



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIÓLOGO

Establecimiento de un sistema autotrófico para la reproducción in vitro de hongos micorrízicos arbusculares del Sur de Ecuador.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR (A) : Ochoa Luna Emily Michelle.

DIRECTOR (A) : Kalinhoff Rojas Carolina Gertrudis

LOJA – ECUADOR

2018



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2018

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Doctor,

Darío Javier Cruz Sarmiento

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: Establecimiento de un sistema autotrófico para la reproducción in vitro de hongos micorrízicos arbusculares del Sur de Ecuador realizado por Emily Michelle Ochoa Luna, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, diciembre de 2018

f)

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Emily Michelle Ochoa Luna, declaro ser autora del presente trabajo de titulación: Establecimiento de un sistema autotrófico para la reproducción in vitro de hongos micorrízicos arbusculares del Sur de Ecuador, de la Titulación Biología, siendo Carolina Gertrudis Kalinhoff Rojas directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f).....

Autor: Ochoa Luna Emily Michelle

Cedula :1104787310

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación lo dedico con mucho cariño:

A Dios y la Virgen por bendecirme y guiarme constantemente

A mis padres Manuel y Virginia quienes con su amor, paciencia, apoyo y ejemplo me han enseñado a nunca rendirme ante las adversidades.

A mis hermanas María Virginia y Estefanía que me apoyan y motivan siempre hasta alcanzar mis objetivos.

Emily Michelle Ochoa Luna

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios y la Virgen por guiar cada paso de mi vida y darme fortaleza en los momentos difíciles.

A la Universidad Técnica Particular de Loja y a todos los docentes por impartirme sus conocimientos contribuyendo así en mi formación académica.

A la Dra. Carolina Kalinhoff, directora del presente trabajo de investigación por su confianza, guía y paciencia en la elaboración de la misma.

Al Ing. Hernán Lucero por su gran carisma al momento de asesorarme, apoyarme y brindarme valiosos consejos.

A mi familia por su preocupación e inigualable apoyo.

A mis grandes amigas: Paola, Diana, Valentina por haber compartido tantos momentos juntas y darme su apoyo incondicional.

A quienes participaron de alguna forma en la realización de este estudio.

Agradezco de todo corazón a cada una de las personas mencionadas, sin ustedes este logro hubiera sido difícil culminar.

Emily Michelle Ochoa Luna.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPITULO I	6
MATERIALES Y MÉTODOS	7
<i>Descripción de material vegetal.....</i>	7
Metodología	7
<i>Producción de plántulas in vitro.....</i>	7
<i>Obtención, desinfección y pre germinación de propágulos de MA.....</i>	8
<i>Establecimiento de la asociación Hongo-Planta en el sistema autotrófico</i>	10
<i>Análisis de datos.....</i>	15
<i>Establecimiento del Sistema Autotrófico</i>	17
<i>Inoculación con Esporas</i>	19
CONCLUSIONES.....	30
RECOMENDACIONES	31
BIBLIOGRAFÍA	32
ANEXOS	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Espora “Naranja hifa gruesa” <i>Funneliformis</i> sp. (400X).....	11
Figura 2. Colonización de hongos micorrízicos en raíces de <i>Kalanchoe</i> sp. A. vesículas. B. Hifas y C. arbuscúlos.....	12
Figura 3. Sistema autotrófico establecido para la reproducción in vitro de hongos micorrízicos.....	13
Figura 4. A. Sistemas autotróficos con plántulas de uvilla (<i>Physalis peruviana</i>) establecidos. B. Espora de hongo micorrízico arbuscular (<i>Funneliformis</i> sp.) visto desde microscopio estereoscópico (60x).....	15
Figura 5. A. Fragmentos de raíces pregerminados en gotas que contienen 3 g/L de Phytigel más MgSO ₄ al 0,03% (pH 6). B. Sistemas autotróficos con plántulas de uvilla (<i>Physalis peruviana</i>) establecidos.....	16
Figura 6. Sistemas autotróficos apilados en grupos de 5 cajas, separados con cartulina negra en cuarto de crecimiento con intensidad lumínica de 16 h luz / 8 horas oscuridad y una temperatura de 22 °C día/ 18 °C noche.....	16
Figura 7. Semillas de <i>Physalis peruviana</i> pregerminadas en cajas Petri de vidrio con los medios Strullu y Romand (izquierda), Murashine y Skoog (derecha).....	17
Figura 8. Imagen de plántulas de uvilla (<i>Physalis peruviana</i>). A. semillas pregerminadas en medio Strullu y Romand. B. Plantulas desarrollándose en sistema autotrófico de 7 días. C. Material vegetal enraizado en medio de cultivo. D. Plantulas desarrolladas en sistema autotrófico de 5 semanas.	18
Figura 9. Imagen de plántulas de trébol rojo (<i>Trifolium pratense</i>). A-B. Plántulas desarrollándose en sistema autotrófico. C. Material vegetal enraizándose en medio de cultivo. D-E-F. Plántulas marchitas.....	19
Figura 10. Plántula de uvilla (<i>Physalis peruviana</i>). A. Clorosis en plántula de siete meses. B. Plántula muerta de siete meses sin hojas y sin absorción de medio.....	14
Figura 11. Índice de clorofila de <i>Physalis peruviana</i> inoculadas con (<i>Funneliformis</i> sp) 22	
Figura 12. Altura de <i>Physalis peruviana</i> inoculadas con (<i>Funneliformis</i> sp).....	20
Figura 13. Peso Seco de <i>Physalis peruviana</i> inoculadas con (<i>Funneliformis</i> sp).....	21
Figura 14. A. Inoculación directa con fragmento de raíz de <i>Plantago lanceolata</i> . B-C. Vista desde microscopio invertido 400x donde se observa micelio en contacto con la raíz de uvilla.	24
Figura 15. Índice de Clorofila de <i>Physalis peruviana</i> inoculadas con fragmentos de raíz 25	
Figura 16. Altura de <i>Physalis peruviana</i> inoculadas con fragmentos de raíz.....	26
Figura 17. Peso Seco de <i>Physalis peruviana</i> inoculadas con fragmentos de raíz.....	27
Figura 18. Formaciones de Endófitos Septados Oscuros. A. microesclerocios intracelulares B. Endófitos septados oscuros con hifas intercelulares.	28
Figura 19. Porcentaje de colonización ESO en los diferentes tratamientos.....	28

RESUMEN

La simbiosis micorrízico arbuscular aumenta la calidad, sanidad, vigor y desarrollo de plántulas micropropagadas ya sea en condiciones in vivo como *in vitro*. Por este motivo la búsqueda de nuevos sistemas para obtener estructuras fúngicas y plantas sanas es indispensable. Se compararon dos sistemas de cultivo autotrófico para la micorrización *in vitro*, utilizando plántulas de trébol rojo (*Trifolium pratense* L.) y uvilla (*Physalis peruviana* L.). *T. pratense* mostro adelgazamiento en el tallo y plasmólisis en las hojas mientras que *P. peruviana* se adaptó adecuadamente al sistema autotrófico. Se evaluaron dos métodos de inoculación directa de *P. peruviana*, uno con esporas extraídas del suelo y otro con fragmentos de raíz. En la inoculación con esporas, se obtuvo una colonización menor al 10% observándose solo hifas micorrízicas, las posibles causas de la ausencia de continuidad de la colonización son la baja viabilidad y bajo número de esporas utilizado. Los fragmentos de raíces con hongos micorrízicos arbusculares fueron inoculados en cada unidad experimental. *P. peruviana* presentaron una colonización micorrízica menor al 6%, sin embargo fueron colonizadas por endófitos septados oscuros.

Palabras clave: Hongos micorrízicos arbusculares, sistema autotrófico, *Physalis peruviana*, micorrización *in vitro*.

ABSTRACT

The arbuscular mycorrhizal symbiosis increases the quality, health, vigor and development of micropropagated seedlings in both in vivo and in vitro conditions. For this reason, the search for new systems to obtain fungal structures and healthy plants is essential. Two autotrophic culture systems were compared for in vitro mycorrhization, using red clover (*Trifolium pratense* L.) and uvilla (*Physalis peruviana* L.) seedlings. *T. pratense* showed thinning in the stem and plasmolysis in the leaves while *P. peruviana* adapted adequately to the autotrophic system. Two methods of direct inoculation of *P. peruviana* were evaluated, one with spores extracted from the soil and the other with root fragments. In the inoculation with spores, a colonization of less than 10% was obtained with only mycorrhizal hyphae, the possible causes of the lack of continuity of the colonization are the low viability and low number of spores used. The fragments of roots with arbuscular mycorrhizal fungi were inoculated in each experimental unit. *P. peruviana* presented a mycorrhizal colonization of less than 6%, however they were colonized by dark septate endophytes.

Key words: Arbuscular mycorrhizal fungi, autotrophic system, *Physalis peruviana*, *in vitro* mycorrhization.

INTRODUCCIÓN

La uvilla (*Physallis peruviana*) es un arbusto perteneciente a la familia Solanaceae que se originó en las zonas andinas peruanas. Esta especie se distribuye en las zonas altas de Suramérica (Legge, 1974), y en la última década su cultivo se ha convertido en una alternativa rentable. En el 2012 Ecuador exportó 104,7 t, por un valor FOB de US\$ 407.640, con precio de US\$ 3,57/kg, siendo Holanda, España y Alemania los principales países de destino (Banco central del Ecuador, 2012). En la provincia de Imbabura *P. peruviana* es cultivada por pequeños y medianos productores entre los 2000 y 3000 msnm, en extensiones cercanas a las 350 ha, con producciones de 13,6 t ha⁻¹ (Altamirano, 2010). La zona ecuatorial por su temperatura estable y periodos prolongados de luminosidad hacen que el fruto contenga mayor contenido de azúcar y coloración más intensa, comparada con la que proviene de Sudafrica y Kenia, haciéndola más apreciada comercialmente (Muñoz, 2003).

La uvilla tiene una respuesta positiva a la propagación asexual por injertos, estacas y esquejes, así como también a la propagación *in vitro*, sin embargo, estos métodos resultan costosos y en la mayoría de los casos las plantas producidas por esta vía, tienen periodos vegetativos reducidos y susceptibilidad al viento (Fischer y Miranda, 2012). Frecuentemente las semillas se infectan con hongos como *Cladosporium* sp., *Phoma* sp., *Alternaria* sp., *Phytium* sp., *Botrytis* sp. y *Colletrotrichum* sp. Por lo que se deben desinfectar con hongos antagónicos o fungicidas dejando así grandes pérdidas para el agricultor (Angulo, 2005). Uno de los pasos más importantes en la micropropagación, es la transferencia de plántulas *in vitro* a condiciones *ex vitro*, debido a su alto grado de mortalidad entre 50% y 90%, por problemas de aclimatación ya que la plántula presenta estomas no funcionales, una cutícula poco desarrollada y un sistema radical débil, facilitando así la deshidratación (Vestberg & Estaún, 1994; Elmeskaoui et al., 1995; Alarcón y Ferrera-Cerrato, 2000; Schultz, 2001).

A pesar de aplicar varias técnicas para reducir las tasas de mortalidad y mejorar el crecimiento durante el trasplante, es necesario buscar estrategias sustentables que garanticen el mantenimiento de las plántulas en las fases posteriores de su desarrollo, una de las alternativas es la asociación con microorganismos benéficos. Gracias a los beneficios sobre el crecimiento de plantas y nutrición que obtienen las plantas a través de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), se han implementado estrategias de inoculación que reducen el estrés generado durante el trasplante o crecimiento de distintas especies de interés, tanto en condiciones *in vitro* como de invernadero (Joshee, et al., 2007). Sustratos enriquecidos con propágulos de HMA de diferentes ecosistemas, han sido ampliamente

utilizados para el mejoramiento de los atributos morfológicos y fisiológicos de plantas silvestres y de cultivo (Ferrera & Alarcon, 2001). Es importante extraer hongos eficientes del suelo para propagarlos emplearlos después como bioinoculantes en suelos degradados o con condiciones de estrés, ya que incrementan la capacidad de supervivencia, crecimiento y aprovechamiento nutricional de las plantas (Rapparini et al., 1994). Así pues la simbiosis micorrízica puede aprovecharse para la producción de plantas micropropagadas, aumentando la calidad de las plantas con respecto a su desarrollo, vigor y sanidad (Manjarrez et al., 2000). Sin embargo, la búsqueda de nuevos sistemas para obtener esporas, estructuras fúngicas y plantas sanas en periodos de tiempo cortos es indispensable para obtener altos niveles de colonización (Fernández Suarez, 2012).

Debido al carácter biotrófico obligado de los HMA, para multiplicarlos se requiere de la presencia de una raíz hospedera viva, (Bianciotto et al., 1996). El cultivo de HMA en macetas en presencia de plantas hospederas y diferentes tipos de suelos y sustratos alternativos es una de las formas más utilizadas (Sylvia, 1999). La propagación axénica de HMA (cultivo de un organismo sin la presencia de otro), fue un reto que comenzó a finales de los años 80, cuando Becard y Fortin (1988) utilizaron raíces transformadas de zanahoria producidas *in vitro* mediante la inserción de un plásmido de *Agrobacterium rhizogenes*, inductor de la ramificación de raíces (Ri), y obtuvieron el primer cultivo axénico. Desde entonces se han realizado modificaciones al medio de cultivo para contar con un sistema de cultivo monoxénico (un organismo creciendo en presencia de otro, en este caso una especie de HMA y una raíz hospedera), para obtener micelio y esporas en grandes cantidades y libres de contaminantes para diferentes fines (Fernández Suárez, 2012). Aun así, muchos de estos HMA denominados “recalcitrantes” no se han podido cultivar *in vitro* (Fernández Suárez, 2012).

El sistema de cultivo *in vitro* de raíces ha sido desde entonces perfeccionado con la finalidad de recrear los sistemas naturales suelo-planta-hongo y así favorecer el crecimiento del micelio de los HMA. Entre los sistemas propuestos se encuentran el de Elmeskaoui et al. (1995), con plantas de fresa producidas *in vitro* en cultivo monoxénico con HMA, que además demostraba la capacidad de los HMA para reducir el estrés hídrico en plantas micorrizadas. Este sistema era difícil de reproducir ya que necesita raíces transformadas de zanahorias previamente micorrizadas. Años después se publicó un sistema de micorrización autotrófico parcialmente *in vitro*, de plantas de *Solanum tuberosum* L, donde las raíces se desarrollan dentro de la placa y el sistema aéreo se desarrolla expuesto al ambiente, tuvo éxito en la producción de micelio y esporas, sin embargo al finalizar las plantas mostraban numerosas afectaciones en su desarrollo y estado fisiológico (Voets et al., 2005). Estos

autores lograron obtener plántulas micorrizadas en periodos cortos de tiempo, reproducían la colonia fúngica en nuevas plántulas demostrando la capacidad del micelio de una planta donante de *Solanum tuberosum* L para colonizar nuevas plántulas. Perez-Moncada et al. (2015) adaptaron el sistema de micorrización *in vitro* de Voets et al. (2005) a mora de castilla (*Rubus glaucus*) donde los HMA se fueron desarrollando en plántulas con la parte área expuesta al ambiente de un cuarto de crecimiento con intensidad lumínica alta, incrementando la tasa de fotosíntesis. Las hifas emergentes fueron capaces de colonizar nuevas raíces, desarrollar micelio extra radical y producir nuevas esporas.

En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue establecer y comparar dos sistemas de cultivo autotrófico para la micorrización *in vitro* de plántulas de trébol rojo (*Trifolium pratense* L.) y uvilla (*Physalis peruviana* L.), utilizando el modelo propuesto por Voets et al. (2005) con algunas modificaciones. Se planteó producir *in vitro* cada especie de planta en un medio de cultivo que favorezca el desarrollo de la simbiosis micorrízica y que asegure el desarrollo óptimo de la planta; establecer el consorcio hongo micorrízico-planta (sistema autotrófico) finalmente evaluar y comparar la eficiencia de los sistemas autotróficos establecidos con *Trifolium pratense* y *Physalis peruviana* y un hongo micorrízico aislado de un cultivo de maíz.

CAPITULO I
MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción de material vegetal

T. pratense es una herbácea de la familia Leguminosae, se encuentra distribuida ampliamente en todo el mundo (McGregor, 1976; Brown, et al., 1992). Posee hojas trifoliadas e inflorescencia en capitulo de 2 a 4 cm (McGregor, 1976; Rebolledo et al., 2004). Son auto estériles por lo que necesitan de un insecto forrajero para su polinización (Bissuel- Belaygue et al., 2002; Damgard et al., 2008). Tiene una alta respuesta de crecimiento ante la simbiosis con hongos micorrízicos arbusculares, por su rápido crecimiento y capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (Shuel, 1951, Sturz et al., 1997). Poseen gran relevancia agroecológica ya que mejora la calidad de la dieta animal (Sevilla & Fernández, 1991) además es utilizado en programas de renovación de pastos para la ganadería (Correa, 2006).

P. peruviana es un arbusto de la familia Solanaceae, se cree que es originaria de las zonas andinas peruanas (Legge, 1974) y se encuentra distribuida en las zonas altas de Suramericana, es una planta arbustiva y perenne, normalmente crece de 1 a 1.5 metros de altura, su fruto es en forma de baya y contiene hasta 300 semillas (Rodas, 1996). Posee características similares a las plantas de papa, las cuales han sido utilizadas ampliamente en el cultivo *in vitro* de micorrizas arbusculares. Además el cultivo de uvilla, ha sido iniciado en muchos países incluyendo Ecuador como un cultivo rentable, ya que, al fruto se le atribuyen características medicinales como: aliviar problemas de garganta, antiasmático, antiséptico, sedante, analgésico, además de propiedades antidiabéticas (Ramadan & Mörsel, 2003; Ahmad et al., 1999) y características nutricionales, debido a que es rica Vitamina A (648 UI / 100g), Vitamina C (26 mg), fibra (4.8 g), proteínas (1.9 g), fósforo, hierro, potasio y zinc (Wu, et al., 2011), generando así gran interés en los mercados internacionales (Beltrán, 2009; Gastelum, 2012).

Metodología

Producción de plántulas *in vitro*.

Las semillas de *Trifolium pratense* y *Physalis peruviana* fueron esterilizadas superficialmente por agitación en una solución acuosa de hipoclorito de sodio al 5% para *P. peruviana* durante 10 minutos y al 1% para *T. pratense* durante 5 minutos, y lavadas posteriormente 4 veces con agua destilada estéril. Luego fueron sembradas en dos medios diferentes

Murashige & Skoog modificado (MS) (Anexo 1) y Medio Strullu y Romand (Duchefa Biochemie). En cada caja de cultivo estéril se colocaron 10 semillas. Las plántulas emergentes de dos semanas se incorporaron en cajas Petri adaptadas para el cultivo autotrófico (ver apartado de establecimiento del sistema autotrófico).

Obtención, desinfección y pre germinación de propágulos de MA.

Se utilizaron esporas provenientes de suelo de un cultivo orgánico de maíz del barrio Amable María ubicado en el sector norte de la ciudad de Loja, Ecuador. Para aislar esporas de HMA se realizó la técnica de tamizado húmedo y decantado de Gerderman & Nicholson (1963), y la separación en gradiente de sacarosa (Sieverding, 1991). La técnica consiste en colocar muestras de 50 gramos de suelo en 250 ml de agua, agitar la mezcla y vaciar el sobrenadante sobre una batería de 2 tamices (750 μm el tamiz superior y 38 μm el inferior). El material retenido en el primer tamiz se lavó con abundante agua a presión para disgregar los agregados de suelo y colocar todo el material retenido en el tamiz de 38 μm en un tubo aforado con 15 ml de agua destilada y 20 ml de una solución acuosa de sacarosa al 80%. Seguidamente se lleva a centrifugación a 2500 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante es extraído y llevado al tamiz de 38 μm para lavar toda la sacarosa con agua destilada.

Para manipular las esporas, utilizamos una placa con surcos (cápsulas de Doncaster), y con el microscopio estereoscópico (60x) fueron seleccionadas con micropipeta las esporas que lucieron intactas y con contenido lipídico. El morfotipo de esporas más abundante y en mejores condiciones fue uno de color ambar-naranja, caracterizado preliminarmente como *Funneliformis* sp. (Figura 1), la identificación de este morfotipo se realizó utilizando la lista de especies de AMF en línea y las descripciones disponibles en el sitio web creado por el Dr. Arthur Schüßler group: <http://schuessler.userweb.mwn.de/amphylo/>, y el sitio web de International Culture Collection of Mycorrhizal Fungi: <http://invam.caf.wvu.edu/index.html>

Una segunda fuente de propágulos fueron fragmentos de raíces provenientes de cuatro especies vegetales colectadas en zonas verdes cercanas al campus UTPL, (*Oxalis* sp, *Kalanchoe* sp, *Plantago lanceolata* y *Emilia sonchifolia*). Raíces frescas de estas especies fueron colectadas, lavadas con agua corriente, cortadas en fragmentos de 3 cm, esterilizadas y pregerminadas como se indica en el próximo párrafo. Diez fragmentos fueron reservados y teñidos para verificar la colonización por hongos micorrízicos arbusculares (figura 2).

Las esporas y los fragmentos de raíz por separado fueron esterilizados superficialmente con 50 ml de agua estéril, 1 g de cloramina T, 20 mg de estreptomycin y una traza de Tween20 (Mosse, 1962). Luego fueron lavados tres veces con agua estéril. Las esporas estériles

fueron colocadas en los sistemas autotróficos, mientras que los fragmentos de raíz estériles fueron pregerminados en placas Petri que contenían 3 g/L de Phytigel y 0,03% MgSO₄ (pH 6). Se estableció una raíz estéril por gota y se incubaron a 25°C durante 4-6 días (Silvani et al., 2008). Luego de incubar, se seleccionaron los fragmentos que presentaron crecimiento de hifas de HMA en sus extremos (Silvani et al., 2008). Los fragmentos seleccionados fueron utilizados como inóculo de los sistemas autotróficos.

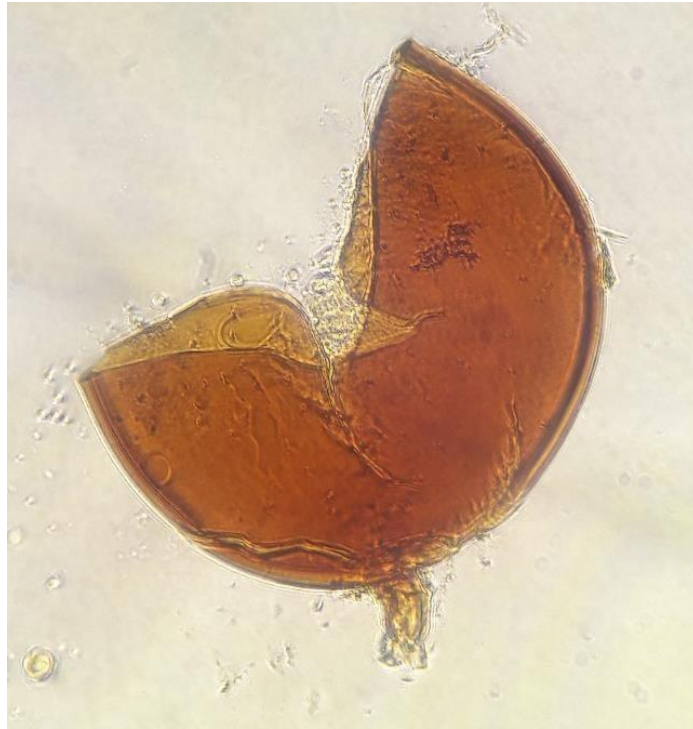


Figura 1. Espora “Naranja hifa gruesa” cf. *Funneliformis* sp. (400X), aislada de suelo rizosférico de maíz bajo cultivo orgánico.

Fuente: autora

Elaborado: autora

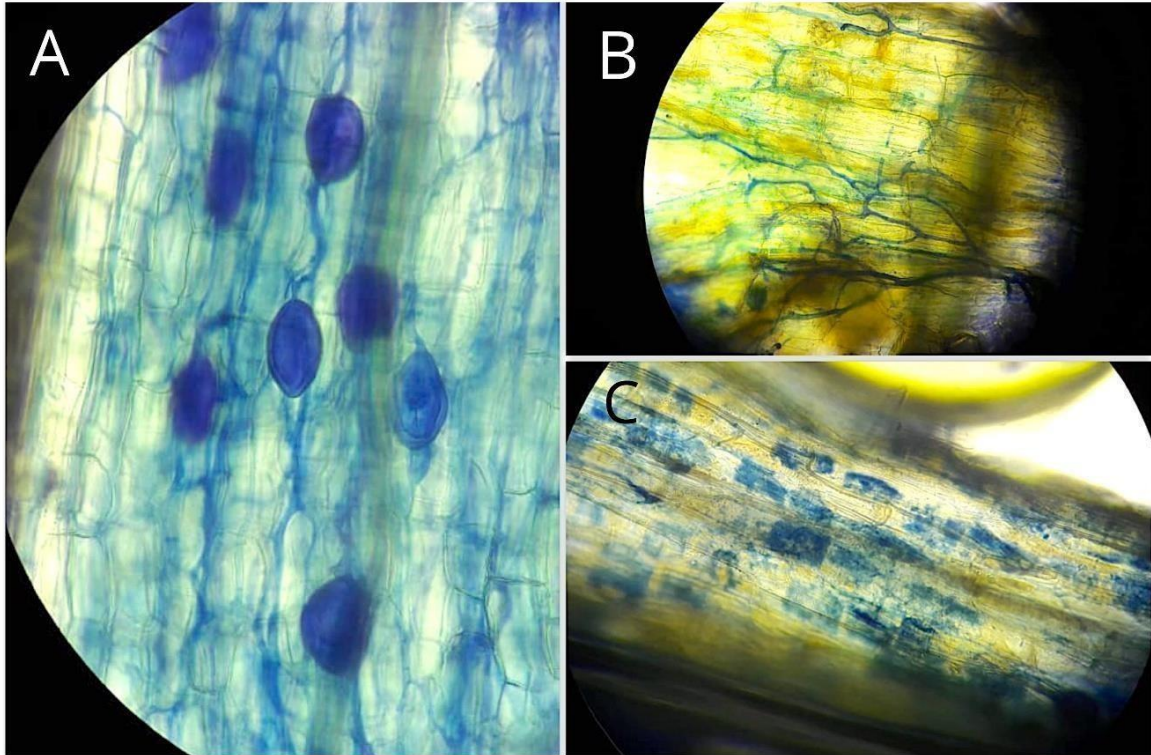


Figura 2. Colonización de hongos micorrízicos en raíces de *Kalanchoe* sp. **A.** vesículas. **B.** Hifas y **C.** arbúsculos.

Fuente: autora

Elaborado: autora

Establecimiento de la asociación Hongo-Planta en el sistema autotrófico

Las cajas Petri modificadas contenían 30 ml de medio MSR sin sacarosa ni vitaminas y 5 g/L de Bacto Agar. Estas cajas fueron previamente perforadas con un orificio de 2 mm aproximadamente uno en la base y otro en la tapa de la caja. La raíz de cada planta se mantuvo en contacto con el medio y el tallo sobresalía a través del orificio de la placa (figura 3).



Figura 3. Sistema autotrófico establecido para la reproducción *in vitro* de hongos micorrízicos.

Fuente: autora

Elaborado: autora

Se efectuaron dos ensayos, uno inoculado con esporas individuales (figura 5) y el segundo inoculado con fragmentos de raíz (figura 6). Para cada ensayo por separado, se colocó una espora o un fragmento de raíz sobre el sistema radicular de las plántulas de *P. peruviana* de cada unidad experimental (sistema autotrófico). Para evitar contaminación el orificio se cubrió con grasa de silicona y sellado con papel parafilm.

Los sistemas autotróficos fueron apilados en grupos de 5 cajas y separados con cartulina negra para mantener a las raíces en la oscuridad. Toda la estructura se mantuvo en un cuarto de crecimiento con intensidad lumínica de 16 h luz / 8 horas oscuridad y una temperatura de 22 °C día/ 18 °C noche, durante ocho semanas (figura 7). Dependiendo de los requerimientos de las plantas se les agregó medio nuevo sin sacarosa ni vitaminas, esterilizado a 120°C cada tres o cuatro semanas. Es importante mencionar que los sistemas autotróficos permanecieron viables hasta los 7 meses aproximadamente, pasado este

tiempo se observó clorosis en las hojas, no se desarrollaban hojas nuevas y las raíces no absorbían el medio de cultivo (figura 4).

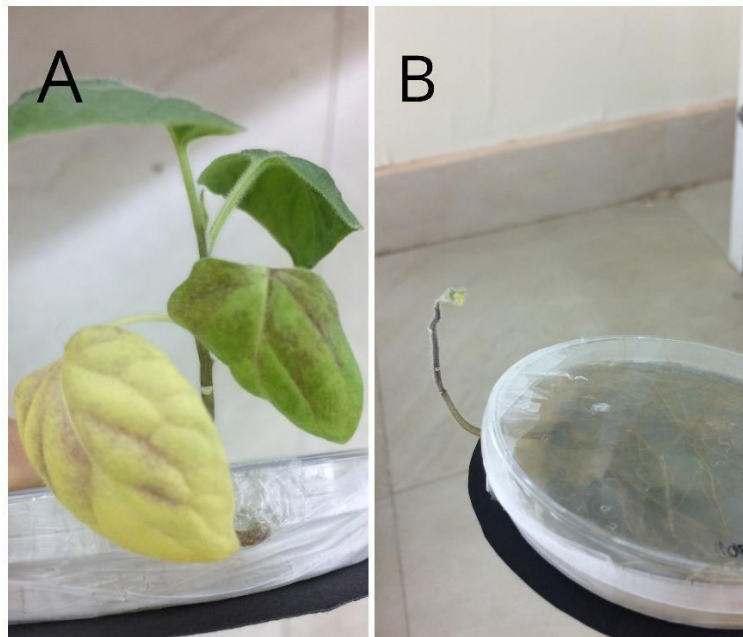


Figura 4. Plántula de uvilla (*Physalis peruviana*). **A.** Clorosis en plántula de siete meses. **B.** Plántula muerta de siete meses sin hojas y sin absorción de medio.

Fuente: autora

Elaborado: autora

Luego del periodo de crecimiento, se midieron variables fisiológicas morfométricas en las plantas de cada experimento. El contenido relativo de clorofila se midió con un medidor no invasivo atLEAF CHL PLUS FT Green LLC®, y la clorofila total (mg cm^{-2}) fue estimada mediante conversión de acuerdo a <http://www.atleaf.com/SPAD.aspx>. La altura y diámetro basal del tallo fue medido con regla y calibrador (Stainless Hardener®) respectivamente. El peso seco de las plántulas fue determinado llevando a peso constante en una estufa a 60°C .

Las raíces fueron teñidas para evaluar el porcentaje de colonización micorrízica siguiendo el protocolo de Phillips & Hayman (1970) que consiste en aclarar durante 30 minutos a 90°C las raíces con KOH al 20%, enjuagar tres veces con agua corriente, seguidamente a temperatura ambiente durante 15 minutos se acidificaron con HCL al 10% finalmente se tiñeron con tripan blue a 90°C durante 15 minutos. Se montaron por cada planta 25 cm de raíces teñidas con lactoglicerol (ácido láctico-glicerol-agua 1: 1: 2) en portaobjetos. Con un aumento de 100x en un microscopio óptico se evaluó la presencia de estructuras AMF (arbúsculos, hifas, enrollados hifales, vesículas e hifas aseptadas) siguiendo el método de

intersección magnificada (McGonigle et al., 1990) el cual consiste en que a cada campo que se encuentre colonizado con las estructuras agregar el valor de 1, hasta obtener un total de 50 campos por cada lamina.

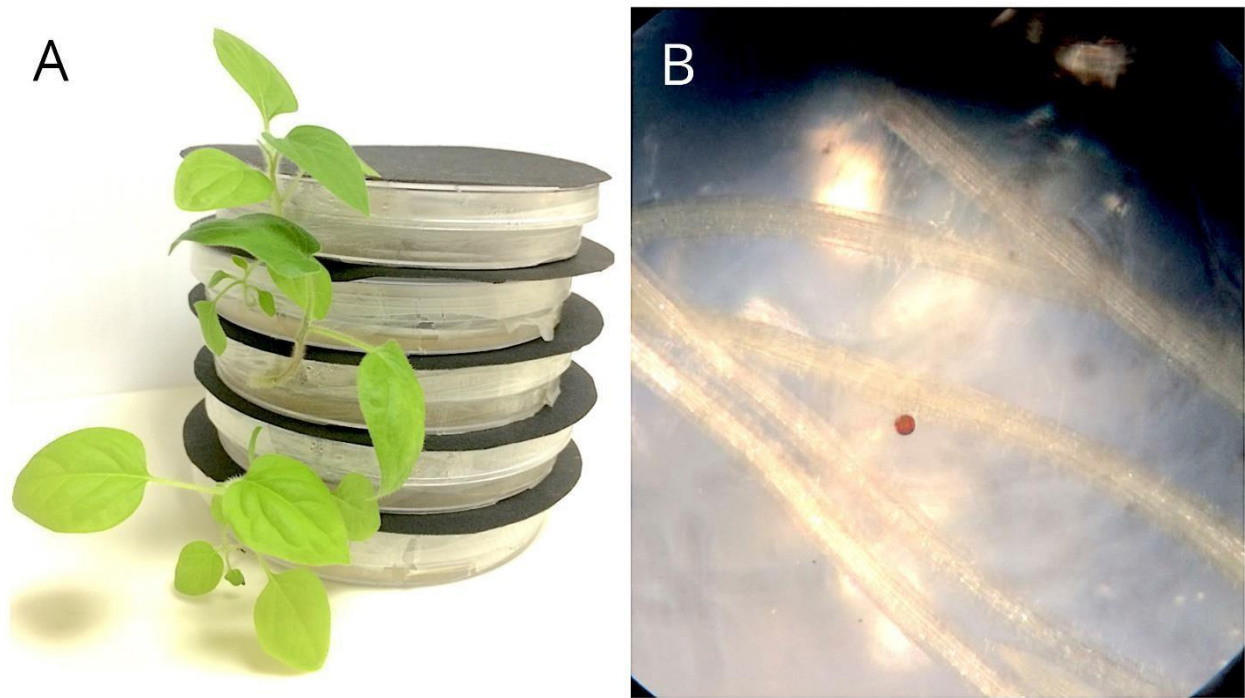


Figura 5. A. Sistemas autotróficos con plántulas de uvilla (*Physalis peruviana*) establecidos. **B.** Espora de hongo micorrízico arbuscular (cf. *Funneliformis* sp.) visto desde microscopio estereoscópico (60x).

Fuente: autora

Elaborado: autora

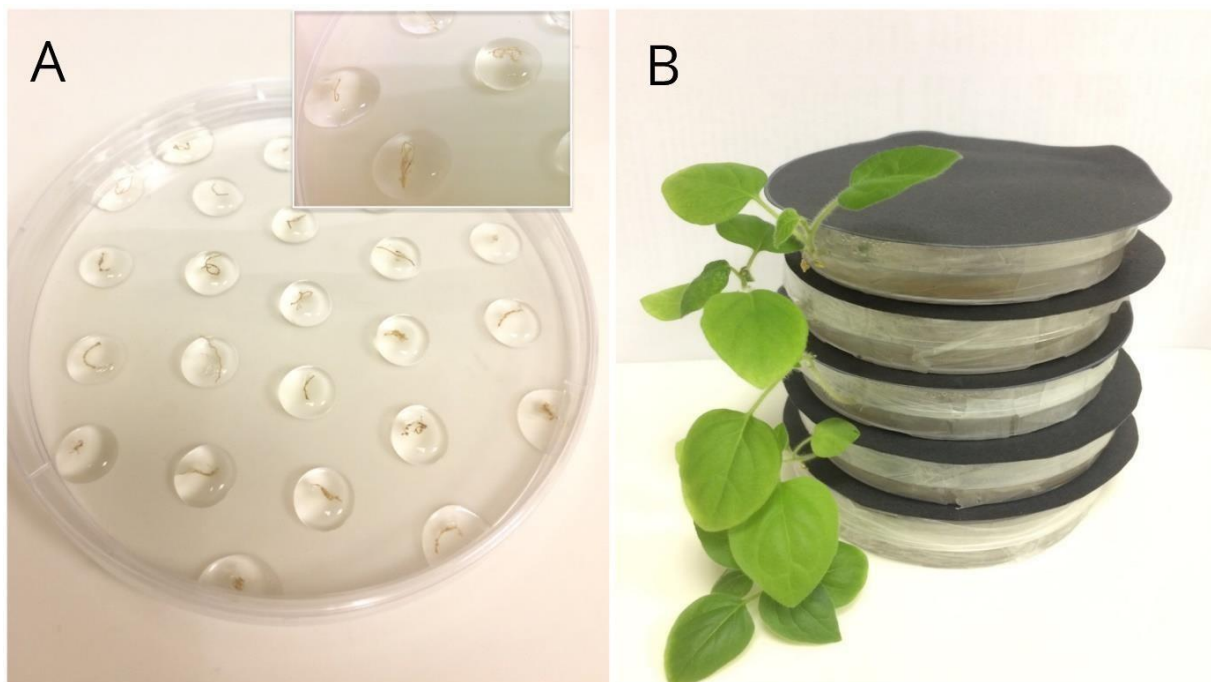


Figura 6. A. Fragmentos de raíces pregerminados en gotas que contienen 3 g/L de Phytigel más MgSO₄ al 0,03% (pH 6). B. Sistemas autotróficos con plántulas de uvilla (*Physalis peruviana*) establecidos.

Fuente: autora

Elaborado: autora



Figura 7. Sistemas autotróficos apilados en grupos de 5 cajas, separados con cartulina negra en cuarto de crecimiento con intensidad lumínica de 16 h luz / 8 horas oscuridad y una temperatura de 22 °C día/ 18 °C noche.

Fuente: autora

Elaborado por: autora

Análisis de datos

Para el experimento de inoculación con esporas de cf. *Funneliformis* sp. Se realizó una prueba T de Student para evaluar si existían diferencias significativas en biomasa, altura y contenido de clorofilas de plantas no inoculadas e inoculadas (Anexos 2, 3 y 4). Se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía con un factor (inoculación) y cinco niveles del factor, correspondientes al control no inoculado y a los fragmentos radiculares de cuatro especies de planta colonizados por HMA. Los análisis estadísticos fueron elaborados con el paquete estadístico R Studio®. Y para los gráficos se utilizó el programa SigmaPlot©v12.0.

CAPITULO II
RESULTADOS Y DISCUSION

Establecimiento del Sistema Autotrófico

Durante la producción de plántulas, el medio MSR fue el más adecuado para el cultivo de *P. peruviana*, debido a que, transcurridos siete días se observó germinación y desarrollo de tallo y hojas, mientras que en el medio MS se desarrolló únicamente la radícula en el mismo periodo de tiempo (Figura 8).



Figura 8. Semillas de *Physalis peruviana* pregerminadas en cajas Petri de vidrio con los medios Strullu y Romand (izquierda), Murashine y Skoog (derecha).

Fuente: autora

Elaborado: autora

Al trasplantar al sistema autotrófico, la especie *P. peruviana* fue la que mejor se adaptó y continuó su desarrollo (figura 9), no obstante *T. pratense* no tuvo éxito, a los 10 días de trasplantarlas se notaron aspectos negativos en el crecimiento de las plantas como adelgazamiento del tallo, plasmólisis en las hojas y posterior marchitamiento (figura 10).

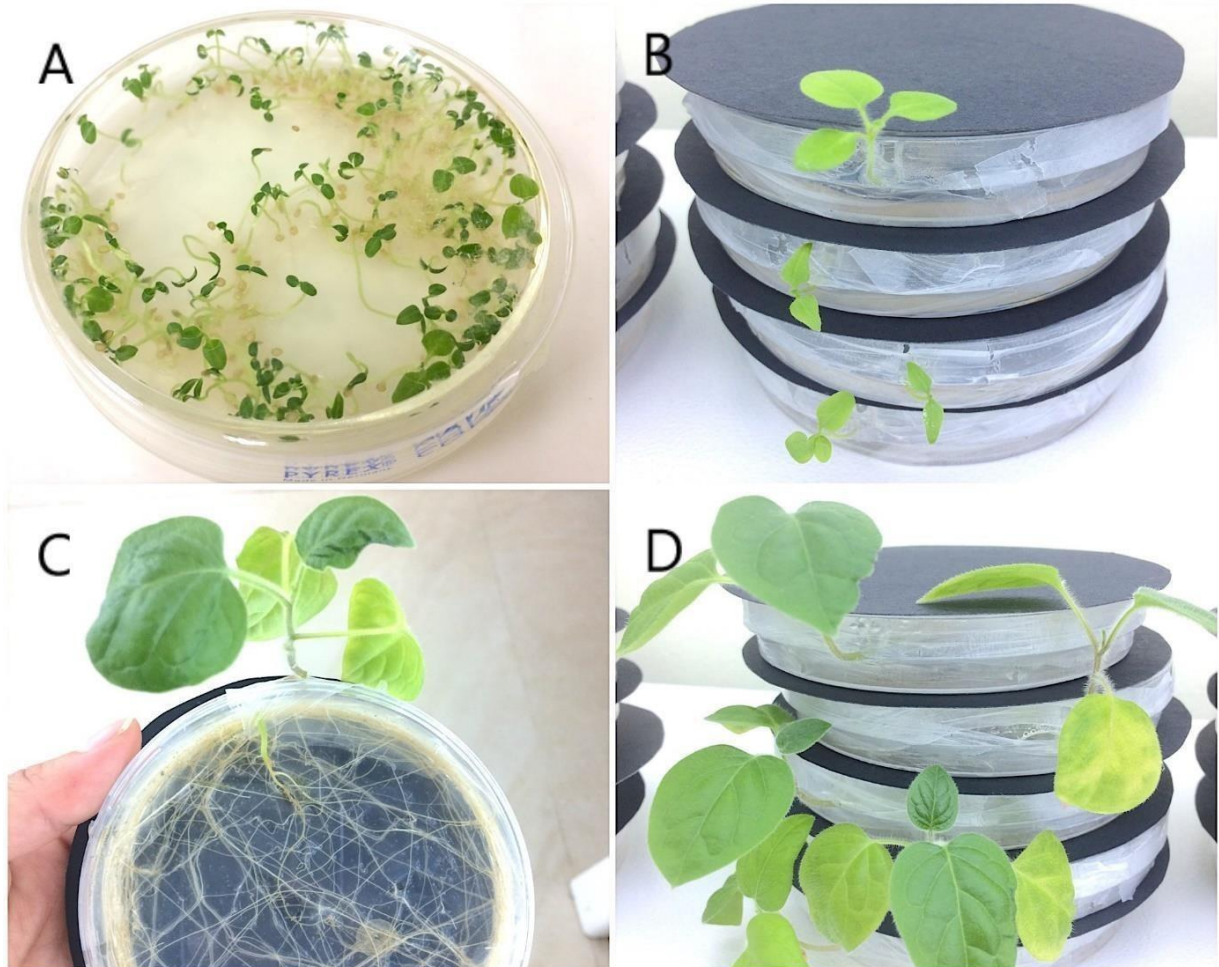


Figura 9. Imagen de plántulas de uvilla (*Physalis peruviana*). **A.** semillas pregerminadas en medio Strullu y Romand. **B.** Plantulas desarrollándose en sistema autotrófico de 7 días. **C.** Material vegetal enraizado en medio de cultivo. **D.** Plantulas desarrolladas en sistema autotrófico de 5 semanas.

Fuente: autora

Elaborado: autora

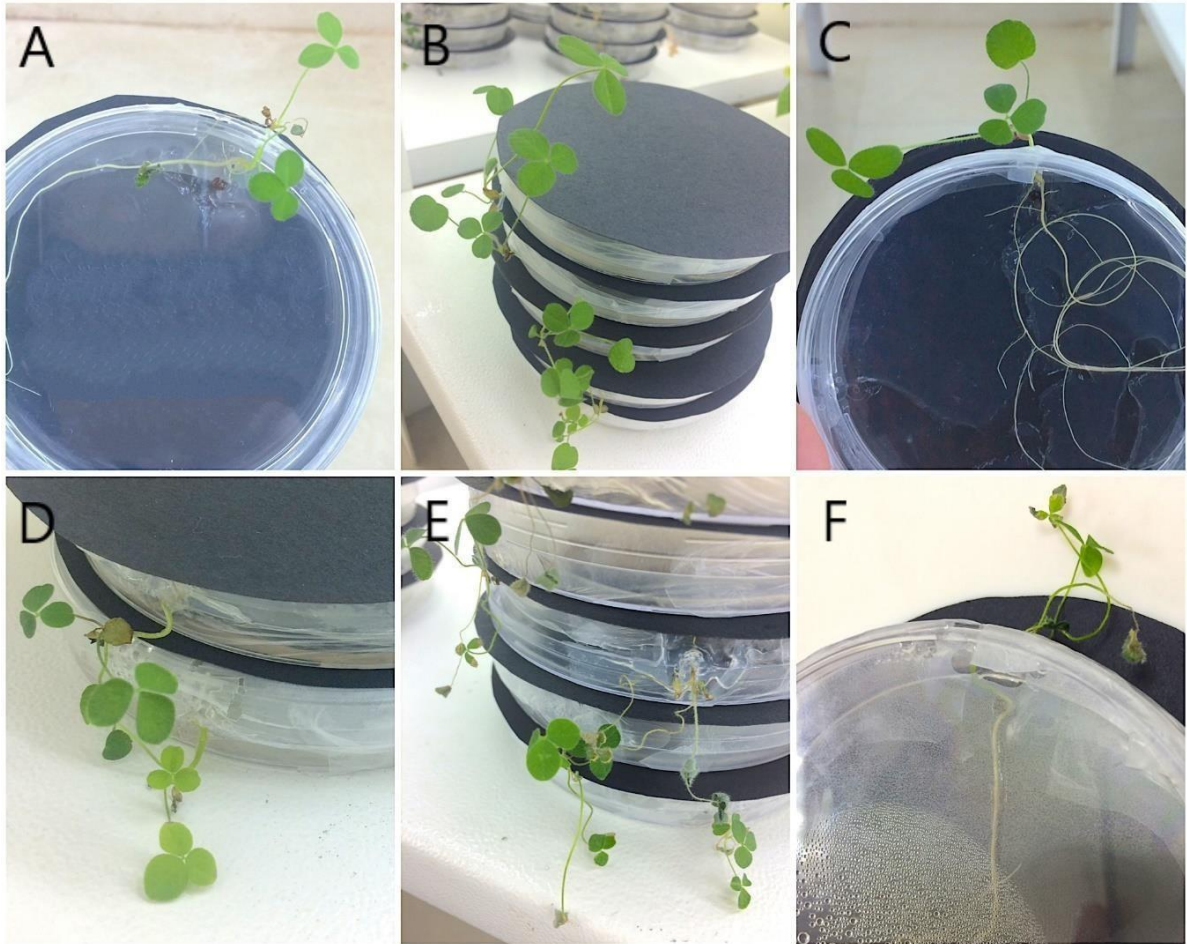


Figura 10. Imagen de plántulas de trébol rojo (*Trifolium pratense*). **A-B.** Plántulas desarrollándose en sistema autotrófico. **C.** Material vegetal enraizándose en medio de cultivo. **D-E-F.** Plántulas marchitas.

Fuente: autora

Elaborado: autora

Inoculación con Esporas.

Las esporas y fragmentos de raíces son los dos tipos de inóculos más utilizados para iniciar un cultivo monoxénico (Fortin et al., 2002). El éxito del establecimiento de la simbiosis va a depender en gran medida de la germinación de esporas ya que es el proceso más importante durante el ciclo de vida de estos hongos (Hidayat et al., 2013). En este ensayo se utilizaron 20 sistemas autotróficos, 10 que sirvieron de control y los otros 10 fueron inoculados con esporas de *Funneliformis* sp. (una espora por sistema autotrófico).

No se observaron diferencias significativas en la altura y el diámetro de las plantas inoculadas respecto a las no inoculadas (Figuras 11 y 12), pero si hubo un aumento

significativo en el contenido de clorofilas en plantas inoculadas (Figura 13). Efectos positivos de la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares sobre el peso seco de *P. peruviana* fueron observado luego de 103 días de crecimiento (con valores de colonización menores al 20.3%), y estos fueron de mayor magnitud durante la etapa de floración y fructificación de la planta (Miranda et al., 2011). Por este motivo, es posible que para esta especie la dinámica de colonización micorrízica sea más lenta, y que se requiera más de dos meses para observar efectos positivos de las micorrizas sobre el crecimiento. Por otro lado, el incremento en el contenido de clorofilas podría deberse a una mayor incorporación de magnesio en plantas inoculadas (Zare-Maivan et al., 2017).

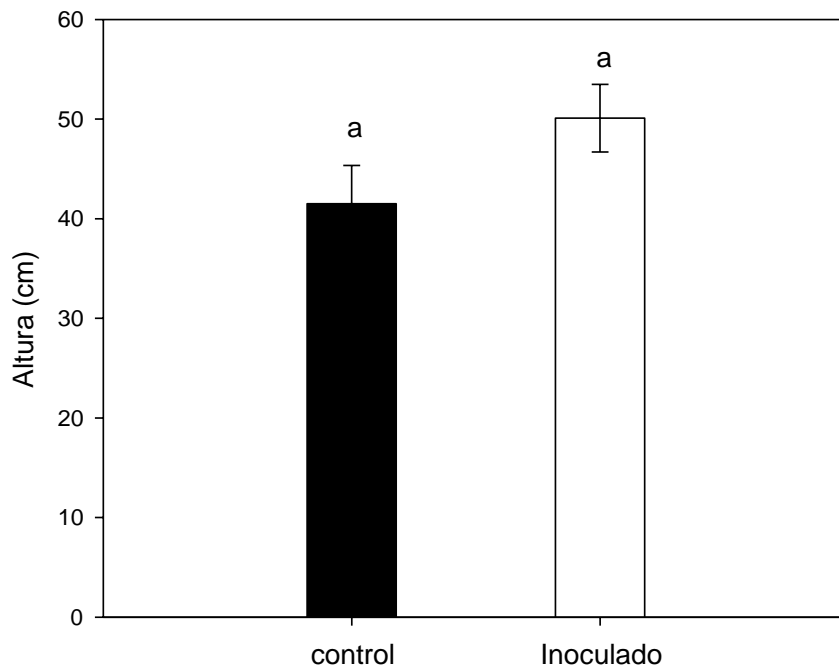


Figura 11. Altura de *Physalis peruviana* inoculadas con cf. *Funneliformis* sp. Se muestran valores promedio \pm DE. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias comparadas por el test de T de Student $P < 0.05$.

Fuente: autora

Elaborado: autora

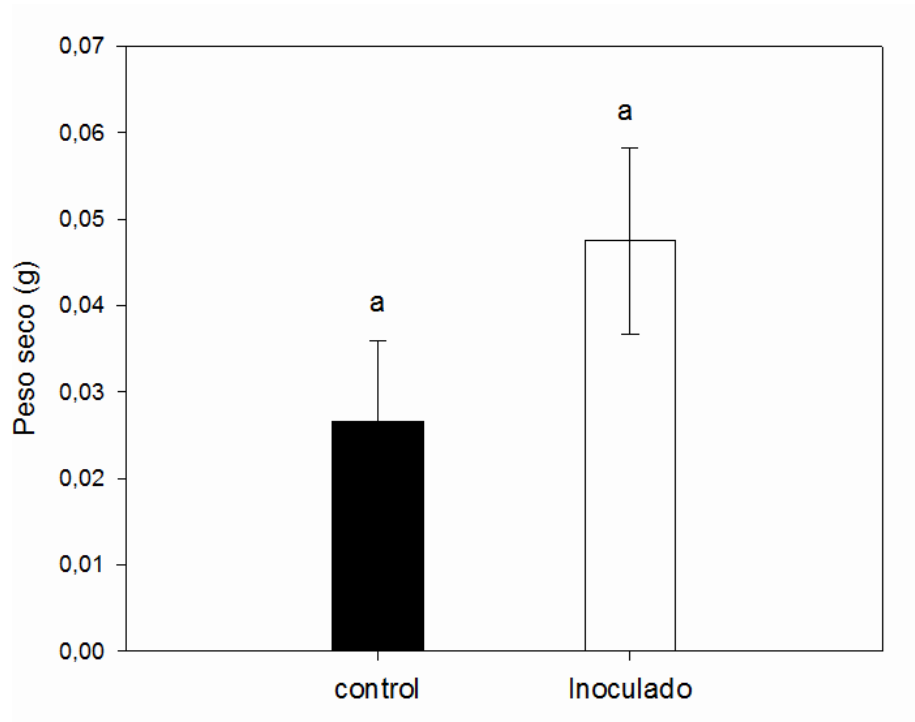


Figura 12. Peso seco de *Physalis peruviana* inoculadas con cf. *Funneliformis* sp. Se muestran valores promedio \pm DE. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias comparadas por el test de T de Student $P < 0.05$.

Fuente: autora

Elaborado: autora

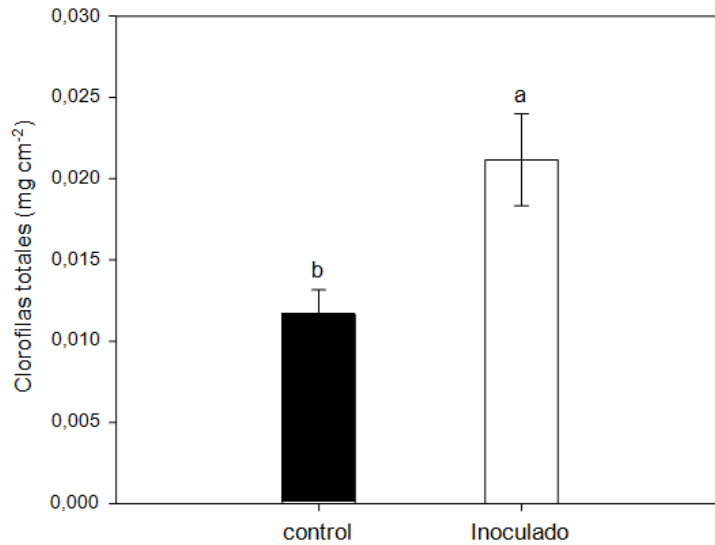


Figura 13. Clorofilas totales de *Physalis peruviana* inoculadas con cf. *Funneliformis* sp. Se muestran valores promedio \pm DE. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias comparadas por el test de T de Student $P < 0.05$.

Fuente: autora

Elaborado:autora

Al realizar la tinción de las raíces de las plantas inoculadas, sólo se observó la colonización por hifas intercelulares en porcentajes menores al 10%, y no hubo evidencia de otras estructuras micorrízicas. Estos resultados indican que no se cumplió el ciclo de vida completo del hongo y por ello tampoco observamos producción de esporas. Entre las posibles razones de la ausencia de continuidad en el proceso de colonización, se encuentran la baja viabilidad de las esporas cuando estas provienen directamente del campo. Los aislados micorrízicos se encuentran adaptados a las condiciones edáficas de las cuales provienen, y la dinámica de la colonización intraradicular puede verse afectada por el pH, textura y concentración de los diferentes nutrientes (Helgason & Fitter, 2009).

Algunos estudios como el de Douds (1997) reporta que en medio mínimo (M) *F. mosseae*, colonizó las raíces transformadas de zanahorias pero no esporuló, se observó germinación solo cuando el medio M se encontraba en un pH por encima de 7.0. (Mosse y Hepper 1975; Mugnier y Mosse 1987) indicaron que el desarrollo de *F. mosseae* y *Rhizophagus irregularis* (Mosse 1988) en un pH bajo se inhibieron y crecieron sus hifas solo después de aumentar el pH. Pawlowska et al. (1999) informaron también la ausencia de esporulación en *F. mosseae* mientras se encontraban en cultivo dual. En el estudio de Rodrigues & Rodrigues (2015), las esporas de *F. mosseae* y su colonización no fueron afectadas por la composición del medio MSR o el pH (5.5) por lo que sugieren que el desarrollo micorrízico temprano, la germinación, la esporas, crecimiento del tubo germinal, reconocimiento del huésped y

contacto inicial con las raíz, determinan el fracaso o el éxito de la simbiosis de MA.

Los HMA previamente cultivados *in vitro* se han adaptado adecuadamente a cultivos autotróficos, produciendo abundantes esporas (Pérez-Moncada et al., 2012), por lo que es posible que un periodo de pre-adaptación a condiciones de cultivo *in vitro* sea necesario para algunas especies de HMA. Otro factor importante a considerar en el establecimiento de cultivos autotróficos de HMA *in vitro*, es el uso de un mayor número de esporas que incrementen las probabilidades de colonización en diferentes lugares del sistema radicular, como ha sido comprobado por Voets et al. (2005), quienes lograron establecer un cultivo autotrófico exitoso con plantas de *Solanum tuberosum* L. utilizando 150 esporas por caja Petri.

También es posible que un efecto tóxico del hipoclorito de sodio sobre las esporas nativas, pudiese afectar el proceso de colonización, ya que si el lavado no es eficiente este se concentra alrededor de la spora (Cranenbrouck et al., 2005). Pérez Moncada et al. (2011) desarrollaron una metodología para la desinfección de esporas utilizando hipoclorito de calcio en lugar de hipoclorito de sodio, obteniendo una contaminación del 1% sin daños en las esporas, sus resultados fueron similares a los de Budi et al. (1999), observaron una reducción del 90% de contaminación y un alto nivel de germinación. En muchos estudios el uso de una solución de antibióticos, y agentes desinfectantes aplicados en esporas de diferentes géneros en condiciones *in vitro* ha sido exitoso (Dalpé & Declerck, 2002; Fortin et al., 2002; Yinli et al., 2004; Fernández et al., 2005; Kandula et al., 2006; Mirabal & Ortega, 2008; Solís-Dominguez et al., 2009; Eskandari & Danesh, 2010). Sin embargo, las diferentes concentraciones y tiempos de exposición deben ser establecidas para cada especie, ya que, en función de la misma estos efectos varían (Walley & Germida, 1996).

Aunque no se logró el resultado esperado de multiplicación del hongo, la presencia de hifas micorrízicas intercelulares y los incrementos en el contenido de clorofilas en plantas inoculadas, indican un efecto positivo de la micorriza a nivel fisiológico, y un alto potencial de *P. peruviana* para futuras pruebas de reproducción de HMA en cultivos autotróficos *in vitro*.

7.3 Inoculación con fragmentos de raíz.

En un segundo ensayo de inoculación con fragmentos de raíz, 29 sistemas autotróficos fueron inoculados con fragmentos de raíces de cuatro especies diferentes y siete fueron mantenidos como tratamiento control (no inoculados). Los fragmentos de raíz fueron cultivados previamente en gotas de gel gro, y seleccionados en función de la producción de hifas. A la cuarta semana de inoculación en los sistemas autotróficos y utilizando un microscopio invertido, se observó contacto entre las hifas fúngicas provenientes de los fragmentos y las raíces de las plántulas de *P. peruviana* (figura 14).

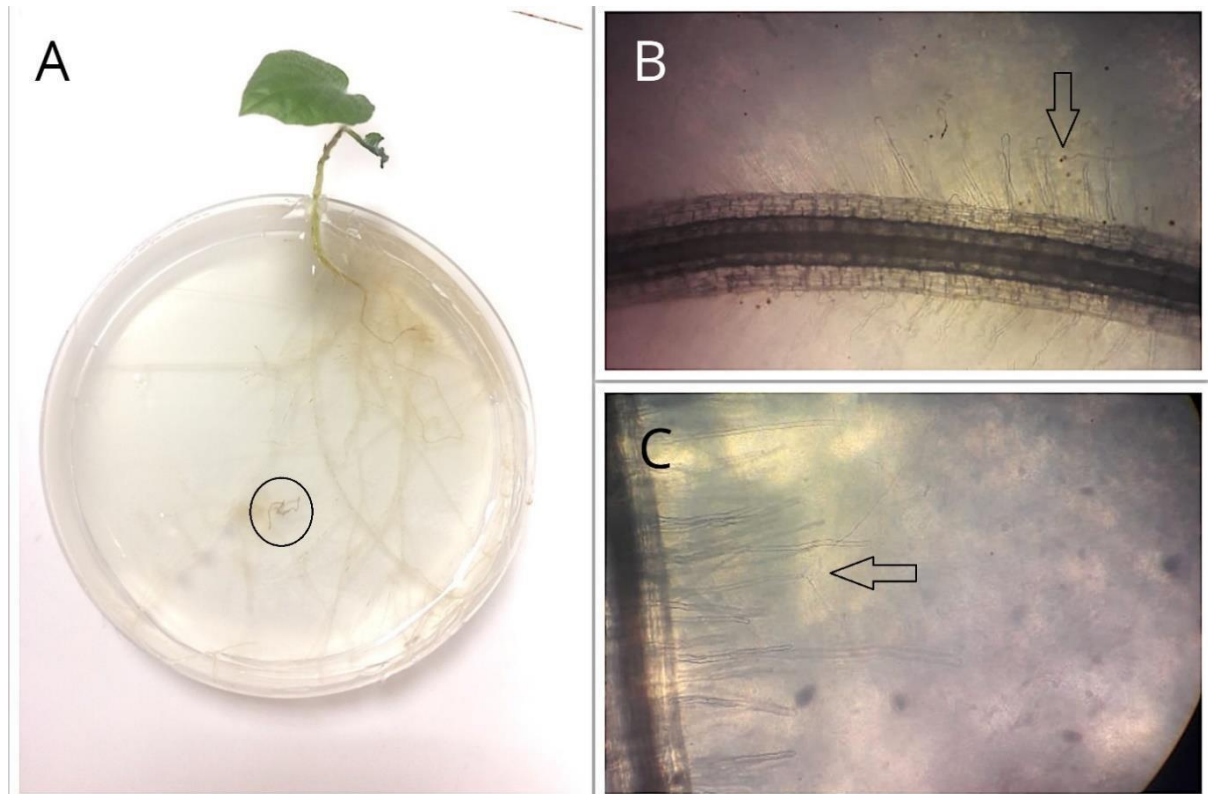


Figura 14. A. Inoculación directa con fragmento de raíz de *Plantago lanceolata*. B-C. Vista desde microscopio invertido donde se observa micelio en contacto con la raíz de *P. peruviana* (400X).

Fuente: autora

Elaborado por: autora

El contenido de clorofilas totales de las plantas de *P. peruviana* inoculadas con fragmentos de raíz de *Oxalis* sp. fue significativamente mayor al de todos los demás tratamientos (figura 15). Los tratamientos inoculados con fragmentos de raíz de *Oxalis* sp., *Plantago lanceolata* y *Emilia sonchiflora*, mostraron mayores valores de altura que el control, mientras que en el tratamiento inoculado con fragmentos de *Kalanchoe* sp. no se observaron diferencias significativas respecto al control (figura 16). Por otro lado, el peso seco de las plántulas fue significativamente menor en todos los tratamientos inoculados que en el control (figura 17).

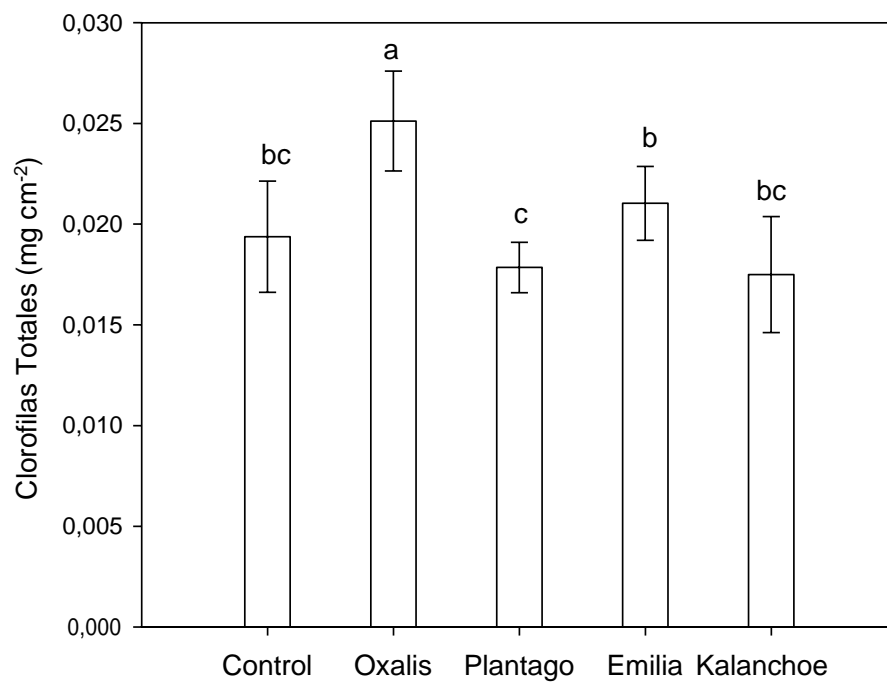


Figura 15. Clorofilas totales de *Physalis peruviana* inoculadas con fragmentos de raíz. Se muestran valores promedio \pm DE. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias comparadas por el test de LSD $P < 0.05$.

Fuente: autora

Elaborado por: autora

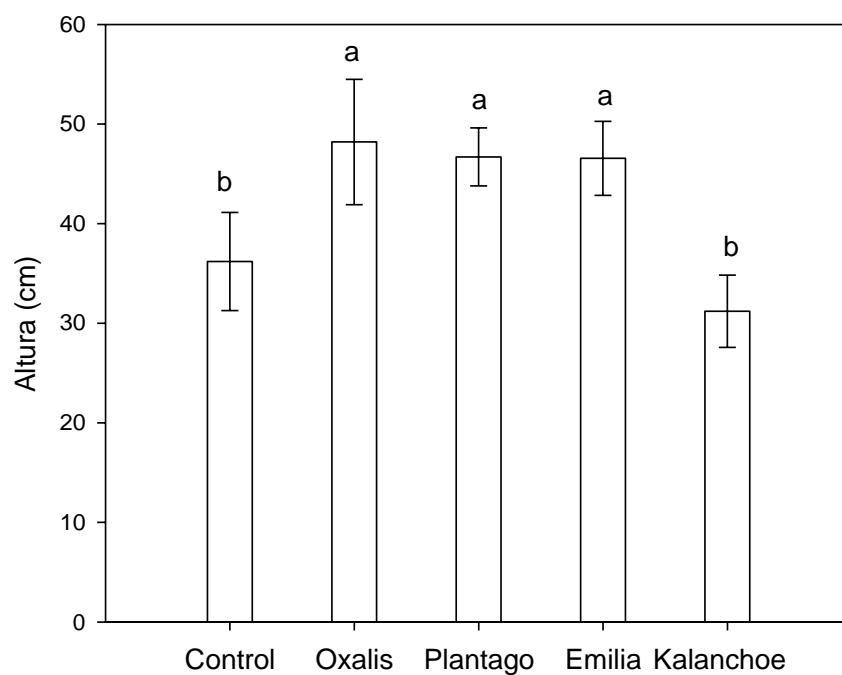


Figura 16. Altura de *Physalis peruviana* inoculadas con fragmentos de raíz. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias comparadas por el test de LSD $P < 0.05$.

Fuente: autora

Elaborado por: autora

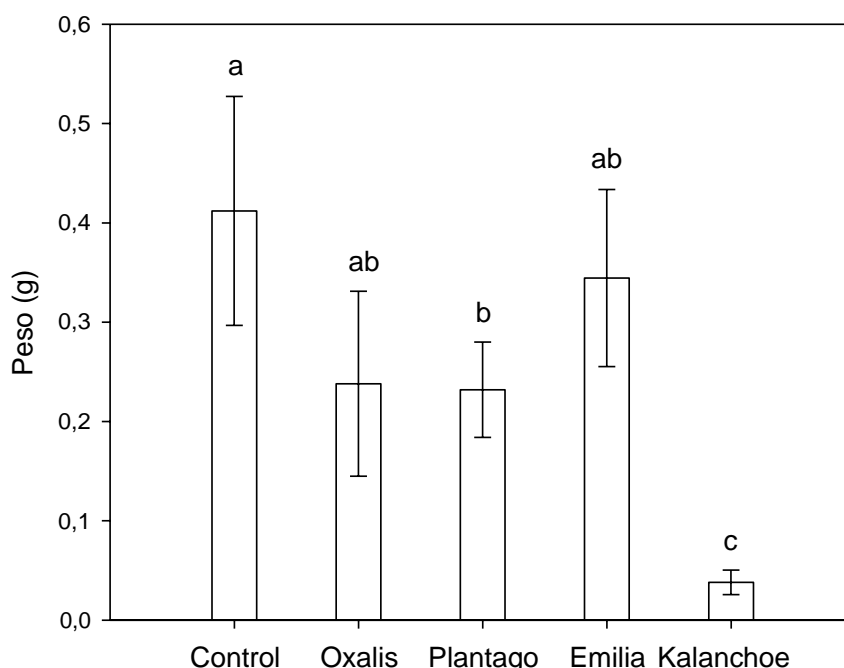


Figura 17. Peso Seco de *Physalis peruviana* inoculadas con fragmentos de raíz. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias comparadas por el test de LSD $P < 0.05$.

Fuente: autora

Elaborado por: autora

Las raíces de las especies seleccionadas, aunque presentaron colonización por HMA, no fueron eficientes como fuente de inóculo de estos hongos, pero si constituyeron una fuente de propágulos de endófitos septados oscuros (ESO). Con el método de aclarado y tinción radicular se logró observar que las raíces fueron colonizadas por ambos tipos de endófitos fúngicos (figura 18), pero porcentaje de colonización por micorrizas arbusculares fue nuevamente muy bajo (<6%). El porcentaje de colonización por ESO en *P. peruviana* se muestra en la figura 19. La mayor colonización por ESO se observó en el tratamiento de raíces de *P. lanceolata* con 64%, seguida de *Kalanchoe* sp. con 51%, luego *Oxalis* sp. con 50% y finalmente *E. sinchoflora* con 49%.

Los ESO presentan una alta heterogeneidad funcional, y sus efectos dependen principalmente de la ontogenia, genotipo y fisiología de sus plantas hospederas (Knapp et al., 2018). Su presencia se asocia a ambientes duros y estresantes con limitaciones nutricionales, y se han encontrado en 600 especies de plantas sin ejercer efectos patogénicos, o actuando como promotores del crecimiento vegetal (Vergara et al., 2017). El

establecimiento de ESO en condiciones *in vitro* con *P. peruviana*, implica el potencial de esta especie como modelo de estudio para estos hongos.

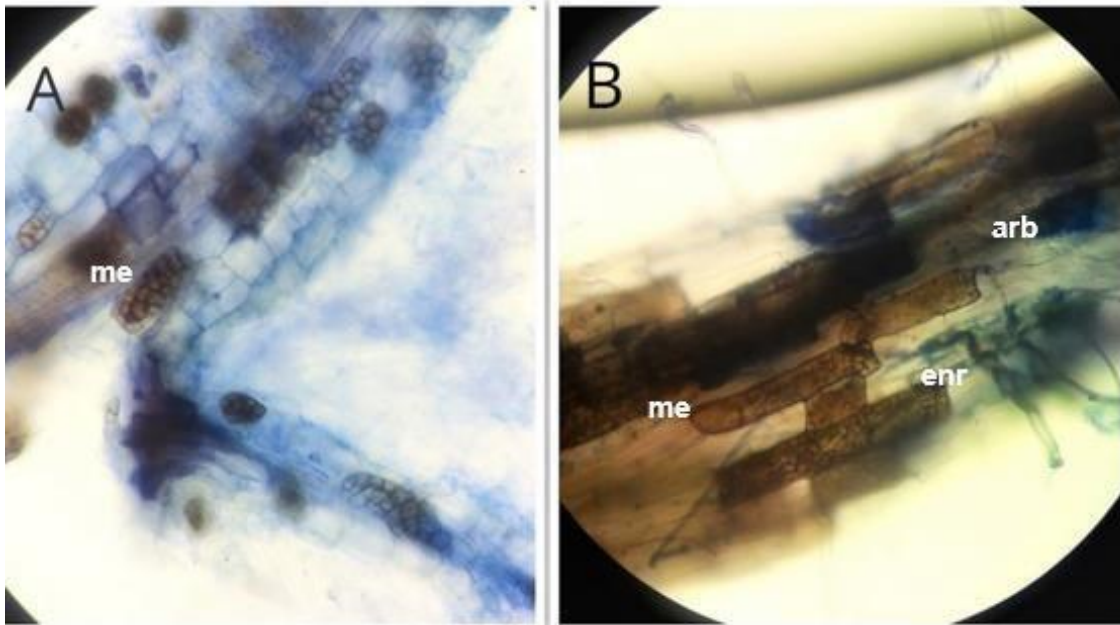


Figura 18. Formaciones de endófitos septados oscuros. **A.** Microesclerocios intracelulares **B.** Microesclerocios de ESO, enrollados hifales y arbusculo de HMA. Microesclerocios (me), Arbúsculo (arb), Enrollado hifal (enr).

Fuente: Emily Ochoa Elaborado

por: Emily Ochoa

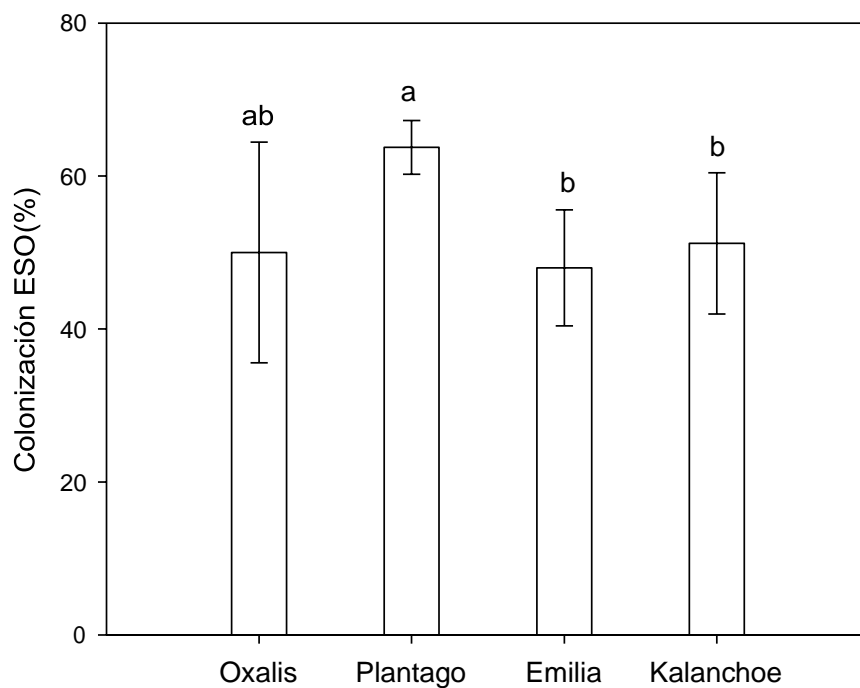


Figura 19. Porcentaje de colonización ESO en los diferentes tratamientos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias comparadas por el test de LSD $P < 0.05$.

Fuente: autora

Elaborado por: autora

CONCLUSIONES

- Plántulas de uvilla (*Physalis peruviana*), se establecieron exitosamente en el sistema de cultivo autotrófico hasta los siete meses, siendo el medio MSR el más idóneo para su germinación y crecimiento.
- El procedimiento de desinfección superficial utilizado y la baja viabilidad de las esporas extraídas directamente del campo, son factores que posiblemente interfirieron en la dinámica colonización micorrízica en los sistemas autotróficos de *P. peruviana*.
- La inoculación de plantas de uvilla con esporas provenientes de suelo de un cultivo de maíz no tuvo los resultados esperados en términos de producción de propágulos de hongos micorrízicos, pero si tuvo un efecto positivo en el contenido de clorofila total de *P. peruviana*.
- Los fragmentos de raíces fueron mejores fuentes de hongos septados oscuros que de micorrizas arbusculares en los sistemas autotróficos de *P. peruviana*, y su alta colonización señala a esta especie como un posible modelo para el estudio de este grupo de endófitos radiculares.

RECOMENDACIONES

- Realizar un orificio extra en la tapa del sistema autotrófico para añadir medio de cultivo cuando la planta lo necesite sin abrir toda la caja petri, evitando riesgo de contaminación.
- Se recomienda establecer un protocolo de desinfección y germinación previamente para la germinación de esporas de cf. *Funneliformis* sp. ya que, el efecto del desinfectante varía en función de la especie.
- Se recomienda el cultivo previo de las micorrizas arbusculares con el sistema de planta trampa (en suelo) para incrementar el número de esporas disponibles, así como también la inoculación con un número alto de esporas (50-100 esporas) para garantizar un establecimiento óptimo de la simbiosis.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, S., Malik, A., Yasmin, R., Ullah, N., Gul, W., Khan, P. M., & Afza, N. (1999). Withanolides from *Physalis peruviana*. *Phytochemistry*, 50(4), 647-651.
- Bécard, G., & Fortin, J. A. (1988). Early events of vesicular–arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist*, 108(2), 211-218.
- Bianciotto, V., C. Bandi, D. Minerdi, M. Sironi, T. H. Volker, and P. Bonfante. (1996). An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3005-3010.
- Bissuel-Belaygue, C., Cowan, A. A., Marshall, A. H., & Wery, J. (2002). Reproductive Development of White Clover (*L.*) is Not Impaired by a Moderate Water Deficit That Reduces Vegetative Growth. *Crop Science*, 42(2), 414-422.
- Butcher, D. N., & Street, H. E. (1964). Excised root culture. *The Botanical Review*, 30(4), 513-586.
- de Boulois, H. D., Delvaux, B., & Declerck, S (2005). Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on the root uptake and translocation of radiocaesium. *Environmental pollution*, 134(3), 515-524.
- Brown, B., Scott, R. R., & Macfarlane, R. P. (1992). An assessment of *Vicia faba* and *Trifolium pratense* as forage crops for *Bombus hortorum*. *New Zealand Entomologist*, 15(1), 42-47.
- Cuenca G (2014). Las micorrizas arbusculares: aspectos teóricos y aplicados. Ediciones IVIC, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Caracas, Venezuela. 432 pp.
- Correa, H. (2006). Perfil de Mercado de Semillas forrajeras–Colombia., “*Monitoreo nutricional y metabólico en hatos lecheros*”, *Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Producción Animal.* (1), 89-95.
- Damgaard, C., Simonsen, V., & Osborne, J. L. (2008). Prediction of pollen-mediated gene flow between fields of red clover (*Trifolium pratense*). *Environmental modeling & assessment*, 13(4), 483-490.

- Declerck, S., Strullu, D.G. and Plenchette, C. (1996). *In vitro* mass-production of the arbuscularmycorrhizal fungus, *Glomus versiforme*, associated with Ri T-DNA transformed carrot roots. *Mycol. Res.* 100, 1237–1242.
- Douds Jr. JDD. 1997. A procedure for the establishment of *Glomus mosseae* in dual culture with Ri T-DNA-transformed carrot roots. *Mycorrhiza*. 7:57–61
- Elmeskaoui, A., Damont, J. P., Poulin, M. J., Piché, Y., & Desjardins, Y. (1995). A tripartite culture system for endomycorrhizal inoculation of micropropagated strawberry plantlets *in vitro*. *Mycorrhiza*, 5(5), 313-319.
- Fernández Suárez, K. (2012). Los sistemas de cultivo *in vitro* aplicados al estudio de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA). *Cultivos Tropicales*, 33(2), 33-43.
- Ferrera Cerrato, R., & Alarcón, A. (2001). La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *Ciencia Ergo Sum*, 8 (2).
- Gastelum, D. (2012). *Demanda nutrimental y manejo agronómico de Physalis peruvianum L* (Doctoral dissertation, Tesis de Maestría. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas, Texcoco, México).
- Gerdemann, J., Nicholson, T. (1963). Spores of mycorrhizal *Endogone* species from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46: 235 -244.
- Giovannetti, M. and Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscularmycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84, 489–500.
- Helgason T, Fitter A (2009) Natural selection and the evolutionary ecology of the arbuscular mycorrhizal fungi (Phylum Glomeromycota). *Journal of Experimental Botany.* 60: 2465-2480.
- Hidayat, C., Arief, D. H., Nurbaity, A., & Sauman, J. (2013). Rhizobacteria selection to enhance spore germination and hyphal length of arbuscular mycorrhizal fungi *in vitro*. *Asian Journal of Agriculture and Rural Development*, 3(4), 199.
- Jasper DA, Abbott LK & AD Robson (1989). Soil disturbance reduces the infectivity of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 112:93-99.
- Joshee, N., Mentreddy, S.R., & Yadav, A. K. (2007). Mycorrhizal fungi and growth and development of micropropagated *Scutellaria integrifolia* plants. *Industrial Crops and Products*, 25(2), 169-177.
- Kim Maria Rodrigues & Bernard Felinov Rodrigues (2015) Endomycorrhizal association of *Funneliformis mosseae* with transformed roots of *Linum usitatissimum*: germination,

colonization, and sporulation studies, *Mycology*, 6:1, 42-49, DOI: 10.1080/21501203.2015.1024777

Knapp, D. G., Németh, J. B., Barry, K., Hainaut, M., Henrissat, B., Johnson, J., ... Kovács, G. M. (2018). Comparative genomics provides insights into the lifestyle and reveals functional heterogeneity of dark septate endophytic fungi. *Scientific Reports*, 8(1), 6321. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24686-4>

Manjarrez, M.M.J., R. Ferrera-Cerrato y A. Alarcón (2000). Biotecnología de la producción de inóculo micorrízicoarbuscular y su control de calidad. pp. 238-250.

Miranda D, Fischer G, Ulrichs C (2011) The influence of arbuscular mycorrhizal colonization on the growth parameters of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) plants grown in a saline soil. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 11: 18-30.

Mosse, B. (1962). The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. *Microbiology*, 27(3), 509-520.

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

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

Mugnier J, Mosse B. 1987a. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in transformed root-inducing T-DNA roots grown axenically. *Phytopathology.* 77:1045–1050.

McGregor, S. E. (1976). *Insect pollination of cultivated crop plants* (Vol. 496). Washington (DC): Agricultural Research Service, US Department of Agriculture.

Pawlowska TE, Douds DD, Charvat I. 1999. *In vitro* propagation and life cycle of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum*. *Mycol Res.* 103:1549–1556.

Pérez-Moncada, U. A., Ramírez-Gómez, M. M., Núñez-Zarante, V. M., Franco-Correa, M., & Roveda-Hoyos, G. (2012). Evaluación de un sistema para la micorrización *in vitro* en plantas de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth). *Univ Sci*, 17(2), 140-151.

Rapparini, F., R. Baraldi, G. Bertazza, B. Branzanti y S. Predieri. (1994). Vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation of micropropagated fruittrees. *J. Hort. Sci.* 69: 1101-1109.

Rebolledo, R., Martínez, P., Palma, M., Aguilera, A., & Klein, K. (2004). Actividad de visita de *Bombus dahlbomi* (Guérin) y *Bombus ruderatus* (F.)(Hymenoptera: Apidae) sobre Trébol Rosado (*Trifolium pratense* L.) en la IX Región de la La Araucanía, Chile. *Agricultura Técnica*, 64(3), 245-250.

- Sevilla, G. H., & Fernández, O. N. (1991). Leguminosas forrajeras herbáceas. Emergencia y establecimiento de plántulas (revisión bibliográfica). *Revista Argentina de Producción Animal*.
- Sieverding E (1991). Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. In Technical Cooperation Federal Republic of Germany. 371 p.
- Simon L, Bousquet J, Levesque RC & M Lalonde (1993). Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363:67-69.
- Ramadan, M. F., & Mörsel, J. T. (2003). Oil goldenberry (*Physalis peruviana* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(4), 969-974.
- Rodas, M. (1996). *Taxonomía, histología, ecogeografía y usos medicinales de Physalis peruviana L." tomatillo silvestre"(Solanaceae)* (Doctoral dissertation, Tesis para optar el grado de Bachiller en Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú).
- Schüßler A, Mollenhauer D, Schnepf E & M Kluge (1994). Geosiphon pyriforme an endosymbiotic association of fungus and cyanobacteria: the spore structure resembles that of arbuscular mycorrhizal AM fungi. *Botanica Acta* 107:36-45.
- Schüßler A, Schwarzott D & C Walker (2001). A new fungal phylum the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105:1413-1421.
- Shuel, R. W. (1952). Some factors affecting nectar secretion in red clover. *Plant physiology*, 27(1), 95.
- 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 intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots. *Mycological research*, 100(3), 328-332.
- Sturz, A. V., Christie, B. R., Matheson, B. G., & Nowak, J. (1997). Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biology and Fertility of Soils*, 25(1), 13-19.
- Sylvia, D. M. (1999). Mycorrhizal symbioses. pp. 408-426. In: D. M. Sylvia, J. F. Fuhrmann, P. J. Hartel, and D. A Zuberer (eds). Principles and applications of soil microbiology. Prentice Hall. Upper Saddle River, NJ, USA.
- Vergara, C., Araujo, K. E. C., Urquiaga, S., Schultz, N., Balieiro, F. de C., Medeiros, P. S., ... Zilli, J. E. (2017). Dark Septate Endophytic Fungi Help Tomato to Acquire Nutrients from

Ground Plant Material. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2437.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02437>

Voets, L., Dupré de Boulois, H., Renard, L., Strullu, D. G., & Declerck, S. (2005). Development of an autotrophic culture system for the *in vitro* mycorrhization of potato plantlets. *FEMS Microbiology letters*, 248(1), 111-118.

Wu, S. J., Ng, L. T., Huang, Y. M., Lin, D. L., Wang, S. S., Huang, S. N., & Lin, C. C. (2005). Antioxidant activities of *Physalis peruviana*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(6), 963-966.

White, P. R (2011). *In vitro* cellular and the biology. *Plant*, vol. 47, no. 2, p. 201-204

Zare-Maivan H, Khanpour-Ardestani N, Ghanati F (2017) Influence of mycorrhizal fungi on growth, chlorophyll content, and potassium and magnesium uptake in maize. *Journal of Plant Nutrition* 40: 2026-2032.

ANEXOS

Anexo 1. Composición del medio basal Murashige & Skoog modificado.

Medio MS modificado para 100 ml.	
fertilizante	0.20g
Azúcar	20g
Agar	6.8g

Anexo 2. Pruebas de t para medias de dos muestras emparejadas del contenido de clorofilas totales de plantas no inoculadas e inoculadas con esporas. Valores de $P(T \leq t)$ dos colas < 0.05 , indican diferencias significativas entre tratamientos. Valor de alfa 0.05.

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	28.79	37.25
Varianza	22.3054444	61.4961111
Observaciones	10	10
Coeficiente de correlación de Pearson	0.33218033	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	9	
	-	
Estadístico t	3.47715605	
$P(T \leq t)$ una cola	0.00348486	
Valor crítico de t (una cola)	1.83311293	
$P(T \leq t)$ dos colas	0.00696972	
Valor crítico de t (dos colas)	2.26215716	

Anexo 3. Pruebas de t para medias de dos muestras emparejadas de la altura de plantas no inoculadas e inoculadas con esporas. Valores de $P(T \leq t)$ dos colas < 0.05 , indican diferencias significativas entre tratamientos. Valor de alfa 0.05.

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	41.5	50.1
Varianza	118.277778	102.1
Observaciones	10	10
Coeficiente de correlación de Pearson	0.18654749	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	9	
	-	
Estadístico t	2.03055207	
$P(T \leq t)$ una cola	0.0364347	
Valor crítico de t (una cola)	1.83311293	
$P(T \leq t)$ dos colas	0.07286941	NS
Valor crítico de t (dos colas)	2.26215716	

NS= No significativo.

Anexo 4. Pruebas de t para medias de dos muestras emparejadas del peso seco de plantas no inoculadas e inoculadas con esporas. Valores de $P(T \leq t)$ dos colas < 0.05 , indican diferencias significativas entre tratamientos. Valor de alfa 0.05.

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	0.0266	0.0475
Varianza	0.00087649	0.0011665
Observaciones	10	10
Coefficiente de correlación de Pearson	-0.3308664	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	9	
	-	
Estadístico t	1.26909297	
$P(T \leq t)$ una cola	0.11812204	
Valor crítico de t (una cola)	1.83311293	
$P(T \leq t)$ dos colas	0.23624408	NS
Valor crítico de t (dos colas)	<u>2.26215716</u>	

NS= No significativo.