amplificación de ADN ribosomal (ADNr) de hongos MA (Simon et al. 1993a). El uso de este sistema dio la seguridad de que las secuencias no eran de géneros homólogos de hongos no MA o de otros eucariontes del suelo usualmente presentes en la preparación estándar de esporas. Simon (1995) diseñó primers específicos de ADNr (VANS1). Todas las muestras de hongos de estos primers específicos a nivel de subgrupos mostraron obvias asociaciones con Glomerales.

2.3.2 Variabilidad intraespecífica

Ahora es posible realizar análisis comparativos de la ontogénesis de las esporas, arquitectura de las paredes y ultra estructura combinados con investigaciones moleculares y análisis bioquímicos.

Los cultivos de raíces facilitan el estudio de los efectos ambientales, nutricionales y fisiológicos en el crecimiento del hongo y morfología de la espora. Un rango de parámetros relacionados con la esporulación, arquitectura hifal, y ontogénesis de la espora pueden ser comparados de acuerdo con el sistema utilizado.

Las múltiples características (anatómicas, ultraestructura, bioquímicas) que se pueden generar utilizando la producción de colonias de hongos MA *in vitro* necesitan ser clasificadas de acuerdo a su significancia taxonómica para discriminar entre los parámetros medioambientales y filogenéticos. Por ejemplo las esporas diferenciadas *in vitro* pueden ser más pequeñas y menos pigmentadas que las esporas originadas en el suelo (Pawlowska et al. 1999; Dalpé, 2001).

2.4 Características fúngicas antes y después de la colonización de raíces

2.4.1 Germinación *in vitro* de esporas

El uso de los cultivos de raíces de hongos MA permite la producción aséptica de esporas de varias especies fúngicas MA, y es bueno saber que una estratificación de frío es importante para romper el estado de letargo encontrado en ciertas especies de hongos MA.

Tratamientos de frío aplicados por más de 14 días permite la completa germinación con una fuerte dominancia apical y brazos escasos como lo describe Mosse (1988). En ausencia de tratamiento en frío, sólo se ha observado un patrón

de germinación: los tubos de germinación son cortos con brazos profusos, que se enredan alrededor de las esporas y las encierran.

Muchos hongos tienen la capacidad de germinación inicial pero el tubo de germinación bloquea su crecimiento en ausencia de planta hospedera (Bonfante y Perotto, 1995).

2.4.2 Desarrollo *in vitro* de la fase extrarradical

El uso de cultivos de raíces en cajas de Petri compartimentalizadas (St-Arnaud et al. 1996) ha permitido el estudio de lapsos de tiempo del desarrollo del micelio extrarradical en compartimentos libres de raíces. Cuando se compararon el amonio y los nitratos como fuente de N, Villegas (2001) encontró que la presencia de amonio en el compartimento distal reduce drásticamente la producción de esporas. También se encontró que en presencia de amonio, el micelio de la fase extrarradical desarrolló ovillos hifales y agregaciones de hifas que nunca se observan en presencia de nitratos. Investigaciones ultraestructurales revelaron que los BAS (por las siglas en inglés branched absorbing structures) (Bago et al. 1998b) son muy similares a los arbuscúlos intrarradicales y que al igual que los arbuscúlos son sitios de intensa actividad metabólica y son muy parecidos en su morfología.

El incremento de la acidez del medio coincide con una alta producción de esporas asociadas a BAS. Este cambio de pH podría ser consecuencia directa de la gran cantidad de fosfatos absorbidos que proveen de productos almacenados a las esporas (Bago et al. 1998a, 1998b).

2.5 Aspectos fisiológicos de la relación hospedero- hongo

Mediante el uso de cultivos de raíces MA se ha podido investigar sobre la señalización entre los dos integrantes de la simbiosis y el metabolismo del hongo.

2.5.1 Señalización entre integrantes

La germinación de la espora generalmente no requiere la presencia de la raíz del hospedero, sin embargo para el crecimiento y desarrollo del hongo MA se requiere la presencia de un hospedero adecuado (Mosse y Hepper, 1975; Elías y Safir, 1987; Bécard y Piché, 1989b; Giovannetti et al. 1993, 1996).

Durante esta etapa el metabolismo del hongo es predominante dependiente del catabolismo de lípidos para la futura biosíntesis, el catabolismo de los lípidos permite la formación de acetyl CoA, 2 moléculas de C, que después se oxida en el ciclo de Krebs y el balance neto de C es teóricamente cero.

Poco se sabe sobre la naturaleza química de compuestos estimulatorios producidos por la raíz. Varios flavonoides y ácidos fenólicos han sido estudiados encontrando que algunos flavonoides son altamente estimulatorios (Vierheilig et al. 1998). Esto sugiere que existe cierto grado de actividad química y esteroespecífica que quizá varía entre especies fúngicas. Por ejemplo, isoflavonoides como la biocanina A y formononetina estimulan algunas especies de *Glomus* (Nair et al. 1991; Poulin et al. 1997) pero inhiben a *G. etunicatum* (Tsai y Phillips, 1991) y *Gi. rosea* (Bécard et al. 1992; Chabot et al. 1992b).

Experimentos *in vivo* e *in vitro* muestran que la formación de la micorriza y el crecimiento y desarrollo normal del hongo puede lograrse en ausencia de flavonoides. Recientes investigaciones muestran que algunas fracciones de exudados de raíz purificados (sin compuestos químicos estimulatorios) tienen fuerte efecto en las ramificaciones del hongo (Nagahashi y Douds, 1999) y la proliferación celular (Buée et al. 2000).

2.5.2 Metabolismo del integrante fúngico

El sistema de cajas de Petri compartimentalizadas (St-Arnaud et al. 1996) es particularmente útil para el estudio de la absorción de nutrientes y translocación en hongos MA bajo condiciones estrictamente controladas. También permite la diferenciación entre el metabolismo fúngico intra y extra radical (Bago et al. 2000).

Previamente algunos estudios utilizando análisis espectroscópicos NMR de fragmentos de raíces micorrizadas de poro (Shachar-Hill et al. 1995) y experimentos respirométricos en raíces micorrizadas de cebolla (Solaiman y Saito, 1997) muestran que la glucosa es la mayor fuente de C proporcionada por las plantas. La $^{13}\text{C}_1$ -glucosa y la $^{13}\text{C}_1$ -fructuosa que se suministran exógenamente son rápidamente asimiladas por el hongo y convertidas en trehalosa, glicógeno y lípidos. La absorción del azúcar se lleva a cabo exclusivamente en el micelio interno del hongo. Cuando se le adicionan estos azúcares marcadores al micelio externo, no fue posible encontrar estos marcadores en el hongo. Este dato indica que el papel de la raíz es disparar los mecanismos para la absorción y metabolismo de azúcares simples (glucosa y fructuosa) por el hongo MA.

Esto sugiere que la sacarosa que se adiciona al medio y que es almacenada por las raíces micorrizadas *in vitro*, es utilizada por el hongo como fuente de carbono.

Es posible especular que el hongo posee todos los genes necesarios para el crecimiento independiente pero que algunos de ellos son regulados por la planta hospedera, especialmente los relacionados con el metabolismo del C.

Los sistemas compartimentalizados han sido utilizados por Joner et al. (2000) y Koide y Kabir (2000) para estudiar el transporte de P por las hifas extrarradicales de *G. intraradices*, que encontraron que hay varias fuentes orgánicas de P como: fitatos, 5-bromo-4cloro-3indolyl fosfatos y di fosfato fenolftaleína, que pueden ser hidrolizados y utilizados como fuentes de P para el hospedero.

2.6 El Aluminio como metal pesado

Los metales pesados son liberados al ambiente como consecuencia de la mineralización natural de las rocas, pero sobre todo debido a las actividades humanas tales como la minería, industrias diversas, combustión de energéticos fósiles y uso de fertilizantes fosfatados. En México la minería es una de las principales fuentes de contaminación ambiental por MP debido a la acumulación de desechos sólidos denominados jales (Rivera-Becerril 2006).

Los metales pesados se encuentran agrupados en una categoría de 53 elementos con peso específico mayor a 5g/cm.³ (Holleman y Wiberg, 1985). Los elementos traza tales como Cu, Fe, Ni y Zn resultan esenciales para un desarrollo normal de las plantas. Los metales pesados como Cd, Pb, Hg y As no son esenciales (Mertz, 1981). Para las plantas terrestres la raíz es el órgano que entra inmediatamente en contacto con los iones metálicos, en la adquisición de la interfase planta y suelo, la homeostasis de los metales pesados (MP) esenciales debe estar bien controladas por la planta para estabilizar la deficiencia o el exceso de estos. Dado que muchas especies de plantas son sensibles a concentraciones micro molares de Al el potencial para que los suelos sean tóxicos por la presencia del Al es considerable.

El aluminio es el metal más abundante en la corteza terrestre comprendiendo aproximadamente el 7% de su masa y es un metal pesado ya que

en pequeñas concentraciones afecta el desarrollo de las plantas (Delhaize y Ryan, 1995). Generalmente se encuentra en forma de aluminio-silicatos y conforme el pH del suelo disminuye, se solubiliza.

La toxicidad del aluminio ha sido reconocida como el factor limitante más importante para la producción agrícola en suelos ácidos.

Las plantas jóvenes son más susceptibles que las plantas maduras. El Al aparentemente no interfiere en la germinación de la semilla pero deteriora el crecimiento de nuevas raíces y el establecimiento de la plántula (Nosko et al. 1988).

La mayoría de las plantas contienen no más de 0.02 mg de Al por gramo de peso seco, sin embargo se sabe que algunas plantas que son acumuladoras de Al pueden contener 10 veces más de Al sin ser dañadas (Mossor-Pietraszewska 2001). Jackson (1967) estableció que la correlación entre el contenido de Al en el follaje de plantas de cultivo y la toxicidad del Al era mas bien raro, también estableció que los efectos tóxicos de Al pueden ser resultado de un exceso en el medio de crecimiento con poco o ningún cambio de su contenido en el follaje.

Henning (1975) reportó que mucho del Al absorbido por las raíces de trigo penetraba el límite entre el ápice de la raíz y la primera capa y se acumulaba en el núcleo y citoplasma de las células adyacentes de esta zona. Parte del Al pasa a través de la epidermis y del cortex pero una cantidad considerable es retenida en las células corticales.

Las primeras evidencias de la toxicidad del aluminio aparecen en el sistema radical, el cual se ensancha como resultado de la inhibición de la elongación del eje principal y lateral de la raíz, las raíces laterales se tornan delgadas y algunas veces de coloración café (Mossor-Pietraszewska, 2001). Las raíces se vuelven ineficientes para la absorción de nutrientes y agua.

Se ha reportado que el Al interfiere con la división celular en la punta de la raíz y las raíces laterales, incrementa la rigidez de las paredes celulares por adición de pectinas, reduce la replicación de DNA por incremento en la rigidez de su doble hélice, la fijación del fósforo en su forma menos disponibles en el suelo y en la superficie de la raíz de la planta, disminuye la respiración de la raíz, interfiere con varias enzimas, reduce la deposición de polisacáridos y la pared celular, modifica la estructura y función de la membrana plasmática e interfiere con la absorción, transporte y metabolismo de muchos nutrientes esenciales así como en la absorción de agua (Mossor-Pietraszewska, 2001). Se dice que en una solución nutritiva con concentraciones micromolares de Al se puede inhibir el crecimiento de la raíz en un tiempo de 60 minutos (Delhaize y Ryan, 1995).

Es de amplio conocimiento que los principales factores limitantes del crecimiento de plantas en suelos ácidos son la fitotoxicidad de Al y deficiencia de P (Mora 1993). Ambos factores se presentan normalmente asociados (Baligar et al. 1993). La fitotoxicidad de Al involucra un efecto nocivo directo del ion aluminio en el crecimiento de las plantas y una reducción de la disponibilidad de fosfato del suelo, causado por la precipitación de fosfato aluminio (Lindsay, 1979).

El transporte del P entre la raíz y el tallo disminuye con el incremento en las concentraciones del Al en la raíz (Rout et al. 2001).

El Al también interfiere en la absorción y transporte de K, Ca y Mg. La inhibición del crecimiento de la raíz y el daño en su estructura principalmente la pérdida de las paredes celulares se debe a la deficiencia o reducción del transporte de Ca (Rout et al. 2001). El transporte de Ca dentro de la raíz es más intenso en los ápices que también son los sitios primarios de acumulación y toxicidad de Al (Taylor, 1988). La interacción entre el Al y el Ca es el factor más importante que afecta la absorción de Ca y su transporte en plantas que crecen en suelos ácidos ya que con un incremento en los niveles de Al la concentración de Ca en tallos y raíces disminuye drásticamente (Jones et al. 1998). Se ha visto

también que la acumulación de Ca y Mg disminuye a causa del Al de manera más significativa que la absorción de otros nutrientes minerales importantes (Rengel y Robinson, 1989).

Las concentraciones de Al y Mn solubles a menudo elevan la toxicidad de suelos ácidos ya que a altas concentraciones de Al (por arriba de 100 μM) disminuye la acumulación de Mn en los tallos de igual manera a altas concentraciones de Mn (por arriba de 50 μM) se incrementa la acumulación de Al en raíces y tallos (Mossor-Pietraszewska, 2001).

2.7 Los HMA y los metales pesados

Los hongos y las plantas están expuestos a la contaminación por MP en el suelo, pero la simbiosis micorrizica incrementa la tolerancia a la misma (Gildon y Tinker, 1983). En altas concentraciones los MP interfieren con actividades enzimáticas esenciales por modificación de la estructura proteica o por el emplazamiento de elementos vitales dando como resultado síntomas de deficiencia en la planta. La membrana plasmática es particularmente vulnerable a la toxicidad de MP, desde la permeabilidad de la membrana y de esta manera su funcionalidad puede ser afectada por la alteración de proteínas membranales intrínsecas como H^+ -ATPasas (Hall, 2002). La producción de oxígeno reactivo ocasiona daño oxidativo en los tejidos de las plantas, que se presenta debido a los niveles altos de MP. Como una consecuencia de esto, se presentan en la planta los síntomas de toxicidad tales como clorosis, retraso en el crecimiento, oscurecimiento en raíces y efectos en los dos fotosistemas.

Los HMA son de gran importancia porque ellos juegan un papel importante y un rol vital en la tolerancia y acumulación de metales (Del Val et al. 1999a, Jamál et al. 2002). Algunos reportes indican que existe una menor captación de metales pesados en la planta debido a los HMA (Joner y Leyval, 1997).

Los HMA se encuentran en el suelo en la mayoría de los ecosistemas, incluyendo suelos contaminados. Los HMA mejoran el estado nutricional de sus hospederos (plantas) por medio de adquisición de fosfatos y micronutrientes. Los metales pesados también son absorbidos por la vía de la hifa fúngica y pueden ser transportados a la planta. De esta manera en algunos casos las plantas micorrizadas pueden demostrar aumento en la toma de metales pesados y estos pueden ser transportados de la raíz al tallo, mientras que en otros casos los HMA contribuyen a la inmovilización de los metales pesados en el suelo. El resultado de la eficiencia de colonización micorrízica como descontaminante de suelos depende de la combinación de la planta/hongo/metal pesado y de su influencia en las condiciones del suelo (Gaur y Adholeya, 2004).

Varias especies de HMA pertenecientes a diferentes géneros han sido aisladas de suelos contaminados mostrando que una diversidad considerable puede existir en esos ecosistemas. Por ejemplo seis especies del genero *Glomus* fueron aisladas de suelos a los que se habían adicionado lodo de tratamiento conteniendo Cd y Pd, pero se observó un decremento del número total de esporas, así como en la riqueza y diversidad de especies fúngicas cuando se incrementaron las concentraciones de MP en el sustrato (Del Val et al. 1999b). Sin embargo las esporas de HMA nunca desaparecen completamente en suelos con los más altos rangos de contaminación, sugiriendo una cierta adaptación de los HMA al estrés ambiental.

El efecto de la inoculación con HMA sobre la acumulación de metales pesados es variable entre las diferentes especies de plantas (Malcova, et al. 2003) y depende del metal pesado que se trate (Kaldorf et al. 1999).

Se han propuesto diferentes estrategias para explicar el efecto protector de la micorriza arbuscular contra los MP. La primera de ellas se atribuye al mejor estado nutricional favorecido por las redes hifales que proveen nutrimentos del suelo a la planta. Otra de las estrategias se refiere a que los organismos

restringen la captación del metal (Leyval et al. 1997). Por ejemplo se ha reportado que la glomalina, una glicoproteína insoluble producida y excretada de forma abundante por las hifas de los HMA secuestra elementos tóxicos (González-Chávez et al. 2004). Así mismo las células fúngicas tienen una alta capacidad de absorción de metales gracias a la presencia de grupos carboxilo, amino, hidroxilo, fosfato y sulfhidrilo, así como a la quitosana y quitina (Joner et al. 2000).

El secuestro de metales en el citoplasma fúngico y vegetal por metalotioninas y fitoquelatinas se ha propuesto como otro mecanismo posible de tolerancia en la micorriza arbuscular.

3. HIPOTESIS

Dado que se ha reportado que los HMA contribuyen aumentando la tolerancia de las plantas a concentraciones altas de MP como el Al, se espera que en el presente trabajo, las raíces asociadas a HMA en cultivos *in vitro* muestren menos síntomas de daño ocasionado por Al, que aquellas que se desarrollen en ausencia de los HMA.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Aluminio sobre el crecimiento y desarrollo de raíces y *Glomus intraradices*, cultivados *in vitro*.

Objetivos particulares

1. Evaluar la cantidad de estructuras de los HMA (hifas, esporas, raíz, BAS) de *G.intraradices* desarrollados en cultivo de raíces *in vitro*, con diferentes concentraciones de Aluminio; para determinar si hay un efecto diferencial sobre las distintas estructuras.
2. Cuantificar la biomasa del micelio de *G.intraradices* en cultivo de raíces *in vitro*, con diferentes concentraciones de Aluminio, tanto en exposición aislada como en exposición conjunta con las raíces, para determinar si la respuesta del hongo y de la planta son diferentes cuando se exponen juntas o por separado al medio.
3. Cuantificar la biomasa de las raíces transformadas en ausencia del hongo.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Preparación de medio de cultivo

El medio mineral más ampliamente utilizado para los cultivos de Hongos Micorrizicos Arbusculares es el medio mínimo (M) (Bécard y Fortín, 1988) (cuadro 1) y el medio modificado de Strullu y Romand (MSR) (Declerck et al. 1996; Diop, 1995) modificados por Strullu y Romand (1986). Ambos medios son resultados de modificaciones empíricas a los medios usualmente utilizados para el cultivo *in vitro* de plantas y que son igualmente útiles para una gran cantidad de Hongos Micorrizicos Arbusculares.

Composición del medio mínimo "M"	Cantidades
N(NO ₃ ⁻), μM	3,200
N(NH ₄ ⁺), μM	-
P(μM)	30
K (μM)	1,735
Ca (μM)	1,200
Mg (μM)	3,000
S (μM)	3,000
Cl (μM)	870
Na (μM)	20
Fe (μM)	20
Mn (μM)	30
Zn (μM)	9
B (μM)	24
I (μM)	4.5
Mo (μM)	0.01
Cu (μM)	0.96
Pantotenato de Calcio (μM)	-
Biotina (μM)	-
Piridoxina (μM)	0.49
Tiamina (μM)	0.3
Cianocobalina (μM)	-
Acido Nicotínico (μM)	4
Glicina (mg/l)	3
Mio-inositol (mg/l)	50
Sacarosa (g/l)	10
pH	5.5
Phytigel (g/l)	5

Tabla 1. Composición del medio mínimo (M)

Para la preparación de 1 litro de medio de cultivo “M” llenar un frasco Schott con 500 ml de agua y posteriormente añadir las siguientes soluciones (Tabla 2):

- 1.- 25 ml de la solución 1 que son los macro elementos
- 2.- 5 ml de la solución 2 que contiene KH_2PO_4
- 3.- 5 ml de la solución 3 Nitrato de Calcio
- 4.- 1 ml de la solución 4 Na-Fe-EDTA
- 5.- 1 ml de la solución 5 que son los micros elementos
- 6.- 10 ml de la solución 6 vitaminas
- 7.- 10 gramos de sacarosa como fuente principal de Carbono
- 8.- aforar con 455 ml de agua y agitar. Ajustar el pH a 5.5 con KOH (0.1N)
- 9.- Añadir 3.5 g/L de phytigel, agitar y tapar.
- 10.- autoclavar durante 20 minutos a 121°C , dejar enfriar y vaciar a las placas en condiciones de esterilidad.

SOLUCION	SOLUCION MADRE	CANTIDAD
Solución 1	MACROLELEMENTOS ▪ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ▪ KNO_3 ▪ KCl	29.24 g/L 3.20 g/L 2.60 g/L
Solución 2	KH_2PO_4	0.960 g/L
Solución 3	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	57.6 g/L
Solución 4	Na-Fe-EDTA	800 mg/100 mL
Solución 5	MICRO ELEMENTOS ▪ KI ▪ $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ▪ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ▪ H_3BO_4 ▪ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ▪ Solución A=24 mg Na_2MoO_4 en 100 mL	75 mg/100 mL 600 mg/100 mL 265 mg/100 mL 150 mg/100 mL 13 mg/100 mL 1 ml/100mL
Solución 6	VITAMINAS ▪ Glicina ▪ Mio-inositol ▪ Acido nicotínico ▪ Solución B = 20 mg de tiamina y 20 mg de piridoxina en 10 ML.	150 mg/500 mL 2.5 g/500 mL 25 mg/500 mL 2.5 ml/500 mL

Tabla 2. Soluciones madre para el medio de cultivo M.

NOTA: la cantidad de las diferentes soluciones dependerá de la cantidad de medio de cultivo que se necesite preparar. Las soluciones utilizadas para la preparación del medio de cultivo se preparan por separado para posteriormente colocarlos en frascos Schott, y utilizar la cantidad necesaria para la preparación del medio.

La solución madre 6 debe almacenarse en congelación hasta el momento de su uso. Se recomienda distribuirla en viales pequeños para utilizar y descongelar solamente lo que sea necesario, viales con 10 ml son ideales para preparar volúmenes de 1 litro.

5.1.1 Preparación de medio de cultivo “M” con Aluminio

NOTA: se realizó el mismo procedimiento para la preparación del medio de cultivo “M” con la única diferencia que después de agregar la solución 6, se le adicionó el Aluminio en forma de Cloruro de Aluminio ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{PM}=241.43$) en la cantidad que se requirió y para lo cual se utilizó la siguiente fórmula:

$$V_1C_1 = V_2C_2 \quad \text{Por lo tanto tenemos que: } C_2 = \frac{V_1C_1}{V_2}$$

Donde: V_1 = cantidad de medio de cultivo que se necesita (1/2, 1, 2,3 litros, etc.)
 C_1 = concentración que se requiere de Aluminio (50,100 y 200 μM)
 V_2 = volumen en que se encuentra el Stock de Aluminio = 100 μM
 C_2 = ¿? Cantidad de Aluminio que se le adiciona al medio de cultivo.

5.2 Propagación de raíces transformadas en cultivo *in vitro*

5.2.1 Metodología para el establecimiento de cultivo axénico

Para el experimento se utilizaron raíces transformadas de zanahoria con el gen Ri y esporas de *Glomus intraradices*. Una vez que se obtuvieron las raíces transformadas con *Agrobacterium rhizogenes* se procedió a su resiembra en medios de cultivo “M” para mantenerlas en cultivos axénicos.

1. Para iniciar el cultivo se remueven con mucho cuidado los ápices de apariencia blanca, saludable y turgente con una longitud mínima de 5-8 cm de la caja de Petri en la que se encuentra.
2. Con pinzas colocar dos raíces con ápices con crecimiento activo en cajas de Petri de 9 cm de diámetro que contenga medio "M" fresco (los dos ápices deben ser puestos en sentido opuesto para favorecer su crecimiento).
3. Cuando las raíces se colocan en el medio se presiona suavemente en el ápice para conseguir que estén en contacto con el gel, el proceso debe ser muy cuidadosa para evitar romper el ápice.
4. Sellar las cajas de Petri con adhesivo plástico e incubar en posición invertida a una temperatura de 25°C en la oscuridad.

5.2.2 Metodología para el establecimiento de cultivo monoxénico

1. Seleccionar la planta hospedera (raíces transformadas de zanahoria) de 5-8 cm de longitud con pocos ápices de 2-3 semanas de crecimiento en cultivos.
2. Con un bisturí cortar un pedazo de inóculo asociado.
3. Transferir el pedazo de inóculo en el medio de cultivo.
4. Con un bisturí cortar dos pedazos de raíz y colocar cuidadosamente cerca del inóculo asociado que esta en el medio de cultivo.
5. Sellar la caja de Petri con plástico adherente e incubar en posición invertida a 25°C en oscuridad.

5.3 Diseño experimental

El experimento se realizó en el periodo de Septiembre de 2007 a Agosto de 2008 en el Laboratorio de Genética y Microbiología de la Facultad de Biología de la U.M.S.N.H. En este experimento se utilizaron esporas de *Glomus intraradices* y raíces transformadas de zanahoria, y medios de cultivo M puro y medios de cultivo con Aluminio a diferentes concentraciones. Para la siembra de estos medios se utilizaron cultivos axénicos y monoxénicos, teniendo para cada experimento cultivos testigos sin Aluminio, utilizando técnicas diferentes de inoculación con la finalidad de determinar el método más adecuado a nuestras necesidades y fueron: corte del cultivo con bisturí en fragmentos, con la técnica de sacabocado y la técnica de dilución del medio con Citrato de Sodio para recuperar las esporas y micelio para medir el peso seco. Después de la siembra se dejaron en incubación a 25°C y el reporte de cada cultivo se realizó cada 7 y 15 días evaluando para cada cultivo diferentes características morfológicas.

5.4 Variables a evaluar

En los cultivos axénicos las variables a evaluar fueron: crecimiento de raíces secundarias y peso seco.

En los cultivos monoxénicos: conteo de estructuras, cantidad de hifas, cantidad de esporas, raíz, peso seco de la raíz, peso seco del micelio. En este experimento se realizó el conteo de las estructuras con la técnica de intersecciones en la cuadrícula (Tabla 3).

CULTIVO	CAJA	TRATAMIENTO	REPLICAS	TIEMPO DE REPORTE	VARIABLES A EVALUAR	VARIABLES A EVALUAR
Axénico	1 compartimento	Control 50 μ M Al 100 μ M Al 200 μ M Al	10 replicas para cada tratamiento	15 días	Raíz	Crecimiento de raíces secundarias Peso seco
Monoxénico	1 compartimento	Control 50 μ M Al 100 μ M Al 200 μ M Al	10 replicas para cada tratamiento		Conteo de estructuras: Hifas Esporas Raíz	<u>Raíz:</u> Peso seco <u>Hongo:</u> Peso seco del micelio Peso seco de la raíz.

Tabla 3. Variables a evaluar en cultivos axénicos y monoxénicos.

5.5 Diseño estadístico

Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey, a un nivel de significancia de 0.05. El tratamiento estadístico se realizó utilizando el programa JMP (versión 6.0).

6. RESULTADOS

6.1. Cuantificación de estructuras de los HMA: *Glomus intraradices*

Al evaluar la cantidad de estructuras de *Glomus intraradices* desarrolladas en los diferentes tratamientos de aluminio con la finalidad de determinar el efecto que éste tiene sobre el hongo se encontró que las concentraciones utilizadas no afectaron el desarrollo del HMA ya que la cantidad de estructuras en los diferentes tratamientos no mostró diferencias significativas ($P \geq 0.05$ ANOVA) (Figura 4). Esto es contrario a lo señalado por otros autores (Del Val et al. 1999; Jamal et al. 2002) que mencionan que la cantidad de esporas, por ejemplo, disminuye al incrementar la cantidad de metales pesados como Cu, Pb y Zn, aunque este resultado puede deberse a que en el presente experimento se utilizó un metal diferente (Al) y las concentraciones utilizadas fueron diferentes además de que esos trabajos se desarrollaron en campo y no *in vitro*, por lo que sería conveniente realizar pruebas a concentraciones mayores y bajo condiciones de campo.

Las estructuras que se desarrollaron en mayor cantidad fueron las hifas que superaron la cantidad de esporas y de raíces, presentando un mayor número en ausencia de Al ($P \geq 0.05$), mientras que en las esporas no se observó alguna tendencia y en todos los tratamientos las cantidades encontradas fueron semejantes incluyendo el tratamiento control (Figura 4).

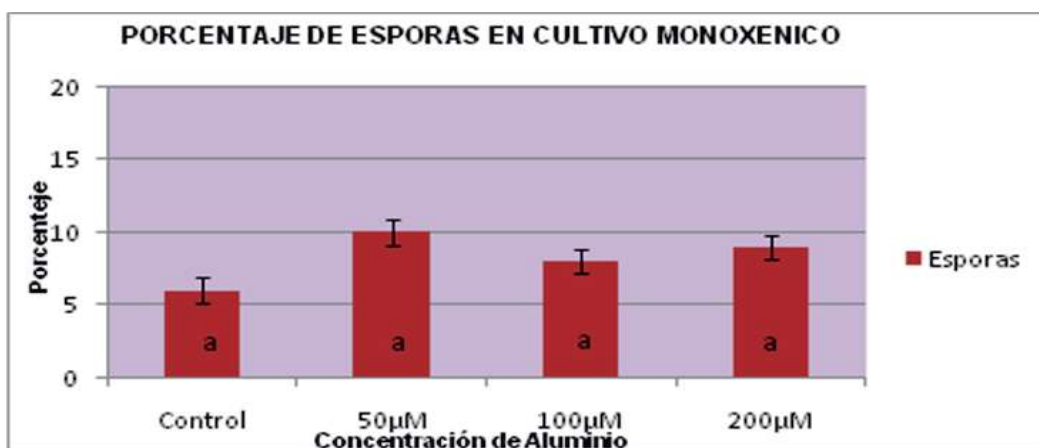
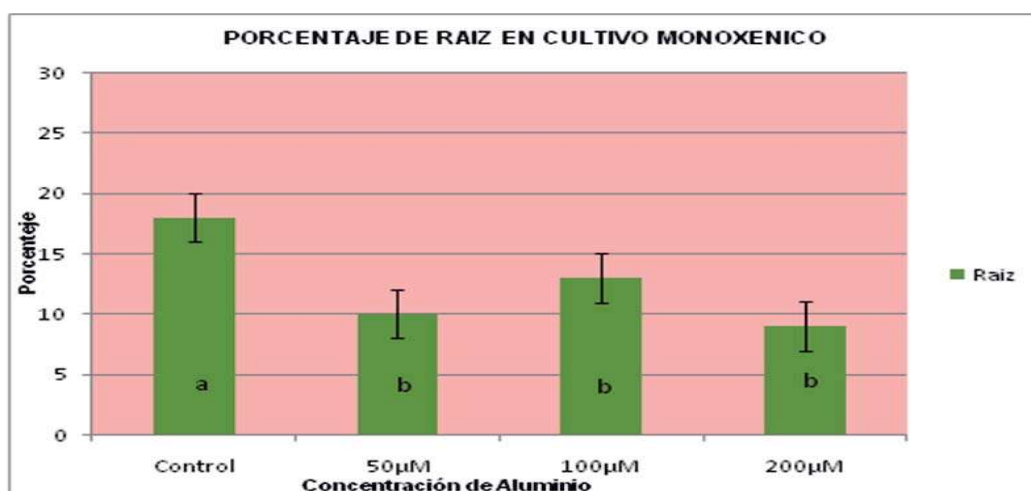
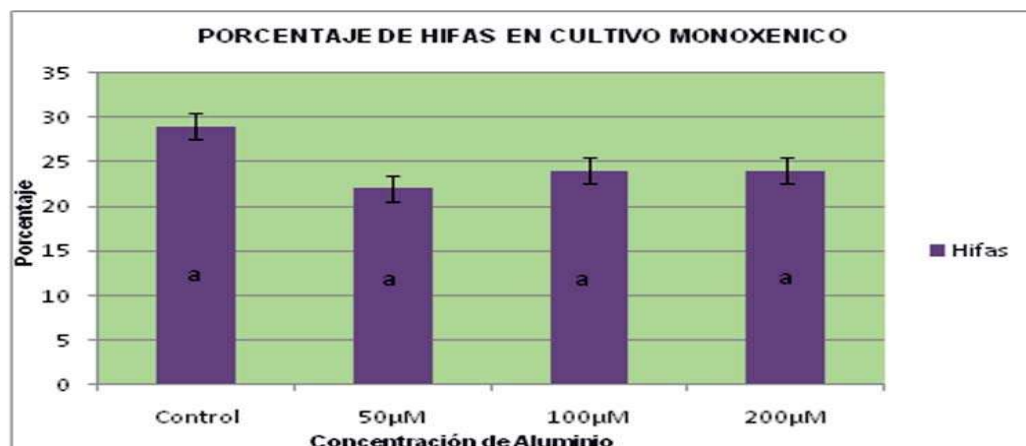


Figura 4. Comparación de promedios obtenidos por estructura de *Glomus intraradices* en diferentes concentraciones de Al en cultivo monoxénico ($P=0.05$). Letras diferentes en cada figura indican diferencia significativa al interior de cada tipo de estructura.

6.2. Cuantificación de la biomasa de raíz y micelio de *Glomus intraradices* en cultivo monoxénico

Al comparar el efecto del Aluminio en cultivos monoxénicos de raíz y HMA se observó que el micelio aumenta su biomasa al aumentar la concentración del metal, alcanzando sus máximos valores a 200µM en donde casi duplicó su peso en comparación con el control y demás tratamientos ($P \geq 0.05$) (Figuras 5 y 6). La raíz, en cambio disminuyó su biomasa en los medios con Al en comparación con el control. ($P \geq 0.05$) (Figura 5).

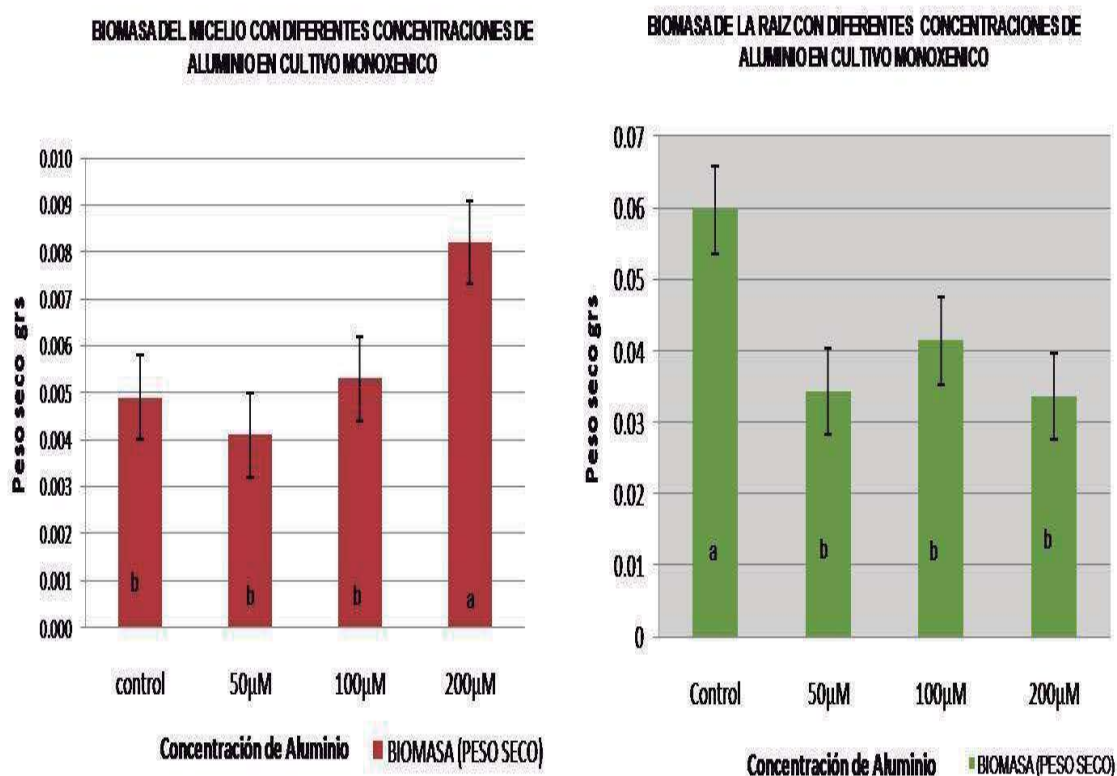


Figura 5. Comparación de biomasa de raíz y micelio a diferentes concentraciones de Aluminio ($P \geq 0.05$). Letras diferentes indican diferencia significativa al interior de cada tipo de estructura.

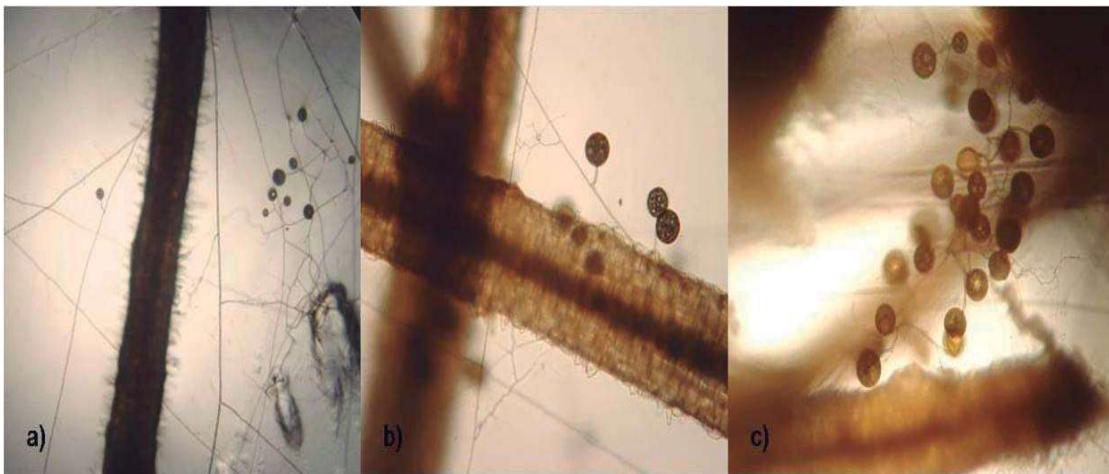


Figura 6. Comparación de cantidad de esporas a diferentes concentraciones de Al. a) Esporas y micelio a 50 μM a 10x, b) a 100 μM a 10x c) 200 μM a 10x.

La respuesta observada en la raíz es entonces inversa a la respuesta del hongo. En cultivo monoxénico el HMA respondió a los tratamientos desarrollando mayor biomasa de micelio conforme aumentó la concentración de Al lo que nos indica su capacidad de tolerancia al metal, mientras que la raíz respondió disminuyendo dicha biomasa a concentración de 200 μM mostrando el efecto negativo que el Al tiene en ella.

6.3. Cuantificación de la biomasa de las raíces transformadas en cultivo axénico

Al analizar la respuesta de las raíces en cultivos axénicos se observó que el valor más alto de la biomasa producida se encuentra en el tratamiento al cual no se le adicionó Aluminio (Figura 8). Delhaize y Ryan (1995) que mencionan que el síntoma más fácil de reconocer la toxicidad del Al es la inhibición del crecimiento de la raíz, lo que se observó en las raíces sometidas a las concentraciones más altas de Al tanto en cultivos axénicos como monoxénicos ($P \geq 0.05$) siendo más notorio en la concentración de 200 μM de Al del cultivo axénico (Figuras 7 y 8).

Además se observó que el tamaño alcanzando por las raíces en cultivo axénico sin Aluminio es semejante a los obtenidos en presencia del metal pero en asociación con el hongo (Figura 7).

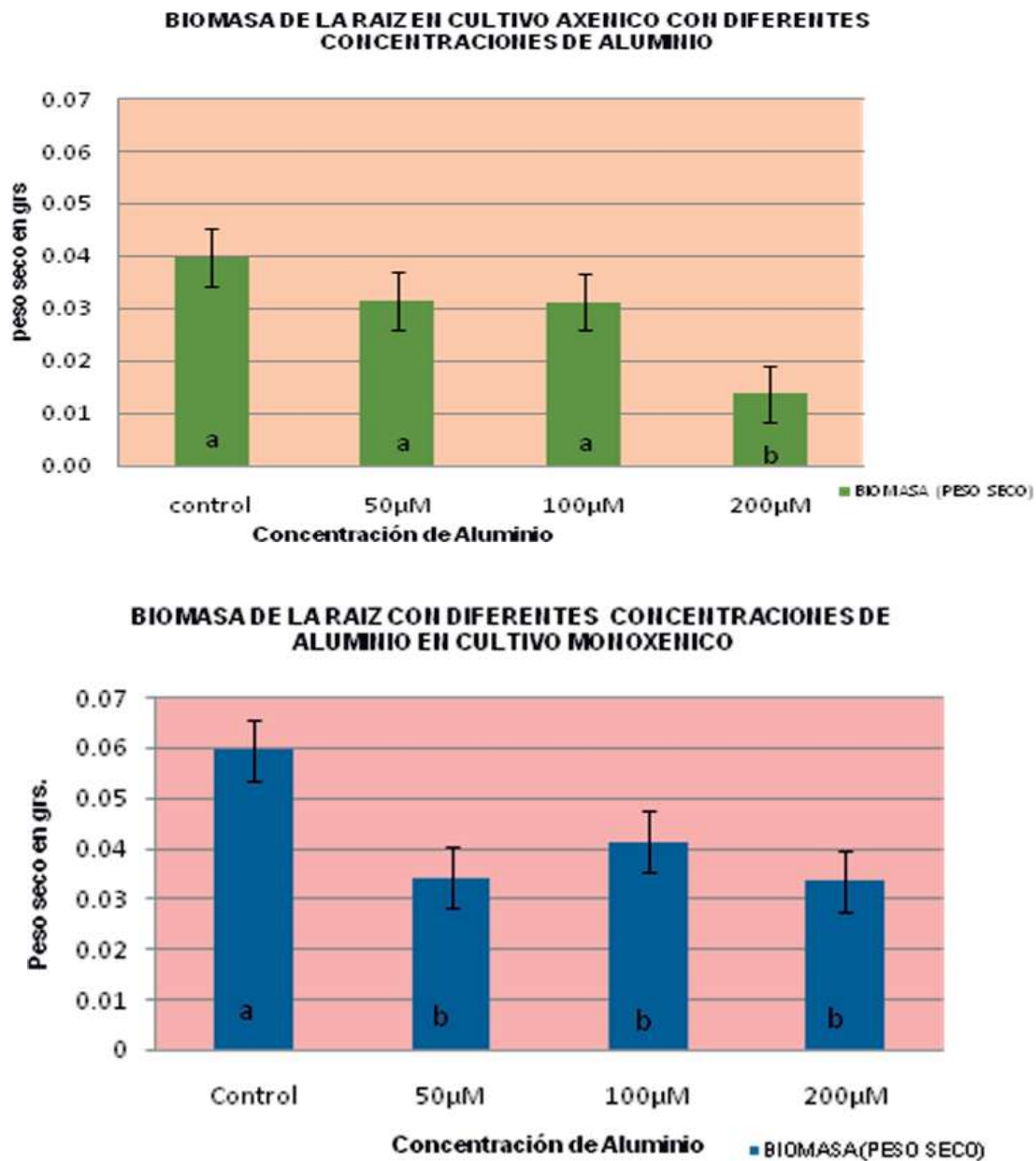


Figura 7. Biomasa de la riaz en cultivos axénicos y monoxénicos a diferentes concentraciones de Al ($P \geq 0.05$).

En cultivo monoxénico la cantidad de biomasa en raíces sin adición de Al fue significativamente más alta en comparación con las raíces tratadas con Al ($P \geq 0.04$) mientras que en las tres concentraciones de aluminio las raíces mostraron un decremento en su crecimiento, sin embargo esta disminución fue menos notoria (0.033, 0.034, 0.041) que la observada en los tratamientos sin presencia del hongo en los cuales la biomasa fue menor en el cultivo control (0.039 el valor más alto) (Figura 7 y 8), lo que nos indica que la presencia del hongo en los medios con aluminio puede contribuir al incremento y quizá aumentar la tolerancia de la raíz tal como lo señalan Joner y Leyval (1997) en presencia de otros metales pesados, aunque los resultados obtenidos no muestran claramente este efecto por lo que se requieren más estudios.

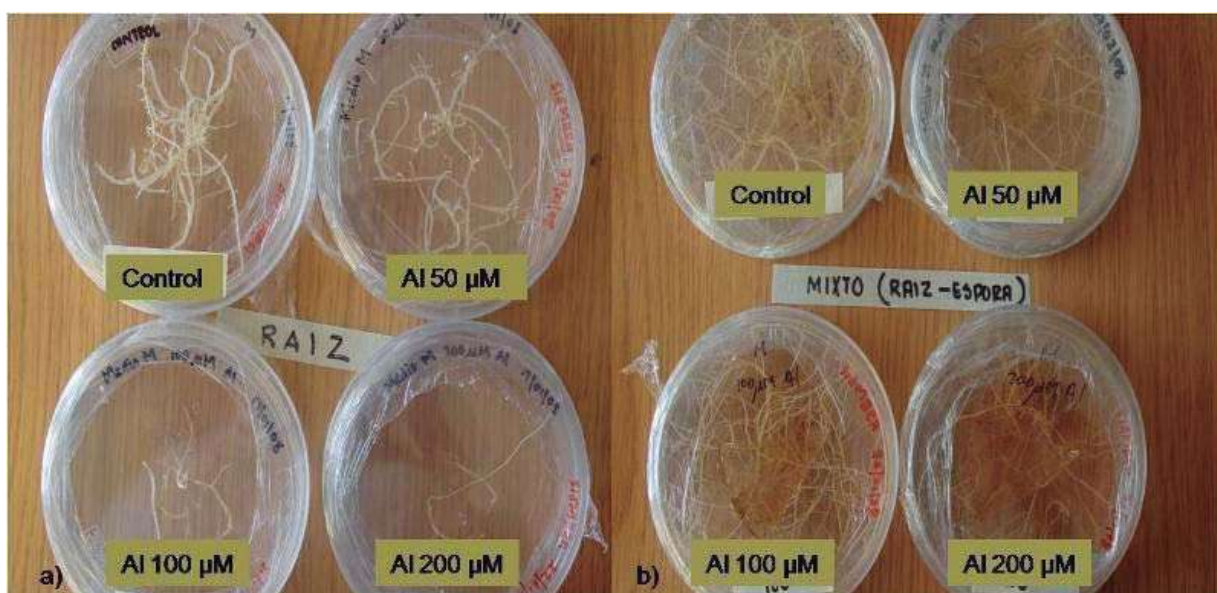


Figura 8. Desarrollo de raíz en cultivos axénico y monoxénico con diferentes tratamientos de Al. a) raíces en cultivo axénico a los 21 días y b) raíces en cultivo monoxénico.

Algunos autores señalan, en el caso de ectomicorrizas, que la acumulación de este metal en las paredes celulares y citoplasma del hongo asociado a las raíces da como resultado una menor transferencia de este metal hacia la raíz (Mossor-Pietraszewska, 2001).

6.4. Crecimiento de la raíz a diferente tiempo en cultivo axénico

Al analizar el crecimiento y desarrollo de la raíz sin la presencia del hongo se encontró que el crecimiento fue mayor y mas rápido hasta los 21 días en los tratamientos control y 50 μ M, a los 36 días estas raíces fueron las que presentaron mayor crecimiento acumulado y mayor cantidad de raíces secundarias, así como una coloración blanca a crema y de mayor grosor (Figura 8).

TRATAMIENTO	CRECIMIENTO (en cm)		CRECIMIENTO ACUMULADO (A LOS 36 DÍAS)	CRECIMIENTO (en cm)	CRECIMIENTO ACUMULADO (A LOS 48 DÍAS)
	21 DIAS	36 DIAS		48 DIAS	
control	1.92 $\pm$ 1.54	1.46 $\pm$ 1.15	3.38 $\pm$ 2.20	1.73 $\pm$ 1.38	5.1 $\pm$ 2.99
50 μ M	1.89 $\pm$ 1	1.18 $\pm$ 0.51	3.06 $\pm$ 1.47	2.21 $\pm$ 1.14	5.28 $\pm$ 2.61
100 μ M	1.29 $\pm$ 1.23	1.50 $\pm$ 1.64	2.78 $\pm$ 2.58	2.39 $\pm$ 1.16	5.18 $\pm$ 3.34
200 μ M	1.33 $\pm$ 0.93	1.97 $\pm$ 2.81	3.3 $\pm$ 2.97	1.68 $\pm$ 2.71	4.98 $\pm$ 5.59

Tabla 4. Crecimiento de raíz y tamaño acumulado a diferente tiempo en las diferentes concentraciones de Al.

Las raíces en los medios con concentraciones de 100 y 200 μ M a los 21 días de tratamiento fueron las que presentaron menor crecimiento (1.2 y 1.3 cm respectivamente) (Tabla 4), desarrollando muy pocas raíces laterales que eran más delgadas en comparación con las raíces del tratamiento control y con una coloración de amarilla a café (Figura 8), lo que concuerda con lo señalado por otros investigadores (Rout et al. 2001; Kinraide,1988; Roy et al. 1988) sin embargo a los 36 días casi igualaron el crecimiento alcanzado en los demás tratamientos. De tal manera que a los 48 días el crecimiento acumulado de las raíces en concentraciones de 200 μ M fueron solo ligeramente inferiores a las raíces del resto de los tratamientos (Figura 9).Esto puede ser reflejo de que a este tiempo las raíces de todos los tratamientos alcanzaron su crecimiento máximo igualando su tamaño, reflejo de la capacidad máxima del sistema.

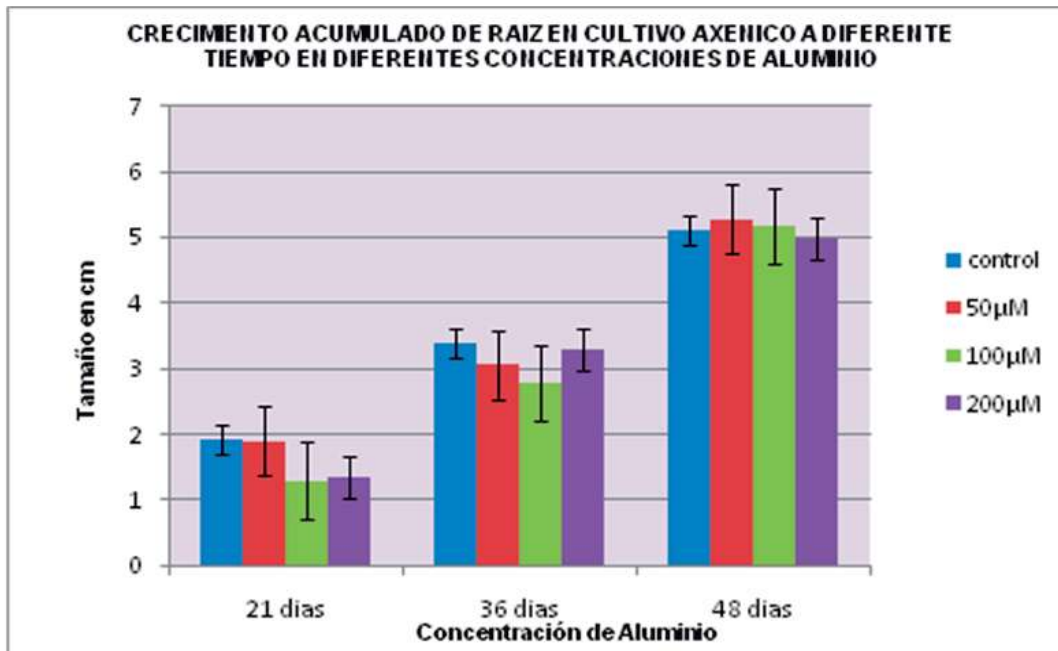


Figura 9. Crecimiento acumulado de la raíz a diferente tiempo con diferentes concentraciones de Al.

Al comparar la cantidad de raíces secundarias desarrolladas en los diferentes tratamientos se pudo observar que las raíces sin Al o con concentraciones bajas presentaron mayor cantidad (Figura 8).

A los 21 días el 100% de las replicas utilizadas como control presentaron crecimiento, mientras que en los tratamientos con Al el porcentaje fue menor, a concentraciones de 50µM se tuvo crecimiento en el 30% de las replicas, a 100 µM en el 20% y a 200 µM 28%. Lo que demuestra nuevamente el efecto que tiene la presencia de este metal para las raíces.

7. DISCUSIÓN

La contribución de los HMA a la tolerancia al metal en las plantas hospederas, está pobremente documentada. Loth y Höfner (1995) atribuyeron la mayor captación de Cu, Zn, y Cd en raíces de plantas de avena a la gran superficie de absorción, dado que la colonización micorrízica la incrementa. Esto coincide con los resultados de los experimentos obtenidos, en donde la raíz asociada con el hongo, acumula la mayor cantidad de Al. Joner y Leyval sugirieron que hay una inmovilización fúngica del Cd, dentro del sistema de raíz. Esto lo demostraron en *Pteridium aquilinum*, en un experimento en parcelas de bosque tratadas con metales pesados, demostrando la acumulación de los metales dentro de la hifa intracelular principalmente en material ricos en fosfato en vacuolas (Turnau, et al. 1993b).

Las especies de HMA tienen potencial que puede ser empleado para programas de biomonitoreo. La disminución de la ocurrencia de los HMA (densidad de propágulos y la infectividad en los suelos con metales pesados) pueden ser utilizados como bioindicador de la contaminación de suelos (Leyval et al. 1995). La colonización micorrízica de las raíces después de la remediación del suelo, puede ser una señal de que la concentración del metal o la biodisponibilidad se han reducido. Dado que la tolerancia al metal involucra la presencia de algunos hongos en suelos contaminados con metales, estos pueden ser utilizados para probar el establecimiento de la colonización en raíces en cualquier suelo contaminando con metales, proveyendo información adecuada acerca de la toxicidad del metal.

Como los Hongos Micorrízicos Arbusculares no pueden ser cultivados sin la planta, es más difícil demostrar la captación intrínseca del metal por medio de la hifa. Utilizando sistemas de cultivo, en los cuales permanezcan separados la hifa extraradical de las raíces, como es el caso de los cultivos monoxénicos, se ha podido demostrar que la hifa puede acumular y asimilar Zn, a un grado que difiere

entre especies (Cooper y Tinker, 1978; Burker y Robson 1994). El Cd se compartimentalizó en la hifa (Joner y Leyval 1997a), demostrándose que la hifa extraradical puede transportar Cd del suelo a las raíces.

Todos los organismos, incluyendo los microorganismos, pueden obtener resistencia a los metales pesados (Joho et al. 1985). El primer mecanismo involucra, por ejemplo, reducción de la captación o incremento del reflujo, formando complejos fuera de las células y liberación de ácidos orgánicos. En la segunda situación, los metales son quelados intracelularmente a través de la síntesis de ligandos tales como metolotioneina, polifosfatos, y otros compartimentos como vacuolas. Los individuos sensibles pueden ser distinguidos por su escaso crecimiento sobre sustratos contaminados con metales.

Se han hecho experimentos, con aislados de Hongos Micorrízicos Arbusculares de suelos contaminados (Gildon y Tinker, 1981). La tolerancia al metal fue probada, por la germinación de las esporas, en una solución con cadmio (Weissenhorn, et al. 1993), *Glomus mosseae* P2 (BEG 69), aislada de suelos contaminados con metales fue más tolerante al Cd que las cepas de *G. mosseae* (BEG12) aislada de suelos no contaminados. En estos experimentos el Cd se redujo la germinación de esporas más que la extensión de la hifa. Utilizando un sistema de medio compartimentalizado separando raíces e hifas extraradicales, Joner y Leyval, (1997b), demostraron que la longitud de la hifa no fue afectada por cantidades mayores a 100 mg Kg^{-1} de Cd adicionado en el compartimento de la hifa. Esto coincide con los resultados obtenidos en nuestro experimento de cultivos monoxénicos, en donde los valores más altos fueron para las hifas, esporas y raíces, a las concentraciones más altas del metal ($200 \mu\text{M}$).

El mecanismo de la tolerancia a metales por los Hongos Micorrízicos Arbusculares no está aun dilucidado. La co-tolerancia al Cd y al Zn fue sugerida por un aislado de suelo contaminado con aplicaciones de lodos contaminados con Zn (Weissenhorn, et al. 1994). El incremento de la tolerancia al Cd de un cultivo

mixto fue observado en suelos con sales de Cd, pero solo un año después se logró la restauración (Weissenhorn, et al. 1994). El incremento en la tolerancia al metal ha sido observado en los HMA aislados de suelos naturales con altas cantidades de metales (Leyval, et al. 1995). El hongo utilizado en nuestros experimentos *G. intraradices*, no está adaptado a suelos contaminados con Al, pero permitió la protección de las raíces a las elevadas concentraciones de Al, y estas tuvieron una buena respuesta con un buen desarrollo. Sin embargo, es necesario buscar especies nativas de Hongos Micorrízicos Arbusculares que muestren similares y mejores efectos protectores a las plantas y que promuevan la actividad para la bioremediación de suelos contaminados con aluminio.

Los metales pesados entran a la raíz por las vías del apoplasto y simplasto (Salt, et al. 1995), utilizando energía dependiente de canales transmembranales para los iones metálicos. Los metales no esenciales compiten con los esenciales, por estos acarreadores membranales. Sin embargo, los mecanismos de captación de los metales en raíces micorrizadas no han sido descritos. Una vez que los metales entran a la hifa, pueden ser inmovilizados o transferidos a la raíz, y una vez en la raíz son retenidos ahí mismo o translocados al tallo. De acuerdo a Salt et al. (1995) la translocación del metal de la raíz al tallo tiene lugar en el xilema después de atravesar por el simplasto hacia la endodermis, Los complejos de ácidos orgánicos, tales como citrato de Cd y las fitoquelatinas pueden jugar un papel importante en la transportación del metal en el xilema. Cuando se forman complejos, la tasa de translocación de cationes metálicos tales como Zn, Cd y Cu en el xilema aumenta (Marschner, 1995).

Desafortunadamente, los datos de la cantidad de micelio extraradical producido por el hongo micorrízico hacen falta en la mayoría de los estudios sobre micorrizas y metales pesados. En el presente estudio la biomasa del micelio fue mayor en la concentración de 200 μ M, alcanzando hasta 0.0082 g. de biomasa, lo cual indica la tolerancia la metal.

En la mayoría de los experimentos reportados sobre metales pesados y micorrizas, solo uno de unos cuantos aislados han sido considerados y el origen de estos aislados no siempre se conoce. Aun así, esto se considera importante, ya que existen diferencias en la tolerancia del metal entre géneros y dentro de especies de hongos micorrízicos han sido demostrados en suelos contaminados. Para entender el efecto de los metales pesados sobre los hongos micorrízicos, sería necesario estudiar y comparar la diversidad dentro de las poblaciones de los hongos micorrízicos en suelos contaminados y no contaminados. Resultados preliminares de (Leyval, y Vandenkoornhuyse, en resultados aun no publicados), demuestran que la diversidad intraespecífica de los HMA decrece en suelos contaminados con metales. Una clave importante para entender las interacciones entre los metales pesados y la micorriza es evaluar la diversidad funcional de los hongos micorrízicos y la compatibilidad funcional con las plantas (Ravnskov y Jakobsen, 1995).

8. CONCLUSIONES

1. Los propágulos fúngicos (hifas, micelio y esporas, tuvieron los valores más altos a concentraciones de 200 μ M de Al.
2. En cultivo monoxénico las hifas y esporas no tuvieron diferencia significativa, pero si en las raíces, lo que se pudo observar que la presencia del hongo le ayuda a la raíz a su crecimiento pero no a la tolerar el efecto del metal.
3. El micelio fúngico obtuvo la mayor cantidad de biomasa en altas concentraciones de Al (200 μ M).
4. Las raíces en cultivo monoxénico y axénico redujeron su biomasa conforme aumentaba la concentración del metal. En los cultivos monoxénicos la biomasa de la raíz sin tratamiento fue significativamente más alta que en todos los tratamientos con Aluminio ($P \geq 0.05$) y en el cultivo axénico disminuyó significativamente solo a la concentración de 200 μ M.
5. En el tratamiento de cultivo axénico en concentración de 200 μ M de Al, las raíces disminuyeron su tamaño al aumentar la concentración del metal. Por lo que el crecimiento de las raíces tanto primarias como laterales se inhibe al aumentar la concentración de aluminio por arriba de 200 μ M hasta perder su viabilidad.

9. LITERATURA CITADA

Abbot, L.,K., Robson, A.D.1991.Factors influencing the occurrence of vesicular arbuscular mycorrhizas Agriculture Ecosystems & Enviroment 35:121-150.

Ark, P.A.,Thompson, J.P.1961.Detection of hary root pathogen, *Agrobacterium rhizogenes*, by the use of fleshy roots. Phytopathology. 51:69-71.

Baligar,V.C.,Schaffert,R.E., Dos Santos ,H.L.,Pitta,G.V., and Bahia Filho,C.1993.Soil aluminum effects on uptake,influx,and transport of nutrients in sorghum genotypes.Plant and soil.150:271-277.

Bago, B., Azcón-Aguilar, C., Goulet, A., Piché,Y.1998a.Branched absorbing structures (BAS): a feature the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. New.Phytol.139:375-388.

Bago, B., Azcón-Aguilar, C., Piché,Y.1998b.Extraradical mycelium of arbuscular mycorrhizae: the concealed extension of roots. In Radical biology: advance and perspectives on the function of plant roots. Edited by H.E.Flores, J.P.Lynch, and D.Eissenstat.Current Topics in Plant Physiology, American Society of Plant Physiologists, Rokville, Md Series 18, pp. 502-505.

Bago,B.,Schachar-Hill.,Y., Pfeffer,P.E.2000. Dissecting carbon pathways in arbuscular mycorrhizas with NMR spectroscopy.In Current advances in mycorrhizae research.Edited by G.K.Podila and D.D.Douds.American Phytopathological Society,St.Paul, Minn.111-126.

Bécard, G., Fortin, J.A.1988.Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. New. Phytol.1078:211-218.

Bécard, G., Piché, Y.1989a.Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis.Appl.Environ.Microbiol.55:2320-2325.

Bécard, G., Piché, Y.1989b. New aspects of the acquisition of biotrophic status by a vesicular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. New. Phytol.112:77-83.

Bécard, G., Piché, Y. 1992.Establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza in root organ culture: revie and proposed methodology. In Techniques for the study of mycorrhiza.Edited by J.Norris, D.Read, and A.Varma.Academic Press, New York.pp.89-108.

Berkelaar, E., Ph, D.2008. Efecto del Aluminio en suelos ácidos sobre el crecimiento de las plantas.

Bonfante, P., Perotto, S.1995.Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. New. Phytol.130:3-21.

Budi, S.W., Blal Gianinazzi, S.1999.Surface-sterilization of *Glomus mosseae* sporocarps for studying endomycorrhization in vitro, Mycorrhiza, 9:65-68.

Buée, M. 2000. Mise en evidence d'un facteur racinaire impliqué dans la croissance des champignons mycorrhiziens á arbuscules.Ph.D.thesis, Mycologie Végétale, Université Paul Sabatier, Toulouse, France.

Burker, B., Robson, A. 1994.Zn uptake in subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.)by three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in a root-free sandy soil.Soil. Biol .Biochem. 26 :1117-1124

Butcher,D.N., Street,H.E.1964.Excised root culture.Bot.Rev.30 :513-586.

Butcher, D.N,1980. The culture of isolated roots. In Tissue culture methods for plant pathologists. Edited by D.S.Ingram and J.P. Helgelson.Blackwell Scientific, Oxford.pp.13-17.

Chabot,S.,Bel-Rhid,R., Chênevert,R. and Piché,Y.1992b.Hyphal growth promotion *in vitro* of the VA mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* Becker & Hall,by the activity of structur-ally specific flavonoid compounds under CO₂ enriched conditions .New.Phytol.122:461-467.

Chilton,M.D.,Tepfer,D.A.,Petit,A.,David,C.,Casse-Delbart F.,Tempé,J.1982.Agrobacterium rhizogenes inserts T-DNA into the genome of host plant root cells.Nature.295:432-434.

Cooper, KM.,Tinker, P.B. 1978.Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas,II.Uptake and translocation of phosphorus,zinc and sulphur.New. Phytol 81:43-52.

Cranenbrouck, S., Voets, L., Bivort,C., Renard, L., Strullu A.G., Declerck ,S. 2005. Methodologies for in Vitro Cultivation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi with Root Organs. En: Declerck S, Strullu DG and Fortin A. (Eds): In vitro biology of mycorrhizal symbiosis. Soil Biology Series, Springer-Verlag Vol. 4.

Dalpe, Y. 2001.*In vitro* monoxemic culture of arbuscular mycorrhizal fungi: a major tool for taxonomical studies. In proceedings of the 3rd National Symposium on Mycorrhizal Symbioses.Guanajuato, Mexico, October, 2000.Edited by V.Olalde, Comité Nacional de Investigación y enseñanza de la micorriza.In press.

Dakessian,S.,M.S., Brow, G.J. Bethenfalvay.1986.Relationship of Mycorrhizal growth enhancement and plant growth with soli water and texture.Plant Soil 94:439-443.

Declerck, S., Strullu, D.G., Plenchette, C. 1996, *In vitro* mass production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* associated with Ri T-DNA transformed carrot roots. *Mycol. Res.* 100:1237-1242.

Declerck, S., Stroller, D., Plenchette, C. 1998. Monoxenic culture of the intraradical forms of *Glomus* sp. isolated from a tropical ecosystem: a proposed methodology for germplasm collection. *Mycologia*, 90:579-585.

Declerck, S., Angelo-van Coppenolle, M.G. 2000. Cryopreservation of entrapped monoxenically produced spores of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol.* 148:169-176.

Delhaize, E., Ryan, P. R. 1995. Aluminium Toxicity and Tolerance in Plants. *Plant Physiol.* 107:315-321.

Del Val, C., Barea, J.M., y Azcon-Aguilar, C. 1999. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. *Appl Environ Microbiol* 65:718-723.

Del Val, C., Brea, J.M., Azcon-Aguilar, C. 1999a. Assessing the tolerance to heavy metals of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from sewage sludge-contaminated soils. *Appl. Soil Ecol.* 11:261-269.

Del Val, C., Barea, J.M., y Azcon-Aguilar, C. 1999b. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated Soils. *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology, pp. 718-723.

Diop, T.A. 1995. Ecophysiologie des champignons mycorrhiziens a vésicules et arbuscules associés a *Acacia albida* Del. dans les zones Sahélienne et Soudano-Guinéenne du Sénégal. Thèse de Doctorat, Université d Angers.

Douds, D.D., Jr, Schenck, N.C. 1990. Cryopreservation of spores of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 115:667-674.

Elias, K.S., Safir, G.R. 1987. Hyphal elongation of *Glomus fasciculatus* in response to root exudates. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1928-1933.

Foy, C.D., Fleming, A.L. 1982. Aluminium tolerance of two wheat cultivars related to nitrate reductase activities. *J. Plant. Nutr.* 5:1313-1333.

Foy, C.D. 1983. The physiology of plant adaptation to metal stress. *Iowa State J. Res.* 57:355-391.

Foy, C.D. 1992. Soil chemical factors limiting plant root growth, in: Hatfield J.L., Stewart B.A (Eds.). *Advance in Soil Sciences: Limitations to Plant Root Growth*, Vol. 19, Springer Verlag, New York. 97-149.

Furlan, V., Bartschi, H., Fortin, J.A.1980. Media for density gradient extraction of endomycorrhizal spores. Trans. Br Mycol. Soc. 75; 336-338.

Gaur, A., y Adholeya, A. 2004. Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. Current Sci 86:528–534.

Gildon, A., Tinker, P.B. 1981. A heavy metal tolerant strain of a mycorrhizal fungus. Trans, Br , Mycol , Soc. 77:648-649.

Gildon, A., Tinker, P.B. 1983. Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants. I. The effects of heavy metals on the development of vesicular-arbuscular mycorrhizas. New Phytol. 95:247-261.

Giovannetti, M., Sbrana, C., Avio, L., Citernesi, A.S., Logi. C. 1993. Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre infection stages. New Phytol. 125:587-593.

Giovannetti, M., Sbrana, C., Avio, L., Citernesi, A.S., Avio. L. 1996. Analysis of factors involved in fungal recognition responses to host-derived signals by arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol. 133:65-7.

González-Chávez, M.C., Carrillo-González, R., Wright, S.F., Nichols, K.A. 2004. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. Environ. Pollution. 130:317-323.

Hall, J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. J Exp Bot 53:1–11.

Harley, J.L. and S.E. Smith. 1983. Mycorrhizal symbiosis. Academic, Londres, p. 268-295.

Henning, S.J. 1995. Aluminium toxicity in the primary meristem of wheat roots, Ph.D. thesis, Oregon State Univ. Corvallis, Oregon, USA

Hepper, C.M., Mosse. B. 1975. Techniques used to study the interaction between Endogone and plant roots. In Endomycorrhizas. *Edited by* F.E. Sanders, B. Mosse, and P.D. Tinker. Academic Press, London. pp. 65-75.

Holleman, A., y Wiberg. E. 1985. Lehrbuch der Anorganischen Chemie. Berlin.

Hosny, M.H., Dulieu, H., Gianinazzi-Pearson, V. 1996. A simple and rapid method for collecting Glomales spores from soil.

Jackson, W.A. 1967. Physiological effects of soil acidity, in: Pearson R.W. Adams F. (Eds). Soil Acidity and Liming. Am. Soc. of Agron. Madison , USA. 43-124.

Jamal,A.,Ayub, N.,Usman M.,Khan, A.G.2002. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance zinc and nickel uptake from contaminated soil by soyabean and gentil.Int.J.Phitoremed.4:205-225.

Joho,M.,Imai, M.,Murayama,T .1985.Different distribution of Cd²⁺ between Cd-sensitive and Cd-resistant strains of *Saccharomyces cerevisiae*.J Gen Microbiol 131:53-56.

Joner,E.J.,Leyval, C.1997a. Uptake of Cd by roots and hyphae of a *Glomus mossese/Trifolium subterraneum* mycorrhiza from soil ameded with high and low concentration of cadmium.New. Phytol.135:353-360.

Joner,E.J.,Leyval, C.1997b.Plant uptake of C through arbuscular-mycorrhiza,an important group of symbiotic fungi.In:Proceeding of hte 3rd international conference on the biogeochemistry of trace elements,15-20 May 1995,Paris.

Joner, E.J., Ravnskov, S., Jacobsen, I. 2000. Arbuscular mycorrhizal phosphate transport under monoxenic conditions using radio-labelled inorganic and organic phosphate.Biotechnol.

Joner,E.J.,Briones,R., Leyval,C.2000.Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium.Plant Soil 226:227-234.

Jones,D.L.,Kochian,L.V.,Gilroy,S.1998.Aluminum induce a decrease in cytosolic Calcium concentracion in BY-2 tobacco cell cultures.Plant Physiol.116:81-89.

Kaldorf, M., Kuhn, A.J., Schroder, W.H., Hildebrandt, U., Bothe, H. 1999. Selective element deposits in maize colonized by a heavy metal tolerance conferring arbuscular mycorrhizal fungus. J Plant .Physiol 154:718–728.

Kinraide, T.B.1988.Proton extrusion by wheat roots exhibiting severe aluminium toxicity symptoms.Plant .Physiol.418-423.

Koide, R.T., Kabir, Z. 2000.Extraradical hyphae of themycorrhizal fungus *Glomus intrarradices* can hydrolyse organic phosphate. New. *Phytol.*148:511-517.

Legué, V.,Driss-Ecole, D.,Maldiney,R.,Perbal ,G.1996. The response to auxin of rapeseed (*Brassica napus* L.) roots displaying reduce gravitropism due to transformation by *Agrobacterium rhizogenes*.Planta 200:119-124.

Leyval, C.,Sing, B.R.,Joner, E.J.1995.Occurrence and infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi in some Norwegian soils influenced by heavy metals and soil properties.Water Air Soil Pollut 84:203-216.

Leyval,C.,Turnau,K., Haselwandter,K.1997. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiologica, ecological and applied aspects. Mycorrhiza 7: 139-153.

Lindsay, W.L. 1979. Chemical equilibria in soils. John Wiley and Sons, New York, N.Y. p.34-49.

Loth, F.G., Hofner, W. 1995. Einfluss der VA-Mykorrhiza auf die Schwermetallaufnahme von Hafer (*Avena sativa* L.) in Abhängigkeit vom Kontaminationsgrad der Boden. Z Pflanzen ernähr Boden 158:339-345.

Malcova, R., Vosáltka, M., Gryndler, M. 2003. Effects of inoculation with *Glomus intraradices* on lead uptake by *Zea mays* L. and *Agrostis capillaries* L. Appl. Soil Ecol. 23:55-67.

Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London.

Mertz, S.M., Heithaus, J.J., III Bush, R.L. 1979. Mass production of axenic spore of the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. Trans, Br, Mycol, Soc. 72:167-169.

Mertz, W. 1981. The essential trace elements. Science 213:1332–1338.

Mora, M. 1993. Nivel de fertilidad de los suelos de la IX Región y su relación con la acidificación. Frontera Agrícola. Universidad de la Frontera, 1:5-12
Mosse, B. 1988. Some studies relating to “independent” growth of vesicular arbuscular endohyphes. Can. J. Bot. 66:2533-2540.

Mosse, B., Hepper, C.M. 1975. Vesicular-arbuscular infections in root-organ cultures. Physiol. Plant, Pathol. 5:215-223.

Mosse, B. 1988. Some studies relating to “independent” growth of vesicular arbuscular endophytes. Can. J. Bot. 66:2533-2540.

Mossor-Pietraszewska, T. 2000. Effect of aluminium on plant growth and metabolism. Acta Biochimica Polonica Vol. 48 (3): 673 -688.

Mugnier, J., Mosse, B. 1987. Vesicular-arbuscular infections in Ri T-DNA transformed roots grown axenically. Phytopathology, 77:1045-1050

Nagahashi, G., Douds, D.D. 1999. A rapid and sensitive bioassay with practical application for studies on interactions between root exudates and arbuscular mycorrhizal fungi Biotechnol. Tech. 13:893-898.

Nair, M.G., Safir, R., Siqueira, J.O. 1991. Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza-stimulatory compounds from clover (*Trifolium ripens*) roots. Appl. Environ. Microbiol. 57:434-439.

Nosko, P., Brassard, P., Kramer, J.R., Kershaw, K.A. 1988. The effect of aluminum on seed germination and early seedling establishment, growth and respiration of white spruce (*Picea glauca*). Can. J. Bot. 66, 2305-2310.

- Pawlowska**, T.E., Douds, D.D., Charvat, I.1999. *In vitro* propagation and life cycle of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum*.Mycol.Res.103:1549-1556.
- Plenchette**,C.,Declerck,S.,Diop,T.A., Strullu,D.G.1996. Infectivity of monoxenic subcultures of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* associated with Ri T-DNA transformed carrot root.Appl.Microbiol.Biotechnol.46:545-548.
- Poulin**, MJ., Bel-Rhild, R., Piché, Y., Chenevert, R. 1993.Flavonoids released by carrot (*Daucus carota*) seedlings stimulate hyphal development of vesicular-arbuscular fungi in the presence of optimal CO₂ enrichment.J.Chem.Ecol.19:2317-2327.
- Poulin**,M.,Simard,J.,Catford,J.G.,Labrie,F., Piché,Y.1997. response of symbiotic endomycorrhizal fungi to estrogens and antiestrogens.Mol.Plant-Microbe Interac.10:481-487.
- Ravnskov**,S.,Jakobsen, I.1995.Functional compatibility in arbuscular mycorrhizas measured as hyphal P transport to the plant.New. Phytol 129:611-618.
- Rengel**, Z., Robinson,D.L. 1989.Aluminum effects on growth and macronutrient uptake by annual ryegrass. *Agron. J.* 81, 208-215.
- Riker**, A.J., Banfield, W.M., Wright, W.H., Keit, G.W., Sagen, H.E.1930.Studies on infectious hairy root of nursery apple trees.J.Agric.Res.41:507-540.
- Rivera-Becerril**, F. 2006. Tolerancia de la micorriza arbuscular contra los metales pesados.Rev. Latinoam. Microbiol. 48 (2): 154-161.
- Rout**,G.R.,Samantaray, S.,Das, P. 2001. Aluminium toxicity in plans: a review.Review article.Agronomie 21: 3-21.
- Roy**, A.K.,Sharma, A.,Talukder, G.1988. Some aspects of aluminium toxicity in plants.Bot.Rev.54: 145-177.
- Salt**,D.E., Blaylock, M.,Kumar, NPBA.,Dushenkov, V.,Ensley, BD., Chet, I.,Raskin, I.1995.Phytoremediation:a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants.Biotechnology 13:468-474.
- Salazar**, E.,Lorena, M.2005.Efecto del Aluminio en el crecimiento y desarrollo de la raiz de *Arabidopsis thaliana* L.1-53.
- Shachar-Hill**,Y.,Pfefer,P.E.,Douds,D.,Osman,S.F.,Doner,L.W., Ratcliffe,R.G.1995.Partitioning of intermediary carbon metabolism in vesicular-arbuscular mycorrhizal leek. Plant, Physiol.108:2979-2995.

Simon, L., Levesque, R.C., Lalonde, M. 1993a. Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent single-strand conformation polymorphism polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:4211-4215.

Simon, L. 1995. Molecular approach to the identification of mycorrhizal fungi. In *Biotechnology of ectomycorrhizae*. Edited by V. Stocchi, P. Bofante, and M. Nuti. Plenum Press, New York. 35-40.

Smith, S.A., Read, D. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. 2 ed. Academic Press, Inc., San Diego.

Solaiman, S.A., Saito, M. 1997. Use of sugars by intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by radiorespirometry. *New Phytol.* 136:533-538.

St-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M., Fortin, J.A. 1996. Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradice* 3s in an in vitro system in absence of host roots. *Mycol. Res.* 100:328-332.

Strullu, D.G., Romand, C. 1986. Methode d'obtention d'endomycorhizes à vésicules et arbuscules en conditions axéniques. *C.R. Acad. Sci. Ser. III Sci Vie*, 303:245-250.

Strullu, D.G., Diop, T.A., Plenchette, C. 1997. Realisation de collections in vitro de *Glomus intraradices* (Schenck et Smith) et de *Glomus versiforme* (Karsten et Berch) et proposition d'un cycle de développement. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 320:41-47.

Taylor, G.J. 1988. The physiology of aluminum tolerance; in *Metals Ions in Biological Systems* (Sigel, H., ed.) vol. 24, Aluminum and Its Role in Biology, pp. 165-198, Marcel-Dekker, New York.

Tepfer, D. 1989. Ri T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes*: a source of genes having applications in rhizosphere biology and plant development, ecology and evolution. In *Plant-microbe interactions*. Vol. 3. Edited by T. Kosuge and E.W. Nester.

Trejo, A.D., Ferrera-Cerrato, R. 1997. Ecología de la endomicorriza arbuscular en diferentes agroecosistemas productores de café. Pag. 52. En *Memorias del VI Congreso Nacional de Tecnología –IX Jornadas Científicas*, Tapachula Chiapas.

Tsai, S.M., Phillips, D.A. 1991. Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1485-1488.

Turnau, K., Kottke, I., Oberwinkler, F. 1993b. Localization of toxic elements in mycorrhizal roots of *Pteridium aquilinum* collected from dust treated experimental plots. *New Phytol.* 123:313-324.

Vierheiling, H., Bago, B., Albrecht, C., Poulin, M.J., Piché, Y. 1998. Flavonoids and arbuscular-mycorrhizal fungi. In *Flavonoids in the living system*. Edited by J.A. Manthey and B.S. Buslig. Plenum Press, New York. pp.9-33.

Villegas, J. 2001. Comportement nutritionnel du mycelium externe du *Glomus intraradices* en présence d'azote nitrique et ammoniacal. Ph.D. thesis, Institut de Recherche en Biologie Végétale. Université de Montréal.

Walley, F.L., Germida, J.J. 1996. Failure to decontaminate *Glomus clarum* NT4 spores is due to spore wall-associated bacteria. *Mycorrhiza*, 6:43-49.

Weissenhorn, I., Leyval C., Berthelin, J. 1993. Cd-tolerant arbuscular mycorrhizal (AM) fungi from heavy-metal polluted and unpolluted soils. *Plant Soil* 157:247-256.

Weissenhorn, I., Glashoff, A., Leyval, C., Bertelin, J. 1994. Differential tolerance to Cd and Zn of arbuscular mycorrhizal (AM) fungal spores isolated from heavy metal-polluted and unpolluted soils. *Plant Soil* 167:189-196.

White, P.R. 1943. A handbook of plant tissue culture. J. Cattell, Lancaster.