SEP
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CONKAL

ANÁLISIS *in vitro* DE LA ABSORCIÓN DE FÓSFORO POR PLÁNTULAS DE CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.) Y SU INTERACCIÓN CON *Rizhophagus intraradices.*

TESIS

Que presenta:

Jazmin Araceli López Herrejón

Como requisito parcial para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias en Horticultura Tropical

Director de tesis:

Dr. Carlos Juan Alvarado López

Conkal, Yucatán, México

Septiembre, 2018

TecNM

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Conkal

SEP
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

Conkal, Yucatán, México, 24 de septiembre de 2018

El comité de tesis del candidato a grado: Jazmin Araceli López Herrejón, constituido por los CC. Dr. Carlos Juan Alvarado López, Dr. Arturo Reyes Ramírez, Dr. Jairo Cristóbal Alejo y Dr. Horacio Salomón Ballina Gómez, habiéndose reunido con el fin de evaluar el contenido teórico-metodológico y de verificar la estructura y formato de la tesis titulada: **Análisis *in vitro* de la absorción de fósforo por plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) Y su interacción con *Rizhophagus intraradices*,** que presenta como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en ciencias en Horticultura Tropical, según lo establece el Capítulo 2, inciso 2.13.3, de los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado en el Sistema Nacional de Institutos Tecnológicos, dictaminaron su aprobación para que pueda ser presentada en el examen de grado correspondiente.

ATENTAMENTE

Dr. Carlos Juan Alvarado López
Director de Tesis

Dr. Arturo Reyes Ramírez
Asesor de Tesis

Dr. Jairo Cristóbal Alejo
Asesor de Tesis

Dr. Horacio Salomón Ballina Gómez
Asesor de Tesis

REDMI NOTE 8
AI QUAD CAMERA

Conkal, Yucatán, México, 24 de septiembre del 2018

DECLARATORIA DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de materiales y métodos, resultados y discusión de este documento, es producto del trabajo de investigación realizado durante mi estudio de posgrado y con base en los términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial le pertenece patrimonialmente al Instituto Tecnológico de Conkal. En virtud de lo manifestado reconozco que los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que se deriven de lo correspondiente a dicha información son propiedad de la citada institución educativa.

IBT. Jazmin Araceli López Herrejón

REDMI NOTE 8
AI QUAD CAMERA

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por haberme otorgado la beca para continuar con mis estudios de posgrado en el programa de Maestría en Ciencias en Horticultura Tropical y financiar mi proyecto de investigación.

DEDICATORIA

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I. LA ABSORCIÓN Y TRANSPORTE DEL FÓSFORO EN LAS PLANTAS 1

1.1 INTRODUCCIÓN 3

1.2 ANTECEDENTES 5

1.2.1 Ciclo del fósforo 5

1.2.2 Fertilizantes fosfóricos 6

1.2.3 Hongos Micorrízicos Arbusculares 7

1.2.4 Uso de hongos micorrízicos arbusculares como tecnología alternativa en la agricultura 9

1.2.5 Cultivos *in vitro* aplicados al estudio de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA)... 9

1.3 HIPÓTESIS 12

1.4 OBJETIVOS 12

1.4.1 Objetivo general 12

1.4.2 Objetivos específicos 12

1.5 Estrategia experimental 13

1.6 Literatura Citada 14

CAPÍTULO II. DINÁMICA DE ABSORCIÓN DE FÓSFORO EN CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.) ASISTIDA CON *Rizhophagus intraradices* EN CULTIVO AUTOTRÓFICO PARCIALMENTE *in vitro*. 17

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS 21

2.2.1 Área de estudio. 21

2.2.2 Material Vegetal 21

2.2.3 Obtención del inoculo fúngico a través del cultivo monoxénico de *Rizophagus intraradices*. 23

2.2.4 Desinfección de propágulos infectivos de *R. intraradices* 23

2.2.5 Desarrollo del cultivo autotrófico parcialmente *in vitro* para plántulas de chile habanero. 24

2.2.6 Modificación en la concentración de P en el medio MS e inoculación de *R. intraradices* en el CA-PIV 25

2.6.1 Desarrollo del sistema de cultivo autotrófico parcialmente *in vitro* de Chile habanero inoculado con *R. intraradices*. 27
2.6.2 Desarrollo vegetal 28
2.6.3 Biomasa seca 30
2.6.4 Análisis nutrimental 32
2.6.5 Parámetros de Fluorescencia de la clorofila 34
2.6.5 Colonización e intensidad de estructuras micorrízicas 36
2.7 DISCUSIÓN 37
2.7.1 Desarrollo vegetal 38
2.7.2 Biomasa seca 39
2.7.3 Análisis nutrimental 39
2.7.4 Fotoquímica de la hoja 40
2.7.5 Porcentaje de colonización micorrízica 41
2.8 CONCLUSIÓN 42
2.9 LITERATURA CITADA 43

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO I

Fig. 1 Etapas de desarrollo de la simbiosis micorrízica arbuscular (Bucher, 2006). 8
Fig. 2 Diagrama de flujo de la estrategia experimental propuesta para el desarrollo del proyecto de tesis. 13

CAPITULO II

Fig. 3 Plántula de chile habanero (Capsicum Chinense Jacq.) en crecimiento en un sistema de cultivo autotrófico parcialmente *in vitro*. 27
Fig. 4 Efecto de las concentraciones de P en el medio de cultivo en interacción con *R. intraradices* en el desarrollo de plántulas de chile habanero, cultivadas en el sistema autotrófico parcialmente *in vitro* a través de las variables **a** longitud de tallo y **b** raíz. 29
Fig. 5 Efecto de la interacción de *R. intraradices* y las concentraciones de P en el medio de cultivo en el desarrollo de plántulas de chile habanero cultivadas en el sistema autotrófico parcialmente *in vitro* a través de la biomasa seca **a)** aérea **b)** radical. 31
Fig. 6 a) Rendimiento cuántico fotoquímico máximo del fotosistema II (PSII) (Fv/Fm), **b)** Quenching fotoquímico (qP) y **c)** quenching no fotoquímico (NPQ) en plántulas de chile habanero con diferentes concentraciones de P en interacción con R. intraradices. 35
Fig. 7 a. Crecimiento de Esporas Primarias (EP); esporas secundarias (ES), **b.** Hifas en contacto con la raíz (H); producción de micelio externo (ME) y **c.** formación de vesículas e hifas (V-H). 37

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Concentración mineral (mg . kg^{-1}) en hojas, tallo y raíz de chile habanero en los diferentes tratamientos en el sistema de cultivo autotrófico parcialmente *in vitro*. 33

Cuadro 2. Efecto de las concentraciones de P sobre la colonización de estructuras inoculadas con *Rhizohagus intraradices* en raíces de plántulas de *Capsicum chinense*..... 36

RESUMEN

En México, uno de los cultivos importantes, es el chile habanero, su nutrición con fertilizantes solubles y específicamente su poca disponibilidad de P, puede afectar de manera negativa el crecimiento del cultivo. Una de las alternativas sustentables para reducir el estrés asociado con: déficit de agua, estructura del suelo, pH, salinidad, metales pesados, patógenos y nutrición, es el uso de Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA), considerados útiles como inoculantes benéficos en la agricultura porque contribuyen a la supervivencia y el crecimiento de las plantas. Estos beneficios de la simbiosis mutualista planta-HMA están basados en la transferencia de nutrientes bidireccionales, donde las plantas abastecen a los hongos con azúcares, y los hongos mejoran la capacidad de las plantas para adquirir nutrientes, particularmente fósforo, a través de una extensa red de hifas que exploran el suelo para trascolar P de lugares donde las raíces no pueden llegar y trasportándolo a la planta. Debido a que no existe una dosis exacta de este nutriente. Recientemente se han desarrollado sistemas de cultivos *in vitro* de micorrizas, que incluyen los dos organismos (planta-HMA), donde las raíces se desarrollan dentro de la caja petri, en un ambiente totalmente *in vitro* y la planta modelo es expuesta a condiciones de cuarto de crecimiento. Para conocer los efectos que pueden llegar a tener los HMA sobre el hospedero, el medio de cultivo puede ser controlado en términos de concentración de P. Esta investigación se enfocó en evaluar la absorción de fósforo utilizando como planta modelo el chile habanero bajo condiciones de cultivo autotrófico parcialmente *in vitro*, en interacción con *Rizhophagus intraradices.*

ABSTRAC

In Mexico, one of the important crops is the habanero pepper, its nutrition with soluble fertilizers and specifically its low availability of P, can negatively affect the growth of the crop. One of the sustainable alternatives to reduce the stress associated with: water deficit, soil structure, pH, salinity, heavy metals, pathogens and nutrition, is the use of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF), considered useful as beneficial inoculants in agriculture because they contribute to the survival and growth of plants. These benefits of the plant-HMA mutualist symbiosis are based on the transfer of bidirectional nutrients, where the plants supply the fungi with sugars, and the fungi improve the capacity of the plants to acquire nutrients, particularly phosphorus, through an extensive network of hyphae that explore the soil to trascolar P from places where the roots can not reach and transporting it to the plant. Because there is no exact dose of this nutrient. Recently, systems of *in vitro* cultures of mycorrhizae have been developed, which include the two organisms (plant-HMA), where the roots develop inside the petri dish, in a totally *in vitro* environment and the model plant is exposed to room conditions. of growth. In order to know the effects that AMF may have on the host, the culture medium can be controlled in terms of concentration of P. This research focused on evaluating the phosphorus absorption using Habanero pepper as a model plant under culture conditions. autotrophic partially *in vitro*, in interaction with *Rizhophagus intraradices*.

CAPÍTULO I. LA ABSORCIÓN Y TRANSPORTE DEL FÓSFORO EN LAS PLANTAS

1.1 INTRODUCCIÓN

El crecimiento y la productividad en los cultivos hortícolas ha tenido como principal objetivo sobrellevar el gasto nutricional y alcanzar condiciones ideales en cuanto a la disponibilidad de nutrientes como el fósforo (P). Este mineral es esencial para el crecimiento de las plantas, tiene distribución limitada en los habitas naturales y suelos agrícolas, debido a la forma en la que se encuentra en la naturaleza (Havlin *et al.,* 2005), lo que causa problemas de abastecimiento nutrimental.

La disponibilidad para las plantas se refiriere a la relación del P con el pH y el tipo de suelo. Los suelos de la península de Yucatán son principalmente Leptosoles y Rendzinas (Borges *et al*., 2008), con pH que va de neutro a alcalino lo que genera limitaciones en la adquisición de P ya que en estas condiciones se queda inmóvil. Para contrarrestar este déficit nutricional los agricultores aplican altas dosis de fertilizante fosfatado, para sobrellevar este bloqueo de P y abastecer suficientemente a la planta (Bautista Zuñiga *et al*., 2005).

Steen en 1998; estimó que para el 2060 las reservas globales de P serán reducidas a la mitad. Con esta predicción, la disminución de P, los precios de los fertilizantes fosfóricos van en aumento, por lo que la fertilización para la producción de cualquier cultivo es costosa y con efectos de contaminación ambiental. Existe una necesidad urgente de minimizar la pérdida de fósforo, que ocurre por la rápida fijación así mismo desarrollar tecnologías más eficientes en la toma de P (Chen *et al*., 2006).

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) pueden aumentar el transporte de nutrientes hacia su hospedero (Parniske, 2008). Las hifas extrarradicales absorben nutrientes de zonas del suelo que no son accesibles para las raíces (Smith y Read, 2008), los transporta hacia el micelio intrarradical para entregarlos a la raíz a cambio de carbono. Mejoran la nutrición de la planta, especialmente la de aquellos iones presentes en baja concentración o con poca movilidad en el suelo, como fósforo, amonio y zinc (Barea *et al.,* 2005).

A pesar de conocer como sucede el trasporte de P a través del HMA a la planta (Ravnskov *et al*., 1995), aún existen interrogantes en cuanto a la interacción que puede llegar a tener con su hospedero y el desempeño fúngico que puede alcanzar dependiendo de la cantidad de P que existe a su alrededor. Bajo este contexto el uso de cultivos *in vitro* ha esclarecido un poco estas interrogantes permitiendo observar en forma directa y no destructiva, la dinámica de la simbiosis incluyendo producción de esporas, colonización intrarradical de las raíces y capacidad de reproducir el ciclo de vida del hongo (Fernández Suarez *et al*., 2013)

Uno de los sistemas *in vitro* utilizados en las últimas décadas es el cultivo autotrófico parcialmente *in vitro,* ya que permite el desarrollo fúngico en la raíz y al mismo tiempo la respuesta a esta simbiosis de la planta modelo, que es desarrollada en condiciones de cuarto de crecimiento con una intensidad lumínica controlada para favorecer la fotosíntesis (Voets *et al*., 2005).

Este trabajo busca analizar el potencial del trasporte nutricional del fósforo por *Rizhopagus intraradices* en plántulas de chile habanero en un cultivo autotrófico parcialmente *in vitro* y contribuir al esclarecimiento del trasporte mineral y el comportamiento de la simbiosis a diferentes concentraciones de P.

1.2 ANTECEDENTES

1.2.1 Ciclo del fósforo

El P está presente en la mayoría de los compuestos de las células vegetales; azucares, lípidos, ácidos nucleicos y nucleótidos libres, es un componente elemental en la formación de ATP en la célula (Taiz y Zeiger 2006). Su ciclo en el suelo es dinámico, los microrganismos juegan un papel central en la trasferencia de electrones, que involucran la acumulación del elemento en su biomasa, materia orgánica y formas inorgánicas (Otiniano *et al.,* 2002).

El P en el suelo se encuentra en forma inorgánica y orgánica. Una fracción pequeña se encuentra en forma soluble, la cual está en equilibrio con la fracción precaria que comprende el P orgánico fácilmente mineralizable y los fosfatos débilmente adsorbidos a las arcillas coloidales, las células lo absorben como orto-fosfato o anión monovalente fosfato ($H_2PO_4^-$) y con menor rapidez, como anión bivalente (HPO_4^{-2}) (Havlin *et al.,* 2005; Salisbury y Ross, 1994). La forma orgánica del P en el suelo puede constituir del 30-50% del fósforo total. Casi el 50% se encuentra en la forma inositol fosfato o fitato, sintetizado por microorganismos y plantas, representando la forma más estable en el suelo (Rodriguez y Fraga., 1999).

La mayor porción de P se encuentra en formas insolubles o fijadas, la fijación es el principal problema de este elemento, ya que genera una zona de desabastecimiento radicular, condicionando el crecimiento de la planta (Picone y Zamuer, 2002). La fijación es altamente dependiente del pH del suelo ya que, en un intervalo de pH neutro a alcalino los iones fosfato se inmovilizan formando complejos con el calcio (Ca) (Johnson et al., 2003; Sylvia et al., 2005).

La mayoría de los suelos agrícolas de la península de Yucatán oscilan en este pH y contienen altos niveles de fósforo, pero no está disponible para las plantas (Borges *et al.,* 2012), para solucionar esta problemática los agricultores agregan fertilizantes fosfóricos sintéticos, los cuales se han acumulado como consecuencia de su uso regular, causando contaminación por su variada lixiviación, a cualquier forma de vida natural.

1.2.2 Fertilizantes fosfóricos

Históricamente, la agricultura ha dependido de los niveles naturales de fósforo en el suelo y la adición de materia orgánica fácilmente disponible, como el estiércol animal (Cordell *et al*., 2009). No obstante, la erosión del suelo y las hambrunas europeas de los siglos XVII y XVIII mostraron la necesidad de usar fuentes adicionales de nutrientes. Debido al crecimiento de la población mundial, la demanda de alimentos fué cada día mayor (FAO, 2015), lo que incrementó a su vez el fósforo necesario para su producción. Sin embargo, se sabe que el fósforo se obtiene a partir de minerales que podrían agotarse dentro de los próximos años (Steen, 1998).

El uso de fertilizantes minerales fosfatados se incrementó sustancialmente en el siglo XX por la llamada "Revolución Verde" (Luna Tovar, 1997). Los fertilizantes minerales procesados, como el superfosfato ordinario, tienen una concentración de fósforo hasta diez veces mayor que la de las excretas, lo que contribuyó a disminuir el déficit de este elemento en los suelos, pero incrementó la erosión en el mismo (PNUMA, 2011). La revolución verde aumentó los rendimientos agrícolas en muchos países, gracias a la introducción de nuevos cultivos, semillas mejoradas y a la aplicación de fertilizantes químicos. Lo que disminuyó la proporción de personas con hambruna, pero incrementó la erosión genética vegetal y de los suelos, además modificó la disponibilidad de agua, también aumentó la resistencia de plagas y enfermedades agrícolas lo que generó consecuencias funestas globales, tanto sociales como ecológicas (Ceccon, 2009).

Dentro de esta tarea de reducción de fertilizantes de síntesis química se busca actuar sobre los cultivos agrícolas de tal forma que permita un aumento del contenido de la materia orgánica (Julca *et al.,* 2006), lo cual a su vez tendría un efecto positivo sobre la actividad biologica del suelo, específicamente sobre los microrganismos benéficos en la agricultura, para disminuir la pérdida de los suelos ya que son eficientes transformadores de sustratos edáficos en tejidos microbianos (Wild, 1992). Dando como resultado efectos benéficos directos o indirectos sobre la planta, así como un uso sustentable del suelo.

1.2.3 Hongos Micorrízicos Arbusculares

El término micorriza se refiere a asociaciones simbióticas mutualistas entre hongos del suelo y las raíces de las plantas. Los hongos involucrados en esta asociación son biótrofos obligados, por lo que solo pueden completar su ciclo de vida en presencia de la planta hospedera. Las micorrizas arbusculares son la asociación más común, colonizan entre el 80-90% de las plantas terrestres y solo 200 especies de hongos han sido identificadas en el Filum Glomeromycota (Smith y Read, 2008).

Taxonómicamente, su identificación ha sido compleja con cambios en su clasificación en los últimos 20 años. El Filum Glomeromycota, se creó con base a la secuencia de la subunidad pequeña del ADNr (Schussler, 2001). Incluye una sola clase: Glomeromycetes y cuatro órdenes: Glomerales, Diversisporales, Paraglomerales y Archaesporales.

Su ciclo de vida implica una serie de pasos a partir del reconocimiento de la superficie de la raíz por el hongo, hasta la formación de un apresorio que genera la penetración de células epidérmicas, desarrollo de hifas intrarradicales y arbusculares, y en algunos casos, la formación de vesículas; reguladas bajo un control genético (Peterson *et al*., 2004) que se desarrolla en 3 etapas: etapa de asimbiótica (1), las esporas germinan y HMA muestran el desarrollo de hifas limitado en ausencia de una planta hospedera, una vez detectando exudados de la raíz, las hifas ramifican y se lleva a cabo la etapa presimbiotica (2), ésta se caracteriza por la extensa producción de las hifas (Buée *et al.,* 2000). Las ramificaciones de las hifas extrarradicales del hongo, se contactan con la superficie de la raíz a través de la formación de un apresorio, el cual aparece antes de la penetración de las hifas a la epidermis de la raíz. Finalmente, la colonización simbiótica (3) del tejido de la corteza de la raíz culmina, lo que implica la formación de arbúsculos intracelulares (estructuras fuertemente ramificadas), vesículas y la formación de un micelio extrarradical esporulativo (Bucher, 2006).

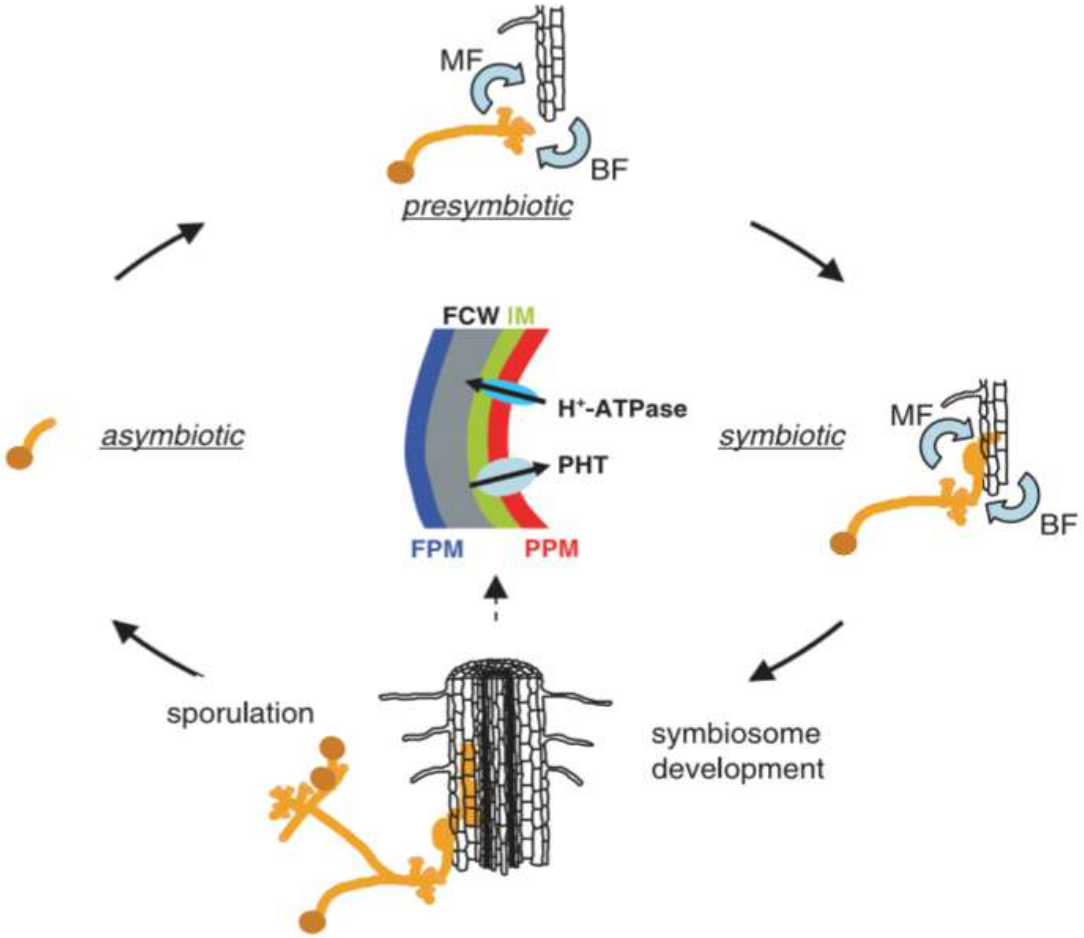


Fig. 1 Etapas de desarrollo de la simbiosis micorrízica arbuscular (Bucher, 2006).

El micelio extrarradical funciona como un sistema radical complementario que se extiende más allá de la zona de agotamiento de nutrientes cercana a la raíz (Bucher, 2006). Su función es la búsqueda, absorción y transporte de nutrientes para la planta, especialmente aquellos de lenta difusión en la solución del suelo, como el P, formulando una red tridimensional que parece ser idónea para retener las partículas de suelo, mejorando así la estabilidad de los agregados. Debido a las ventajas que presentan los HMA en las plantas de manera natural, han sido utilizados en la agricultura con diferentes investigaciones científica en cuanto a la mejora en la adquisición y movilización de nutrientes (Cardoso y Kuyper, 2006; Sylvia *et al*., 2005).

1.2.4 Uso de hongos micorrízicos arbusculares como tecnología alternativa en la agricultura

Los efectos benéficos de los HMA que ejercen sobre las plantas a las que colonizan son bien conocidos, especialmente cuando se habla de nutrición mineral, además tienen efectos indirectos como son: protección contra agentes patógenos de la raíz, protección contra sequía y atracción de parasitoides, entre otros (Jeffries *et al*., 2003). Se ha confirmado que el micelio externo de los HMA puede absorber fosfatos (PO_4^{-2}), nitritos (NO_3^-) y nitratos (NH_4^+) (Hodge *et al*., 2001; Villegas y Fortin, 2002) y también micronutrientes como el zinc (Zn) (Cardoso y Kuyper, 2006); mejoran la toma de nutrientes por este mecanismo, sin embargo, el incremento en la toma de fosfato es el beneficio más importante para la planta (Helgason y Fitter, 2009).

La mayoría de las plantas tienen dos vías de absorción de P_i, una llamada directa que hace referencia a la interface raíz-suelo, y la otra llamada micorrízica o simbiótica que corresponde al fósforo que se intercambia en los arbúsculos intracelulares formados por los HMA (Smith *et al*., 2003).

No obstante, el conocimiento de esta simbiosis aun muestra incógnitas en cuanto a la fisiología de esta interacción, que se han señalado un poco, en las últimas décadas gracias al uso de los cultivos *in vitro*.

1.2.5 Cultivos *in vitro* aplicados al estudio de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA)

El estudio de los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) debido a su condición de simbiontes obligados es difícil entender su interacción por lo que se han realizado estudios en sistemas de cultivo *in vitro* (Fernández Suárez *et al*., 2012). Estos sistemas han evolucionado a lo largo de los años y han contribuido a dar respuesta a las interrogantes relacionadas con la fisiología y la bioquímica de la asociación.

La primera esporulación *in vitro* fue obtenida en 1988 por Bécard y Fortin al utilizar raíces transformadas de zanahoria (*Daucus carota* L.) colonizadas con *Glomus intraradices*. Posteriormente, Bécard y Piché en 1992, realizaron modificaciones en el medio de cultivo existente, y redujeron las concentraciones de algunos elementos para evitar la inhibición del establecimiento micorrízico sin afectar el crecimiento y desarrollo radical. El uso de este

sistema permitió realizar un control riguroso de la raíz hospedera, el inóculo fúngico y las condiciones ambientales físicas, químicas y microbiológicas.

En el año 1995, Elmeskaoui y colaboradores publicaron un novedoso sistema que permitió micorrizar *in vitro* plantas de fresa (*Fragaria* sp.) y demostraron la capacidad de los HMA de reducir el estrés hídrico en plantas micorrizadas. Para el 2000 Joner *et al.,* demostraron la respuesta de las plantas al ser inoculación con HMA y la mejoría en la adquisición de fósforo, utilizaron radioisótopos de P, para evaluar la capacidad mineralizadora de los HMA al absorber y traslocar a las raíces colonizadas, formas orgánicas e inorgánicas de P.

En el 2005, se publicó un sistema de micorrización autotrófico, «parcialmente» *in vitro*, de plantas de *Solanum tuberosum* L. al utilizar placas Petri, por Voets *et al*., donde obtuvieron una intensa colonización micorrízica y la producción de miles de esporas después de 22 semanas de cultivo.

Una vez establecida las técnicas de cultivo parcialmente *in vitro,* surgió otra limitante, el medio de cultivo. Este constituye un eslabón clave para garantizar el establecimiento de la simbiosis micorrízica arbuscular en plantas *in vitro*, pues involucra a organismos con requerimientos nutricionales muy diferentes, Fernández Suárez *et al.* (2013) desarrollaron un medio de cultivo a partir de modificaciones nutricionales realizadas al medio MS, que permitió el establecimiento de la micorrización *in vitro* de plantas de papa con un estado nutricional adecuándolo que dio como resultado un medio de cultivo E en el cual la reducción de N-P-K fue al 25%, a diferencia del resto de los medios evaluados que presentaban concentraciones más altas de estos minerales, favoreció tanto el desarrollo de las plántulas como el establecimiento de la colonización micorrízica.

Castañeda-Ordoñez (2013), utilizó diferentes concentraciones de fósforo, con evaluaciones antes de trasplantar y después de 20 días después del trasplante (DDT) utilizando un sistema de cultivo *in vitro* monoxenico, demostrando que la simbiosis *G. intraradices* y la plántula de papa fueron efectivas porque aumentaron la concentración de fósforo foliar comparado con las plantas no micorrizadas, y se demostró que la función del HMA respecto a la nutrición fosforada mejora.

Algunos reportes indican que los HMA producen enzimas que hidrolizan P orgánico y transportan el P_i resultante a la raíz hospedera. Se ha demostrado que las hifas extraradicales

de *G. intraradices* en cultivo *in vitro* y en ausencia de otros microorganismos, pueden translocar P orgánico cuando la fuente es fitato (Koide y Kabir, 2000).

Fernández Suárez *et al. (*2017) trabajaron con la aplicación de un sistema de planta donante de micelio (PDM) en la micorrización *in vitro* de papa, obtuvieron elevados niveles de colonización (55%) a solo 12 días de haber entrado en contacto con las redes de micelio. Las plantas de papa se encontraban en condiciones óptimas para ser trasplantadas y fueron capaces de reproducir la colonia fúngica cuando se replantaron en medios frescos, produciendo un elevado número de estructuras extraradicales (micelio y esporas).

Los sistemas de cultivo *in vitro* demuestran su gran utilidad como herramienta para la investigación de numerosos aspectos relacionados con la simbiosis micorrízica de igual forma es muy rentable para los estudios de absorción y translocación de nutrientes en raíces micorrizadas bajo condiciones controladas, gracias a los sistemas *in vitro* que permiten observar, el desarrollo de la interacción en condiciones más puras (Voets *et al*., 2005).

En este sentido, es importante constar con investigación sobre los procesos de trasporte del P en chile habanero, ya que no existen reportes de esta planta modelo, para así aportar más a la comprensión de la fisiológica-desarrollo de esta simbiosis y su comportamiento frente a escases o exceso de este nutriente.

1.3 HIPÓTESIS

La inoculación de plántulas de *Capsicum chinense* con *Rhizophagus intraradices* mejora y optimiza la toma de P en condiciones parcialmente *in vitro.*

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo general

Evaluar la absorción de fósforo en plántulas de chile habanero mediante un sistema parcialmente *in vitro,* en interacción con *Rizhophagus intraradices.*

1.4.2 Objetivos específicos

- Implementar protocolos para manejo de propágulos infectivos (desinfección).
- Desarrollar un sistema de cultivo autotrófico parcialmente *in vitro* de *C. chinense* inoculado con *R. intraradices.*
- Evaluar la efectividad de *R. intraradices* con relación a la translocación de fosfatos hacia la planta bajo diferentes concentraciones P en el medio.

1.5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

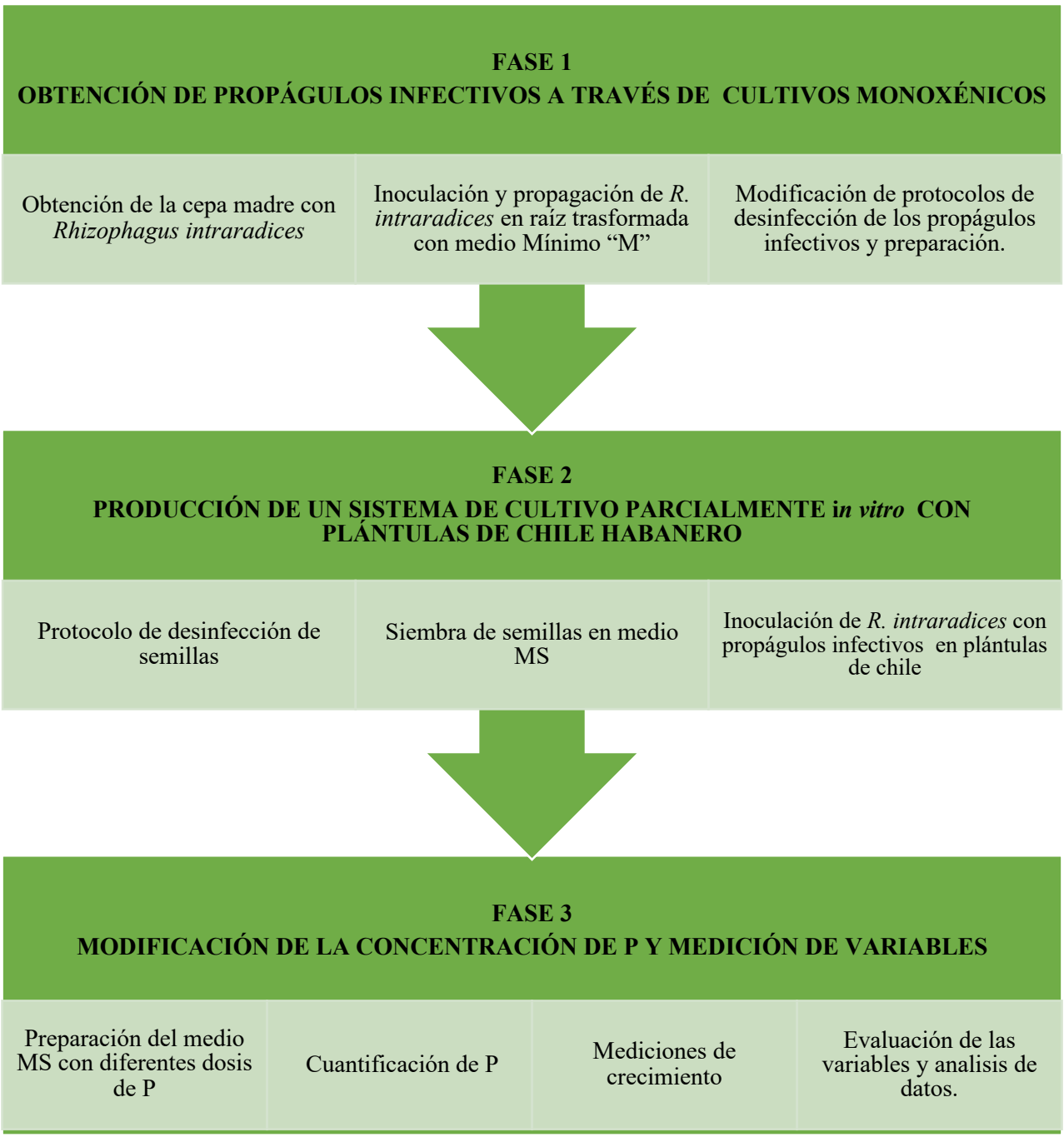


Fig. 2 Diagrama de flujo de la estrategia experimental propuesta para el desarrollo del proyecto de tesis.

1.6 LITERATURA CITADA

Bago, B.; Vierheilig, H.; Piché, Y. y Azcón-Aguilar, C. 1996. Nitrate depletion and pH changes induced by extraradical mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown in monoxenic culture. New Phytol 133: 273-280.

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

Bécard, G.; Fortin, J. A.; Bécard, G. y Fortin, J. A. 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. New Phytol 108: 211-218.

Borges Gómez Lizette, Soria Fregoso Manuel, Casanova Villarreal Víctor, Villanueva Cohuo Eduardo y Pereyda Pérez Gaspar. 2008. Correlación y calibración del análisis de fósforo en suelos de Yucatán, México, para el cultivo de chile habanero. Agrociencia, 42(1): 21-27.

Bucher, Marcel. 2007. Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. New Phytologist 173(1): 11-26.

Ceccon Eliane. 2008. La revolución verde tragedia en dos actos Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México 1(91): 21-29

Contreras Alonso, Rogelio; Aguilera Gómez, Luis I.; Arriaga, M. Rubí; Olalde Portugal, Víctor. 2007. Micorrizas arbusculares. Ciencia Ergo Sum, noviembre-febrero, 300-306.

Cordell, D., Drangert, J., White, S. 2009. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. Global Environmental Change 19(2): 292–305.

Cranenbrouck, S.; Voets, L.; Bivort, C.; Renard, L.; Stullu, D. G. y Declerck, S. 2005. Methodologies for *in vitro* cultivation of arbuscular mycorrhizal fungi with root organs. In: *In vitro* culture of mycorrhizas. Springer, Berlin, p. 341-348.

Declerck, S.; Strullu, D. G. y 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.

Dupré de Boulois, H.; Voets, L.; Delvaux, B.; Jakobsen, Y. y Declerck, S. 2006. Transport of radiocaesium by arbuscular mycorrhizal fungi to Medicago truncatula under *in vitro* conditions. Environmental Microbiology 11: 1926-1934.

Elmeskaoui, A.; Damont, J. J. P. y Piché, Y. 1995. A culture system for endomycorrhizal inoculation of micropropagated strawberry plantlets in vitro. Mycorrhiza 5: 313-319.

Fernández, María Teresa; Rodríguez, Hilda. 2005. El papel de la solubilización de fósforo en los biofertilizantes microbianos. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, XXXIX septiembre-diciembre, 27-34.

Foyer, C. and M. Paul. Source-Sink Relationships. 2001. pp. 11. In: Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group, United Kingdom.

Gerdemann, J. W. y Nicholson, T. H. 1963. Spore of mycorrhizae endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. Trans Br. Mycol. Soc 46: 235-244

González E. Tomas, et al. Chiles cultivados en Yucatán. Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán, Uso de la Flora y Fauna Silvestre. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Yucatán. México.

Gumbo, B. 2005. Short-cutting the phosphorus cycle in urban ecosystems. Delft University of Technology. 325 p.

Havlin, J., Beaton, J., Tisdale, S. and Nelson, W. 2005. Soil Fertility and Fertilizers. 7th Edition. Ed. Pearson Prentice Hall. Charper 5 pp: 354-358.

Joner, E. J.; Ravnskov, S.; Jakobsen, I. 2000. Arbuscular mycorrhizal phosphate transport under monoxenic conditions using radio-labelled inorganic and organic phosphate. Biotechnol. Lett 22: 1705-1708

Luna Tobar Alfredo. 1997. Historia política internacional de las Islas Galápagos, Ecuador 306-311. Cita incompleta

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15: 473-497.

Otiniano Julca, Meneses Florián Alberto, Blas Sevillano Liliana, Bello Amez Raul. 2006. Organic matter, importance, experiences and it role in agriculture**.** Idesia (arica), 24(1), 49 61.

Pawloska, T. E.; Douds, D. D. y Charvat, I. 1999. *In vitro* propagation and life cycle of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum*. Mycol. Res., vol. 103: 1549-1556.

Picone I. Liliana y Zamuner Ester. 2006. Fósforo orgánico y fertilidad fosfórica. Facultad Ciencias Agrarias (UNMP)-EEA INTA 276

Ravnskov S. Jakobsen I. 1995 Functional compatibility in arbuscular mycorrhizas measured as hyphal P transport to the plant. New Phytologist 129 (4): 611-618.

Rodríguez, H. and Fraga, R. 1999. "Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion." Biotechnology Advances 17: 319–339.

Sally E. Smith, F. Andrew Smith, and Iver Jakobsen. 2003 Mycorrhizal Fungi Can Dominate Phosphate Supply to Plants Irrespective of Growth Responses. Plant Physiol. Vol. 133:16-20

Steen Ingrid. 1998. Phosphorus availability in the 21st century Management of a nonrenewable resource. The article originally appeared in the Journal: Phosphorus & Potassium, Issue 217:2

Taiz L. Zeiger. 2006 E. Plant Physiology, 3rd. Ed. Sinauer Associates, Inc. D.L., Sunderland USA p.515-523.

CAPÍTULO II

CAPÍTULO II. DINÁMICA DE ABSORCIÓN DE FÓSFORO EN CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.) ASISTIDA CON *Rizhophagus intraradices* EN CULTIVO AUTOTRÓFICO PARCIALMENTE *in vitro*.

Jazmin A Lopez Herrejón[1], Carlos J Alvarado López [2§], Arturo Reyes Ramírez[1], Horacio Salomón Ballina Gomez[1], Jairo Cristóbal Alejo [1]
[1]Tecnológico Nacional de México, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico de Conkal, [2]Catedrático CONACYT. Avenida Tecnológico S/N, Conkal, Yucatán, México. C.P 97345.
[§] Autor responsable: carlos.alvarado@itconkal.edu.mx

RESUMEN

El fósforo (P) es vital para el desarrollo de las plantas y tiene una baja solubilidad en el suelo, ocasionando una zona de desabastecimiento alrededor de las raíces y limitando el crecimiento vegetal por déficit nutricional. Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) ayudan a mejorar la nutrición de las plantas, atreves de su red de hifas que explora lugares donde las raíces no pueden llegar. Esta investigación evaluó la absorción de fósforo en plántulas de chile habanero en un sistema parcialmente *in vitro*, inoculado con *Rizhophagus intraradices*. Se estableció de 1 a 4 semillas de chile habanero del hibrido Chichen Itzá en frascos de cristal de 12x8 cm con 20 mL de medio MS, a los 25 DDG se trasplanto a cajas Petri con medio MS modificado (en la concentración de P: 0.500, 0.850, 1 g L^{-1}). Las raíces estaban en contacto con el medio y la planta sobresalía por un orificio. Empleando un diseño con arreglo factorial dando un total de 6 tratamientos con 10 repeticiones. Se observó un comportamiento diferenciado tanto en los parámetros de crecimiento vegetal, fisiológicos y fúngicos, dependiendo de la concentración de P en el cual se desarrollaron. Se observaron diferencias significativas en la toma del P mostrando una mayor eficiencia, en los tratamientos inoculados.

Palabras clave: Micorrización *in vitro*, eficiencia de la toma de P, chile habanero.

ABSTRAC

Phosphorus (P) is vital for the development of plants and has a low solubility in the soil, causing a shortage zone around the roots and limiting plant growth due to nutritional deficit. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) help to improve the nutrition of plants, through their network of hyphae that explore places where roots can not reach. This research evaluated the phosphorus uptake in habanero pepper seedlings in a partially *in vitro* system, inoculated with Rizhophagus intraradices. One to four habanero chili seeds from the Chichen Itzá hybrid were placed in 12x8 cm glass jars with 20 mL of MS medium, at 25 DDG they were transplanted into Petri dishes with modified MS medium (in the P concentration: 0.500, 0.850, 1 g L-1). The roots were in contact with the medium and the plant protruded through a hole. Using a design with factorial arrangement giving a total of 6 treatments with 10 repetitions. A different behavior was observed in the parameters of plant, physiological and fungal growth, depending on the concentration of P in which they developed. Significant differences were observed in the P uptake showing greater efficiency in the inoculated treatments.

Key words*: in vitro* mycorrhization, efficiency of P uptake, habanero pepper.

2. 1 INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) tiene una escasa disponibilidad en el suelo, por lo que puede limitar el crecimiento de las plantas. Las interacciones entre planta-microorganismo en la adquisición de nutrientes y la promoción del crecimiento, son de suma importancia, ya que influyen positivamente en la absorción de P en condiciones estresantes, como las que resultan de la escasez de P (Bulgarelli *et al.,* 2017).

Los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) se caracterizan por el intercambio mutuo de nutrientes con su hospedero, el hongo recibe el carbono fotoasimilado por la planta (Bago *et al*., 2003) y los HMA facilitan la capacidad de transferencia del P, al incrementar su micelio externo más allá del área de agotamiento de nutrientes que rodea la raíz, mejorando la tasa y la zona de absorción (Finlay, 2008).

Los HMA tienen una condición fisiológica de simbiontes obligados, lo cual dificulta su estudio. Debido a la complejidad de sus procesos fisiológicos y moleculares, no se pueden desarrollar en condiciones axénicas (Hodge, 2017).

Las innovaciones biotecnológicas han diseñado sistemas de cultivo *in vitro*, que permiten monitorear el establecimiento de la simbiosis y los factores que influyen en el trasporte nutricional, generando nuevos conocimientos de la biología básica de esta simbiosis (Kalyane *et al.,* 2017).

Un sistema para el estudio de la adquisición y trasporte del P es el cultivo autotrófico parcialmente *in vitro* (SA-PIV)*,* que consiste en desarrollar las raíces inoculadas dentro de la placa, en un ambiente totalmente *in vitro* y la planta modelo, sobresale por un orificio expuesta a condiciones ambientales de cuarto de crecimiento (Voets *et al.,* 2005).

Sin embargo, este tipo de cultivos *in vitro* no son tan sencillos pues debe tomarse en cuenta que cada especie de HMA y cada una de las simbiosis que generan, constituyen un sistema diferente (Fernández Martín, 2003), incluso el P mismo puede ser un sistema diferente.

Hasta el momento no existe un sistema de cultivo de micorrización *in vitro* en plántulas de chile habanero que haya sido diseñado para el evaluar el trasporte de P, con base a lo anterior el objetivo del presente estudio consistió en evaluar el potencial de *R. intraradices* para trasportar el fósforo adicionado al medio de cultivo, utilizando el chile habanero como planta modelo en un cultivo autotrófico parcialmente *in vitro.*

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Área de estudio.

Esta investigación se llevó acabo en los laboratorios de Microbiología, Fisiología Vegetal y Biotecnología, del Instituto Tecnológico de Conkal.

2.2.2 Material Vegetal.

Las semillas fueron el hibrido Chile Habanero variedad Chichen Itzá Seminnis®. Se realizaron tres lavados con Hipoclorito de Sodio (NaClO) al 2% por 6 min, intercalados con tres lavados de agua destilada estéril por 6 min con agitación continua, durante el proceso de desinfección se desecharon las semillas vanas. Lo anterior con qué el propósito, de obtener un material vegetal innocuo y reducir los problemas de contaminación en el medio.

2.2.2.1 Producción de plántula.

Las semillas se establecieron en frascos de vidrio de 12x8 cm con 20 mL de medio de cultivo Murashige & Skoog (MS, 1962) suplementado con 30 g L^{-1} de sacarosa y 2 g L^{-1}

de Phytagel™ (SIGMA-ALDRICH®), se redujo la concentración del gelifícate a la mitad para generar un medio semi sólido, dosificando con 20 mL de medio ajustado a pH 5.5-5.8 antes de la esterilización (121 °C, 15 min.), en Cámara de Flujo Laminar se sembró sobre el medio de 1 a 4 semillas por frasco.

Los frascos fueron cultivados a 25 ± 2 °C de temperatura y 8/16 h de fotoperiodo, una intensidad lumínica de 100 µmol generados por focos en espiral fluorescentes de 65 Watts para iniciar la germinación. Las semillas se monitorearon s hasta obtener la germinación (7 días aproximadamente), trascurridos 25 días después de la germinación (DDG) se procedió al trasplante.

Las semillas se establecieron en frascos de vidrio de 12x8 cm con 20 mL de medio de cultivo Murashige & Skoog (MS, 1962) suplementado con 30 g L^{-1} de sacarosa y 2 g L^{-1} de Phytagel™ (SIGMA-ALDRICH®), se redujo la concentración del gelifícate a la mitad para generar un medio semi sólido, dosificando con 20 mL de medio ajustado a pH 5.5-5.8 antes de la esterilización (121°C, 15 min.), en Cámara de Flujo Laminar se sembró sobre el medio de 1 a 4 semillas por frasco.

Los frascos fueron cultivados a 25±2°C de temperatura y 8/16 h de fotoperiodo, una intensidad lumínica de 100 µmol generados por focos en espiral fluorescentes de 65 Watts para iniciar la germinación. Las semillas se monitorearon s hasta obtener la germinación (7 días aproximadamente), trascurridos 25 días después de la germinación (DDG) se procedió al trasplante.

2.2.3 Obtención del inoculo fúngico a través del cultivo monoxénico de *Rizophagus intraradices*.

La cepa *R. intraradices* en asociación con raíces trasformada (Ri T-DNA) de zanahoria (*Daucus carota* L.) en medio M (Mínimo) (Bécard y Fortin 1988), cultivado en cajas Petri, fue adquirida en colaboración con el laboratorio de Interacción suelo-planta-microorganismo del Centro de Innovación y Desarrollo Agroalimentario de Michoacán (CIDAM). La cepa fue subcultivada de acuerdo conla metodología descrita por St-Arnaud *et al.* (1996).,

2.2.4 Desinfección de propágulos infectivos de *R. intraradices*

Se utilizó la metodología de Mertz *et al.*1(979), las cual consiste en aplicar una serie de lavados con hipoclorito de sodio, cloramina T, estreptomicina y gentamicina con la inclusión del surfactante Tween 20.

Como primer lavado se utilizó hipoclorito de calcio por 1 min, ya que es inestable y se degrada cuando permanece unido a los propágulos de los hongos. Sin embargo, no se utilizó el hipoclorito de sodio como menciona la metodología, ya que cuando no se enjuaga a fondo permanece alrededor de las esporas o en los fragmentos de raíz desinfectados donde puede tener un efecto tóxico (Cranenbrouck *et al.,* 2005).

Se realizaron modificaciones a este protocolo, utilizando 15 mL del desinfectante comercial Sanix® AH uso veterinario, en sustitución de cloramina T, posteriormente se añadió 100 µl de Tween 20 al 2% a la misma solución por 10 min, se enjuagaron con agua destilada estéril y se procedió a agregar 100 µl de la solución antibiótica de Gentamicina de

80 mg por 10 min. Una vez desinfectados se almacenaron a 4° C hasta su posterior inoculación en el sistema de cultivo autotrófico parcialmente *in vitro* (SA-PIV).

2.2.5 Desarrollo del cultivo autotrófico parcialmente *in vitro* para plántulas de chile habanero.

Se estableció el SA-PIV para plántulas de chile habanero, como lo describen Voets *et al*. (2005), en plántulas de papa. Con la ayuda de una espátula caliente se realizaron dos orificios en la caja Petri (± 2 mm de diámetro) uno en la base y otro en la tapa (Figura 6); las placas contenían 20 mL de medio MS sin sacarosa, sin vitaminas y solidificado con 4 g L^{-1} de Phytagel™ (SIGMA-ALDRICH®). Se transfirieron plántulas de chile habanero crecidas en cultivo *in vitro,* a los 25 DDG (una vez que presentaban de 2 a 4 hojas verdaderas y de 1-1.5 cm de longitud aproximadamente). Las raíces se colocaron en contacto con la superficie del medio, mientras que el tallo sobresalía a través del orifico de la placa, tanto las placas como el orificio se sellaron con película plástica.

Los sistemas se cubrieron con bolsas de fomy negras esto con la finalidad de proteger las raíces de la luz, pero se dejó la parte aérea al aire libre. Toda la estructura se mantuvo en un cuarto de crecimiento con una intensidad lumínica de 100-150 µmol y un fotoperiodo de16 h luz / 8h oscuridad y una temperatura de 23 – 25 °C.

Cada semana, con base a la necesidad de las plantas y el tratamiento, se añadió medio MS sin sacarosa ni vitaminas, esterilizado a 120 °C durante 15 min, a las placas Petri para mantener un nivel adecuado de nutrientes a las plantas.

2.2.6 Modificación en la concentración de P en el medio MS e inoculación de *R. intraradices* en el CA-PIV

Se realizó la modificación de la concentración del P en el medio de cultivo MS el mismo día que se llevó acabo el trasplante, tomando como referencia la concentración de P en el medio M, esto con la finalidad de cumplir los requerimientos nutricionales de ambos organismos obteniendo las siguientes concentraciones: 1 g L^{-1} (optima), 0.850 g L^{-1} (moderada), 0.500 g L^{-1} (baja).

A los 32 DDG se realizó la inoculación, con ayuda de una micropipeta Eppendorf (200 µL) se inocularon 100 µL de la solución de propágulos infectivos a la cercanía de las raíces de chile habanero.

2.3 VARIABLES EVALUADAS

El desarrollo fúngico y de las plantas fue monitoreado a los 7, 14, 21, 28 y 35 días después de inoculación (DDI). Las variables estudiadas fueron: longitud del tallo (mm), longitud de raíz (mm), numero de hojas por planta, observaciones de contacto entre hifas fúngicas y raíces Al finalizar el ensayo (40 DDI) se estimó la masa fresca y seca (g) por cada órgano vegetal, también se analizaron las concentraciones nutrimentales foliares, radiculares y de tallo por medio de Micro-fluorescencia de Rayos X (µFRX) (M4 TORNADO-Bruker), la calidad fisiológica de las plántulas se evaluó por medio de la florescencia de la clorofila a través del JUNIOR-PAM chlorophyll fluorometer y el % de la presencia de estructuras típicas de una colonización micorrízica.

En cuanto al % de la presencia de estructuras micorrízicas, para su determinación se colectaron las raíces y se secaron en horno a 60 °C clarificaron con KOH (10 %) a 80 °C en

baño maría. Se tiñeron con una solución de tinta azul (1% HCL:1% de tinta azul (Parker)) a 80 °C por 15 min (Rodríguez *et al*., 2015).

Se montaron 10 raíces de 1 cm de longitud, con cuatro repeticiones por planta dando un total de 16 láminas por tratamiento. La colonización micorrízica se estimó con base en la presencia de las estructuras micorrízicas dentro de la raíz (hifas, arbúsculos y vesículas) con la técnica de intersecciones amplificadas descrito por McGonigle *et al*. (1990). Las observaciones se ejecutaron bajo microscopio compuesto de campo (Leyca).

2.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizó un diseño factorial AxB, con 10 repeticiones por tratamiento. El factor A fue la inoculación con *R. intraradices* (inoculado y no inoculado) y el factor B concentraciones de P (1 g, 0.850 g, 0.500 g) en el medio, dando un total de seis tratamientos donde: T1, T3, T5 (1 g, 0.850 g, 0.500 g de P, respectivamente) inoculadas con *R. intraradices;* y T2, T4, T6 (1 g, 0.850 g, 0.500 g de P, respectivamente) sin inocular, la unidad experimental consistió de una caja Petri dando un total de 60 unidades experimentales.

2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para las variables fisiológicas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey p (≤0,05). Las variables de desarrollo vegetal, fúngicas y nutrimentales fueron sometidos a una prueba de Duncan (p≤0,05). Se utilizó el programa estadístico InfoStat/L.

2.6 RESULTADOS

2.6.1 Desarrollo del sistema de cultivo autotrófico parcialmente *in vitro* de Chile habanero inoculado con *R. intraradices*.

Se desarrolló con éxito la asociación *Capsicum Chinense-Rizhophagus intraradices* en condiciones *in vitro*, y se observó una colonización intraradical por parte de la cepa a los 14 DDI. Los primeros puntos de contacto entre las hifas y las raíces comenzaron a dispersarse de manera profusa en el medio de cultivo. A los 21 días DDI una red de hifas cubrió el volumen del medio.

Por otra parte, las condiciones del cuarto de crecimiento y el propio CAP-IN resultaron positivos para las plántulas de chile habanero (ya que se observó un aumento en el número de hojas conforme al paso del tiempo y un crecimiento extenso de raíces en el medio). El desarrollo de la plántula en si fue dependiente del tratamiento al cual pertenecía (Figura 1).

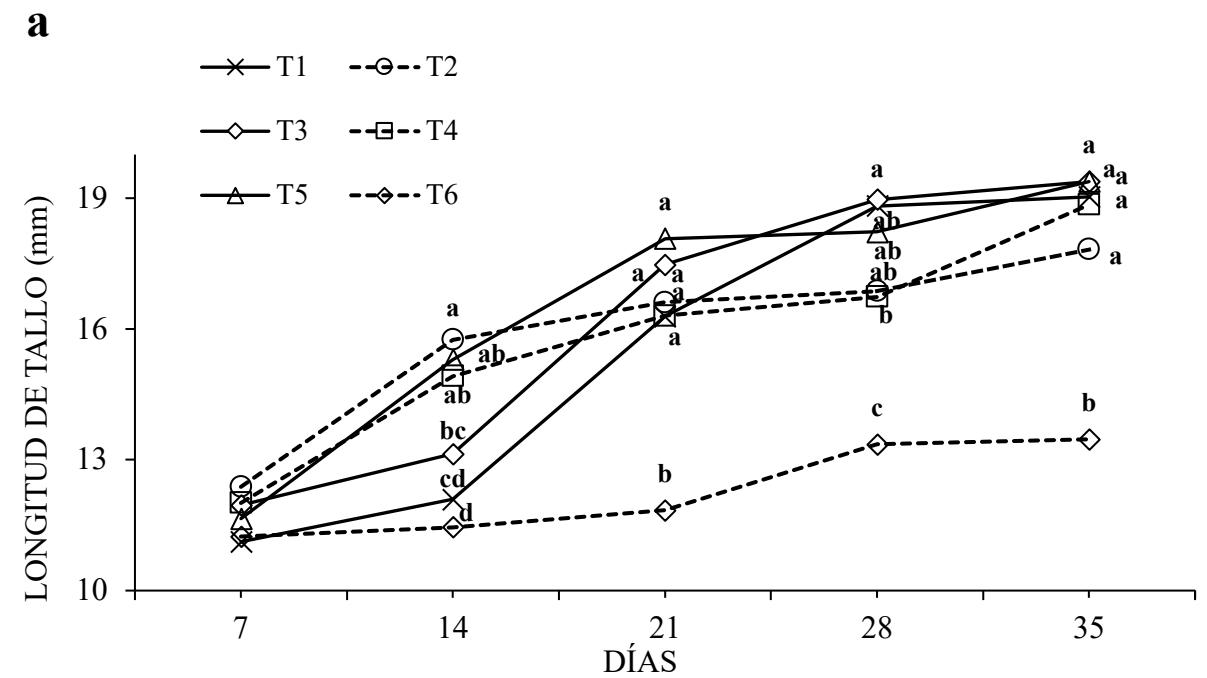
Fig. 3 Plántula de chile habanero (*Capsicum Chinense* Jacq.) en crecimiento en un sistema de cultivo autotrófico parcialmente *in vitro*.

2.6.2 Desarrollo vegetal

Para las variables longitud de tallo y raíz se presentaron diferencias significativas entre tratamientos desde la primera semana y hasta el término del ensayo (35 DDI), mostrando un mayor efecto de crecimiento, en los tratamientos donde se inoculó con *R. intraradices* (Fig. 2), sin embargo, las diferentes concentraciones de P influyeron de manera diferencial en el comportamiento vegetal en todos los tratamientos.

En cuanto a la longitud de tallo (Fig. 2 a), los valores comenzaron a presentar diferencias significativas ($P \leq 0.01$) a los 14 DDI y los mayores valores se mostraron en el tratamiento T2 (1 g L^{-1} de P sin inocular) sin embargo, su comportamiento a través del tiempo fue estadísticamente igual al T5 (0.5 g L^{-1} de P con *R. i.*). Pese a que el tratamiento T6 (0.5 g L^{-1} de P sin *R.i.*) contenía la misma concentración de P que el T5, el cual presentó los promedios más bajos durante todo el experimento. Para los 21 DDI y hasta el final del experimento los tratamientos inoculados presentaron los promedios de tallos más largos.

Al analizar la variable longitud radical (Fig.2 b) en los tratamientos hubo un aumento exponencial del crecimiento radicular a través del tiempo, no obstante, los mayores valores se encontraron en los tratamientos inoculados con el hongo micorrízico (T1, T3 Y T5), este contraste se observó con base a la mayor extensión de la raíz y a la diferencia del incremento en un 50% más que en los tratamientos no inoculados (T2, T4 Y T6) en este contexto se evidencio el efecto positivo de *R. intraradices.* A partir de los 14 DDI el tratamiento T6 mostro un menor crecimiento y muy poco uniforme ya que sus valores fueron por debajo de todos los tratamientos, con lo que se comprobó que la concentración de P era insuficiente para satisfacer las necesidades de las plantas.



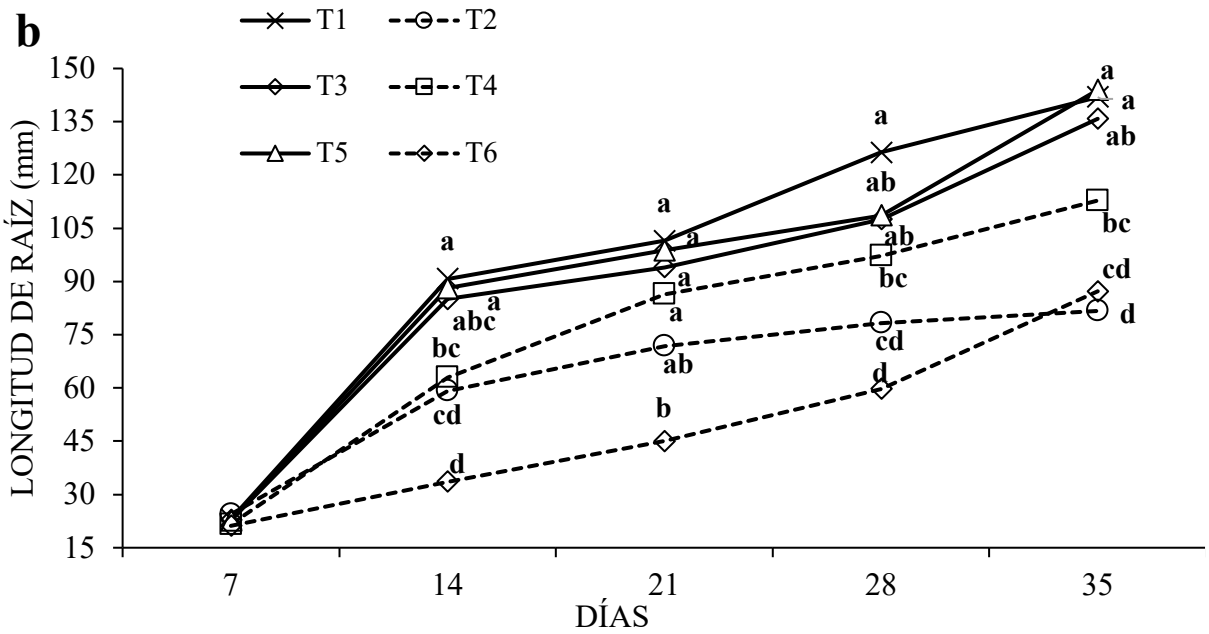


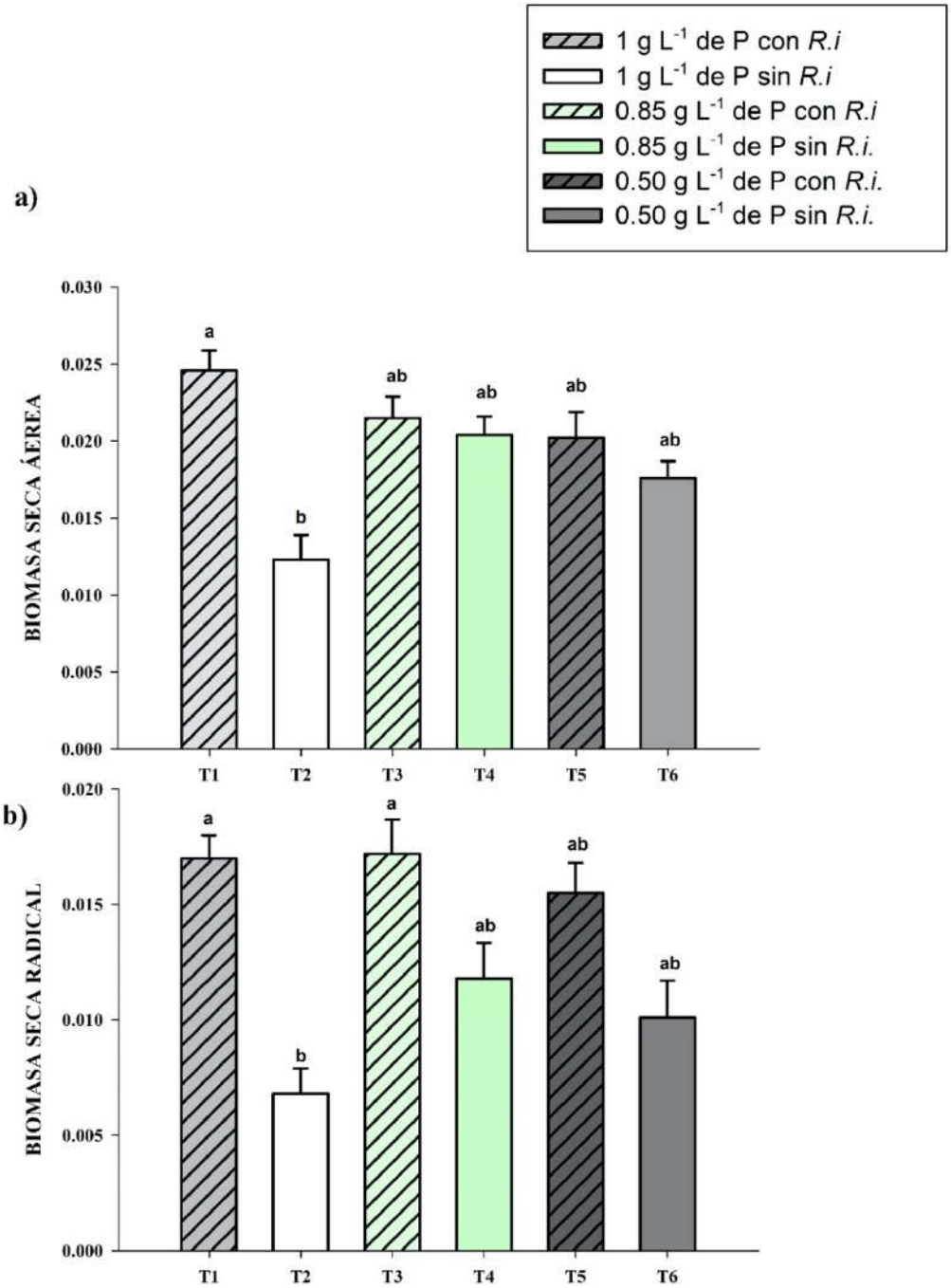
Fig. 4 Efecto de las concentraciones de P en el medio de cultivo en interacción con *R. intraradices* en el desarrollo de plántulas de chile habanero, cultivadas en el sistema autotrófico parcialmente *in vitro* a través de las variables **a** longitud de tallo y **b** raíz.

2.6.3 Biomasa seca

En cuanto a la variable biomasa seca aérea y radical, solo se observaron diferencias significativas al analizar la interacción de las dosis de P y el tipo de inoculación.

La biomasa aérea, obtuvo los mayores valores cuando las plantas tenían la dosis más alta de P (1g L^{-1} de P) e inoculada con el hongo y con el menor valor en la dosis de P más alta, pero sin inocular, el resto de los tratamientos fue estadísticamente igual, no obstante, los mayores valores fueron dados por las plantas inoculadas.

Se encontró mayor producción de biomasa seca radicular en plantas inoculadas independientemente de la dosis de P adicionada, las plantas no inoculadas produjeron menor biomasa seca radical. Sin embargo, los tratamientos 4 y 6 con las dosis de P moderada y baja (inoculado y no inoculado, respectivamente) fueron estadísticamente iguales a todos los tratamientos.



Valores con letras distintas ± la desviación estándar son estadísticamente diferentes (Duncan, $p \leq 0.05$).

Fig. 5 Efecto de la interacción de *R. intraradices* y las concentraciones de P en el medio de cultivo en el desarrollo de plántulas de chile habanero cultivadas en el sistema autotrófico parcialmente *in vitro* a través de la biomasa seca **a)** aérea **b)** radical.

2.6.4 Análisis nutrimental

En general, el contenido nutrimental en los diferentes órganos vegetales (hoja, tallo, raíz), fue mayor en las plantas inoculadas con el hongo, denotando la influencia de éste en la movilización de nutrientes.

Las hojas de las plantas con la aplicación de la dosis más alta de P (1 g L^{-1} de P) e inoculadas con el hongo mostraron un incremento en un 50 % en la concentración de Mg, Mn, Fe y Zn, en comparación con los tratamientos sin inocular. También, se apreció un efecto positivo de la interacción de *R. intraradices* y la reducción de la dosis de P ya que en hojas el T5 (0.50 g L^{-1} de P + *R.i.*) mostró una acumulación superior de P.

En cuando al tallo únicamente se presentaron diferencias significativas en los elementos de Mg, Fe y Zn. Para Mg y Zn el mayor valor se presentó en las plantas con P moderado (0.85 g L^{-1} de P) e inoculadas, en cuanto al Fe el tratamiento con mayor acumulación fue el que contenía la dosis de P alta e inoculada con el hongo. El resto de los elementos no presentaron diferencias significativas.

En lo que concierne al contenido nutrimental de la raíz para Mn, Mg, Fe y Zn el tratamiento con la dosis de P alta (1g L^{-1} de P) e inoculado mantuvo la misma tendencia, siendo siempre estadísticamente mayor que el resto de los tratamientos, independientemente de si fueron inoculados o no.

Para el P se observó un comportamiento interesante ya que las plantas adicionadas con 0.85 y 0.50 g L^{-1} de P e inoculadas duplicaron la concentración de P en la raíz, pero las plantas tratadas con la dosis más alta de P e inoculadas con el hongo, aumentaron su contenido de P seis veces más en comparación con su control sin inocular, demostrando la ventaja de *R. intraradices* para movilizar de manera eficiente el P a la raíz.

Cuadro 1. Concentración mineral (mg . kg^{-1}) en hojas, tallo y raíz de chile habanero en los diferentes tratamientos en el sistema de cultivo autotrófico parcialmente *in vitro*.

HOJA mg . g^{-1}					
Tratamientos	**Mg**	**P**	**Mn**	**Fe**	**Zn**
T1	18.98±5.58[a]	22.38±1.48**b**	12.10±1.81**a**	4.81±0.61**a**	4.17±1.61**a**
T2	6.35±2.27**b**	4.43±0.57**b**	3.68±0.89**b**	0.82±0.44**c**	1.42±0.68**a**
T3	6.86±0.98**b**	10.20±1.24**b**	4.76±0.43**b**	2.32±0.67**bc**	2.42±0.66**a**
T4	5.35±2.15**b**	4.07±0.17**b**	2.62±1.11**b**	1.31±0.44**bc**	1.88±1.48**a**
T5	8.01±2.01**b**	467.49±51.99**a**	5.05±0.56**b**	3.27±1.13**ab**	2.87±0.44**a**
T6	2.07±1.04**b**	4.20±0.60**b**	4.20±0.96**b**	1.43±0.76**bc**	2.94±0.52**a**

TALLO mg . kg^{-1}					
Tratamientos	**Mg**	**P**	**Mn**	**Fe**	**Zn**
T1	0.42±0.09**b**	0.27±0.05[a]	0.42±0.09**a**	1.91±0.90**a**	2.31±0.72**ab**
T2	0.10±0.09**c**	0.12±0.02[a]	0.27±0.09**a**	0.57±0.11**b**	0.70±0.39**b**
T3	0.72±0.18**a**	0.26±0.09[a]	0.52±0.05**a**	0.91±0.34**ab**	2.66±0.67**a**
T4	0.08±0.05**c**	0.23±0.07[a]	0.50±0.14**a**	0.83±0.06**ab**	2.18±0.66**ab**
T5	0.14±0.04**c**	0.12±0.01[a]	0.49±0.15**a**	0.29±0.04**b**	1.51±0.24**ab**
T6	0.11±0.05**c**	0.09±0.05[a]	0.38±0.06**a**	0.46±0.03**b**	1.70±0.32**ab**

	RAÍZ mg . kg $^{-1}$				
Tratamientos	**Mg**	**P**	**Mn**	**Fe**	**Zn**
T1	2.61±0.76**a**	4.38±0.65**a**	2.52±0.80**a**	7.42±1.76**a**	10.06±2.67**a**
T2	0.46±0.06**b**	0.62±0.19**c**	0.37±0.35**b**	1.34±0.42**b**	1.72±0.13**b**
T3	0.72±0.37**b**	1.85±0.29**b**	1.05±0.17**b**	3.92±0.64**b**	4.49±0.92**b**
T4	0.11±0.06**b**	0.73±0.35**bc**	0.57±0.35**b**	1.75±0.94**b**	1.79±1.09**b**
T5	0.66±0.06**b**	0.98±0.24**bc**	0.64±0.04**b**	2.17±0.78**b**	2.40±0.28**b**
T6	0.21±0.10**b**	0.46±0.10**c**	0.34±0.09**b**	1.03±0.37**b**	1.33±0.28**b**

Valores con letras distintas ± la desviación estándar son estadísticamente diferentes (Duncan, $p \leq 0.05$).

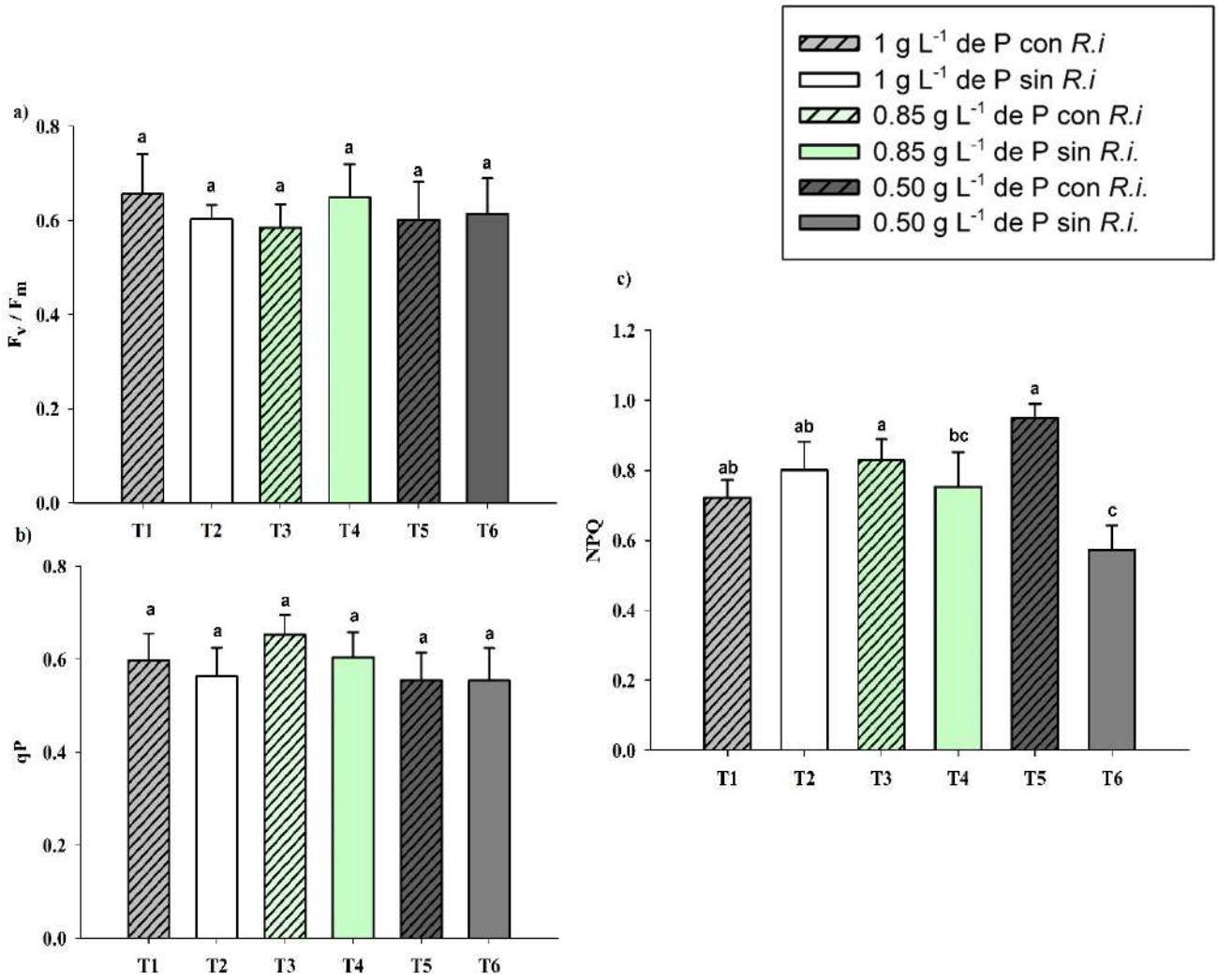
Dónde: **T1:** 1 g L^{-1} de P con *R.i* **T2:** 1 g L^{-1} de P sin *R.i* **T3:** 0.85 g L^{-1} de P con *R.i* **T4:** 0.85 g L^{-1} P sin *R.i* de P **T5:** 0.50g P con *R.i* **T6:** 0.50 g L^{-1} de P sin *R.i*.

2.6.5 Parámetros de Fluorescencia de la clorofila

El máximo rendimiento cuántico fotoquímico de PSII (Fv / Fm) se observó en el tratamiento que contenía a las plantas inoculadas con el hongo y la dosis más alta de P, T1 (0.784) con mayor rendimiento con respecto a las plantas no inoculadas y misma dosis (0.685) (Figura 4A).

En relación al Quenching fotoquímico (qP) con respecto a las plantas inoculadas con *R. intraradices* y no inoculadas no mostraron diferencias significativas, pero el T3 con la dosis moderada de P e inoculado, presentó el mayor promedio (Figura 4B).

Contrariamente el Quenching no fotoquímico (NPQ), presentó un comportamiento similar en las plantas que contenían *R. intraradices*, (1.00) aumentando el NPQ un 20% con respecto a las plantas de no inoculadas (0.88) (Figura 4C).



Intensidad de luz: 190 µmol m -2 s-1. Las medias ± DE con letras diferentes representan diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$)

Fig. 6 a) Rendimiento cuántico fotoquímico máximo del fotosistema II (PSII) (Fv/Fm), **b)** Quenching fotoquímico (qP) y **c)** quenching no fotoquímico (NPQ) en plántulas de chile habanero con diferentes concentraciones de P en interacción con *R. intraradices.*

2.6.5 Colonización e intensidad de estructuras micorrízicas

Por otra parte, las variables fúngicas de porcentajes de colonización e intensidad de estructuras típicas de unas simbiosis, reflejaron ampliamente el comportamiento micorrízico. Para esta variable, se analizaron únicamente los tratamientos inoculados (T1, T3 y T5). El mayor porcentaje de vesículas y arbúsculos se observaron en el tratamiento con la dosis baja de P (0.50 g L^{-1}) en el que se contabilizó el doble de estructuras en relación a los tratamientos T1 y T3.

En cuanto a las hifas no hubo diferencias significativas, sin embargo, el mayor promedio se estimó en el tratamiento T1; con dosis alta de P (1 g L^{-1}).

Cuadro 2. Efecto de las concentraciones de P sobre la colonización de estructuras inoculadas con *Rhizohagus intraradices* en raíces de plántulas de *Capsicum chinense*.

TRATAMIENTO	Hifas (%)	Arbúsculos (%)	Vesículas (%)
T1	88.94 ± 6.69^{a}	9.98 ± 6.28^{b}	68.00 ± 6.26^{b}
T3	83.33 ± 5.08^{a}	13.50 ± 5.69^{ab}	69.35 ± 9.22^{b}
T5	73.00 ± 4.69^{a}	17.00 ± 5.40^{a}	80.16 ± 3.58^{a}

Valores ± la desviación estándar seguidos por la misma letra en la misma variable y muestreo no difieren significativamente para $p \leq 0.05$, según Test de Duncan.

Se observó un marcado crecimiento micelial durante las cuatro semanas de muestreo, proveniente tanto de hifas intactas o dañadas que se encontraban adheridas a la superficie de las raíces, como de hifas que emergían desde el interior radical (Fig. 5). Este crecimiento fue aumentando en intensidad a medida que las plantas estuvieron más tiempo (40 días) en contacto con las redes de micelio.

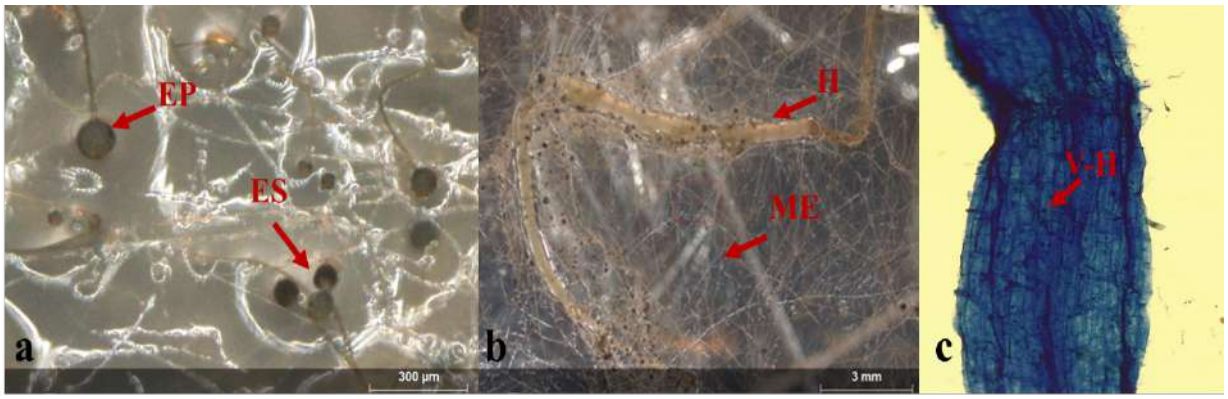


Fig. 7 a. Crecimiento de Esporas Primarias (EP); esporas secundarias (ES), **b.** Hifas en contacto con la raíz (H); producción de micelio externo (ME) y **c.** formación de vesículas e hifas (V-H).

2.7 DISCUSIÓN

Las plantas necesitan del P para sobrevivir y crecer. Las deficiencias de P pueden afectar a distintos procesos como síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Es de suma importancia el estudiar los procesos involucrados con el trasporte de P.

Una de las vías de trasporte es la captación de P a través de las micorrizas, el cual consiste en la absorción de P a partir de la solución del suelo por los transportadores fúngicos ubicados en los externos de las hifas y se suministra a las interfaces de hongo de las plantas en la corteza de la raíz (Smith *et al.,* 2003).

Los resultados obtenidos en esta investigación cuanto al sistema de cultivo parcialmente *in vitro* concuerdan con varios autores (Voets *et al*., 2005, 2009; Pérez Moncada *et al*., 2012; Fernández Suarez *et al*., 2015) en distintos modelos vegetales, donde se permitió la asociación exitosa con el HMA y las plantas de chile habanero micropropagadas.

2.7.1 Desarrollo vegetal

Las plantas micorrizadas demostraron tener una alta demanda del P reflejada en el crecimiento mayor de s raíces, esto debido a la posible presencia de trasportadores de alta afinidad por el P, presentes en el micelio extrarradical del hongo, generando mayor trasporte mineral con el fin de evitar la acumulación de los iones fosfato que pudieran llegar a dificultar el buen funcionamiento del hongo, debido a la incrementación de la presión osmótica, ocasionado cadenas de polifosfatos que se acumulan en las vacuolas (Rasmussen *et al.,* 2000). Por otra parte, fue evidente el efecto negativo que se ocasiono por el déficit de P, ya que se vio afectado el desarrollo del tallo y raíces de las plantas no inoculadas. Produciendo plantas enanas, provocando una maduración vegetal retardada y dando como consecuencia una mala calidad vegetal (Fernández, 2007) como se puede observar en el T6.

El mayor crecimiento vegetal en el tratamiento que presentaba el contenido nutricional de P más bajo e inoculado con el hongo. Lo anterior puede atribuirse principalmente a dos mecanismos, el primero: los micelios externos representan una importante superficie de absorción que en condiciones de estrés moderado, permiten mayor superficie de exploración mineral del medio (Ruscitti *et al.,* 2007) y segundo: la presencia del sistema vacuolar tubular móvil característico de *G. intraradices* (Olsson *et al.,* 2002) trasporta el P al interior de la vacuola a través del micelio interno, gastando menos energía que la trasferencia directa de P (Hartley y Smith 1983).

El contraste tan marcado de ambos tratamientos (T5 vs T6) pudiera ser atribuido a la mayor disponibilidad de P en las hifas fúngicas trasportadas a la raíz del hospedero, contrariamente el desbalance ocasionado por la reducción de P ocasionaba alteraciones bioquímicas en la planta.

2.7.2 Biomasa seca

Al analizar el efecto de la biomasa seca aérea y radical de la planta, se demostró que la micorrización no causó cambios sustanciales en el crecimiento foliar, pero estimuló el crecimiento radical de las plantas, tanto en condiciones de estrés nutrimental, como con un abastecimiento suficiente.

Efectos similares en este sentido han sido descritos en trabajos anteriores y en diferentes cultivos, donde se señalaron que la simbiosis hongo-planta es típicamente mutualista: el hongo depende de la planta para la obtención de fotoasimilados y la planta recibe a cambio una variedad de beneficios que le permite incrementar su crecimiento, como fue el caso de la biomasa seca de las plantas micorrizadas (Davies *et al.,* 1993).

Fue evidente que la micorrización juego un papel esencial en activar la difusión de iones y agua hacia las raíces de las plantas hospederas (Faber *et al.,* 1991), mejorando la nutrición y la absorción de fósforo, lo que permite a las plantas soportar las condiciones de estrés y recuperarse con mayor facilidad.

2.7.3 Análisis nutrimental

El aumento en la concentración de P en los diferentes órganos vegetales, corresponde directamente al eficaz funcionamiento de la simbiosis HMA, ya que la vía de adquisición del P micorrízica, se caracteriza por tener trasportados específicos que a su vez regulan la captación directa en las raíces (Bücking y Shachar-Hill 2005).

En cuanto a los tratamientos no inoculados es posible que el pH ácido del medio que oscilaba entre 5.5-6 y algunas cantidades de Al y Fe reaccionaron con el escaso P formando

fosfatos insolubles que indudablemente, disminuyeron aún más la concentración de P a disposición de la planta (Fernández-Suárez *et al.,* 2013).

Con base a los resultados que se obtuvieron, hubo una mejora en la captación de P, debido principalmente a la rápida translocación del P, por medio de los micelios externos del hongo inoculado.

2.7.4 Fotoquímica de la hoja

La eficiencia fotosintética está relacionada con una disminución en el contenido de nitrógeno de la hoja y en el contenido de clorofila. Los conocimientos actuales reflejan el efecto de fósforo y su influencia en cuanto a la disponibilidad o el uso de muchos otros elementos, ya sean o no esenciales (Azcón, 1997) dentro de los que se destaca el nitrógeno y viceversa, la concentración de P en las plantas, disminuyen cuando están en presencia de concentraciones limitadas de fósforo. Por otra parte, las plantas con y sin HMA mostraron valores de Fv/Fo similares. Lo anterior puede relacionarse con mayor consumo de fotoasimilados por el hongo simbionte, lo que ocasionó estrés a la planta y que se reflejó en valores bajos de Fv/Fo. En esta investigación los HMA incrementaron el crecimiento de las plantas y por ende pudieron agotar los nutrientes existentes en el sustrato, ocasionado un estrés a la planta al final de experimento que fue el momento de la medición.

En cuanto a los tratamientos en los que no se inocularon con *R. intraradices,* gracias al reciclado de nutrientes, se disipó el exceso de energía en forma de calor lo que previno un foto daño. Cuando una molécula de clorofila es excitada mediante la luz, no siempre los electrones pasan a la cadena de trasporte, si no que esta energía puede ser disipada en forma de calor (Maxwell y Johnson, 2000), como consecuencia se observó que el NPQ en el tratamiento que contenía la concentración de P más bajo y la presencia de *R. intraradices*

mostró una adaptación mayor a la luz, posiblemente para proteger a la planta de la fotoxidación.

2.7.5 Porcentaje de colonización micorrízica

Resulta de gran importancia el papel que pueden jugar estos microorganismos sobre el estado fisiológico y nutricional de las plantas colonizadas (Davies *et al.,* 2000). Su impacto en este sistema de cultivo responde a su capacidad de colonizar ampliamente el sistema radical, participando activamente en la absorción de los diferentes nutrientes y el agua.

Los resultados muestran un incremento en la presencia de arbúsculos y vesículas. La principal función del arbúsculo es trasportar de manera bidireccional los nutrientes entre ambos simbiontes, las vesículas a su vez fungen como órganos de reserva de lípidos (Herrera-Medina, 2008).

El tratamiento T5 contenía solo 0.50 g L^{-1} de P, lo cual causó en la planta un estado de estrés, por tanto, el simbionte se vio en la necesidad de intercambiar de manera continua diferentes señales para asegurar su supervivencia y el correcto desarrollo de las micorrizas (Bago *et al.,* 2003), lo cual genera un incremento en la demanda de energía, este gasto energético es sobrellevado por la simbiosis y participa en los cambios metabólicos y estructurales del hospedero, esto puede verse reflejado en un mayor número de estructuras fúngicas intrarradicales.

2.8 CONCLUSIÓN

Las plantas de chile habanero bajo condiciones *in vitro* se asociaron con éxito con *R. intraradices.* Las raíces primarias y secundarias fueron colonizadas en un 100% en el porcentaje de micorrización, las vesículas, hifas y arbúsculos se desarrollan en ramificaciones terminales intracelulares.

La inoculación *in vitro* de *Rizhophagus intraradices* originó efectos positivos sobre el crecimiento y desarrollo de las plántulas de chile habanero e incrementó la concentración de P en las raíces, de igual modo se modificó la estructura de la raíz según la concentración de P. Incluso bajo una concentración reducida de P, *R. intraradices* trasporta eficientemente el nutriente, y alcanzó los mismos valores en las respuestas generales de la planta que con una concentración alta.

Se estableció un método de desinfección de propágulos infectivos (esporas y fragmentos de raíces trasformadas), que permitió su uso bajo condiciones *in vitro.* Este procedimiento garantizó la ausencia de contaminación.

2.9 LITERATURA CITADA

Azcón A, C and M Barea J. 1997. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. Scientia Horticulturae 68: 1-24.

Bago B, Pfeffer PE, Abubaker J, Jun J, Allen JW, et al. 2003. Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. Plant Physiol. 131:1496–507.

Bécard, B. G. and J. A. Fortin. 1988. Early events of vesicular– arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. New Phytol. 108: 211-218.

Bucher, Marcel. 2006. "Functional biology of plant phosphate uptake at root and Mycorrhiza interfaces." New Phytologist 173: 11-26.

Bücking H and Shachar-Hill Y. 2005. Phosphate uptake, transport and transfer by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is stimulated by increased carbohydrate availability. New Phytol 165: 899–912.

Bulgarelli G., R. Castro C., F. Vasconcelos R., M R and López., A, S A. 2017. Mycorrhizae enhance nitrogen fixation and photosynthesis in phosphorus-starved soybean (*Glycine max* L. Merrill). Environmental and Experimental Botany. 140: 26-33.

Cranenbrouck, S.; Voets, L.; Bivort, C.; Renard, L.; Stullu, D. G. y Declerck, S. 2005. Methodologies for *in vitro* cultivation of arbuscular mycorrhizal fungi with root organs. In: *In vitro* culture of mycorrhizas. Springer, Berlin, 11: 341-348.

Davies, F. T.; Potter, J. R. y Linderman, R. G. 1993. Drought resistance of mycorrhizal pepper plants independent of leaf P-concentration-response in gas exchange and water relations. Physiol Plantarum. 87: 45-53.

Faber, B. A.; Zasoski, R. J.; Munns, D. N. y Shackel, K. 1991. A method for measuring hyphal nutrient and water uptake in mycorrhizal plants. Canadian Journal of Botany. 69: 87-94.

Fernández Suárez K., Fernández MartínI F., & Declerck S. 2013. Búsqueda de un medio de cultivo para la micorrización *in vitro* de plántulas de papa (Solanum tuberosum L.). Cultivos Tropicales, 34(4), 9-19.

Fernández Suárez, K., Declerck S., Fernández García L., y Ortega Delgado E. 2017. Aplicación del sistema de Planta Donante de Micelio (PDM) en la micorrización *in vitro* de papa. Cultivos Tropicales, *38*(1), 31-38.

Fernández, M. 2007. Fósforo: amigo o enemigo. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 151 (2): 51-57.

Fernández-Martín F. 2003. Factibilidad biológica de la micorrización "*in vitro*" de Papa, Solanum tuberosum.

Finlay RD. 2008. Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. J Exp Bot. 59:1115–1126.

Fortin, J. A., Bécard, G., Declerck, S., Dalpé, Y., St-Arnaud, M., Coughlan, A. P., Piché, 2002. Arbuscular mycorrhiza on root organ cultures. Can. J. Bot. 1-20.

Hans Lambers, Michael W. Shane, Michael D. Cramer Stuart, J. Pearse1 and Erik J. Veneklaas (2006). Root Structure and Functioning for Efficient Acquisition of Phosphorus: Matching Morphological and Physiological Traits.

Hodge. A. 2017. Accessibility of Inorganic and Organic Nutrients for Mycorrhizas. Mycorrhizal Mediation of Soil Fertility, Structure, and Carbon Storage, University of York, York, United Kingdom. 2: 129–148.

Maxwell K, Johnson GN. 2000. Chlorophyll fluorescence. A practical guide. J Exp Bot 51: 659-668.

McGonigle, T, P; M. H. Miller; D. G. Evans; G. L. Fairchild & J. A. Swan. 1990. A method which gives and objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol. 115: 495-501.

Mertz SM Jr, Heithaus JJ, Bush RL. 1979. Mass production of axenic spores of the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. Trans Br Mycol Soc. 72:167–169

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

Nieves González, F., & Alejo Santiago, G., & Luna Esquivel, G., & Lemus Flores, C., & Juárez López, P., & Salcedo Pérez, E. (2015). Extracción y Requerimiento de Fósforo en Chile Habanero (Capsicum Chinense Jacq.) 'Big Brother'. *Interciencia, 40* (4), 282-286.

Pérez M, U; R Gómez M; N Zarante V; F Correa M y R Hoyos G. 2012. Evaluación de un sistema para la micorrización *in vitro* en plantas de mora de castilla (*Rubus glaucus,* Benth). Universitas Scientiarum, 17(2): 140-151.

Rasmussen 2000, P NRM for study of P metabolism and trasnlocation in arbuscular mycorrhizal fungi.

Rodríguez Y, Y; L Arias P; A Medina C; Y Mujica P; L R Medina G; K Fernández S y A Mena E. 2015. Alternativa de la técnica de tinción para determinar la colonización micorrízica. Cultivos Tropicales, 36 (2): 18-21.

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

Voets L, I de la Providencia E, F Suarez K, IJdo M, Cranenbrouck S, Declerck S. 2009. Extraradical mycelium network of arbuscular mycorrhizal fungi allows fast colonization of seedlings under *in vitro* conditions. Mycorrhiza. 19: 347-356.

Voets, L.; Dupré de Boulois, H.; Renard, L.; Strullu, D. G. y Declerck, S. 2005. Development of an autotrophic culture system for the *in vitro* mycorrhization of potato plantlets. FEMS Microbiology Letters. 248:111-118.

Wang, X., Zhao, X., Jiang, C., Li, C., Cong, S., Wu, D, Chen, Y., Yu, H., Wang, C. 2015. Effects of potassium deficiency on photosynthesis and photoprotection mechanisms in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). Journal of Integrative Agriculture. 14(5): 856–863.

Zhang M, Tang S, Huang X, Zhang F, Pang Y, Huang Q, Yi Q. 2014. Selenium uptake, dynamic changes in selenium content and itsinfluence on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in rice (*Oryza sativa* L.). Environ Exp Bot. 107:39-45.