

**INTERACCIÓN SINÉRGICA ENTRE HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS ARBUSCULARES-
Pseudomonas fluorescens Y SU RELACIÓN EN LA NUTRICIÓN VEGETAL DE FÓSFORO**

**YULI MARCELA ORDOÑEZ CASTAÑEDA
186275**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de
Magíster en Ciencias.**

**Dirigido por:
PhD. ALIA RODRIGUEZ VILLATE**

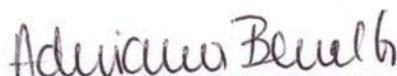
**Con la colaboración de:
PhD. DANIEL URIBE VELEZ**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA
Bogotá, 2009**

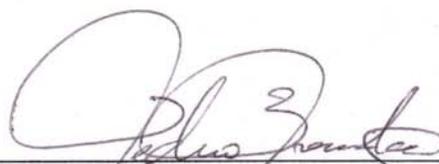
NOTA DE ACEPTACIÓN

La presente tesis titulada: “Interacción sinérgica entre Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares-*Pseudomonas fluorescens* y su relación en la nutrición vegetal de fósforo” fue sustentada y aprobada para el grado de Maestría en Microbiología, el 28 de Enero de 2010.

En constancia firman:



Jurado: Adriana Jimena Bernal Giraldo
Grupo de Micología y Fitopatología
Universidad de los Andes



Jurado: Pedro F.B. Brandão
Departamento de Química
Universidad Nacional de Colombia

“Like microscopy for cell biology,
and the polymerase chain reaction for molecular biology,
the mycorrhizal root organ culture system can be considered
a critical step in the scientific history of mycorrhiza”
Guillaume Bécard

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme fuerza, constancia y sabiduría para llevar a buen término este proceso.

A mis padres por su apoyo constante.

A la Universidad Nacional de Colombia por abrirme sus puertas.

Al Posgrado Interfacultades Maestría en Microbiología por contribuir a mi formación académica.

A la profesora Martha Fontanilla por sus enseñanzas y por ser un ejemplo de mujer científica.

A Socorrito por estar siempre pendiente de nosotros los estudiantes, por sus buenos consejos y por su amistad.

Al Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía, por recibirme como estudiante tesista.

Al Instituto de Genética-UNAL Sede Bogotá, y al profesor Alejandro Chaparro por el préstamo del cuarto de crecimiento.

Al Laboratorio de Microbiología Agrícola del IBUN, por apoyarme en la metodología.

A Rubencito por su ayuda en el transporte de las macetas, por su paciencia y por estar siempre dispuesto de colaborar.

A la profesora Sixta Martinez, por su asesoría.

A Almudena Medina, por su colaboración con el programa MycoCalc.

A Maria Cecilia, por estar pendiente de mi trabajo y por introducirme en el cultivo de tejidos vegetales, por su compañía y amistad.

A Angelita Maria, por ser una buena compañera, por enseñarme el uso de algunos programas informáticos útiles en esta investigación, por ser ejemplo de perseverancia y planeación científica.

A Jose Marulanda por su ayuda en el poster del ICOM y por creer en las micorrizas.

A Pablo, Mayra e Isa, por aquellos días de intenso estudio y por su amistad.

Al profesor Daniel Uribe, por permitir el uso las cepas bacterianas en estudio, por su apoyo incondicional, por su interés en ésta investigación, por el tiempo dedicado a la planeación del proyecto y discusión de los resultados, por sus aportes y correcciones, por ser ejemplo de excelencia e intenso trabajo.

A la profesora Alia Rodriguez, por volver a Colombia y aplicar la investigación en el desarrollo del país. Por mostrarme el cautivante y extenso mundo de las micorrizas, por aportar a mi formación científica. Por ser ejemplo de dedicación, tenacidad y éxito. Por su confianza y amistad.

A Dios y a todos ustedes gracias, sin su presencia en mi vida no habría sido posible este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	12
1. MARCO TEORICO.....	14
1.1. EL CICLO DEL FÓSFORO EN EL SUELO	14
1.2. LA RIZÓSFERA.....	15
1.3. RIZOBACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO.....	15
1.3.1. <i>Pseudomonas fluorescens: generalidades y su papel en la rizósfera</i>	16
1.4. HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS ARBUSCULARES (HFMA).....	17
1.4.1. <i>Generalidades</i>	17
1.4.2. <i>Morfología y ciclo de vida</i>	19
1.4.3. <i>Cultivo monoxénico</i>	23
1.4.4. <i>Efecto de los HFMA en la nutrición vegetal</i>	24
1.5. INTERACCIÓN HFMA Y BACTERIAS EN LA RIZÓSFERA.....	26
1.6. SOLANUM PHUREJA: CULTIVO EN COLOMBIA Y PROBLEMAS DE LA NUTRICIÓN FOSFORADA.....	27
2. OBJETIVOS	28
2.1. OBJETIVO GENERAL	28
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3. MATERIALES Y METODOS	29
3.1. INÓCULOS MICROBIANOS	29
3.1.1. <i>Glomus intraradices</i>	29
3.1.2. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	29
3.2. ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO IN VITRO.	31
3.2.1. <i>Diseño experimental</i>	34
3.2.2. <i>Área de crecimiento microbiano</i>	34
3.2.3. <i>Cuantificación de la longitud de micelio MA extraradical</i>	35
3.2.4. <i>Cuantificación de BAS y esporas en el compartimento de la hifa</i>	35
3.2.5. <i>Determinación de la concentración de fosfatos en la raíz</i>	35
3.2.6. <i>Estandarización de la medición de P en raíces transformadas</i>	36
3.3. ENSAYO EN MACETAS.....	36
3.3.1. <i>Condiciones del ensayo</i>	36
3.3.2. <i>Determinación de parámetros simbióticos</i>	37
a. <i>Tinción de raíces micorrizadas</i>	37
3.3.3. <i>Determinación de la colonización bacteriana</i>	39
3.3.4. <i>Determinación de PO_4^- en peciolo</i>	40
3.3.5. <i>Diseño experimental</i>	40
4. RESULTADOS	41
4.1. CULTIVO IN VITRO.....	41
4.1.1. <i>Estandarización de la medición de P en raíces transformadas</i>	41
4.1.2. <i>Experimento I. Sin fosfato Tricálcico. Evaluar la interacción Pseudomonas fluorescens-Glomus intraradices y su influencia en el crecimiento microbiano</i>	42
a. <i>Crecimiento de las cepas bacterianas en el compartimento de la hifa</i>	42
b. <i>Crecimiento del micelio extraradical en el compartimento de la hifa</i>	44
4.1.3. <i>Experimento II. Con Fosfato Tricálcico. Para evaluar la translocación de P solubilizado por las bacterias a través de la hifa extraradical hacia la raíz</i>	47
a. <i>Concentración de PO_4^- en raíces transformadas</i>	47
4.2. CULTIVO EN MACETAS	48
4.2.1. <i>Recuento de ufc/gr suelo rizosférico</i>	48

4.2.2.	<i>Intensidad de la colonización micorrízica</i>	49
4.2.3.	<i>Concentración de PO₄ en peciolo de Solanum phureja</i>	51
4.2.4.	<i>Biomasa seca de parte aérea y raíces</i>	52
5.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	54
6.	CONCLUSIONES	63
7.	PERSPECTIVAS	64
1.	BIBLIOGRAFÍA	65
8.	ANEXOS	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura taxonómica propuesta del filum Glomeromycota con base en las secuencias SSU del ADNr. Tomado de Schüßler *et al.*, 2001.

Figura 2. Ciclo de vida de los hongos formadores de micorrizas arbusculares. Se observan dos fases: una intraradical con el desarrollo de la estructura típica de la simbiosis denominada arbusculo y la otra fase extraradical con el crecimiento del micelio conformado por hifas, esporas y estructuras ramificadas de absorción (BAS).

Figura 3. Formación de halo de solubilización por cepas de *Pseudomonas fluorescens* mutantes rifampicina 150 µg/ml en medio NBRIIP-FT, después de 15 días de incubación 25°C.

Figura 4. Esquema de las placas con dos compartimentos, que permite el cultivo *in vitro* de los hongos formadores de micorrizas arbusculares. Tomado de (Bago *et al.*, 1996).

Figura 5. Diseño metodológico del sistema *in vitro*. Diferencia en los componentes del medio de cultivo e inoculación de raíces transformadas.

Figura 6. Diseño metodológico del sistema *in vitro*. Diferencia en los componentes del medio de cultivo en el compartimento de la hifa y el establecimiento de los experimentos I y II.

Figura 7. Cultivo *in vitro* de raíces micorrizadas. Ubicación del inóculo bacteriano en cuatro puntos (a una distancia de 0,5 cm del borde y 2 cm entre cada punto aproximadamente). Se delimitan halos de crecimiento bacteriano en el CH después de 72 horas de incubación.

Figura 8. Niveles de colonización según método de Trouvelot *et al.*, (1986). Tomado de Medina, 2006.

Figura 9. Niveles de riqueza de arbusculos según método de Trouvelot *et al.*, (1986). Tomado de Medina, 2006.

Figura 10. Raíces transformadas rodeadas por bacterias en el compartimento de la raíz. (a) Raíces no colonizadas (b) Raíces colonizadas, se observa un halo blanquecino alrededor (flecha blanca).

Figura 11. Raíces transformadas rodeadas por bacterias en el compartimento de la hifa (a, b y c). Algunas raíces que atravesaron al compartimento de la hifa (flecha blanca) fueron colonizadas por bacterias que llegaron allí posiblemente utilizando la hifa como vehículo (flecha negra).

Figura 12. Hifas extraradicales a los 20 días postratamiento. Control (a y b): hifas de dominancia apical, las hifas secundarias crecen en un ángulo de 45°C (Flecha roja). Tratamientos(c-f): hifas onduladas.

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Diferencias en la asimilación de P. Barras con la misma letra no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$).

Gráfica 2. Longitud de la hifa extraradical en el compartimento de la hifa después de 20 días del inicio del tratamiento. Las columnas con líneas diagonales representan el control (Cultivo *in vitro* de *G. intraradices* sin inóculo bacteriano *P. fluorescens*). Barras con la misma letra no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$).

Gráfica 3. Recuento de BAS/cm² en el compartimento de la hifa 20 días después del inicio del tratamiento. La columna con líneas diagonales representa el control (Cultivo *in vitro* de *G. intraradices* sin inóculo bacteriano *P. fluorescens*). Barras con la misma letra no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$).

Gráfica 4. Recuento de esporas/cm² en el compartimento de la hifa 20 días después del inicio del tratamiento. La columna con líneas diagonales representa el control (Cultivo *in vitro* de *G. intraradices* sin inóculo bacteriano *P. fluorescens*). Barras con la misma letra no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$).

Gráfica 5. Concentración de PO₄⁼ en raíces transformadas. Barras con líneas longitudinales representan los controles: NO FT (Medio en el compartimento distal sin FT, sin inóculo bacteriano) y C (Medio en el compartimento distal con FT, sin inóculo bacteriano). Barras con la misma letra no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$).

Gráfica 6. Recuento de UFC rifampicina resistentes (150 µg/ml) en suelo rizosférico 80 días post-inoculación. Control: plantas sin inocular. Micorriza: plantas inoculadas solo con *G. intraradices*, producto Glomygel®. Tratamientos: Plantas inoculadas con *G. intraradices* y cepas de *P. fluorescens*.

Gráfica 7. Frecuencia de colonización de *G. intraradices* en las raíces de *S. phureja*, hallada por el método de Trouvelot *et al.*, (1986). Las columnas con líneas diagonales representan los controles: C (plantas sin inóculo) y M (plantas con inóculo de *G. intraradices*). Barras con la misma letra no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$).

Gráfica 8. Intensidad de la colonización de *G. intraradices* en las raíces de *S. phureja*, hallada por el método de Trouvelot *et al.*, (1986). Las columnas con líneas diagonales representan los controles: C (plantas sin inóculo) y M (plantas con inóculo de *G. intraradices*). Barras con la misma letra no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$).

Gráfica 9. Concentración de PO₄⁻² en peciolos de *S. phureja*. (Promedio de cinco réplicas). Barras con líneas longitudinales representan los controles: C (plantas sin inóculo) y M (plantas con inóculo *G. intraradices*). Barras con la misma letra no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$).

Gráfica 10. Peso seco de raíces de *S. phureja*. (Cuatro replicas por tratamiento). Barras con líneas longitudinales representan los controles: C (plantas sin inóculo) y M (plantas con inóculo *G. intraradices*). Barras con la misma letra no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$).

Gráfica 11. Curva de calibración Técnica Azul de Molibdato para evaluar la concentración de fosfatos en el tejido vegetal.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de colonización micorrízica, según el método de Trouvelot *et al.*, (1986). (Manual De Micorrizas, 2001).

Tabla 2. Área de crecimiento de las cepas *P. fluorescens* en el compartimento de la hifa (CH) en cada caja de petri, 72 horas después de la inoculación.

Tabla 3. Recuento de ufc mutantes rifampicina (150 µg/ml) en la superficie de la semilla inoculada.

Tabla 4. Biomasa en peso seco de parte aérea de plantas *S. phureja* (*promedio de cuatro replicas). La inoculación de HFMA y *P. fluorescens* cepa 63 mostró un efecto positivo sobre el crecimiento de las raíces de *S. phureja*.

Tabla 5. Datos curva de calibración de la técnica Azul de Molibdato, para la medición de fósforo en el tejido vegetal.

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Medios de cultivo y soluciones

ANEXO 2. Técnica azul de molibdato para la evaluación de fosfatos en el tejido vegetal.

ANEXO 3. Características de las cepas *Pseudomonas fluorescens*. Tomado de Lara (2007).

ANEXO 4. Análisis físico-químico del suelo utilizado para el ensayo en macetas.

ANEXO 5. Ficha técnica de la Roca fosfórica.

ANEXO 6. Imágenes del crecimiento bacteriano sobre las hifas extraradicales de *G. intraradices* en el compartimento de la hifa en el ensayo *in vitro*.

ANEXO 7. Parámetros morfológicos del micelio extraradical en el ensayo *in vitro*.

ANEXO 8. Análisis estadístico. Ensayos *in vitro*.

ANEXO 9. Análisis estadístico. Ensayo en macetas.

ANEXO 10. Análisis de correlación lineal de Pearson.

INTRODUCCIÓN

Desde el inicio de la agricultura, se han buscado alternativas para soportar el gasto nutricional de los cultivos y alcanzar las condiciones ideales en cuanto a la disponibilidad de nutrientes, para mantener el crecimiento y la productividad.

El fósforo (P), es un nutriente esencial para la planta y su presencia es limitada en los hábitats naturales, así como en los suelos agrícolas a nivel mundial. La tasa de absorción de fosfato por las raíces, es más alta que su tasa de difusión en el suelo, lo cual resulta en una zona de desabastecimiento alrededor de la raíz (Karandashov & Bucher, 2005; Smith & Read, 2008).

Por otra parte, los suelos de la región andina colombiana, son Andisoles, suelos que se destacan por su alta capacidad de fijación de fósforo. Los iones fosfato se inmovilizan cuando forman complejos con aluminio(Al), calcio (Ca) o hierro (Fe), lo cual obliga a la aplicación de altas dosis de fertilizante fosfatado, para sobreponer el alto poder de fijación y abastecer suficientemente a la planta (Espinosa, 1998). Por ser uno de los nutrientes que mas escasea en el suelo, lo ideal sería minimizar la pérdida de fósforo, que ocurre por la rápida fijación (Chen *et al.*, 2006). Una opción para utilizar el fósforo que ya no está disponible, es el uso de microorganismos solubilizadores de fosfato (géneros bacterianos como *Pseudomonas sp*) y movilizadores de fosfato (como los hongos formadores de micorrizas arbusculares-HFMA)

Entre el género *Pseudomonas sp.* la especie *P. fluorescens* es una rizobacteria capaz de solubilizar fósforo inorgánico, a través de la producción de ácidos orgánicos que son excretados al espacio extracelular (Chen *et al.*, 2006) y se ha demostrado cómo su presencia en la rizósfera aumenta la biomasa y la productividad en cultivos agrícolas (Akkopru & Demir, 2005; Ehteshami *et al.*, 2007).

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

En Colombia, el cultivo de papa es el quinto producto de mayor importancia (FAOSTAT, 2007) y el más sobresaliente en el centro del país, donde se concentra el 60% de la producción (Villarreal *et al.*, 2007). En el renglón de exportación, es la papa criolla (*Solanum phureja*) la que se destaca por su potencial en

los mercados mundiales. Sin embargo, uno de los obstáculos para la comercialización en el exterior, es el excesivo uso de fertilizantes y de plaguicidas, que sobrepasa los límites exigidos internacionalmente y restringe la obtención de las respectivas certificaciones (Proexport, 2009b). Aún así, los agricultores le apuestan a producir un alimento con calidad, porque cuando el producto sale del país el valor agregado se encuentra entre el 20 y el 80% (Proexport, 2009a). De esta forma, los agricultores requieren del desarrollo de tecnologías, que permitan reducir el uso de productos sintéticos en la agricultura colombiana.

Por otro lado, el alto costo de los fertilizantes fosforados de síntesis química, sumado a las excesivas aplicaciones en los cultivos, donde cerca del 16% del presupuesto está destinado a estos productos, ocasiona pérdidas en la sostenibilidad de los cultivos agrícolas, desfavorece económicamente a los agricultores y genera problemas medioambientales (Villarreal *et al.*, 2007).

Algunas cepas de *Pseudomonas fluorescens* han sido aisladas de la rizósfera de papa cultivada en Andisoles de la región andina colombiana y se han caracterizado como solubilizadoras de fosfatos (Lara, 2007). La importancia de estos aislamientos, radica en su capacidad de adaptación a condiciones de alta toxicidad por iones Al^{+3} y el bajo pH característico de los suelos andinos. En este estudio se quiso evaluar la interacción de algunas cepas bacterianas seleccionadas a través de ensayos *in vitro*, con HFMA y establecer si la interacción es sinérgica en función del fósforo, con el fin de utilizar estos dos microorganismos como una promisoriosa alternativa biotecnológica que mejore la disponibilidad de iones fosfato en la rizósfera de *Solanum phureja*.

1. MARCO TEORICO

1.1. El ciclo del fósforo en el suelo

El fósforo (P), es un macronutriente esencial para el crecimiento y el desarrollo de los organismos vivos, es un elemento fundamental de los ácidos nucleicos, fosfolípidos y enzimas (Karandashov & Bucher, 2005). El ciclo del P en el suelo es dinámico, donde los microorganismos juegan un papel central, debido a que intervienen en reacciones de transferencia de electrones de fosfito (PO_2^{-3}) a fosfato (PO_4^{-3}) (Rodríguez & Fraga., 1999).

La reserva de fósforo en la naturaleza son las rocas y otras formaciones minerales formadas durante las eras geológicas. La mayoría de los suelos agrícolas contiene altas reservas de fósforo insoluble, las cuales se han acumulado como consecuencia del uso regular de fertilizantes fosforados. La concentración de P soluble en el suelo es muy baja y solamente es absorbido por las células como ortofosfato o anión monovalente fosfato (H_2PO_4^-) y con menor rapidez, como anión bivalente (HPO_4^{-2}) (Havlin *et al.*, 2005; Salisbury & Ross, 1994).

El fósforo en el suelo se encuentra en forma inorgánica y orgánica. El fósforo inorgánico (Pi) soluble es rápidamente inmovilizado después de su aplicación y deja de ser disponible para la planta. Además, la tasa de absorción del fósforo por las raíces de las plantas, es más rápida que la tasa de difusión del fosfato en el suelo (Bucher, 2006; Bucher, 2007; Schachtman & Reid, 1998), lo cual resulta en una zona de desabastecimiento alrededor de las raíces que limita el crecimiento vegetal por déficit nutricional (Karandashov & Bucher, 2005). El problema de fijación y precipitación del fósforo soluble, es altamente dependiente del pH y el tipo de suelo. La disponibilidad óptima de ortofosfatos ocurre a un pH 6,5 (Sylvia *et al.*, 2005). En suelos ácidos, como los suelos agrícolas colombianos, el Pi se fija a óxidos libres y a hidróxidos de aluminio y hierro; mientras que en suelos alcalinos, el Pi es fijado por el calcio (Havlin *et al.*, 2005; Rodríguez & Fraga, 1999; Sylvia *et al.*, 2005). Debido a la formación de estos complejos inorgánicos, el fósforo soluble está presente en concentraciones limitadas en los hábitats naturales, así como en los suelos agrícolas a nivel mundial (Bucher, 2007).

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, y representa la forma más estable en el suelo. El P orgánico restante está representado por fosfomonoesteres, fosfodiesteres incluyendo fosfolípidos y ácidos nucleicos, y fosfortriesteres (Rodríguez & Fraga, 1999). La

planta puede absorber compuestos solubles de bajo peso molecular como ácidos nucleicos (Havlin *et al.*, 2005).

1.2. La rizósfera

La rizósfera es un término que se introdujo desde principios del siglo XX para describir la zona del suelo adyacente e influenciada por las raíces de las plantas. El efecto rizosférico descrito por Lorenz Hiltner en el año 1904, se refiere al efecto de los exudados radicales, compuestos orgánicos solubles, que son sustrato para los microorganismos, por lo tanto se incrementa la actividad y la proliferación microbiana (Darhorn & Fuqua, 2007; Siddiqui, 2004; Sylvia *et al.*, 2005).

Las propiedades físicas, químicas y biológicas de la rizósfera son diferentes a las del suelo no rizosférico. En la rizósfera existe una alta densidad poblacional de microorganismos, donde el máximo valor se encuentra en el rizoplaneo (superficie de la raíz) y desciende al alejarse de la superficie radical (Johansson *et al.*, 2004).

La rizósfera es la principal interfase para las interacciones planta-microorganismos del suelo (Raaijmakers *et al.*, 2009). La dinámica de estas interacciones determina la salud de la planta y permite clasificar a los microorganismos como: (i) Saprofitos, que viven libremente y utilizan compuestos orgánicos procedentes de residuos animales, vegetales o microbianos, (ii) Patógenos, causantes de enfermedades en plantas (iii) Simbiontes mutualistas, que viven asociados a las raíces vegetales y benefician el desarrollo y la nutrición vegetal (Sylvia *et al.*, 2005).

1.3. Rizobacterias solubilizadoras de fosfato

Las bacterias que viven en la rizósfera y que tienen un efecto benéfico directo o indirecto sobre la planta se han denominado bacterias promotoras del crecimiento vegetal, con sus siglas en inglés PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacterias) (Koepller *et al.*, 1989; Vessey, 2003). Entre las funciones reconocidas se destacan el control biológico de patógenos por antagonismo (Akkopru & Demir, 2005; Siddiqui, 2004), Inducción de Resistencia Sistémica (Kandan *et al.*, 2005), tolerancia a estrés abiótico (Yang *et al.*, 2009), fitoestimulación e incremento de la biodisponibilidad de elementos minerales como la solubilización de fosfatos o la fijación de nitrógeno (Vessey, 2003).

Las PGPR deben cumplir ciertas características como: ser capaces de colonizar la raíz, sobrevivir y multiplicarse en la rizósfera, donde deben competir con la microbiota natural y ejercer su actividad promotora del crecimiento (Koeppler *et al.*, 1989).

Algunas PGPR se han utilizado como biofertilizantes, que se define como una sustancia que contiene microorganismos vivos, que cuando son aplicados a la semilla, la superficie de la planta o al suelo, colonizan la rizósfera y promueven el crecimiento vegetal porque incrementan la disponibilidad y absorción de nutrientes a la planta hospedera (Vessey, 2003). Por ejemplo, las bacterias solubilizadoras de fósforo (PSB, Phosphorus Solubilizing Bacteria), benefician el crecimiento de la planta porque incrementan el fósforo disponible en el suelo y de esta forma favorecen el crecimiento vegetal (Vassilev *et al.*, 2006).

Los microorganismos pueden tener tres mecanismos para la solubilización de fosfatos en el suelo. (i) Para liberar Pi pueden excretar ácidos orgánicos como resultado de la oxidación de la glucosa y provocar una disminución en el pH (Rodríguez & Fraga, 1999). Entre los ácidos identificados producidos por PSB están: ácido cítrico, ácido glucurónico, ácido succínico, ácido láctico y ácido propiónico (Chen *et al.*, 2006). (ii) Producción de ácidos orgánicos quelantes de Pi (quitina, polímeros fenólicos y melanina)(Reyes *et al.*, 2001): Los microorganismos involucrados en la solubilización de roca fosfórica, normalmente producen ácidos orgánicos, los cuales a través de su hidroxilo o carboxilo grupo terminal, quelan los cationes unidos al fosfato y entonces liberan el fosfato soluble (Kpombekou & Tabatabai, 1994). (iii) Solubilización de fósforo orgánico, por la producción de fosfatasa ácida que pueden ser del tipo no específicas (fosfohidrolasas ácidas) o específicas (3'-nucleotidasa, 5'-nucleotidasa, hexosafosfatasa y fitasas) dependiendo del sustrato, las cuales hidrolisan los puentes fosfoéster y fosfoanhidro de estas moléculas (Rodríguez & Fraga, 1999).

Entre los géneros bacterianos con esta capacidad se encuentran *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium* y *Erwinia* (Rodríguez & Fraga, 1999).

1.3.1. *Pseudomonas fluorescens*: generalidades y su papel en la rizósfera

El género *Pseudomonas sp.*, corresponde a bacterias Gram negativas que pertenecen al dominio Bacteria, Filum Proteobacteria, clase Gamma Proteobacteria, orden Pseudomonadales y familia Pseudomonadaceae (Ncbi, 2009).

Pseudomonas fluorescens es de distribución ubicua, habitante de la filósfera, puede sobrevivir y multiplicarse en microhabitats asociados a la rizósfera y el rizoplaneo, en su mayoría formando biofilms (Darhorn & Fuqua, 2007). El biofilm consiste en agrupaciones de bacterias de igual o diferentes géneros, recubiertas por exopolisacárido, que les permite adherirse a la raíz o a las hifas de los hongos formando agregados (Bianciotto *et al.*, 2001).

Pseudomonas fluorescens fue una de las primeras especies en ser estudiada por su capacidad promotora de crecimiento vegetal (Siddiqui, 2004). Es una rizobacteria sobresaliente en el campo agrícola por su reconocida versatilidad: controla patógenos (Akkopru & Demir, 2005; Guo *et al.*, 2004) a través de la producción de metabolitos secundarios como sideróforos (Verma *et al.*, 2007) y antibióticos como la phenazina, pirrolnitrina y piocianina (Haas & Défago, 2005); incrementa el crecimiento vegetal por la producción de fitohormonas tipo auxinas como el Acido Indol Acético (Lara, 2007; Siddiqui, 2004). *Pseudomonas fluorescens*, es capaz de solubilizar fósforo inorgánico, a través de la secreción de ácidos orgánicos que son excretados al espacio extracelular (Dey *et al.*, 2004) y se ha demostrado cómo su presencia en la rizósfera aumenta la biomasa y la productividad en cultivos agrícolas (Sood, 2003).

1.4. Hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA)

1.4.1. Generalidades

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 & Read, 2008).

El término simbiosis puede definirse como una interacción estrecha entre dos microorganismos, donde se obtiene beneficio mutuo, en este caso un intercambio bidireccional de nutrientes y fotosintatos

(Reinhardt, 2007). Para que la simbiosis planta-HFMA sea exitosa es necesaria una comunicación coordinada entre los dos organismos (Harrison, 2005; Imaizumi-Anraku *et al.*, 2005; Parniske, 2004; Parniske, 2008). En esta simbiosis, los organismos tienen una historia evolutiva común, demostrada por los registros fósiles de las primeras plantas sobre la tierra, donde se observan esporas de HFMA y estructuras de absorción similares a arbusculos. Éstos fósiles datan de los periodos Silúrico y Devónico, por lo tanto el origen de las micorrizas se puede adjudicar a 400 millones de años atrás (Redecker, 2000).

Taxonómicamente, los HFMA pertenecen al filum Glomeromycota; este filum se ha creado recientemente basándose en la secuencia de la subunidad pequeña del ADNr (Schussler, 2001). Incluye una sola clase, los Glomeromycetes y cuatro órdenes: Glomerales, Diversisporales, Paraglomerales y Archaeosporales (Figura 1). Un aspecto clave de esta nueva clasificación es que el género *Glomus sp.*, antes clasificado en base a criterios morfológicos y estructurales, se ha escindido en al menos tres grupos distintos: *Glomus A*, B y C. Los dos primeros grupos están englobados en el orden Glomerales, mientras que *Glomus C* pertenece a los Diversisporales. La especie *Glomus intraradices* utilizada en este estudio pertenece al Grupo A (Schussler, 2001).

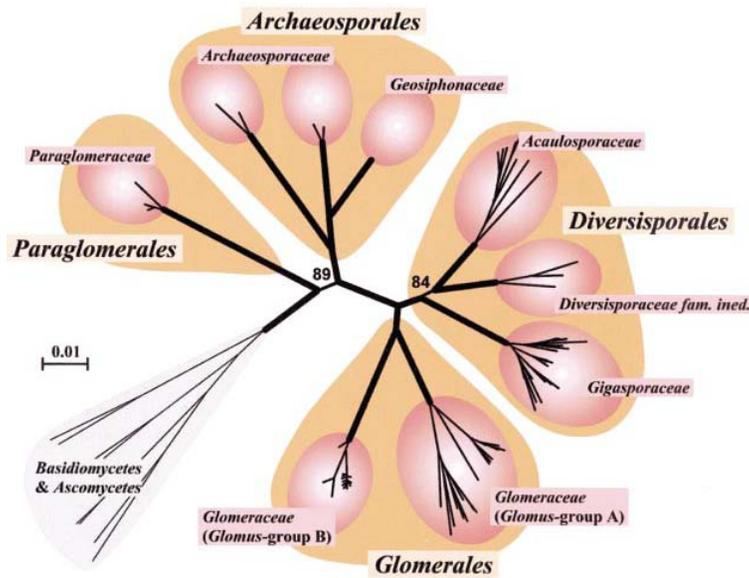


Figura 1. Estructura taxonómica propuesta del filum Glomeromycota con base en las secuencias SSU del ADNr. Tomado de Schussler *et al.*, 2001.

El nombre arbuscular, fue asignado por la característica particular de las estructuras llamadas arbusculos, que se desarrollan dentro de las células corticales de la raíz colonizada y son diagnóstico de la simbiosis

(Figura 2). Otras estructuras menos frecuentes son las vesículas de almacenamiento, que se localizan dentro o entre las células vegetales y acumulan lípidos (Smith & Read, 2008).

Durante el establecimiento de la simbiosis MA, el hongo coloniza la corteza de la raíz, desarrolla un extenso micelio externo que simula un sistema radical complementario y altamente efectivo, ayuda a la planta a adquirir nutrientes minerales y agua del suelo. A su vez, la planta hospedadora le proporciona al hongo fuentes de carbono procedentes de la fotosíntesis y un nicho ecológico protegido (Karandashov & Bucher, 2005; Smith & Read, 2008).

Esta simbiosis representa un alto costo para la planta, entre el 4 y el 20% del carbono fijado a través de la fotosíntesis es consumido por el hongo (Parniske, 2008; Wright *et al.*, 1998). Sin embargo, las hifas del hongo son mucho más finas que las raíces y para la planta podría ser desgastante producir más raíces que establecer una simbiosis que le aporte beneficios nutricionales (Helgason & Fitter, 2009).

El carbono tomado de la planta, es usado para la producción de estructuras: esporas e hifas. El Carbono en forma de hexosas, es absorbido por los arbusculos intraradicales y son convertidos a lípidos y glicógeno que luego son exportados al micelio externo el cual no tiene la capacidad de absorber carbono del suelo (Smith & Read, 2008).

1.4.2. *Morfología y ciclo de vida*

La colonización radical por el hongo sigue un proceso de desarrollo con distintas etapas: precolonización, colonización y crecimiento en el suelo (Figura 2).

a. *Precolonización.* La colonización micorrícica puede iniciarse a partir de tres tipos de propágulos: esporas, raíces previamente colonizadas e hifas. De todos ellos las esporas son los únicos propágulos que pueden ser clasificados taxonómicamente, siguiendo criterios morfológicos.

El ciclo de vida se inicia con la germinación de las esporas. Este es un proceso independiente de la presencia de la planta hospedadora, que requiere de condiciones adecuadas de humedad y temperatura

(Bécard & Piché, 1989), aunque factores como exudados radicales y sustancias derivadas del metabolismo de hongos y bacterias del suelo pueden acelerar la germinación (Hildebrandt *et al.*, 2002).

Los hongos micorrízicos producen esporas de origen asexual, caracterizadas por contener un gran número de glóbulos lipídicos y de núcleos. La presencia de esporas multinucleadas es una particularidad de los HFMA, donde a la fecha, no es claro si los diferentes núcleos son portadores de la misma información genética (homocariosis), o si contienen información genética diferente (heterocariosis) (Hijri (Hijri & Sanders, 2005; Pawlowska & Taylor, 2004; Rodriguez *et al.*, 2004). Existen evidencias que sugieren que los HFMA pueden contener núcleos genéticamente diferentes en un mismo citoplasma, lo cual tiene fuertes implicaciones en la genética de un organismo que forma extensas redes hifales aseptadas a través de las cuales los núcleos pueden potencialmente moverse (Sanders & Croll, 2009).

La germinación inicia con la formación del tubo germinal y la activación metabólica de la espora. En presencia de la planta hospedadora o de sus exudados, el tubo germinal continúa su crecimiento. Cuando el hongo no encuentra hospedero, el desarrollo del tubo germinal es muy reducido y tras unos pocos días, se retrae el citoplasma de la hifa hacia la espora, que entra nuevamente en reposo (Smith & Read, 2008). Sin embargo, cuando el hongo detecta una raíz micotrófica, la hifa empieza una profusa ramificación para aumentar la posibilidad de contacto con la raíz. Una vez ha ocurrido el primer contacto, se forma una estructura denominada apresorio, a través de la cual al cabo de dos o tres días, se iniciará la penetración en la raíz (Giovannetti *et al.*, 1993).

b. Colonización. La hifa de penetración atraviesa la epidermis y en la zona más externa de la corteza da lugar a unas estructuras intercelulares típicas, que se denominan ovillos o "coils". Se forman mediante circunvoluciones de hifas intercelulares y aunque no se conoce su función se ha propuesto que pueden estar implicados en una toma inicial de compuestos hidrocarbonatados. A continuación, la hifa colonizadora se ramifica y se extiende intercelularmente a través del córtex. Finalmente, las hifas penetran la célula y se ramifican repetidamente en forma dicotómica, para dar lugar a la estructura típica de la simbiosis: el arbúsculo (Smith & Read, 2008).

Cuando el hongo coloniza una célula perfora la pared celular pero no la membrana plasmática del hospedante, aunque sí induce su invaginación y extensión para formar la membrana periarbuscular que rodea completamente el arbúsculo (Smith & Read, 2008). La membrana periarbuscular incrementa en cuatro veces la superficie de contacto entre los dos microorganismos (Krajinski & Frenzel, 2007) y exhibe

una cantidad mayor de proteínas transportadoras de membrana involucradas en la transferencia de fosfato (Harrison *et al.*, 2002; Javot *et al.*, 2007; Karandashov & Bucher, 2005; Parniske, 2004). El espacio que separa las membranas vegetal y fúngica corresponde al espacio periarbuscular y representa la interfase donde ocurre el intercambio de nutrientes (Hause & Fester, 2005).

Normalmente los arbusculos tienen un tiempo de vida corto, de 4 a 10 días, después de los cuales se degeneran y son digeridos por la célula hospedadora que vuelve a recuperar su apariencia y su función normal (Alexander *et al.*, 1988; Bonfante-Fasolo & Grippiolo, 1984). Al mismo tiempo, o poco después de que se formen los arbusculos, algunas especies de hongos MA forman vesículas intra y/o intercelulares. Las vesículas, son estructuras de forma diversa según la especie (redondeadas, ovoides, etc.) y de paredes finas que se producen por el hinchamiento terminal de las hifas. Estas estructuras almacenan gran cantidad de lípidos y actúan como órgano de reserva del hongo en situaciones de estrés, como es la falta de carbohidratos (Smith & Read, 2008).

La fase intraradical está representada por hifas intra e intercelulares, arbusculos y a veces vesículas. La colonización solo tiene lugar en la epidermis y en el parénquima cortical de las raíces. El hongo MA no penetra nunca en el cilindro vascular, ni en las regiones meristemáticas (Smith & Read, 2008).

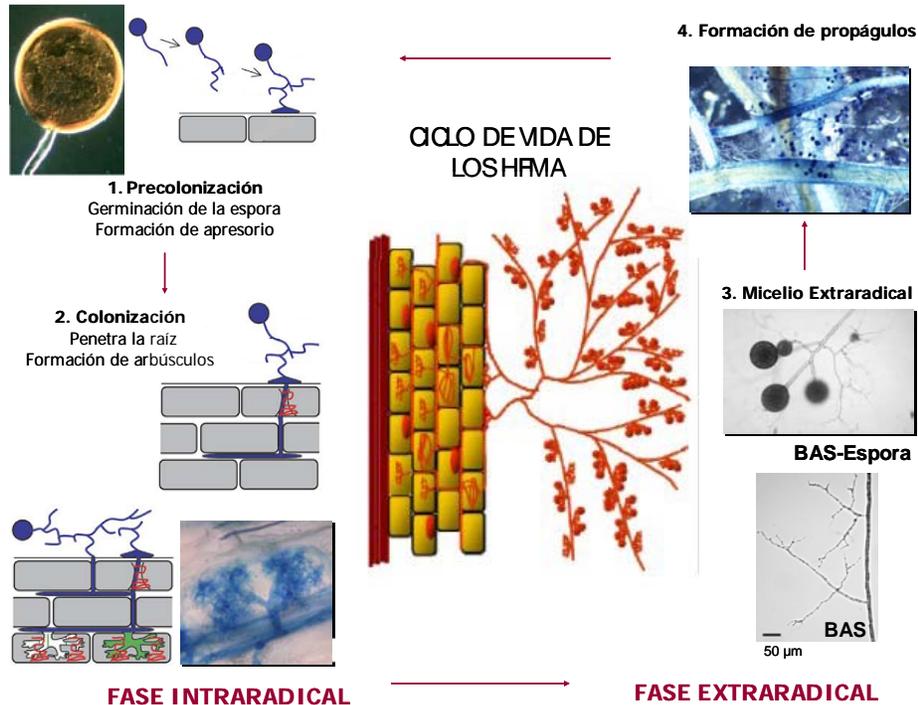


Figura 2. Ciclo de vida de los hongos formadores de micorrizas arbusculares. Se observan dos fases: una intraradical con el desarrollo de la estructura típica de la simbiosis denominada arbusculo y la otra fase extraradical con el crecimiento del micelio conformado por hifas, esporas y estructuras ramificadas de absorción (BAS).

c. Crecimiento del hongo en el suelo. Simultáneamente a la colonización de la raíz, el hongo desarrolla en el suelo una red de micelio que constituye la fase extraradical de la simbiosis, la principal responsable de la absorción de nutrientes minerales que serán posteriormente cedidos a la planta. En una micorriza activa se considera que existe una fase extraradical del hongo. El micelio externo incluye micelio y esporas (Smith & Read, 2008). Inicialmente se producen hifas relativamente gruesas denominadas hifas exploradoras, que crecen de forma apical. Estas hifas sufren ramificaciones (hifas secundarias) que a su vez vuelven a ramificarse. Las hifas exploradoras son las responsables del avance del micelio y la extensión de la colonia fúngica.

Este micelio externo 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 son el fósforo, zinc, cobre y amonio. Las hifas externas forman una red tridimensional, que parece ser idónea para retener las partículas de suelo, mejorando la estabilidad de los agregados (Cardoso & Kuyper, 2006; Sylvia *et al.*, 2005).

A intervalos regulares se forman estructuras ramificadas similares a arbúsculos, conocidas como BAS (Branched Absorbing Structures, Estructuras Ramificadas de Absorción) cuya función es absorber nutrientes del suelo (Bago *et al.*, 1998). Las BAS han sido observadas tanto en cultivo *in vitro* como en el suelo, lo cual demuestra que son estructuras conservadas, sin importar las diferentes condiciones ambientales (Dodd *et al.*, 2000). Las BAS sufren modificaciones estructurales que respaldan su función; disminución progresiva del grosor de la pared hacia el ápice de las hifas que facilita una absorción de nutrientes, y un aumento en el número de mitocondrias en la base de la BAS, aumentando la disponibilidad de energía para el transporte. Las BAS son estructuras transitorias, al cabo de pocos días pierden su contenido citoplasmático a menos que desarrollen esporas (Bago *et al.*, 1998).

1.4.3. Cultivo monoxénico

El cultivo monoxénico de los HFMA es un cultivo *in vitro* libre de contaminantes, donde solo algunos hongos MA pueden crecer asociados a raíces micotróficas transformadas con *Agrobacterium rhizogenes*.

Solo 15 especies han sido cultivadas *in vitro*, pero solo 10 tienen la capacidad de completar su ciclo de vida y producir inóculo continuamente. Entre estas 10 especies la mayoría pertenecen al género *Glomus sp.* que produce esporas pequeñas y vesículas intraradicales. Entonces, solo 5% de aproximadamente 200 especies descritas pueden ser mantenidas en cultivo monoxénico (Declerck *et al.*, 2005)

El desarrollo del sistema monoxénico para HFMA ha revolucionado la vía de aproximación a la compleja interacción simbiótica, además se ha convertido en un sólido modelo para el estudio de microorganismos biótrofos (Fortin *et al.*, 2002). Aunque el cultivo monoxénico es un sistema artificial, permite investigaciones morfológicas y fisiológicas no destructivas de la simbiosis MA, que antes no eran posibles dado el carácter simbiote estricto y biótrofo obligado de los HFMA.

El desarrollo de este sistema fue un largo proceso, que inició en los años 40's con el estudio de los medios de cultivo y requerimientos nutricionales de las raíces transformadas. Se estandarizaron protocolos para la esterilización de esporas aisladas del suelo, un paso crítico para eliminar las bacterias contaminantes

presentes en la superficie de las esporas. Hasta el año 1996, St. Arnaud *et al.*, desarrollaron la técnica del sistema compartimentalizado, donde el micelio extraradical puede ser separado en el compartimento contrario al que crecen las raíces (Fortin *et al.*, 2002).

El sistema monoxénico ha sido utilizado para el estudio extensivo y sistemático de los HFMA, en cuanto al crecimiento del micelio, esporulación, estudios de señalización molecular planta-hongo, la transferencia de macronutrientes, la producción de inóculo libre de otros microorganismos, y el estudio de interacciones con microorganismos del suelo (Declerck *et al.*, 2005). Bago *et al.*, (1998) fueron los primeros en describir el desarrollo de la fase externa de la simbiosis utilizando como modelo el hongo *G. intraradices*.

1.4.4. Efecto de los HFMA en la nutrición vegetal

El efecto mejor conocido y más estudiado que ejercen los HFMA sobre las plantas a las que colonizan, es el que conduce a una mejora de su estado nutricional (Jeffries *et al.*, 2003). Se ha confirmado que el micelio externo de los HFMA puede absorber fosfatos (PO_4^{-2}), nitritos (NO_3^-) y nitratos (NH_4^+) (Hodge *et al.*, 2001; Villegas & Fortin, 2002) y también micronutrientes como el zinc (Zn) (Cardoso & Kuyper, 2006); sin embargo, el incremento en la toma de fosfato, es el beneficio más importante para la planta (Helgason & Fitter, 2009).

La mayoría de las plantas tienen dos vías de absorción de Pi, 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 arbusculos intracelulares formados por los HFMA (Requena, 2005; Smith & Read, 2008).

El micelio fúngico presenta una mayor eficiencia en la absorción de Pi por la amplia exploración física del suelo, llegando a zonas donde el fósforo no está accesible para ser captado por las raíces de las plantas. Entre los nutrientes, el fósforo "extra" absorbido es el elemento clave para explicar el incremento en el crecimiento de las plantas micorrizadas. Además, un desabastecimiento de P en el suelo, es un factor que estimula la asociación con HFMA (Bucher, 2006). En la simbiosis MA, la toma del Pi por la hifa extraradical es el primer paso en la translocación de fosfato a la planta. El fósforo inorgánico absorbido del suelo por las hifas extraradicales es transformado en polifosfato (Poly P), el cual es translocado en forma de gránulos de polifosfato a la hifa intraradical y entregado a la planta después de sufrir hidrólisis en los arbusculos (Ohtomo & Saito, 2005; Olsson *et al.*, 2002). Además, entre los polifosfatos, son los de

cadena corta los que se comportan como un pool de fósforo inorgánico asimilable por la planta (Takanishi *et al.*, 2009).

También se ha descrito actividad fosfatasa alcalina específica de HFMA, sugiriéndose que estas fosfatasas pueden jugar un papel clave en la translocación activa y/o mecanismos de transferencia de P en las MA (Gianinazzi *et al.*, 1995). Pocos reportes indican que los HFMA producen enzimas que pueden hidrolizar P orgánico y transportar el Pi 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, puede traslocar P orgánico cuando la fuente es fitato (Koide & Kabir, 2000).

Desde el punto de vista molecular, los genes GvPT de *Glomus vermiforme* y GiPT de *Glomus intraradices* codifican para moléculas que son posiblemente transportadores y su expresión es predominante en el micelio extraradical cuando se encuentra en contacto con fósforo soluble. La liberación del P a la célula de la raíz micorrizada, constituye el último paso en esta translocación. Los iones fosfato pasan a través de la membrana plasmática del hongo hacia la célula vegetal, posiblemente por un gradiente de concentración y con ayuda de proteínas de membrana (Karandashov & Bucher, 2005).

La simbiosis HFMA-planta, es benéfica para la planta en términos de la mejora en la absorción de nutrientes, en especial fósforo (Smith & Read, 2008). Sin embargo, se ha demostrado que la simbiosis es dependiente de la presencia de proteínas transportadoras de fósforo inorgánico (PiT) en la membrana de las células corticales de las raíces de las plantas. En *Medicago truncatula*, se ha identificado la proteína MtPT4 como esencial para la adquisición de Pi a través de la simbiosis con hongos MA. La pérdida de MtPT4, conlleva a la muerte prematura de los arbusculos y a la incapacidad del hongo de proliferar dentro de las raíces y la simbiosis termina. Entonces, la presencia de transportadores de fósforo inorgánico en la membrana plasmática, no solo son un beneficio para la planta, sino también un requerimiento para la simbiosis MA (Harrison, 2005; Harrison *et al.*, 2002; Javot *et al.*, 2007; Parniske, 2008).

Algunos genes que codifican para las proteínas PiT han sido identificados en la familia *Solanaceae*. *Pht1;3*, *Pht1;4*, y *Pht1;5* se encuentran inducidos en células corticales que contienen arbusculos, en plantas de tomate, papa y pepino (Karandashov & Bucher, 2005; Nagy *et al.*, 2005).

1.5. Interacción HFMA y bacterias en la rizósfera.

Garbaye, fue quien inicialmente describió el concepto "Mycorrhization Helper bacteria-MHB", para referirse a bacterias de la rizósfera que promueven el desarrollo de la simbiosis micorrízica (Garbaye, 1994). Los primeros estudios analizaron la interacción entre el hongo ectomicorrízico *Laccaria laccata* y *Pseudotsuga menzeissii*, mostrando selectividad de las bacterias por la especie de hongo (Frey-Klett & Garbaye, 2005). MHBs han sido aisladas de la rizósfera, entre las más frecuentes se encuentran: *Pseudomonas sp*, *Bacillus sp*, *Azospirillum sp* y *Klebsiella sp* (Frey-Klett *et al.*, 2007).

Garbaye (1994), menciona algunas hipótesis sobre el mecanismo por el cual las bacterias alteran el desarrollo del hongo: efecto sobre la receptividad de las raíces, sobre el reconocimiento y crecimiento del hongo, modificación del suelo rizosférico y efectos sobre la germinación de la espora. Los microorganismos presentes en la rizosfera, identificados como PGPR producen compuestos que incrementan la tasa de exudación radical, lo cual estimula el crecimiento del hongo MA (Barea *et al.*, 2005), incrementa la colonización de las raíces y promueven el funcionamiento de la simbiosis con la planta hospedera (Frey-Klett *et al.*, 2007; Hodge, 2000). Sin embargo aún no es claro si uno o todos los mecanismos están involucrados en el efecto positivo (Johansson *et al.*, 2004; Leveau & Preston, 2008; Marschner & Timonen, 2005).

El establecimiento del hongo en la corteza radical produce cambios fisiológicos en la planta, incluyendo cambios en la composición química de los exudados, que afectan directamente la comunidad bacteriana en la rizósfera (Barea *et al.*, 2005; Hodge, 2000). Por lo tanto, la rizósfera de la planta micorrizada tiene características diferentes en comparación con una planta no micorrizada (Johansson *et al.*, 2004).

Las poblaciones MHBs también están beneficiadas por la presencia del hongo. La cepa *Pseudomonas fluorescens* BBc6R18 aumenta su número en la rizósfera en presencia del hongo ectomicorrízico *Laccaria bicolor* S238N, del cual fue aislada y de forma interesante esto no ocurre cuando las raíces no están micorrizadas, lo cual sugiere que la bacteria depende más de la presencia del hongo que de la raíz (Frey-Klett *et al.*, 2007). De forma similar, la cepa *P. fluorescens* 92 rK en la rizósfera de tomate, puede sobrevivir a un periodo más largo en la rizósfera cuando la simbiosis con el hongo FMA *Glomus mosseae* se ha establecido (Gamalero *et al.*, 2004).

1.6. *Solanum phureja*: cultivo en Colombia y problemas de la nutrición fosforada.

El fósforo es el elemento que con mayor frecuencia resulta limitante en los suelos productores de papa. Existen varios factores que determinan la disponibilidad del P para las plantas: el pH del suelo, el tipo de arcilla predominante, la fuente y localización del P aplicado. El pH ideal para tener una buena disponibilidad de fósforo fluctúa entre 5,5 y 6,5. En los trópicos son comunes los suelos derivados de cenizas volcánicas (Andisoles), en los cuales dominan arcillas amorfas y complejos humus-Al. Estos suelos fijan alta cantidad de P, debido fundamentalmente a que las arcillas tipo alófana tienen una gran afinidad para reaccionar con los iones ortofosfato. Debido a la inmovilidad del P en el suelo, los fertilizantes debe ser aplicados, en forma localizada para lograr en menor tiempo el contacto del P con el suelo y de esta forma contrarrestar en algún grado la fijación de la fuente aplicada (Becerra-Sanabria *et al.*, 2007).

Cuando ha sido absorbido por la planta, el fósforo se redistribuye con facilidad en la mayor parte de las plantas de un órgano a otro y se pierde en las hojas antiguas, acumulándose en hojas jóvenes, en flores y semillas en desarrollo, por lo cual, los síntomas de deficiencia se presentan primero en hojas maduras (Salisbury & Ross, 1994). En la planta de papa, el fósforo promueve el crecimiento de las raíces y la rápida formación de tubérculos, por lo que es un elemento crítico en el periodo inicial de desarrollo de la planta y en la tuberización (Pumisacho & Sherwood, 2002). La deficiencia de P en la planta de papa retarda el crecimiento apical, dando lugar a plantas pequeñas y rígidas. También reduce la formación de almidón en los tubérculos que se manifiesta con manchas necróticas distribuidas en el tubérculo (Pumisacho & Sherwood, 2002).

Solanum phureja Juz et Buk (Hawkes, 1990) conocida como “papa criolla”, representa aproximadamente entre el 7% y el 10% de la papa producida anualmente en Colombia y ocupa alrededor de 12.000 Ha en cada semestre del año (Ardila, 2009). Se cultiva principalmente en los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Antioquia y Nariño. La siembra de papa criolla se desarrolla a pequeña escala por los altos riesgos que genera, de una parte, la susceptibilidad del cultivo a las heladas y a los problemas fitosanitarios, y de otra la alta probabilidad de un producto percedero durante la poscosecha. Como consecuencia, existe una marcada estacionalidad de la oferta y de los precios (Ardila, 2009). En los últimos años la producción de Cundinamarca se ha destinado a la exportación, hacia países como Ecuador, Japón y Estados Unidos (Proexport, 2009a).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la interacción sinérgica hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) - *Pseudomonas fluorescens* y su relación con la nutrición vegetal fosforada.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Evaluar la interacción microbiana *P. fluorescens* y *G. intraradices* en un sistema *in vitro*.

2.2.2 Evaluar la interacción microbiana *P. fluorescens* y *G. intraradices* en el sistema suelo-planta (*Solanum phureja*).

2.2.3. Evaluar la efectividad de la sinergia microbiana *P. fluorescens* y *G. intraradices* en relación a la translocación de fosfatos hacia la planta.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. INÓCULOS MICROBIANOS

3.1.1. *Glomus intraradices*

Se trabajó con la cepa *Glomus intraradices* Smith & Schenck (DAOM 197198 Biosystematic Research Center, Ottawa, Canadá), conservada en cultivos axénicos de dos compartimentos en asociación con raíces de zanahoria (*Daucus carota*) transformadas con *Agrobacterium rhizogenes*. Este material fue suministrado por el Profesor PhD. Ian Sanders, Universidad de Laussane, Suiza.

3.1.2. *Pseudomonas fluorescens*

Cepas de *Pseudomonas fluorescens* aisladas de rizósfera de *Solanum phureja* e identificadas por el sistema API 20 NE (Uribe *et al.*, 1999), fueron analizadas en el laboratorio de Microbiología Agrícola del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia para determinar su capacidad de solubilización de fosfato tricálcico y promoción de crecimiento (Lara, 2007). Según estos estudios, las cepas escogidas fueron: Psfl028, Psfl029, Psfl036, Psfl063, Psfl074, Psfl080, Psfl092, Psfl102, Psfl104, Psfl108.

Las cepas a trabajar se seleccionaron por presión del antibiótico rifampicina a una concentración de 150 µg/ml. Luego de esta selección se comprobó que todavía mantenían su capacidad solubilizadora de fosfato tricálcico, por formación de halo en el medio sólido NBRIP (Nautiyal, 1999). Fueron criopreservadas en medio Gherna a -20°C (Anexo 1)(Gherna, 1994; Parra-Huertas *et al.*, 2006; Parra Huertas *et al.*, 2006).

Después de la selección por presión del antibiótico rifampicina en la concentración 150 µg/ml, se comprobó que las cepas conservaban su capacidad solubilizadora, por formación de halo en el medio NBRIP-FT (Nautiyal, 1999) suplementado con Fosfato Tricálcico 0,5% (Figura 3). Esta metodología fue utilizada por Lara, 2007 para el screening inicial de cepas de *Pseudomonas fluorescens* solubilizadoras de Fosfato Tricálcico.



Figura 3. Formación de halo de solubilización por cepas de *Pseudomonas fluorescens* mutantes rifampicina 150 µg/ml en medio NBRIP-FT, después de 15 días de incubación 25°C.

3.2. ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO *in vitro*.

Se realizó siguiendo la metodología descrita por St. Arnaud y colaboradores (St-Arnaud *et al.*, 1995). Se dispone de cajas de petri plásticas estériles 90*15 mm de diámetro, con dos compartimentos (Figura 4).

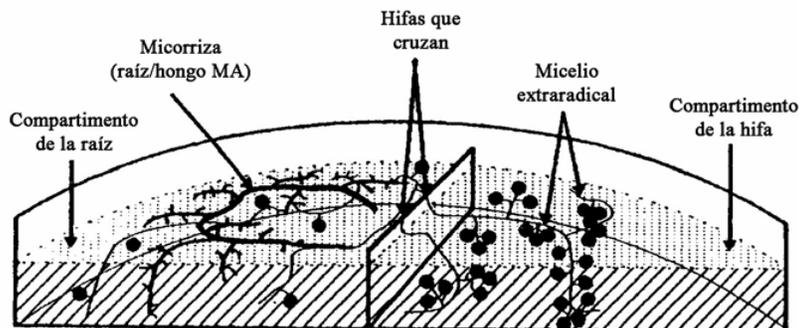


Figura 4. Esquema de las placas con dos compartimentos, que permite el cultivo *in vitro* de los hongos formadores de micorrizas arbusculares. Tomado de (Bago *et al.*, 1996).

En el compartimento de la raíz (CR), se colocaron aprox. 12 ml de medio mínimo MM (Becard & Fortín, 1988) con 38 mM de PO_4 . Allí se sembraron las raíces jóvenes de zanahoria transformadas de longitud 5 cm que ya habían establecido la simbiosis con el hongo *G. intraradices*, provenientes de cultivos previos. Adicionalmente, se colocó inóculo fúngico sobre la raíz, consistente en un cubo de $0,5\text{ cm}^3$ que contenía al menos 50 esporas del HFMA. En el compartimento de la hifa (CH) se colocaron 8 ml de MM sin fosfato y sin sacarosa, que se gelificó de forma inclinada del centro hacia afuera. Se incubaron a 25°C en oscuridad durante 8 semanas, tiempo en el cual el micelio extraradical ha pasado la barrera divisoria y ha iniciado su extensión (Figura 4).

Luego se adicionaron 12 ml de MM ($30\text{-}40\text{ }^\circ\text{C}$) al compartimento de la hifa, con phytigel al 1%. Este medio no tenía fuente de carbono ni fosfato soluble (Figura 5). Estos 12 ml de MM podían o no contener fosfato tricálcico (FT) al 0,5 %. Para lo cual se designó así (Figura 6):

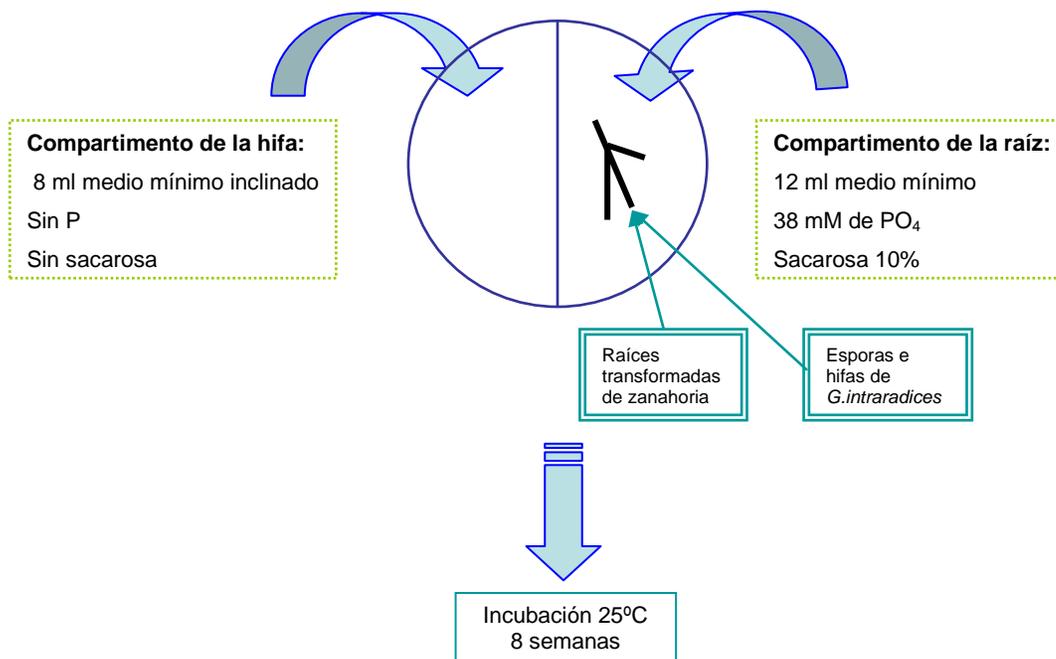


Figura 5. Diseño metodológico del sistema *in vitro*. Diferencia en los componentes del medio de cultivo e inoculación de raíces transformadas.

Experimento I. Sin Fosfato Tricálcico. Evaluar la interacción *P. fluorescens* - *Glomus intraradices* y su influencia en el crecimiento microbiano: Longitud del micelio extraradical, el número de BAS y esporas por cm², área de crecimiento bacteriano en el compartimento de la hifa.

Experimento II. Con Fosfato Tricálcico. Para evaluar la translocación de P solubilizado por las bacterias a través de la hifa extraradical hacia la raíz.

Los tratamientos (10 cepas de *P. fluorescens*) fueron colocados en las placas de petri el mismo día en el que se agregaron los 12 ml de MM en el CH. Se prepararon suspensiones bacterianas con una DO 0,200 +/-0.05 lo cual corresponde 1×10^9 ufc/ml aproximadamente (Lara, 2007). Inmediatamente se tomaron 100 µl de la suspensión que fueron colocados en el compartimento de la hifa en 4 puntos de 25 µl cada uno, como se muestra en la figura 7. Para el control se utilizó solución salina estéril (Anexo 1).

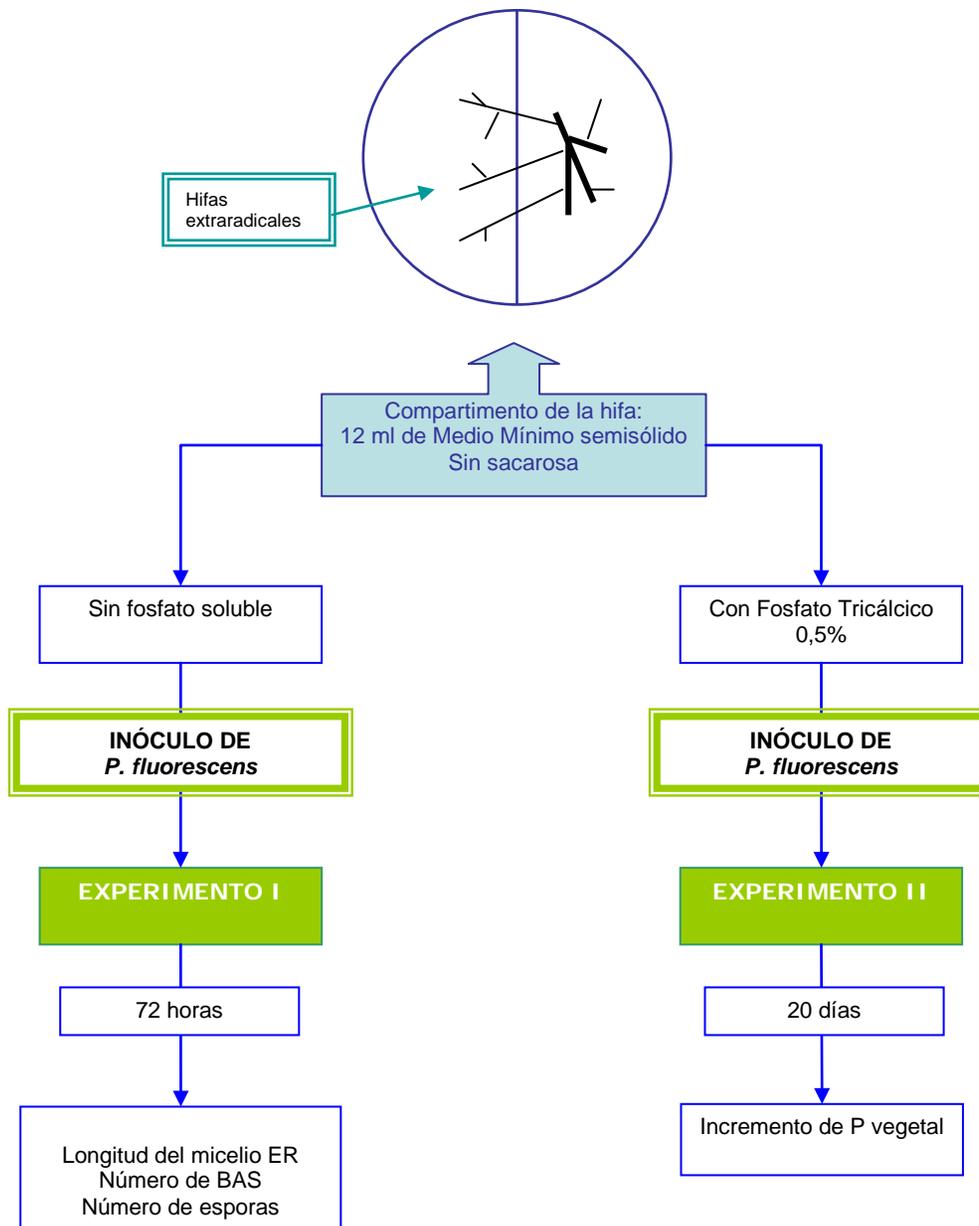


Figura 6. Diseño metodológico del sistema *in vitro*. Diferencia en los componentes del medio de cultivo en el compartimento de la hifa y el establecimiento de los experimentos I y II.

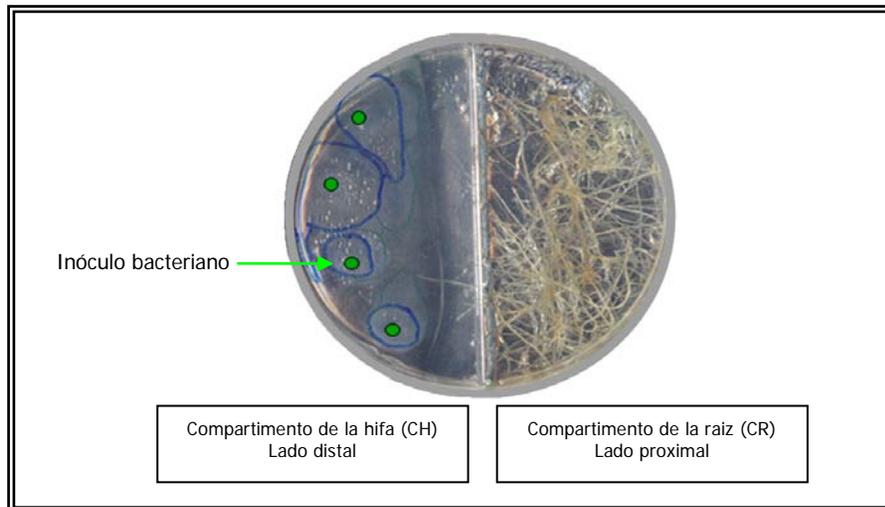


Figura 7. Cultivo *in vitro* de raíces micorrizadas. Ubicación del inóculo bacteriano en cuatro puntos (a una distancia de 0,5 cm del borde y 2 cm entre cada punto aproximadamente). Se delimitan halos de crecimiento bacteriano en el CH después de 72 horas de incubación.

3.2.1. Diseño experimental.

Para cada experimento se realizó un diseño completamente aleatorizado con seis replicas por tratamiento. Los 12 tratamientos corresponden a las diez cepas bacterianas en estudio, control sin bacteria y sin FT, control sin bacteria con FT.

El efecto de los tratamientos sobre cada una de las variables analizadas en este estudio, fue sometido a un análisis de varianza (ANOVA). Los valores seguidos de letras diferentes son estadísticamente distintos según el test de Duncan_{0,05}. Para la realización de estos análisis se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS.

3.2.2. Área de crecimiento microbiano

A las 72 horas posinoculación se realizaron marcas definidas que permitían delimitar el crecimiento bacteriano en términos de un halo de crecimiento (Ver figura 7). Se tomaron imágenes que fueron analizadas en el programa ImageJ.

3.2.3. Cuantificación de la longitud de micelio MA extraradical.

La longitud del micelio se calculó utilizando el método de intersección lineal (Tennant, 1975). Sobre un número de puntos seleccionado al azar en el CH de la placa de petri se contaron todas las hifas que cruzaban la línea del ocular del microscopio óptico en aumento 10x, cuya longitud era de 1.21 mm. Se evaluaron 25 puntos por cada placa.

Longitud= $11/14 \times N \times$ Unidad de la cuadrícula.

N = número de intersecciones por cuadrícula.

Unidad de cuadrícula= longitud de un lado de la cuadrícula.

3.2.4. Cuantificación de BAS y esporas en el compartimento de la hifa.

El número total de BAS y esporas (referidas a un cm^2) se contabilizaron en el microscopio óptico en aumento 10x. Sobre un número de puntos seleccionados al azar en el CH de la placa de petri se contaron todas las esporas y BAS presentes en un área de un rectángulo del ocular que correspondía a $1,06 \text{ mm}^2$.

3.2.5. Determinación de la concentración de fosfatos en la raíz.

Se utilizó la técnica colorimétrica azul de molibdato (Murphy & Riley, 1962), basada en la reacción del ión fosfato con ácido molibdico, formando ácido fosfomolibdico que reacciona con ácido ascórbico en medio alcalino y como resultado se obtiene una mezcla de óxidos de molibdeno de color azul (Anexo 2).

La curva de calibración se elaboró con soluciones de concentración conocidas de fósforo soluble desde 0 hasta 35 mg P/ml; estuvo representada por la siguiente ecuación $y=0,4771x$ con un R^2 de 0,9991. (Anexo 2).

Para hallar la concentración de PO_4 en las raíces transformadas de zanahoria, fueron extraídas en su totalidad, lavadas con agua destilada desionizada para eliminar el exceso de medio y secadas con toallas de papel absorbentes. Posteriormente fueron colocadas en horno a 65°C durante 48 horas envueltas en papel. Luego fueron pesadas y trituradas con nitrógeno líquido con el objetivo de romper todas las estructuras celulares. El producto macerado se guardó, en su totalidad, en tubos plásticos de microcentrifuga de 2 ml. El material fue resuspendido en 1 ml de agua destilada desionizada, y sometido

a vortex por 1 min a 2500 rpm (revoluciones por minuto). Se centrifugó a 8000 rpm durante 10 min, con el objeto de tomar 500 μ L del sobrenadante para realizar la medición de PO_4^- .

3.2.6. Estandarización de la medición de P en raíces transformadas

Las raíces colonizadas con *G.intraradices* crecieron en el medio de cultivo mínimo (Anexo 1) con diferentes concentraciones de fósforo soluble KH_2PO_4 . En el medio mínimo se utilizó KH_2PO_4 en una concentración de 35 mMP (4,8 mg de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{L}$), que se denominó concentración normal. A partir de ésta se establecieron diferentes niveles: cero, 1/8, 1/2, doble y triple. Se sembraron raíces colonizadas de 3-5 cm de longitud y se dejaron crecer durante 2 meses, tiempo después del cual se extrajeron del medio, fueron lavadas con agua destilada desionizada y secadas en horno 60°C por 48 horas. Luego se analizaron según la técnica azul de molibdato descrita anteriormente (Anexo 2). Este experimento se planeó según un diseño completamente aleatorizado con 6 replicas por tratamiento. Se realizó análisis de varianza y prueba de Duncan con un nivel de confianza del 95%, utilizando el programa estadístico Statgrafics.

3.3. ENSAYO EN MACETAS

3.3.1. Condiciones del ensayo

Material vegetal: Se utilizaron tubérculos semilla certificada variedad criolla Colombia.. Las semillas fueron lavadas con agua y su superficie fue esterilizada con una solución de alcohol a los 95% por 1 minuto, e hipoclorito de sodio al 1% durante 1 minuto de forma consecutiva, finalmente lavadas con agua destilada estéril, para retirar residuos que puedan dañar los brotes.

Sustrato: Suelo de jardín enriquecido con roca fosfórica pulverizada FOSFORITA 30P (producto comercial. Anexo 5) en una relación 4:1. Ver anexo 4 para el análisis físico-químico del suelo.

Preparación del inóculo microbiano:

- *Glomus intraradices*: Se utilizó 1 ml por planta de una solución preparada de Glomygel® (MYCOVITRO S.L; url: <http://www.mycovitro.com>). Este inóculo contiene 2000 propágulos por ml de producto concentrado. Los propágulos pueden ser esporas, hifas y raíces colonizadas.

- *Pseudomonas fluorescens*: Para activar el inóculo conservado a -20°C en medio Gherna, se tomaron 20 µL de la suspensión bacteriana y se colocaron en agar LB suplementado con rifampicina, se dispersaron con asa de Drigalsky. Las cajas de agar se conservaron a 25°C por 48 horas. Luego la biomasa microbiana se suspendió en solución salina estéril hasta llegar a una densidad óptica 0,2 que corresponde a 1×10^9 ufc/ml aprox. Las semillas fueron sumergidas en esta suspensión durante 15 minutos con agitación cada 3 minutos.

Ubicación: Las macetas permanecieron en el cuarto de crecimiento de papa, ubicado en el Instituto de Genética en la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, bajo condiciones controladas de temperatura y humedad (16°C, 60%), en fotoperiodo 16H/luz. Se mantuvieron allí con riego dos veces por semana, durante 80 días.

Cosecha: Después de 80 días desde el momento de la siembra, antes de floración, se cosecharon las plantas para realizar diversos análisis. Se muestrearon los peciolo para el análisis foliar de P, raíces para evaluar la intensidad de colonización micorrizica y suelo rizosférico para la cuantificación bacteriana. Se separó la parte aérea de las raíces, sacudidas para eliminar partículas de suelo, se envolvieron por separado en papel y fueron almacenadas en horno de secado a 60°C durante 48 horas para cuantificar peso seco.

3.3.2. Determinación de parámetros simbióticos

a. Tinción de raíces micorrizadas. Fueron seleccionados fragmentos de raíz de cada uno de los sistemas radicales y se cortaron raíces de 1 cm de longitud que fueron tratadas con el proceso de clarificación y tinción azul de tripan (Phillips & Hayman, 1970). El colorante azul de tripan tiñe las estructuras que contienen quitina, principal componente de las paredes celulares de algunos hongos, entre ellos los formadores de micorrizas arbusculares. Así se observan los componentes del hongo en el interior de la raíz sin que esta se coloree. Las raíces fueron sumergidas en una solución de KOH al 10% (10 min., 80°C) para digerir de forma parcial las cubiertas celulares. Luego se lavaron tres veces con agua destilada, se aplica una solución de HCl 0.1 N (5 min, temperatura ambiente) que actúa como neutralizadora y mordiente. Después de eliminar el ácido se agregó una solución de azul de tripan (0.05% en ácido láctico) y se mantuvieron sumergidas toda la noche. Fueron conservadas sumergidas en una solución de ácido láctico hasta su observación.

b. *Estimación de la colonización micorrízica.* El método de Trouvelot *et al.*, (1986) valora las distintas estructuras de la biomasa fúngica presente en la raíz de la planta. Se colocaron en un portaobjetos 30 fragmentos de raíz de 1 cm elegidos al azar. A cada fragmento se le asignaron dos valores; el primer valor, entre un rango del 0 al 5, se refiere al nivel de colonización micorrízica (Figura 8) y el segundo valor que puede estar comprendido entre A0 y A3 se refiere a la riqueza de arbusculos formados en el fragmento micorrizado (Figura 9)(Trouvelot *et al.*, 1986).

Nivel de colonización: Hay 6 niveles (del 0 al 5) según el grado de infección del hongo (Figura 8).

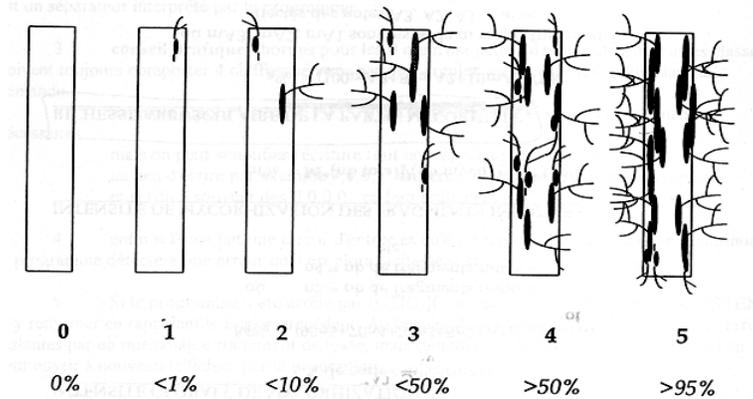


Figura 8. Niveles de colonización según método de Trouvelot *et al.*, (1986). Tomado de Medina, 2006.

Riqueza de arbusculos: Hay 4 niveles (A0 al A3) según la riqueza de arbusculos en el fragmento de raíz.

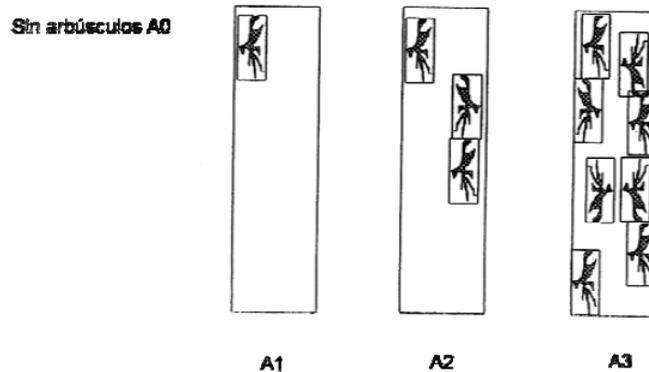


Figura 9. Niveles de riqueza de arbusculos según método de Trouvelot *et al.*, (1986). Tomado de Medina, 2006.

Los datos obtenidos, fueron colocados en el programa informático MycoCalc para obtener los siguientes parámetros (<http://www2.dijon.inra.fr/mychintec/MycoCalc-prg/download.html>):

Parámetro	Interpretación y fórmula
%F	Frecuencia de micorrización en el sistema radicular. Número de fragmentos micorrizados/(total de raíces contadas)*100
%M	Intensidad de la colonización en el sistema radicular. (95n ₅ +70n ₄ +30n ₃ +5n ₂ +n ₁)/total de raíces contadas Donde: n ₅ = número de fragmentos clasificados como 5; n ₄ = número de fragmentos clasificados como 4; n ₃ = número de fragmentos clasificados como 3, etc.)
%m	Intensidad de la colonización micorrízica relativa a los fragmentos de raíces contados. M%*(Total de raíces contadas)/(Total de raíces micorrizadas)
%a	Abundancia de arbusculos en los fragmentos de raíces colonizados (100m _{A3} +50m _{A2} +10m _{A1})/100 Donde m _{A3} :((95n ₅ A ₃ +70n ₄ A ₃ +30n ₃ A ₃ +5n ₂ A ₃ +n ₁ A ₃)/total de raíces micorrizadas)*100/m De igual forma para m _{A2} y m _{A1} .
%A	A*(M/100)

Tabla 1. Parámetros de colonización micorrízica, según el método de Trouvelot *et al.*, (1986). (Manual De Micorrizas, 2001).

3.3.3. Determinación de la colonización bacteriana

El recuento de ufc de *Pseudomonas fluorescens* rifampicina resistentes, se realizó a dos semillas inoculadas por tratamiento y al suelo rizosférico de tres plantas escogidas al azar entre las seis plantas sembradas después de 80 días de ser cultivadas.

La semilla una vez inoculada se sumerge en 10 ml de solución salina estéril, se colocó en vortex por 30 segundos y de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas para hallar la concentración bacteriana. Por otro lado, las plantas fueron cosechadas y se agitó la raíz durante un minuto para desprender el suelo no rizosférico. Se recolectó un gramo de suelo rizosférico (suelo adherido a la raíz), fue transferido a 9 ml de solución salina 0,85% estéril y agitado durante 2 min en vortex, tiempo en el cual se realizaron diluciones seriadas en condiciones de esterilidad. Se evaluaron dos semillas y tres réplicas para suelo rizosférico por tratamiento.

Se utilizó medio de cultivo LB suplementado con rifampicina 150 µg/ml para el conteo de ufc de bacterias rifampicina resistentes (Anexo 1).

3.3.4. Determinación de $PO_4^{=}$ en peciolas.

Se utilizó la técnica colorimétrica azul de molibdato (Murphy & Riley, 1962) (Anexo 2). Se escogieron los peciolas número 3 y 4 según metodología sugerida por el profesor Carlos Ñustez de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá (Comunicación personal) (Ñuztez, 2008). Se lavaron para eliminar restos de tierra y se guardaron en bolsas de papel. Se secaron a 60°C por 48 horas. Se midió el peso seco y fueron digeridas con nitrógeno líquido. El material triturado se recolectó en un tubo de ensayo, se resuspendió en 2 ml de agua destilada desionizada. Se realizó vortex durante 1 min a 2500 rpm. Se centrifugó a 8000 rpm durante 10 min. Se separaron 100 µL del sobrenadante y se diluyeron en agua destilada desionizada para un volumen final de 500 µL. Esta solución se utilizó en la medición de PO_4 .

3.3.5. Diseño experimental

Se realizó un diseño completamente aleatorizado con seis replicas por tratamiento. Para un total de 12 tratamientos: 10 cepas bacterianas con micorriza, solo micorriza y el control (ningún inóculo microbiano).

Para cada experimento se realizó un diseño completamente aleatorizado con seis replicas por tratamiento. Los 12 tratamientos corresponden a las diez cepas bacterianas en estudio, control sin bacteria y sin FT, control sin bacteria con FT.

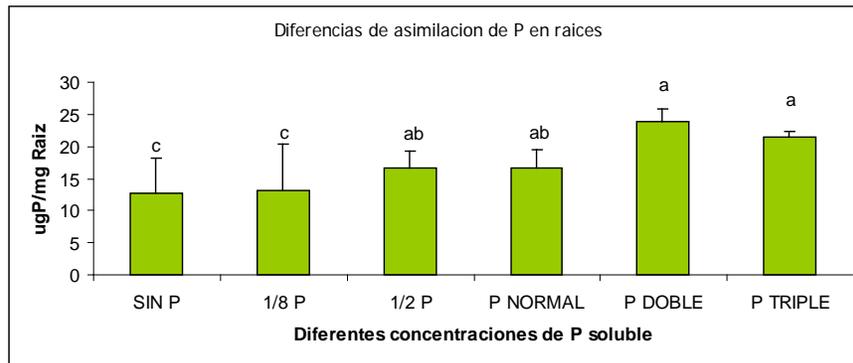
El efecto de los tratamientos sobre cada una de las variables analizadas en este estudio fue sometido a un análisis de varianza (ANOVA). Los valores seguidos de letras diferentes son estadísticamente distintos según el test de Duncan_{0,05}. Para la realización de estos análisis se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS.

4. RESULTADOS

4.1. CULTIVO *in vitro*

4.1.1. Estandarización de la medición de P en raíces transformadas.

Teniendo en cuenta el objetivo principal del estudio, era fundamental demostrar que la técnica utilizada para medir la concentración de fosfatos en el tejido vegetal era sensible, además que el sistema lograba mostrar diferencias respecto a la asimilación de P a través de la hifa. Se estableció un experimento para determinar cuál concentración de fósforo en el medio, permitía observar diferencias significativas frente al fosfato asimilado por las raíces.



Gráfica 1. Diferencias en la asimilación de P. Barras con la misma letra no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$).

Se detectaron diferencias en la absorción de P soluble según la concentración disponible en el medio. Un comportamiento dosis-respuesta hasta la dosis P-doble, donde se observa saturación de la respuesta (Gráfica 1).

Según estos resultados, se decidió que para los ensayos realizados en el sistema bicompartimentalizado, la concentración máxima en el compartimento de las raíces debía ser 1/8 P (4,3 mMP), y que se deberían observar diferencias si el aporte de la simbiosis sinérgica tripartita es de al menos el doble de P.

4.1.2. Experimento I. Sin fosfato Tricálcico. Evaluar la interacción *Pseudomonas fluorescens-Glomus intraradices* y su influencia en el crecimiento microbiano.

a. Crecimiento de las cepas bacterianas en el compartimento de la hifa

Se observó que todas las cepas bacterianas lograron crecer de forma homogénea, cubriendo un área similar en el compartimento de la hifa (Tabla 2). No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en un nivel de confianza del 95%. (Valor P: $0,618 \geq 0,05$) (Anexo 8).

Cepa IBUN Psfl	Área en cm ² /CH	Desviación estándar
28	7,707	4,737 - 10,67
29	6,112	4,646 - 7,578
36	8,012	5,238 - 10,78
63	8,253	7,071 - 9,435
74	7,989	6,267 - 9,308
80	7,277	7,146 - 8,334
95	7,961	6,707 - 9,151
102	7,740	6,362 - 11,64
104	7,929	6,707 - 9,151
108	9,002	6,362 - 11,64

Tabla 2. Área de crecimiento de las cepas *P. fluorescens* en el compartimento de la hifa (CH) en cada caja de petri, 72 horas después de la inoculación.

Por otro lado, en algunas réplicas se observó crecimiento bacteriano sobre la raíz transformada en el compartimento proximal, posiblemente llegaron utilizando a la hifa como superficie de transporte (10 y 11). Se identificaron zonas no continuas de la raíz con un halo mucoide blanquecino. Se tomaron éstas regiones (1 cm² incluyendo raíz y medio de cultivo), se realizaron diluciones seriadas y fueron sembradas en agar LB suplementado con rifampicina (150 µg/ml). Crecieron bacterias a una concentración 1×10^9 ufc/ml.

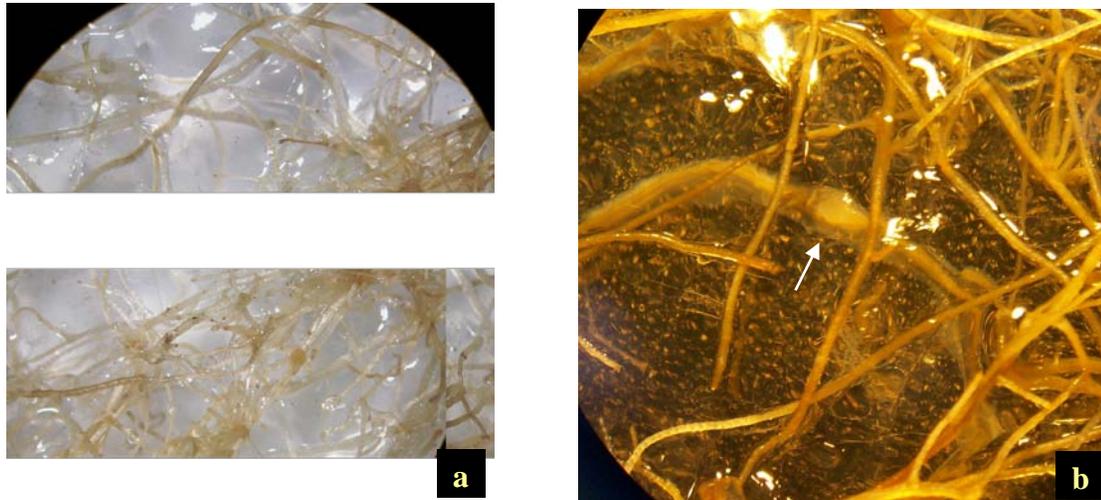


Figura 10. Raíces transformadas rodeadas por bacterias en el compartimento de la raíz. (a) Raíces no colonizadas (b) Raíces colonizadas, se observa un halo blanquecino alrededor (flecha blanca).



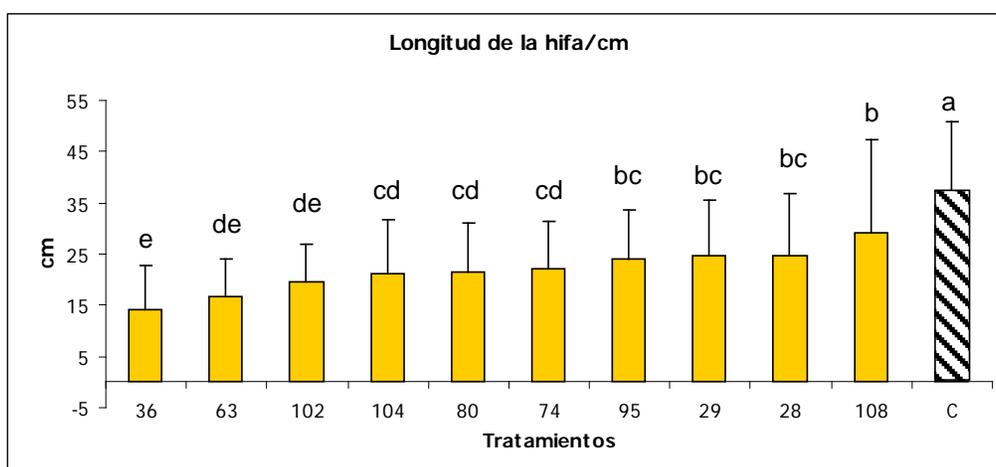
Figura 11. Raíces transformadas rodeadas por bacterias en el compartimento de la hifa (a, b y c). Algunas raíces que atravesaron al compartimento de la hifa (flecha blanca) fueron colonizadas por bacterias que llegaron allí posiblemente utilizando la hifa como vehículo (flecha negra).

b. Crecimiento del micelio extraradical en el compartimento de la hifa.

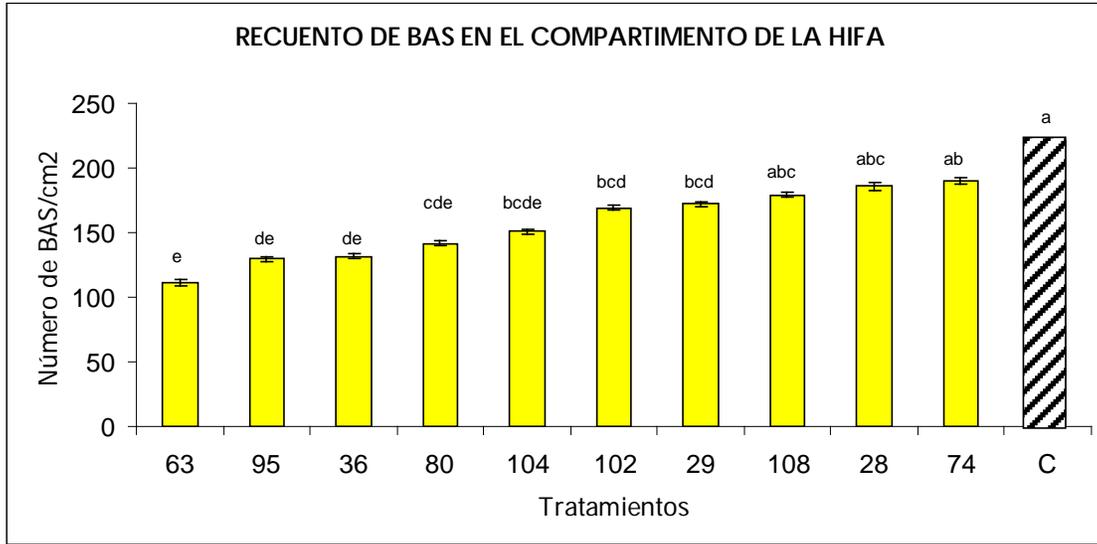
Se observó que el micelio extraradical del hongo en estudio, logró establecerse en el MM sin PO_4^- y permaneció en crecimiento después de la adición de Medio Mínimo enriquecido con Fosfato Tricálcico. Sin embargo la medición de la longitud del micelio en este último no pudo realizarse debido a la opacidad del medio producto de los precipitados que dificultaban la visualización microscópica de la hifa.

Inicialmente se intentó establecer un patrón de crecimiento del micelio extraradical, sin embargo después de iniciar el tratamiento, el micelio crecía rápidamente en todas las réplicas, lo cual no permitió hacer el seguimiento apropiado.

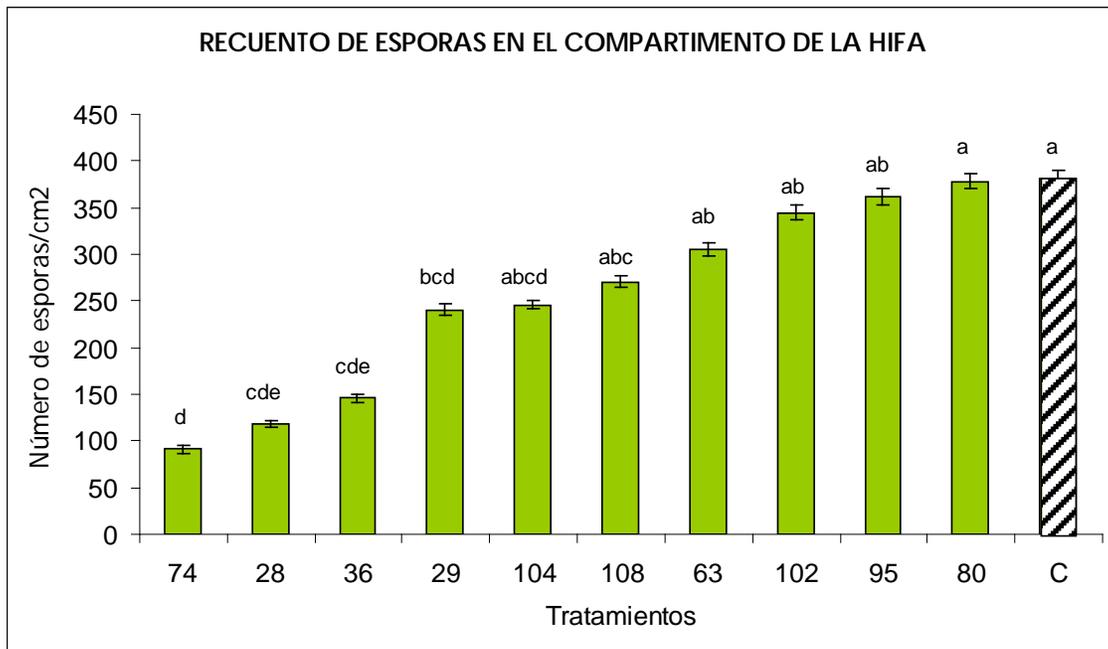
La longitud de la hifa fue menor en todos los tratamientos comparados con el control (Cultivo *in vitro* de *G. intraradices* sin inóculo bacteriano *P. fluorescens*), donde la cepa IBUN Psfl 36 fue la que limitó el crecimiento de la hifa en mas de un 50%, mientras que la cepa IBUN Psfl108 fue la que menor efecto tuvo sobre el micelio extraradical del hongo.



Gráfica 2. Longitud de la hifa extraradical en el compartimento de la hifa después de 20 días del inicio del tratamiento. Las columnas con líneas diagonales representan el control (Cultivo *in vitro* de *G. intraradices* sin inóculo bacteriano *P. fluorescens*). Barras con la misma letra no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$).



Gráfica 3. Recuento de BAS/cm² en el compartimento de la hifa 20 días después del inicio del tratamiento. La columna con líneas diagonales representa el control (Cultivo *in vitro* de *G. intraradices* sin inóculo bacteriano *P. fluorescens*). Barras con la misma letra no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$).



Gráfica 4. Recuento de esporas/cm² en el compartimento de la hifa 20 días después del inicio del tratamiento. La columna con líneas diagonales representa el control (Cultivo *in vitro* de *G. intraradices* sin inóculo bacteriano *P. fluorescens*). Barras con la misma letra no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$).

Cuando se observa el recuento de BAS y esporas, se encuentra que al igual que en la longitud de la hifa, todas las cepas mostraron una reducción en el número de estructuras contadas comparadas con el control, a excepción del tratamiento 80 que presenta igual número de esporas que el control.

El efecto de las cepas fue diferencial sobre el crecimiento del micelio extraradical de *G. intraradices*. Existe un patrón generalizado donde el número de esporas es mayor que el número de BAS (relación esporas/BAS mayor a 1) a excepción del tratamiento 28 y 74 donde ocurrió lo contrario (Anexo 7).

Cabe resaltar que los primeros tres tratamientos con mayor longitud de hifa (tratamientos 28, 29 y 108) (Gráfica 2) se encuentran entre los primeros con mayor número de BAS (Gráfica 3). El tratamiento 36 se destacó por presentar bajos valores en las tres mediciones.

La arquitectura del micelio se vió afectada por la presencia de la bacteria *P. fluorescens* en el compartimento de la hifa (Figura 9). Las hifas se observaron onduladas y perdieron su dominancia apical.

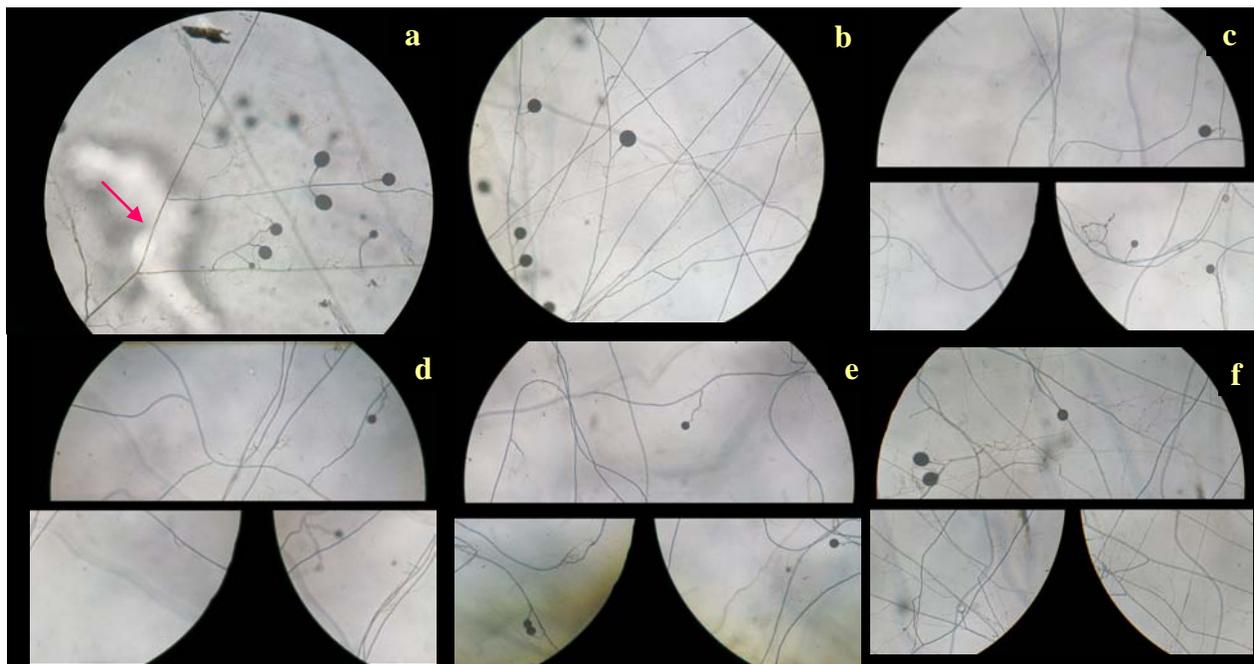


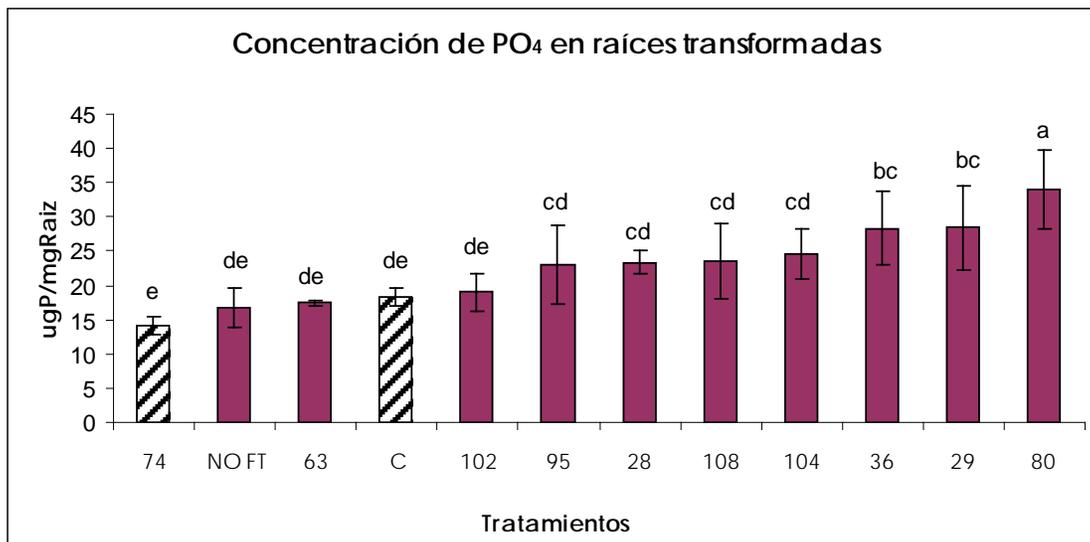
Figura 12. Hifas extraradicales a los 20 días postratamiento. Control (a y b): hifas de dominancia apical, las hifas secundarias crecen en un ángulo de 45°C (Flecha roja). Tratamientos(c-f): hifas onduladas.

4.1.3. Experimento II. Con Fosfato Tricálcico. Para evaluar la translocación de P solubilizado por las bacterias a través de la hifa extraradical hacia la raíz.

a. Concentración de PO_4 en raíces transformadas

Antes de iniciar los tratamientos se confirmó que las hifas continuaron su crecimiento en el medio enriquecido con fosfato tricálcico. A las 72 horas post-tratamiento, se observó crecimiento bacteriano en la superficie del medio y cerca al punto de inóculo. No se identificó la formación de halos de solubilización alrededor de las colonias bacterianas.

La cosecha de raíces se realizó 20 días después del inicio del tratamiento. Dos cajas de cada tratamiento permanecieron sin cosechar hasta el día 60 en espera de halos de solubilización; sin embargo no se observaron. Estas raíces no se incluyeron para la medición de P.



Gráfica 5. Concentración de PO_4 en raíces transformadas. Barras con líneas longitudinales representan los controles: NO FT (Medio en el compartimento distal sin FT, sin inóculo bacteriano) y C (Medio en el compartimento distal con FT, sin inóculo bacteriano). Barras con la misma letra no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$).

Las cepas se comportaron de forma diferencial con respecto a la concentración final de P medida en las raíces transformadas, lo que se puede relacionar de forma indirecta con la capacidad de solubilización del fosfato tricálcico y con la sinergia microbiana funcional. La cepa 80 logró aportar casi el doble de la concentración de PO_4 medida en el control (sin bacteria).

Las cepas Psfl029 y Psfl036 mostraron un buen rendimiento, aumentando el doble de la concentración de PO_4^- comparado con el uso de la cepa 74, la cual mostró el peor desempeño, menor que el control e incluso menor que el tratamiento sin fosfato tricálcico y sin bacteria.

4.2. CULTIVO EN MACETAS

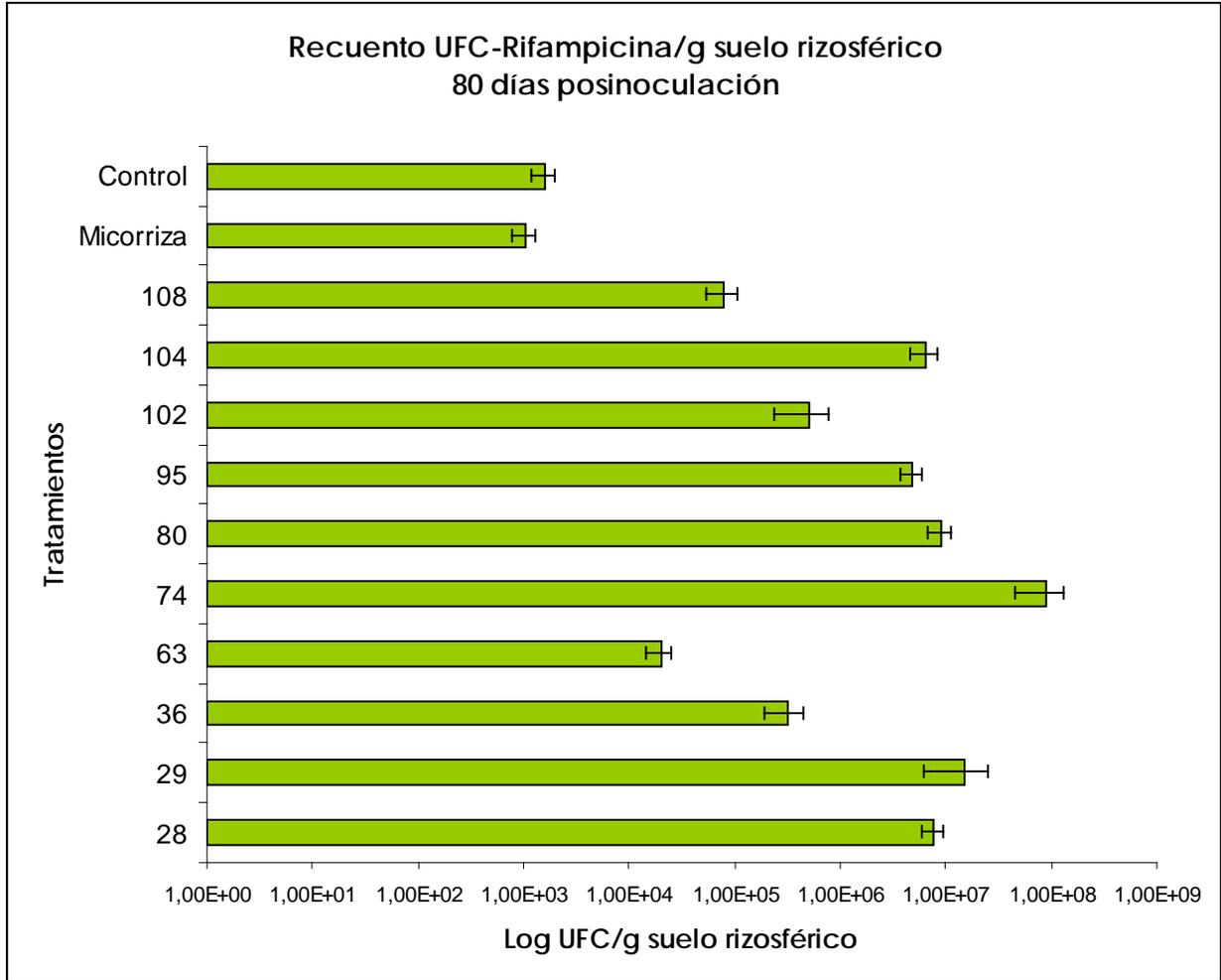
4.2.1. Recuento de ufc/gr suelo rizosférico

Después de inocular las semillas en una suspensión bacteriana de 1×10^9 ufc/ml aproximadamente, las bacterias viables rifampicina resistentes recuperadas de la superficie, estuvieron en una concentración alrededor de $1,34 \times 10^5$ y $1,97 \times 10^7$ ufc/semilla (Tabla 3).

Todas las cepas bacterianas en estudio, lograron colonizar la rizósfera de *Solanum phureja*, aunque la concentración estimada varió entre $2,0 \times 10^4$ y $2,9 \times 10^7$ (Gráfica 6). Se observaron diferencias significativas entre tratamientos (Anexo 9), donde las cepas que mejor lograron colonizar la rizósfera fueron la 28, 29, 74, 80, 95 y 104. Entre estas, la cepa PsflIBUN 074, fue la mejor colonizando la rizósfera de *Solanum phureja* en este ensayo; y la que menor fue la cepa PsflIBUN 063.

TRATAMIENTO	UFC/Semilla*	Desviación estándar
28	$7,85 \times 10^6$	$6,40 \times 10^6 - 9,30 \times 10^6$
29	$1,34 \times 10^5$	$9,19 \times 10^4 - 1,75 \times 10^5$
36	$1,21 \times 10^7$	$9,69 \times 10^6 - 1,44 \times 10^7$
63	$1,25 \times 10^7$	$9,00 \times 10^5 - 1,60 \times 10^6$
74	$7,90 \times 10^6$	$6,00 \times 10^6 - 9,80 \times 10^6$
80	$7,90 \times 10^6$	$6,00 \times 10^6 - 9,80 \times 10^6$
95	$3,50 \times 10^6$	$3,00 \times 10^6 - 4,00 \times 10^6$
102	$4,57 \times 10^6$	$3,73 \times 10^6 - 5,40 \times 10^6$
104	$1,97 \times 10^7$	$1,05 \times 10^7 - 2,88 \times 10^7$
108	$1,44 \times 10^7$	$1,07 \times 10^7 - 1,81 \times 10^7$

Tabla 3. Recuento de ufc mutantes rifampicina (150 μ g/ml) en la superficie de la semilla inoculada.

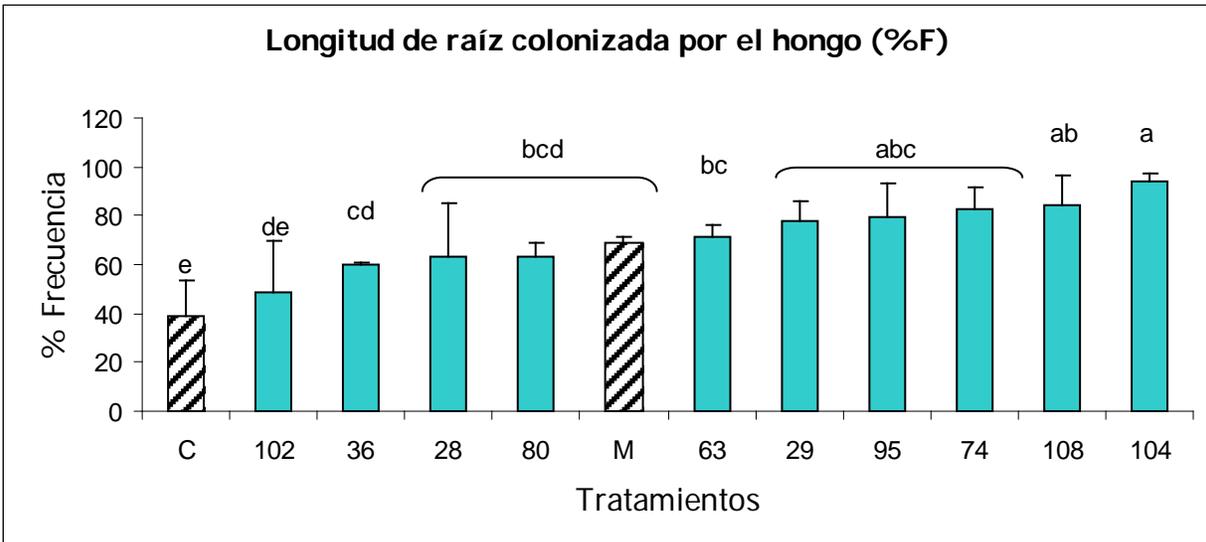


Gráfica 6. Recuento de UFC rifampicina resistentes (150 µg/ml) en suelo rizosférico 80 días post-inoculación. Control: plantas sin inocular. Micorriza: plantas inoculadas solo con *G. intraradices*, producto Glomygel®. Tratamientos: Plantas inoculadas con *G. intraradices* y cepas de *P. fluorescens*.

4.2.2. Intensidad de la colonización micorrízica

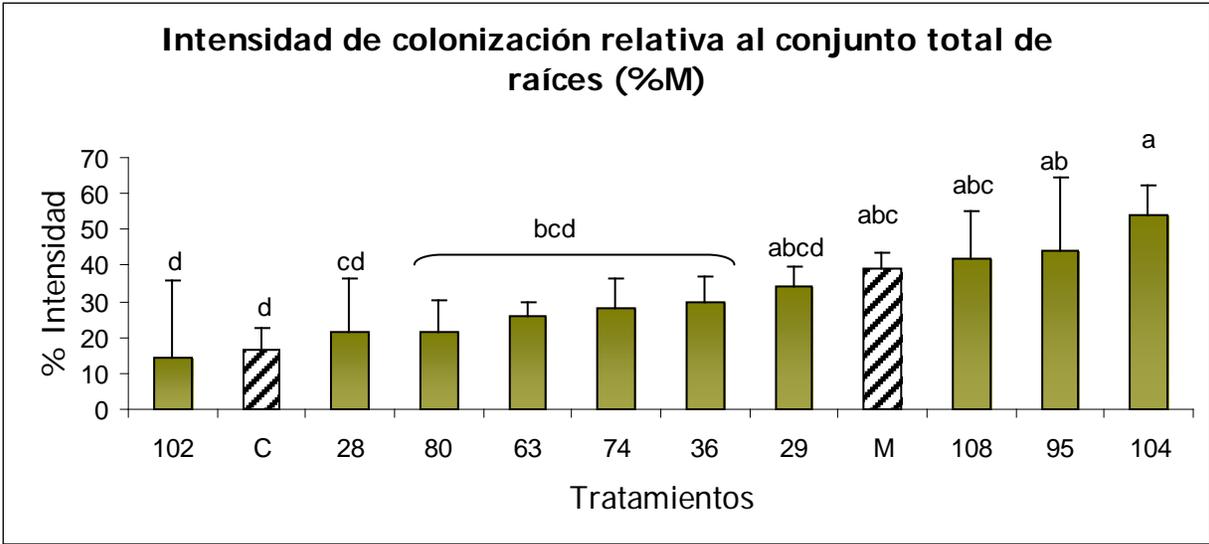
En nueve de los diez tratamientos se observó una colonización micorrízica mayor del 60% (Gráfica 7), lo cual nos permite decir que la cepa *Glomus intraradices* utilizada en este estudio posee una buena capacidad de colonización de las raíces de *S. phureja*. El control, tratamiento sin inóculo bacteriano ni fúngico, fue colonizado en un 40% por HFMA, porcentaje que está representado por las cepas de HFMA nativas como consecuencia de utilizar suelo no estéril.

La intensidad de la colonización relativa al conjunto total de raíces (%M) y la longitud de raíz colonizada por el hongo o frecuencia de colonización (%F) mostraron diferencias estadísticamente significativas, donde el tratamiento cepa IBUN Psfl104 mostró los valores más altos para ambos parámetros. Para %F (Gráfica 7) seis de las diez cepas estudiadas mostraron diferencias contra el control "Micorriza", lo cual puede significar que existe un estímulo positivo de estas cepas bacterianas sobre la frecuencia de la colonización de *Glomus intraradices*.



Gráfica 7. Frecuencia de colonización de *G. intraradices* en las raíces de *S. phureja*, hallada por el método de Trouvelot *et al.*, (1986). Las columnas con líneas diagonales representan los controles: C (plantas sin inóculo) y M (plantas con inóculo de *G. intraradices*). Barras con la misma letra no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$).

Para %M solo tres cepas: 95, 104 y 108 mostraron un efecto positivo sobre la intensidad de la colonización comparado con el tratamiento solo micorriza (M). Mientras que otras como la 28 y 102 mostraron un efecto negativo sobre este parámetro, pues el valor es casi la mitad del mejor tratamiento.

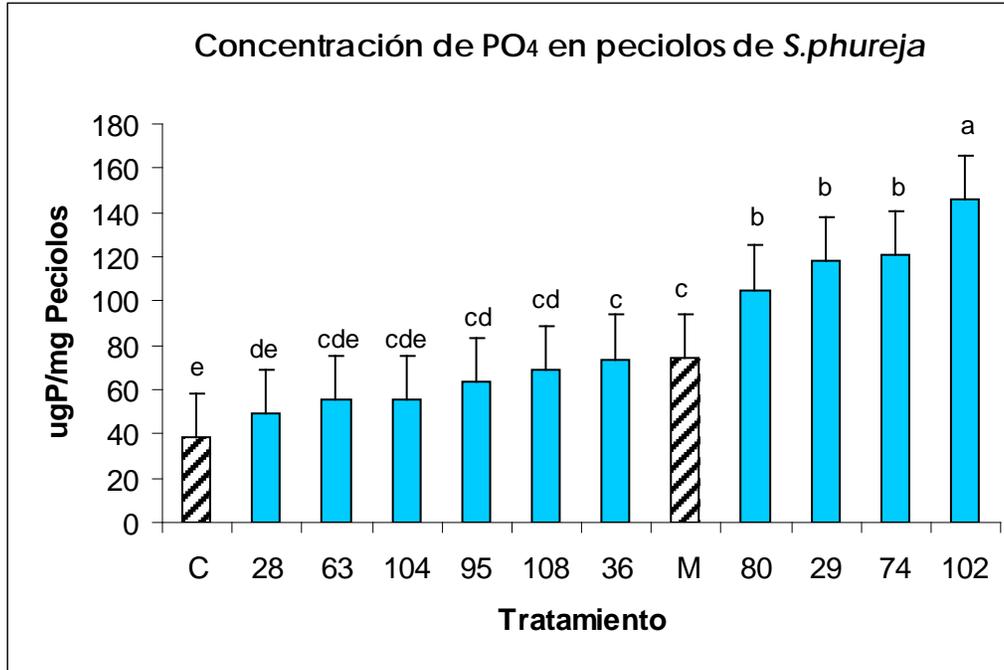


Gráfica 8. Intensidad de la colonización de *G. intraradices* en las raíces de *S. phureja*, hallada por el método de Trouvelot *et al.*, (1986). Las columnas con líneas diagonales representan los controles: C (plantas sin inóculo) y M (plantas con inóculo de *G. intraradices*). Barras con la misma letra no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$).

Para %A (Abundancia de arbuscúlos), %m (Intensidad de la colonización micorrícica relativa a los fragmentos de raíces contados), %a (Abundancia de arbuscúlos en los fragmentos de raíces colonizados) no existió diferencia significativa entre los tratamientos (Anexo 9), esto se puede interpretar diciendo que las cepas bacterianas no influyeron sobre la capacidad de formación de arbuscúlos intraradicales.

4.2.3. Concentración de PO_4 en peciolo de *Solanum phureja*.

Todos los tratamientos aumentaron la concentración de P en el tejido vegetal comparando con el control (plantas sin inóculo), sin embargo solo cuatro cepas lograron establecer una relación simbiótica tripartita con el hongo *G.intraradices* y *S.phureja*. Los tratamientos 80, 29, 74 y 102 aumentaron significativamente la concentración de P en la parte aérea de *S. phureja* comparado con el tratamiento solo micorriza.



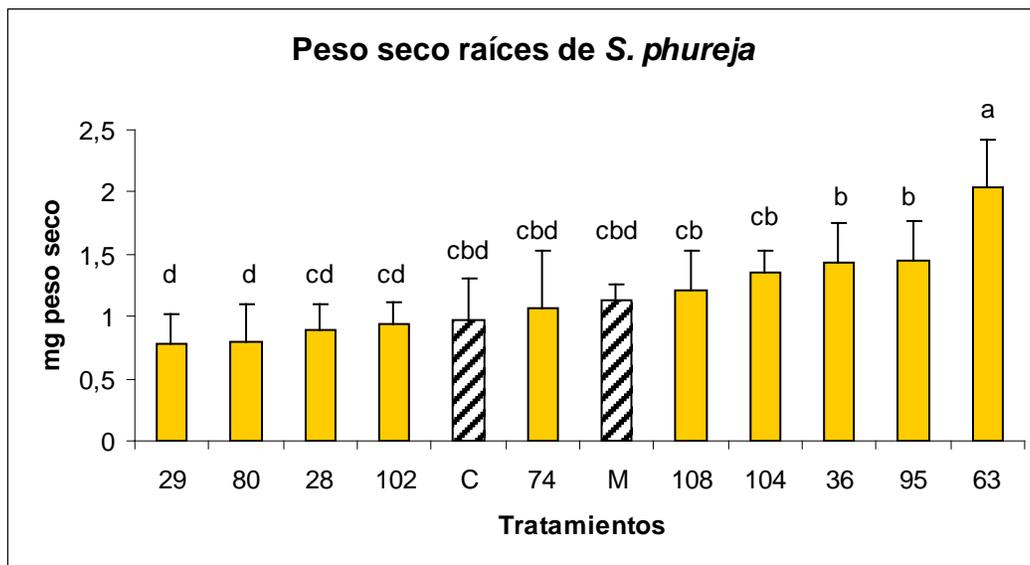
Gráfica 9. Concentración de PO₄⁻² en peciolos de *S. phureja*. (Promedio de cinco réplicas). Barras con líneas longitudinales representan los controles: C (plantas sin inóculo) y M (plantas con inóculo *G. intraradices*). Barras con la misma letra no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$).

4.2.4. Biomasa seca de parte aérea y raíces

En la tabla 4 se muestran los datos promedio de la biomasa seca de la parte aérea de *S. phureja* después de 80 días postratamiento. No se observaron diferencias significativas respecto a la biomasa seca de la parte aérea (Anexo 9). La biomasa seca de las raíces si mostró diferencias entre tratamientos (Gráfica 10).

TRATAMIENTO	PARTE AEREA*	DESVIACIÓN ESTANDAR
28	1,7	1,20 -2,20
29	1,81	1,34 -2,29
36	1,85	1,65 -2,06
63	1,52	1,43 -1,61
74	1,78	1,08 -2,49
80	1,53	1,45 -1,62
95	1,40	0,99 -1,82
102	1,79	1,40 - 2,18
104	1,46	1,27 -1,67
108	1,48	0,98 -1,98
Control	1,50	1,03 -1,31
Micorriza	1,70	1,29 -1,50

Tabla 4. Biomasa en peso seco de parte aérea de plantas *S. phureja* (*promedio de cuatro replicas). La inoculación de HFMA y *P. fluorescens* cepa 63 mostró un efecto positivo sobre el crecimiento de las raíces de *S. phureja*.



Gráfica 10. Peso seco de raíces de *S. phureja*. (Cuatro replicas por tratamiento). Barras con líneas longitudinales representan los controles: C (plantas sin inóculo) y M (plantas con inóculo *G. intraradices*). Barras con la misma letra no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$).

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

In vitro

Este estudio demuestra cómo el cultivo *in vitro* de HFMA es una herramienta apropiada para el análisis de interacciones microbianas entre microorganismos del suelo y HFMA. El estudio *in vitro* de la simbiosis micorrízico arbuscular, ha sido complejo por la naturaleza biótrófa de los hongos formadores de micorrizas arbusculares (Fortin *et al.*, 2002). Sin embargo el establecimiento del cultivo de raíces micorrizadas ha hecho posible el estudio genético, biológico y fisiológico de estos hongos (Declerck *et al.*, 2005). El cultivo de raíces micorrizadas en cajas de petri con dos compartimentos (St-Arnaud *et al.*, 1995) permite controlar la forma y la cantidad de nutrientes colocados en el medio (Bücking & Shachar-Hill, 2005), por ejemplo permite la manipulación y el uso de moléculas radioactivas para el estudio del metabolismo del carbono (Olsson *et al.*, 2006), la translocación de nitrógeno del medio a la raíz a través de la hifa (Cruz *et al.*, 2007), el flujo de fósforo en la simbiosis (Olsson *et al.*, 2002), así como la inclusión de microorganismos (Declerck *et al.*, 2005).

En esta investigación, el uso del cultivo *in vitro* de HFMA en cajas de petri con dos compartimentos, fue útil para el análisis de la interacción entre el hongo modelo *Glomus intraradices* y cepas de *Pseudomonas fluorescens* solubilizadoras de fosfatos, aisladas de suelo paperos de la región andina colombiana (Lara, 2007). Los resultados comprueban que es un método apropiado para evaluar la translocación de PO_4^{2-} a las raíces vía hifal, pues se encontraron diferencias estadísticamente significativas donde los tratamientos que mejor se comportaron (Cepas Psfl029, Psfl036 y Psfl 080), aumentaron casi dos veces la concentración de PO_4^{2-} en las raíces comparado con el control (Gráfica 5). Pocos estudios han utilizado este sistema para evaluar el incremento en la concentración de fosfatos en las raíces transformadas (Antunes *et al.*, 2007) y la solubilización de fosfato tricálcico cuando el micelio extraradical en el compartimento de la hifa está en contacto con bacterias solubilizadoras de P (Villegas & Fortin, 2001; Villegas & Fortin, 2002).

En este estudio, donde se utilizaron 100 μl del inóculo bacteriano en una concentración bacteriana de 1×10^9 ufc/ml y Fosfato Tricálcico 0,5%, no se detectaron zonas claras de solubilización de fosfato tricálcico en el compartimento distal del medio monoxénico, donde se inocularon las cepas de *P. fluorescens*. Contrario a lo encontrado por Villegas & Fortin (2002), donde halos de solubilización fueron visibles cuando el micelio extraradical de *G. intraradices* estaba en contacto con la bacteria solubilizadora de fosfato *P. aeruginosa*. Esto se puede explicar porque Villegas & Fortin (2002) utilizaron un volumen de inóculo mayor (500 μl de 1×10^8 ufc/ml) y una concentración de fosfato tricálcico menor (0,3%), además realizaron la evaluación en el doble de tiempo posinoculación, comparado con el presente estudio. Aun así

no se pone en duda la capacidad solubilizadora de las cepas utilizadas pues su comportamiento se comprobó antes de introducirlas en el sistema *in vitro* (Figura 3). Entonces, diferencias en la medición de PO_4^{-2} en las raíces transformadas es un índice indirecto del fósforo solubilizado en el compartimento distal.

Previamente, se ha demostrado que ni las raíces transformadas de zanahoria sin micorrizas, o con micorrizas, ni el micelio extraradical de *G. intraradices*, son capaces de solubilizar fósforo tricálcico, por lo tanto las bacterias solubilizadoras de fósforo inoculadas en el cultivo monoxénico, son las encargadas de liberar el P que es transportado al tejido vegetal a través de las hifas (Villegas & Fortin, 2001). Por lo tanto el aumento en la concentración de PO_4^{-2} medido en las raíces transformadas, corresponderá directamente al eficaz funcionamiento de la simbiosis HFMA-PSB. De forma complementaria, Antunes *et al.*, (2007) demostraron que las hifas extraradicales de los hongos MA no pueden alterar el pH a su alrededor, ni solubilizar P a partir de roca fosfórica, entonces la contribución de los hongos micorrízicos al crecimiento de la planta es dependiente de la exploración de un mayor volumen de suelo, a interacciones sinérgicas con PSB y a la capacidad del micelio extraradical para absorber, movilizar y translocar nutrientes, en especial fósforo, aumentando la concentración de fosfatos en la planta a la cual está asociado (Villegas & Fortin, 2002).

Esta investigación demostró, que el comportamiento de las cepas de *P. fluorescens* en relación a la solubilización de fósforo tricálcico, cambia cuando comparten nicho con las hifas extraradicales de *G. intraradices*. Factores habituales, como la competencia con otros microorganismos, pueden cambiar las características observadas *in vitro*. Aunque todas las cepas eran solubilizadoras, no se encontró correspondencia con los datos obtenidos por Lara (2007), quien evaluó la solubilización de FT en medio líquido y describió a la cepa Pfl095 como la mejor solubilizadora (114,5 mg/L) entre un grupo de 43 aislamientos (Anexo 3). En este estudio, donde se evaluó el aumento en la translocación de fósforo a partir de una fuente insoluble, ésta cepa no fue sobresaliente. Por el contrario Pfl029 y Pfl080, con concentraciones de fósforo solubilizado de 60,2 mg/L y 27,1 mg/L en medio líquido NBRIP-FT respectivamente, fueron las que aumentaron de forma significativa la concentración de PO_4^{-2} en el tejido vegetal, tanto en ensayos *in vitro* como en el ensayo en macetas. De manera sorprendente, la cepa Pfl063 con un valor alto de solubilización en medio líquido (110,28 mg/L), no se destacó por actuar de forma sinérgica con *G. intraradices*, donde la concentración de PO_4^{-2} no se diferenció de los tratamientos sin inóculo bacteriano en el ensayo *in vitro* ni en macetas (Gráficas 5 y 9).

Este estudio comprobó que existen diferencias bacterianas intra-especie en relación a la capacidad de solubilizar fósforo tricálcico y su habilidad de establecer una interacción sinérgica positiva con *G. intraradices*. Villegas & Fortin (2001) encontraron diferencias inter-especie *Pseudomonas* spp, donde *P.*

aeruginosa es más hábil en su capacidad de solubilización con respecto a *P. putida*. Se debe tener en cuenta, que existe especificidad en el efecto sinérgico. Entonces, solo combinaciones específicas hongo-bacteria pueden mejorar la absorción de P (Toro *et al.*, 1997; Villegas & Fortin, 2001).

En este estudio, las bacterias se agruparon alrededor de las hifas en estructuras similares a un biofilm (Anexo 6). Se conoce que la clase Gamaproteobacteria responde positivamente y aumenta su número en respuesta a los exudados de raíces micorrizadas en ensayos *in vitro*; en especial el género *Pseudomonas spp.*, que por su naturaleza oportunista prevalece en la rizósfera y por ser cultivable en medios *in vitro* es frecuentemente aislada del suelo rizosférico (Toljander *et al.*, 2007). *Pseudomonas fluorescens* ha sido descrita con anterioridad por su habilidad de formar biofilms y colonizar eficientemente raíces (Lugtenberg *et al.*, 2001) e hifas (Toljander *et al.*, 2006). Frey-Klett *et al.*, (2007), describe cómo la cepa *P. fluorescens* BBc6R8 se une a la superficie de las hifas de hongos ectomicorrizicos como *Laccaria bicolor*, desarrollando estructuras similares a un biofilm.

En este estudio las cepas de *P. fluorescens* lograron crecer y extenderse en el compartimento de la hifa del sistema *in vitro* y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Tabla 2). El medio semisólido utilizado en esta investigación, permitió que las bacterias pudieran desplazarse en todos los niveles de profundidad, no solo en la superficie. Aunque el medio de cultivo donde crecía el micelio extraradical no contenía fuente de fósforo ni de carbono, las bacterias permanecieron viables durante al menos 20 días posinoculación, determinado por el movimiento de bacterias alrededor de la raíz. En algunas réplicas de los tratamientos 28, 29, 80 y 102 se observó cómo las bacterias rodearon la hifa, creciendo lo suficiente para hacerse visible, hallazgo que sugiere la formación de biofilm sobre las hifas. Además, se observó como los dos microorganismos lograron compartir el mismo nicho en el compartimento de la hifa, por lo tanto no existió antagonismo entre *G. intraradices* y las cepas de *P. fluorescens* analizadas en este trabajo (Anexo 6).

También se observó la presencia de bacterias en el compartimento de la raíz (Figura 10) y fragmentos de raíz transformada inoculados con bacterias (Figura 10 y 11), que se podría explicar por la afirmación de Johansson *et al.*, (2004), "las hifas de los hongos pueden jugar un papel importante en la distribución de las poblaciones de bacterias y actuar como vectores del inóculo bacteriano". Por lo tanto las hifas pudieron ser un medio de transporte desplazándose por la superficie de la hifa o de forma endófito hasta llegar a la raíz (Leveau & Preston, 2008).

La capacidad de *P. fluorescens* para formar biofilm alrededor de las hifas, les permite tener un contacto estrecho con el hongo y por lo tanto, tener acceso a los exudados de *G. intraradices* y usarlos para suplir el déficit de nutrientes. El micelio extraradical de los HFMA y la hifósfera (zona que rodea a las

raíces)(Johansson *et al.*, 2004), se puede describir como una interfase donde se lleva a cabo la interacción con bacterias de la rizósfera y funciona como vía para el flujo de carbono desde la raíz (Toljander *et al.*, 2006). La exudación de agua y carbohidratos crea un ambiente favorable alrededor de las hifas de HFMA, que en conjunto con el mucílago de las bacterias proporciona una interfase para interacciones físicas y metabólicas (Johansson *et al.*, 2004; Toljander *et al.*, 2006). Las hifas de HFMA en simbiosis con una raíz, liberan compuestos ricos en carbono derivados de los asimilados de la planta hospedera que son fuente de nutrientes para los microorganismos (Johansson *et al.*, 2004). Por ejemplo, se ha identificado que los exudados del hongo *Glomus sp.* MUCL 43205 contienen ácidos orgánicos y azúcares de bajo peso molecular (Formiato, acetato, α -glucosa, β -glucosa), y compuestos de alto peso molecular (Oligosacáridos como Glicógeno) los cuales son probablemente metabolizados por bacterias y son utilizados para su crecimiento (Toljander *et al.*, 2007).

Las bacterias usan estrategias para obtener nutrientes del hongo en la rizósfera, comportándose como necrótrofos extracelulares, biotrófos extracelulares o endófitos (Leveau & Preston, 2008). Toljander *et al.*, (2006) describe cómo algunas cepas bacterianas difieren en su habilidad de colonización y prefieren unirse a hifas vivas y utilizar los exudados liberados cuando tienen estrategia biótropa, por otro lado utilizan a la hifa como sustrato cuando su estrategia es necrótrufa. Sin embargo, en el suelo muchas interacciones pueden involucrar uno o más de estos comportamientos. Una interacción biótropa puede progresar a una necrótrufa cuando el número de bacterias aumenta, o un biótrofo extracelular luego puede penetrar y crecer en el citoplasma de las células fúngicas o vegetales (Leveau & Preston, 2008). En este estudio, el crecimiento bacteriano en el compartimento de la hifa, influyó negativamente en el crecimiento del micelio extraradical y en el desarrollo de sus estructuras (Grafica 2 y Anexo 7). Se observaron hifas que crecieron de forma ondulada (Figura 12) y todos los tratamientos presentaron una medición de la longitud de la hifa, número de BAS/cm² y número de esporas/cm² menor que el control (compartimento distal sin inóculo bacteriano). Fenómenos similares se han descrito en estudios donde evalúan la tolerancia del micelio extraradical a residuos vegetales o metales pesados (Gonzalez- Guerrero, 2005; Medina Peñafiel, 2006), como una respuesta del micelio a condiciones ambientales adversas. En esta investigación, el detrimento de las hifas extraradicales puede explicarse como una respuesta al estrés ejercido por la presencia de las bacterias y la excreción de compuestos bacterianos como resultado de su metabolismo. También pudo deberse a un comportamiento necrótrofo de *P. fluorescens* como respuesta al déficit de nutrientes inducido por la carencia de glucosa y fosfato en el medio adicionado al compartimento de la hifa. Sin embargo, tinciones especiales fluorescentes son requeridas para hacer la diferenciación en el comportamiento de las cepas respecto a un hifa viva o muerta, por lo tanto es un tema que requerirá futuros estudios.

La disminución de los parámetros simbióticos también se podría explicar por las siguientes hipótesis: (i) efecto negativo de algunos compuestos liberados por *P. fluorescens*, como antibióticos (Haas & Défago, 2005; Tarkka *et al.*, 2009); o enzimas como la quitinasa, que degrada la pared celular de hongos fitopatógenos (Nagarajkumar *et al.*, 2004); (ii) Exceso de carbono liberado a través de los exudados, estimulado por la presencia de la población bacteriana en la hifósfera. En este sentido, Bago y cols. sugieren que una disminución en el número de esporas en el micelio extraradical puede deberse a una disminución en el carbono disponible (Bago *et al.*, 2006). Esto es consecuente con la incapacidad del micelio de absorber azúcares del medio, su fuente de carbono son los lípidos provenientes del micelio intraradical (Smith & Read, 2008), por lo tanto, cualquier pérdida de carbono podría estar representada en la disminución en la biomasa del hongo.

Por otra parte, Bago *et al.*, (2004) demostraron cambios en el micelio extraradical en presencia de diferentes compuestos del medio. El nitrato favorece la producción de BAS, mientras que el amonio produce cambio en la arquitectura de las hifas, después de 84 días de cultivo (Bago *et al.*, 2004). En esta investigación se utilizó nitrato como fuente de Nitrógeno (Anexo 1), sin embargo las diferencias entre tratamientos, en el número de estructuras extraradicales observadas en esta investigación (Gráfica 2, 3 y 4), no pueden explicarse por la fuente nutricional, pues todos los tratamientos contenían los mismos componentes en el medio de cultivo.

Ex vitro

Los resultados de esta investigación demuestran que la coinoculación de PSB y HFMA, puede incrementar el contenido de P en los peciolo de *S.phureja* (Gráfica 9).

El inóculo comercial del HFMA utilizado en esta investigación, tiene una alta concentración de propágulos, lo cual aumenta las posibilidades de colonización y así, se puede incrementar el intercambio bidireccional de nutrientes. A diferencia de los inóculos conocidos hasta el momento en Colombia, que utilizan suelo como sustrato, el inóculo del hongo *G. intraradices* está caracterizado taxonómicamente por técnicas moleculares, que permiten conocer con seguridad su especie y ofrece la posibilidad de hacer seguimiento del microorganismo en lugar y tiempo. La identificación de la especie en los inóculos de hongos FMA es importante, pues se ha demostrado que existen diferencias en la respuesta de la planta, frente a la especie o aislado de *Glomus sp* utilizado (Van Der Heijden *et al.*, 2006).

Por otro lado, la planta *Solanum phureja*, es una especie vegetal dependiente de la asociación micorrízica, se asocia eficientemente con HFMA, tanto nativos como con *G. intraradices* (Gráficas 7 y 8). En este

estudio, la simbiosis fue efectiva porque aumentó la concentración de fósforo foliar comparado con las plantas no micorrizadas, y se demostró que la función del HFMA respecto a la nutrición fosforada, mejora cuando se inoculan simultáneamente bacterias solubilizadoras de fosfato en la rizósfera (Gráfica 9).

El contenido de fósforo en las plantas coinoculadas con cuatro de las diez cepas en estudio, fue más alto que las plantas no inoculadas o inoculadas solamente con *G. intraradices*. Microorganismos que interactúan positivamente, incrementan la concentración de fósforo vegetal y aumentan la capacidad de la roca fosfórica como fertilizante, podrían ser una aplicación útil y efectiva en cultivo de *S. phureja*.

Solo cuatro de los diez tratamientos en estudio Psfl029, Psfl074, Psfl080 y Psfl102, lograron aumentar la concentración de fósforo en el planta *S. phureja*, comparado con las plantas micorrizadas (Gráfica 9). La fuente de fósforo utilizada en ambos ensayos, puso a prueba la capacidad de las bacterias para solubilizar fosfato a partir de moléculas unidas a iones calcio, como lo son el fosfato tricálcico utilizado en el sistema *in vitro* y la hidroxiapatita en el ensayo en macetas. Las cepas Psfl029 y Psfl080 lograron sobresalir en el ensayo *in vitro* y en macetas (Gráficas 5 y 9), por lo tanto esta investigación sugiere, que estas dos cepas lograron solubilizar el fósforo precipitado con iones calcio, se relacionan sinérgicamente con el HFMA *Glomus intraradices* y favorecen la nutrición vegetal fosforada de la planta *S. phureja*. Con estos resultados podemos sugerir que la Roca Fosfórica puede ser una alternativa de fertilización en cultivos de papa criolla, cuando se utiliza un coinóculo microbiano como el utilizado en esta investigación.

Buenas cepas colonizadoras de la rizósfera como Psfl029, Psfl074 y Psfl080, en coinoculación con *G. intraradices*, lograron aumentar significativamente, más de dos veces comparado con el control, el contenido de P en el tejido foliar de *S. phureja* (Gráfica 9). Las cepas Psfl074 y Pfl102, solo mostraron buenos resultados en la sinergia con *G. intraradices* en los ensayos en macetas (Gráfica 9). Plantas de *S. phureja* inoculadas con Psfl074, crecieron con tallos alargados y débiles (etioladas), en ensayos bajo cuarto de crecimiento e invernadero; lo cual debería tenerse en cuenta para posteriores estudios. La cepa Psfl102, aunque logró el valor más alto de fosfato en el área foliar (Gráfica 9), no logró destacarse en el ensayo *in vitro*. Los resultados de este estudio sugieren efectos negativos de ésta cepa sobre el crecimiento *in vitro* del micelio intraradical de *G. intraradices* (Gráfica 2, 3 y 4); sin embargo, aunque también afectó el crecimiento intraradical de *G. intraradices* (Gráfica 7 y 8), logró establecerse sinérgicamente con el hongo para incrementar el contenido foliar de fosfatos.

Se observó una correlación positiva entre la concentración de fósforo y la biomasa seca de la parte aérea de *S. phureja* (Anexo 10). Sin embargo, contrario a lo esperado no se observaron diferencias significativas frente al crecimiento vegetal foliar, a excepción del tratamiento Pfl063 que logró incrementar la biomasa radical (Gráfica 10). Otros estudios muestran efecto sinérgico entre *G. intraradices* y *P. fluorescens* que se

refleja en la promoción de crecimiento y la absorción de P en plantas de maíz (Ehteshami *et al.*, 2007) y tomate (Akkopru & Demir, 2005). Sin embargo, Adesemoye y colaboradores (2008), observaron en estudios en campo que las plantas de maíz que recibieron coinoculación de PGPR (bacterias del género *Bacillus sp*) y *G. intraradices* mostraron el mismo crecimiento que la plantas no inoculadas (Adesemoye *et al.*, 2008). Los resultados de este estudio se respaldan por los hallazgos de Van der Heidjen *et al.*, (2006), donde el incremento en la toma de fósforo, no resulta en el aumento de la biomasa, indicando que otros factores como el estrés hídrico, y la disponibilidad de otros macronutrientes como nitrógeno y potasio, controlan la productividad de la planta. Lo anterior podría interpretarse como un uso ineficiente del P absorbido por la planta, que se incrementó por la presencia de la asociación con HFMA. Sin embargo, el P puede ser utilizado para aumentar el tamaño de la semilla (Koide *et al.*, 1988). Por lo cual, se hace necesario realizar ensayos en campo, que utilicen los mismos inóculos microbianos de este estudio y donde se mida la productividad del cultivo de *S. phureja*. Los resultados de ensayos preliminares en campo realizados en Sibaté-Cundinamarca, permiten afirmar que se puede reducir la cantidad de fertilizante fosforado en un 62% de 130 Kg/Ha hasta 50 Kg/Ha sin afectar la calidad de la semilla y utilizando Roca fosfórica como complemento nutricional.

Psfl 036 y Psfl 063, se habían destacado en estudios *in vitro* por comportarse como buenas solubilizadoras de fosfato tricálcico y como PGPR de *Solanum tuberosum* (Lara, 2007; Anexo 3). Sin embargo, en esta investigación una baja colonización de la rizosfera de *S. phureja* pudo influir en la deficiente capacidad mostrada en este estudio. Aun así, por el efecto promotor del crecimiento radical mostrado por el tratamiento Psfl 063, esta cepa podría tenerse en cuenta en estudios posteriores, donde se analice el número y la cantidad de tubérculos.

Aunque las cepas de *P. fluorescens* utilizadas, también pueden producir indoles (Anexo 3), sustancia que promueve el crecimiento de las raíces, no se explica cómo las plantas pudieron alcanzar la misma tasa de crecimiento sin diferenciarse del control (Plantas sin inóculo). Por ejemplo, la cepa Psfl080, con la producción de indoles mas alta *in vitro* (Lara, 2007; Anexo 3), es uno de los tratamientos que mostró un peso seco radical más bajo que el control (Gráfica 10). Mientras que la cepa Psfl 063 que produce menos de la mitad de indoles *in vitro*, es la que sobresale por incrementar el crecimiento radical de *S. phureja*. Por lo tanto se requieren otras investigaciones donde se evalúe la cantidad de auxinas excretadas por *P. fluorescens* en un sistema suelo-planta, debido a que los resultados *in vitro* pueden ser una guía para entender el comportamiento de los microorganismos y su relación con la planta, pero no siempre son reproducibles en campo.

En este estudio se evaluó la capacidad de colonización, supervivencia y competencia de *P. fluorescens* en la rizósfera de *Solanum phureja*, que por ser aisladas de andisoles de la región andina, son cepas nativas

adaptadas a las condiciones abióticas locales. En esta investigación se comprobó que las cepas *P. fluorescens* estudiadas, pueden colonizar y permanecer en la rizósfera de *S. phureja* en simbiosis con *G. intraradices* por al menos tres meses. Sin embargo, sí se observaron diferencias intra-especie en la capacidad de colonización (Gráfica 6 y Anexo 9). Cuando las raíces de las plantas están colonizadas por HFMA, las comunidades microbianas asociadas a la raíz se ven afectadas (Johansson *et al.*, 2004; Marschner & Timonen, 2005). La calidad y la cantidad de los exudados de las raíces varía si están o no micorrizadas. Sood (2003) demostró que los exudados de una planta de tomate en simbiosis con HFMA contienen más aminoácidos, ácidos orgánicos y azúcares que una no micorrizada, lo cual es más atrayente para las bacterias de la rizósfera. Según la literatura, los HFMA ejercen un efecto positivo en la rizósfera. Generalmente, los exudados de las raíces micorrizadas benefician a la población microbiana adyacente (Johansson *et al.*, 2004). Por ejemplo, Akkopru *et al.*, (2005) demostraron que en la rizósfera de *Solanum lycopersicum*, HFMA y rizobacterias pueden coexistir sin mostrar efectos adversos entre microorganismos. El hongo *Glomus mosseae* mejoró la sobrevivencia a largo término de la bacteria helper *P. fluorescens* cepa 92rk en la rizósfera de plantas de tomate (Gamalero *et al.*, 2004).

Al observar los resultados *in vitro* de este estudio, se concluye que las diferencias en la capacidad de colonización entre las cepas de *P. fluorescens*, no puede explicarse por influencia negativa del hongo *G. intraradices* (Tabla 2). Otras variables, como competencia por nicho y nutrientes, la capacidad de asociarse con otros microorganismos y la tolerancia a cambios frecuentes en la rizósfera pueden ser las responsables de estas diferencias (Sylvia *et al.*, 2005). Se han introducido nuevos conceptos para describir pequeños microhábitats en la rizósfera, que afectan la comunidad microbiana en el suelo. El término micorrizósfera, define el espacio en el suelo influenciado por las raíces y las hifas de los hongos micorrízicos; y el término hifósfera para referirse solo al espacio alrededor de las hifas (Bonfante & Anca, 2009; Johansson *et al.*, 2004). Estos microhábitats ponen a prueba la capacidad de supervivencia de la población bacteriana inoculada en la rizósfera, es aquí donde la destreza para formar biofilms, aporta ventajas competitivas que benefician indirectamente a la planta y son las características deseadas en los microorganismos aplicados como biofertilizante.

Por otro lado, se quiso determinar cuáles cepas lograban promover la colonización del hongo *G. intraradices*. Comparando con estudios anteriores, se ha encontrado que una cepa de *Bacillus sp* puede tener efecto positivo en la colonización de *G. intraradices*, cuando las plantas están sometidas a un estrés hídrico (Vivas *et al.*, 2003). La cepa *P. fluorescens* CTR12 logró promover la micorrización de *G. mosseae* en la planta *M. truncatula* (Pivato *et al.*, 2008). Según los resultados del ensayo en macetas (Gráficas 7 y 8), la cepa Psf1104 se podría clasificar como bacteria "helper", por aumentar la frecuencia e intensidad de la colonización de *G. intraradices* en las raíces de *S. phureja*. Por el contrario la cepa Pfl102 presentó los

valores más bajos en estas dos variables. Nuevamente se observa un comportamiento diferencial entre cepas, y se comprueban las diferencias intra-especie en la interacción *P. fluorescens* y *G. intraradices*.

6. CONCLUSIONES

En esta investigación se demostró que la coinoculación de bacterias solubilizadoras de fosfato como *P. fluorescens* y Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares como *G. intraradices*, interactúan positivamente en beneficio de la planta y logran incrementar el contenido de fósforo foliar en *S. phureja* bajo condiciones controladas en cuarto de crecimiento.

Este es el primer estudio en el cual se comparan los resultados *in vitro* y en macetas, en el análisis de la interacción microbiana de HFMA con bacterias solubilizadoras de P y su relación con la nutrición vegetal fosforada. Según los resultados, los tratamientos Psfl029 y Psfl080 se destacaron por incrementar el fósforo radical *in vitro* y el fósforo foliar de la planta *S. phureja*; mientras que el tratamiento Pfl 063 se destacó por la promoción del crecimiento radical de *S. phureja*.

Este trabajo se convierte en un modelo de estudio de las interacciones microbianas edáficas. Se comprobó la funcionalidad de la simbiosis HFMA-PSB y su potencial aplicabilidad en los sistemas agrícolas colombianos, como es el caso de papa criolla.

Se demostró la necesidad de realizar estas comparaciones *in-vitro* y *ex-vitro* cuando se intenta escoger una cepa bacteriana en miras a la producción de biofertilizantes comerciales, porque es una metodología que permiten evaluar los aspectos fisiológicos de la interacción y el papel de cada microorganismo en la relación tripartita planta-HFMA-PSB, en condiciones controladas y en un sistema suelo-planta. Por lo tanto, se concluye que es la metodología que se debe utilizar cuando se planeen estudios similares, previo a ensayos en campo.

La interacción de microorganismos en la rizósfera es específica y requiere del análisis metodológico ejemplificado en esta investigación para la escogencia de los aislamientos más promisorios. Aunque el cultivo monoxénico ha sido utilizado para las investigaciones científicas desde finales del siglo XX, este es el primer proyecto en Colombia donde se adopta el sistema monoxénico para el estudio de los HFMA, por lo tanto abre una puerta a las investigaciones simbióticas en el país, al análisis de las interacciones HFMA-rizobacterias y a su uso para el estudio de otros organismos biótrofos obligados como *Spongospora subterranea*.

7. PERSPECTIVAS

- La interacción funcional entre HFMA y bacterias solubilizadoras de fosfato debe considerarse como una alternativa eficaz, a la cual se le deben dedicar más investigaciones que permitan el desarrollo de productos biotecnológicos.
- Realizar estudios en campo con las cepas identificadas en este estudio, para completar el proceso de selección de cepas solubilizadoras de fosfato nativas, con futuras aplicaciones biotecnológicas.
- El cultivo *in vitro* de HFMA, podría ser utilizado como una herramienta para el estudio de las interacciones en el suelo donde las hifas extraradicales de los HFMA, se relacionan con microorganismos solubilizadores de fosfato y otros caracterizados como biocontroladores.
- El uso de técnicas moleculares para el análisis de las comunidades en la rizósfera, realizar el seguimiento de los microorganismos aplicados y observar los cambios de las poblaciones en el tiempo.
- Utilizar tinciones vitales, como Fosfatasa Alcalina (ALP) y Succinato deshidrogenasa (SDH) para relacionar la actividad y vitalidad del hongo FMA con el fósforo translocado a la planta en simbiosis con bacterias solubilizadoras de fosfato en la rizósfera.
- El uso de tinciones fluorescentes, que permitan observar el biofilm formado sobre las hifas en el cultivo *in vitro* y sobre las raíces en el suelo. También para identificar y cuantificar el porcentaje de bacterias vivas y muertas en la micorrizósfera y evaluar la capacidad de las bacterias para sobrevivir en la hifósfera. Caracterizar las cepas bacterianas de *P.fluorescens* como endofitas, necrótrofas o biótropas, pues también se puede identificar la asociación a micelio de HFMA vivo o muerto.

1. BIBLIOGRAFÍA

- Adesemoye, A.O., Torbert, H.A. and Kloepper, J.W. (2008). "Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system." Can. J. Microbiol **54**: 876-886.
- Akkopru, A. and Demir, S. (2005). "Biological control of Fusarium Wilt in Tomato caused by *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* by AMF *Glomus intraradices* and some Rhizobacteria." Journal of Phytopathology **153**: 544-550.
- Alexander, T., Meier, R., Toth, R. and Weber, H. (1988). "Dynamics of arbuscule development and degeneration in mycorrhizas of *Triticum aestivum* L. and *Avena sativa* L. with reference to *Zea mays* L." New Phytologist **110**: 363-370.
- Antunes, P.M., Schneiderb, K., Hillisc, D. and Klironomos, J.N. (2007). "Can the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* actively mobilize P from rock phosphates?" Pedobiologia **51**: 281-286.
- Ardila, N. (2009). "AGRICULTURA SENSITIVA." En línea:
http://www.agriculturasensitiva.com/papa_criolla.htm Visitado: **Noviembre, 2009.**
- Bago, A., Cano, C. and Toussaint, J. (2006). "Interactions between the arbuscular mycorrhizal (AM) fungus *Glomus intraradices* and nontransformed tomato roots of either wild-type or AM-defective phenotypes in monoxenic cultures." MYCORRHIZA **16**(6): 429-436.
- Bago, B., Azcón-Aguilar, C., Goulet, A. and Piché, Y. (1998). "Branched adsorbing structures BAS: a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi." New Phytologist **139**: 375-388.
- Bago, B., Cano, C., Azcón-Aguilar, C., Samson, J., Coughlan, A. and Piché, Y. (2004). "Differential morphogenesis of the extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus grown monoxenically on spatially heterogeneous culture media." Mycologia **96**: 452-462.
- Bago, B., Vierheilig, H., Piché, Y. and Azcón Aguilar, C. (1996). "Nitrate depletion and pH changes induced by the extraradical mycelium of the arbuscular Mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown in monoxenic culture." New Phytologist **133**: 273-280.
- Barea, J., Pozo, M., Azcon, R. and Azcon-Aguilar, C. (2005). "Microbial co-operation in the rhizosphere." JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY **56**(417): 1761-1778.
- Bécard, G. and Piché, Y. (1989). "Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis." Applied and Environmental Microbiology **55**: 2320-2325.
- Becerra-Sanabria, L.A., Mosquera, S.L.N.-d. and Núñez-López, C.E. (2007). "Efecto de niveles de fósforo y potasio sobre el rendimiento del cultivar 'Criolla Guaneña' en el departamento de Nariño." Revista Latinoamericana de la Papa, **14**(1): 51-60.
- Bianciotto, V., Andreotti, S., Balestrini, R., Bonfante, P. and Perotto, S. (2001). "Mucoïd mutants of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 show increased ability in biofilm formation on mycorrhizal and nonmycorrhizal carrot roots." Molecular plant-microbe interactions **14**(2): 255-260.
- Bonfante-Fasolo, P. and Grippiolo, R. (1984). "Cytochemical and biochemical observations on the cell wall of the spore of *Glomus epigaeum*." Protoplasma **123**: 140-151.
- Bonfante, P. and Anca, I.-A. (2009). "Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions." Annual Review Microbiology **63**: 363-383.

- Bücking, H. and Shachar-Hill, Y. (2005). "Phosphate uptake, transport and transfer by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* stimulated by increased carbohydrate availability." **165**: 899–912.
- Bucher, M. (2006). "Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces." *New Phytologist* **173**: 11-26.
- Bucher, M. (2007). "Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces." *New Phytologist* **173**: 11-26.
- Cardoso, I. and Kuyper, T. (2006). "Mycorrhizas and tropical soil fertility." *Agriculture, Ecosystems and Environment*. **116**: 72-84.
- Cruz, C., Egsgaard, H., Trujillo, C., Ambus, P., Requena, N., Martins-Loucxao, M.A. and Jakobsen, I. (2007). "Enzymatic Evidence for the Key Role of Arginine in Nitrogen Translocation by Arbuscular Mycorrhizal Fungi." *Plant Physiology* **144**: 782–792.
- Darhorn, T. and Fuqua, C. (2007). "Biofilm formation by plant-Associated Bacteria." *Annual Review Microbiology* **61**: 401-422.
- Declerck, S., Strullu, D.-G. and Fortin, J.-A. (2005). *In Vitro Culture of Mycorrhizas*. Germany, Springer.
- Dey, R., Pal, K., Bhatt, D. and Chauhan, S. (2004). "Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria." *Microbiological Research* **159**(4): 371-394.
- Dodd, J.C., Boddington, C.L., Rodriguez, A., Gonzalez-Chavez, C. and Mansur, I. (2000). "Mycelium of Arbuscular Mycorrhizal fungi (AMF) from different genera: form, function and detection." *Plant and Soil* **226**: 131–151.
- Ehteshami, S., Aghaalikma, M. and Khavazi, K. (2007). "Responses of field grown maize plants phosphate solubilizing microorganisms under varying intensities of water." *Acta Physiologiae Plantarum* **29**: 515-518.
- Espinosa, J. (1998). "Fijación de fósforo en suelos derivados de ceniza volcánica y fertilización fosfórica del cultivo de papa." *En: Fertilización de cultivos en clima frío. Monómeros colombo venezolanos. Segunda edición*: Bogotá. 370 p.
- Fortin, J.A., Bécard, G., Declerck, S., Dalpé, Y., St-Arnaud, M., Coughlan, A.P. and Piché, Y. (2002). "Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures." *Can. J. Bot.* **80**: 1-20.
- Frey-Klett, P. and Garbaye, J. (2005). "Mycorrhiza helper bacteria: a promising model for the genomic analysis of fungal-bacterial interactions." *New Phytologist* **168**(1): 4-8.
- Frey-Klett, P., Garbaye, J. and Tarkka, M. (2007). "The mycorrhiza helper bacteria revisited." *New Phytologist* **176**: 22-36.
- Gamalero, E., Trotta, A., Massa, N., Copetta, A., Martinotti, M. and Berta, G. (2004). "Impact of two fluorescens pseudomonads and an arbuscular mycorrhizal fungus on tomato plant growth, root architecture and P acquisition." *Mycorrhiza* **14**: 185-192.
- Garbaye, J. (1994). "Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis." *New Phytologist* **128**(2): 197-210.
- Gherna, R. (1994). "Methods for general and molecular bacteriology." *In Gerhardt, Murray, Wood and Krieg (ed.). (American society for microbiology.): pp.278-292.*
- Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V., Franken, P., Dumas-Gaudot E, Van Tuinen D, Martin-Laurent F and B., D. (1995). *Molecules and genes involved in mycorrhiza functioning*. New York, Plenum Press.
- Giovannetti, M., Avio, L., Sbrana, C. and Citernesi, A. (1993). "Factors affecting appressorium development in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*." *New Phytologist* **123**: 115-122.

- Gonzalez- Guerrero, M. (2005). "Estudio de los mecanismos implicados en la homeostasis de metales pesados en el hongo formador de micorrizas arbusculares *Glomus intraradices*." Tesis doctoral.Universidad de Granada. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. CSIC.
- Guo, J.-H., Qi, H.-Y., Ya-Hui, G., Hong-Lian Ge, Long-Ying Gong, Li-Xin Zhang and Sund, P.-H. (2004). "Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria." Biological Control **29**: 66-72.
- Haas, D. and Défago, G. (2005). "Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads." Nature Reviews Microbiology (Published online).
- Harrison, M. (2005). "Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis." Annual Review Microbiology **59**: 19-42.
- Harrison, M., Dewbre, G. and Liu, J. (2002). "A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi." The Plant Cell **14**: 2413–2429.
- Hause, B. and Fester, T. (2005). "Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis." Planta **221**: 184-196.
- Havlin, J., Beaton, J., Tisdale, S. and Nelson, W. (2005). Soil Fertility and Fertilizers., Pearson Prentice Hall. Seventh edition. Chapter 5.
- Hawkes, J. (1990). "The potato: evolution, biodiversity and genetic resources." **Belhaven Press London.**: 259.
- Helgason, T. and Fitter, A.H. (2009). "Natural selection and the evolutionary ecology of the arbuscular mycorrhizal fungi (Phylum Glomeromycota)." JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY: 1-16.
- Hijri, M. and Sanders, I. (2005). "Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei." Nature **433**(160-163).
- Hildebrandt, U., Schmelzer, E. and Bothe, H. (2002). "Expression of nitrate transporter genes in tomato colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus." Physiologia Plantarum **115**: 125-136.
- Hodge, A. (2000). "Microbial ecology of the arbuscular mycorrhiza." FEMS Microbiol Ecology **32**: 91-96.
- Hodge, A., Campbell, C. and Fitter, A. (2001). "An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material." Nature **413**: 297-299.
- Imaizumi-Anraku, H., Takeda, N., Charpentier, M., Perry, J., Miwa, H., Umehara, Y., Kouchi, H., Murakami, Y., Mulder, L., Vickers, K., Pike, J., Downie, J., Wang, T., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., Yoshikawa, M., Murooka, Y., Wu, G., Kawaguchi, M., Kawasaki, S., Parniske, M. and Hayashi, M. (2005). "Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots." Nature **433**(7025).
- Javot, H., Penmetsa, V., Terzaghi, N., Cook, D.R. and Harrison, M.J. (2007). "A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis." PNAS **104**: 1720–1725.
- Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K. and Barea, J.M. (2003). "The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility." Biology and Fertility of Soils **37**: 1-16.
- Johansson, J.F., Paul, L.R. and Finlay, R.D. (2004). "Minireview.Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture." FEMS Microbiology Ecology **48**: 1-13.

- Kandan, A., Ramiah, M., Vasanthi, V.J., Radjacommar, R., Nandakumar, R., Ramanathan, A. and Samiyappan, R. (2005). "Use of *Pseudomonas fluorescens*-based formulations for management of tomato spotted wilt virus (TSWV) and enhanced yield in tomato." Biocontrol Science and Technology **16**(5): 553-569.
- Karandashov, V. and Bucher, M. (2005). "Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas." TRENDS in Plant Science **10**(1): 22-29.
- Koeppler, J., Lifshitz, K. and Zablutowicz, R.M. (1989). "Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity." Trends Biotechnology Advances **7**: 39-44.
- Koide, R. and Kabir, Z. (2000). "Extraradical hyphae of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* can hydrolyse organic phosphate." NEW PHYTOLOGIST **148**(3): 511-517.
- Koide, R., Li, M., Lewis, J. and Irby, C. (1988). "Role of mycorrhizal infection in the growth and reproduction of wild vs cultivated plants." Oecologia **77**: 537-543.
- Kpombekou, K. and Tabatabai, M. (1994). "Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks." Soil Science **158**: 442-453.
- Krajinski, F. and Frenzel, A. (2007). "Towards the elucidation of AM-specific transcription in *Medicago truncatula*." PHYTOCHEMISTRY **68**(1): 75-81.
- Lara, S. (2007). Determinación del potencial agronómico de aislamientos nativos de *Pseudomonas fluorescens* en términos de su capacidad solubilizadora de fosfatos y antagonista contra *Rhizoctonia solani*. Instituto de Biotecnología. Bogota., Universidad Nacional de Colombia.
- Leveau, J.H.J. and Preston, G.M. (2008). "Bacterial mycophagy: definition and diagnosis of a unique bacterial-fungal interaction." New Phytologist **177**: 859-876.
- Lugtenberg, B., Dekkers, L., Bloemberg, G. and (2001). "Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*." Annu Rev Phytopathol **39**: 461-491.
- Manual de Micorrizas, O. (2001). "Prepared for the Work shop: Arbuscular mycorrhizal fungi in plant production systems: detection, taxonomy, conservation and ecophysiology." http://www2.dijon.inra.fr/mychintec/Protocole/Workshop_Procedures.html#1.5
Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, P.R. China April 2001.
- Marschner, P. and Timonen, S. (2005). "Interactions between plant species and mycorrhizal colonization on the bacterial community composition in the rhizosphere." Applied Soil Ecology **28**: 23-36.
- Medina Peñafiel, A. (2006). Estudio de la interacción entre inoculantes microbianos y residuos agroindustriales biotransformados para su uso en estrategias de revegetación y bioremediación. Departamento de Microbiología. Granada, Universidad de Granada, Facultad de Ciencias.
- Murphy, J. and Riley, J. (1962). "A modified single solution method for determination of phosphate in natural water." Anal. Chim. Acta **27**(31-36).
- Nagarajkumar, M., Bhaskaran, R. and Valazhahan, R. (2004). "Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen." Microbiological Research **159**: 73-81.
- Nagy, R., Karandashov, V., Chague, W., Kalinkevich, K., Tamasloukht, M., Xu, G., Jakobsen, I., Levy, A., Amrhein, N. and Bucher, M. (2005). "The characterization of novel mycorrhiza-specific phosphate transporters from *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum* uncovers functional redundancy in symbiotic phosphate transport in solanaceous species." PLANT JOURNAL **42**(2): 236-250.

- Nautiyal, C. (1999). "An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms." *FEMS Microbiological Letters* **170**: 265-270.
- NCBI (2009). National Center for Biotechnology Information.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser>. Consulta: 30 abril 2009.
- Ñuztez, C. (2008). Muestra ideal para el análisis de fósforo foliar en *Solanum phureja*.
Universidad Nacional de Colombia. Bogotá: Facultad de Agronomía.
- Ohtomo, R. and Saito, M. (2005). "Polyphosphate dynamics in mycorrhizal roots during colonization of an arbuscular mycorrhizal fungus." *New Phytologist* **167**: 571-578.
- Olsson, P.A., Ingrid M. van Aarle, William G. Allaway, Anne E. Ashford and Rouhier, H. (2002). "Phosphorus Effects on Metabolic Processes in Monoxenic Arbuscular Mycorrhiza Cultures." *Plant Physiology* **130**: 1162-1171.
- Olsson, P.I.A., Hansson, M.C. and Burleigh, S.H. (2006). "Effect of P Availability on Temporal Dynamics of Carbon Allocation and *Glomus intraradices* High-Affinity P Transporter Gene Induction in Arbuscular Mycorrhiza." *Applied and Environmental Microbiology* **72**(6): 4115-4120.
- Parniske, M. (2004). "Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis." *Current Opinion in Plant Biology*. **7**: 414-421.
- Parniske, M. (2008). "Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses." *Nature Review Microbiology* **6**(10): 763-775.
- Parra-Huertas, S.L., Pérez- Casas, M.M., Bernal- Morales, M., Suárez- Moreno, Z. and Montoya-Castaño, D. (2006). "Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN)." *NOVA - Publicación científica* **4**(5): 39-49.
- Parra Huertas, S.L., Pérez Casas, M.M., Bernal Morales, M., Suárez Moreno, Z. and Montoya Castaño, D. (2006). "Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN)." *NOVA - Publicación científica* **4**(5): 39-49.
- Pawlowska, T. and Taylor, J. (2004). "Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi." *Nature* **427**: 733-737.
- Phillips, J. and Hayman, D. (1970). "Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesiculararbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection." *Transactions of the British Mycological Society* **55**(159-161.).
- Pivato, B., Gamalero, E., Lemanceau, P. and Berta, G. (2008). "Colonization of adventitious roots of *Medicago truncatula* by *Pseudomonas fluorescens* C7R12 as affected by arbuscular mycorrhiza." *FEMS Microbiol Lett* **289**: 173-180.
- Proexport (2009a). Exportaciones colombianas de papa criolla precocida y congelada.
- Proexport (2009b). "ESTADO DE LOS PRODUCTOS ORGÁNICOS EN EL REINO UNIDO Y COLOMBIA."
<http://www.proexport.com.co/vbecontent/library/documents/DocNewsNo10295DocumentNo8264.pdf>. Visitado: Noviembre, 2009.
- Pumisacho, M. and Sherwood, S. (2002). El cultivo de la papa en Ecuador. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Quito, Centro Internacional de la Papa (CIP).

- Raaijmakers, J.M., Paulitz, T.C., Steinberg, C., Alabouvette, C. and Moenne-Loccoz, Y. (2009). "The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms." Plant Soil **321**: 341-361.
- Redecker, D. (2000). "Glomalean fungi from the Ordovician." Science **289**: 1920-1921.
- Reinhardt, D. (2007). "Programming good relations-development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis." Current Opinion in Plant Biology. **10**: 98-105.
- Requena, N. (2005). "Measuring quality of service: phosphate 'a la carte' by arbuscular mycorrhizal fungi." NEW PHYTOLOGIST **18**(2): 268-271.
- Reyes, I., Baziramakengab, R., Bernierc, L. and Antoun, H. (2001). "Solubilization of phosphate rocks and minerals by wild-type strain and two UV-Induced Mutants of *Penicillium rugulosum*." Soil Biology & Biochemistry. **33**(1741-1746).
- Rodriguez, A., Clapp, J. and Dodd, J. (2004). "Ribosomal RNA gene sequence diversity in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota)." Journal of Ecology **92**(986-989).
- Rodríguez, H. and Fraga, R. (1999). "Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion." Biotechnology Advances **17**: 319-339.
- Salisbury, F.B. and Ross, C.W. (1994). Fisiología vegetal. México., Grupo Editorial Iberoamericano. Pg 127-148.
- Sanders, I. and Croll, D. (2009). "Genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis." Ann Rev Gen. **43** (December 2009).
- Schachtman, D.P. and Reid, R.J. (1998). "Phosphorus uptake by plants: from soil to cell." Plant Physiologist **116**: 447-453.
- Schussler, A. (2001). "A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution." Mycological Research. **105**: 1413-1421.
- Siddiqui, Z.A. (2004). "Effects of plant growth promoting bacteria and composed organic fertilizers on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and tomato growth." Bioresource Technology **95**: 223-227.
- Smith, S. and Read, D. (2008). Mycorrhizal Symbiosis, Elsevier Edition. Third Edition. 10-90.
- Sood, G. (2003). "Chemotactic response of plant-growth-promoting bacteria toward root of vesicular-arbuscular mycorrhizal tomato plants." Microbiology Ecology **45**: 219-227.
- St-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M. and Fortin, J.A. (1995). "Altered growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* in an in vitro dual culture system with the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* growing on *Daucus carota* transformed roots." Mycorrhiza **5**: 431-438.
- Sylvia, D., Fuhrmann, J., Hartel, P. and Zuberer, D. (2005). Principles and applications of soil microbiology. New Jersey. Second Edition. Chapter 11.
- Takanishi, I., Ohtomo, R., Hayatsu, M. and Saito, M. (2009). "Short-chain polyphosphate in arbuscular mycorrhizal roots colonized by *Glomus* spp.: A possible phosphate pool for host plants." Soil Biology & Biochemistry **30**(1-3).
- Tarkka, M.T., Sarniguet, A. and Frey-Klett, P. (2009). "Inter-kingdom encounters: recent advances in molecular bacterium-fungus interactions." Current Genetics **55**: 233-243.
- Tennant, D. (1975). "A Test of a Modified Line Intersect Method of Estimating Root Length." The Journal of Ecology **63**(3): 995-1001.
- Toljander, J., Artursson, V., Paul, L., Jansson, J. and Finlay, R. (2006). " Attachment of diferent soil bacteria to arbuscular mycorrhizal fungi extraradical hyphae is determined by hyphal vitality and fungal species." FEMS Microbiol Lett **254**: 34-40.

- Toljander, J.F., Lindahl, B.D., Paul, L.R., Elfstrand, M. and Finlay, R.D. (2007). "Influence of arbuscular mycorrhizal mycelial exudates on soil bacterial growth and community structure." FEMS Microbiological Ecology **61**: 295-304.
- Toro, M., Azcon, R. and Barea, J. (1997). "Improvement of arbuscular mycorrhizal development by inoculation with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (32P) and nutrient cycling." Applied and Environmental Microbiology **63**: 4408-4412.
- Trouvelot, A., Fardeau, J., Plenchedt, C. and Gianinazzi, S. (1986). "Nutritional balance and symbiotic expression in mycorrhizal wheat." Physl. Veget. **24**: 300.
- Uribe, D., Ortiz, E., Portillo, M., Bautista, G. and Ceron, J. (1999). "Diversidad de pseudomonas fluorescentes en cultivos de papa de la región cundiboyacense y su actividad antagonista in vitro sobre Rhizoctonia solani." Revista Colombiana de Biotecnología **2**: 50-58.
- Van der Heijden, M., Steritwolf-Engel, R., Riedl, R., Siegrist, S., Neudecker, A., Ineichen, K., Boller, T., Wiemkem, A. and Sanders, I. (2006). "The mycorrhizal contribution to plant productivity, plant nutrition and soil structure in experimental grassland." New Phytologist **172**: 739-752.
- Vassilev, N., Vassileva, M. and Nikolaeva, I. (2006). "Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends." Appl Microbiol Biotechnol **71**: 137-144.
- Verma, R., Naosekham, A.S., Kumar, S., Prasad, R. and Shanmugam, V. (2007). "Influence of soil reaction on diversity and antifungal activity of fluorescent pseudomonads in crop rhizospheres." Bioresource Technology **98**: 1346-1352.
- Vessey, J. (2003). "Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers." Plant and Soil **255**(2): 571-586.
- Villarreal, H.J., Porras, P.D., Santa, A., Lagoeyte, J. and Muñoz, D. (2007). "COSTOS DE PRODUCCIÓN DE PAPA EN LAS PRINCIPALES ZONAS PRODUCTORAS DE COLOMBIA." FEDERACIÓN COLOMBIANA DE PRODUCTORES DE PAPA-FEDEPAPA: 22-29.
- Villegas, J. and Fortin, J.A. (2001). "Phosphorus solubilization and pH changes as a result of the interactions between soil bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on a medium containing NH₄⁺ as nitrogen source." Can. J. Bot. **79**: 865-870.
- Villegas, J. and Fortin, J.A. (2002). "Phosphorus solubilization and pH changes as a result of the interactions between soil bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on a medium containing NO₃⁻ as nitrogen source." Can. J Bot. **80**: 571-576.
- Vivas, A., Marulanda, A., Gomez, M., Barea, J. and Azcon, R. (2003). "Physiological characteristics (SDH and ALP activities) of arbuscular mycorrhizal colonizations affected by *Bacillus thuringiensis* inoculation under two phosphorus levels." Soil Biology & Biochemistry **35**(7): 987-996.
- Wright, D., Scholes, J. and Read, D. (1998). "Effects of VA mycorrhizal colonization on photosynthesis and biomass production of *Trifolium repens L.*" Plant, Cell and Environment **21**: 209-216.
- Yang, J., Kloepper, J. and Ryu, C. (2009). "Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress." TRENDS in Plant Science **14**(1): 1-4.

8. ANEXOS

ANEXO 1. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

- **MEDIO MÍNIMO**

COMPONENTES DEL MEDIO MINIMO	1000 ml
Calcio	100 ml
KI	1 ml
Macroelementos	100 ml
Microelementos	1 ml
NaFe/EDTA	5 ml
Vitaminas	10 ml
Sacarosa	10 g
Disolver sin calentar y ajustar pH a 5,5	
Phytigel	3,5 g
Calentar hasta disolver el phytigel. Autoclavar a 121°C por 16 min.	

COMPONENTE	COMPUESTO	CANTIDAD g/L
Calcio (x10)	Ca(NO ₃) ₂ * H ₂ O	7,31
KI (x1000)	KI	0,75
Macroelementos (x10)	MgSO ₄ * H ₂ O	7,31
	KNO ₃	0,80
	KCl	0,65
	KH ₂ PO ₄	0,048
Microelementos (x1000)	MnCl * H ₂ O	6,0
	ZnSO ₄ * 7H ₂ O	2,65
	H ₃ BO ₃	1,50
	CuSO ₄ * 5H ₂ O	0,13
	Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0,0024
Vitaminas (x100)	Glicina	0,30
	Tiamina Hidrocloridrato	0,01
	Piridoxina Hidrocloridrato	0,01
	Acido nicotínico	0,05
	Mio-inositol	5,00

- **SOLUCIÓN SALINA**

Se preparó a una concentración de 0,85%, así: 0,85 gramos de NaCl en 100 ml de agua destilada. Se disolvió y esterilizó por presión a vapor, 121°C durante 2 minutos.

- **MEDIO LURIA BERTANI (LB)**

Para el cultivo de microorganismos.

Componentes (1000 ml):

Triptona	10 g
NaCl	10 g
Extracto de Levadura	5 g
Agar Bacteriológico	12 g

Disolver y esterilizar a 121°C durante 20 minutos.

Cuando se va a preparar Medio de Cultivo LB suplementado con rifampicina, inicialmente se debe preparar una solución stock de rifampicina 10 mg/ml: En condiciones de esterilidad, pesar 250 mg del antibiótico rifampicina, producto comercial en polvo. Disolver en 25 ml de Metanol (CH₃OH) 99,9%. Filtrar y guardar en frasco ambar a 4 °C

Adicionar la rifampicina al medio esteril cuando esté a una temperatura de 40°C aproximadamente.

Para una concentración de 150 µg/ml se agregan 15 ml/L de la solución stock por litro de medio de cultivo.

- **MEDIO GHERNA**

Para la conservación de bacterias a -20°C.

Componentes (100ml):

Caldo Tripticasa de soya	3,125 g
Glucosa	0,52 g
Leche en polvo descremada	2,075 g
Glicerol 87%	4,15 g

Pasteurizar a 10 libras durante 15 minutos.

Las cepas bacterianas fueron crecidas en 10 ml de caldo LB suplementado con rifampicina 150 µg/ml. Se incubaron 48 horas a 25°C. Se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min. El pellet fue resuspendido en 5 ml de medio Gherna.

ANEXO 2. TÉCNICA AZUL DE MOLIBDATO PARA LA EVALUACIÓN DE FOSFATOS EN EL TEJIDO VEGETAL.

SOLUCIONES

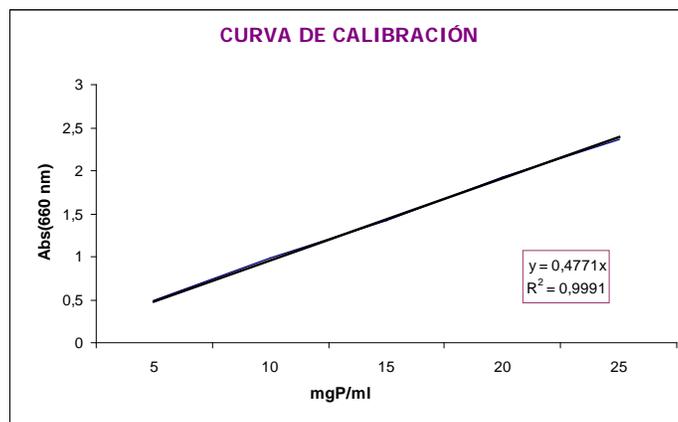
- Solución stock de fosfato 200 mg/L (Disolver 87,9 mg de KH_2PO_4 en 75 ml de solución ácido sulfúrico 10 N y completar el volumen a 100 ml con agua),
- Solución de ácido molíbdico (disolver 84 ml de H_2SO_4 concentrado en 300 ml de agua, agitar y dejar enfriar.
- Aparte se disuelven 25 g de molibdato de amonio en agua, luego se mezclan las dos soluciones y se completa a un litro con agua destilada).
- Soluciones que deben ser recién preparadas: patrón de fósforo 40 mg/L (2 ml de la solución stock y completar a 10 ml con agua), solución de ácido ascórbico 1.5 mg/ml.

CURVA DE CALIBRACIÓN

La curva de calibración se elaboró con la soluciones de concentraciones conocidas de fósforo desde 0 hasta 35 mg P/ml.

Concentración de fosfato soluble mgP/ml	Abs 550nm
5	0,494
10	0,983
15	1,423
20	1,925
25	2,362

Tabla 5. Datos curva de calibración de la técnica Azul de Molibdato, para la medición de fósforo en el tejido vegetal.



Gráfica 11. Curva de calibración Técnica Azul de Molibdato para evaluar la concentración de fosfatos en el tejido vegetal.

ANEXO 3. CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS *Pseudomonas fluorescens*.
Tomado de Lara (2007)

Aislamiento	Fosfato tricálcico solubilizado (mg/L)	[Indoles] (µg/ml)	Antagonismo <i>in viro</i> contra <i>R. Solani</i>	Promoción de crecimiento de <i>S. Tuberosum</i>
P fl 095	114.547	2.497	+	+
P fl 063	110.28	5.267	-	+
P fl 028	102.935	0.593	-	+
P fl 102	101.674	1.395	-	+
P fl 036	100.746	0.919	-	+
P fl 080	27.159	19.678	-	+
P fl 074	95.553	6.683	+	-
P fl 108	33.154	11.307	+	-
P fl 104	46.843	11.395	+	-
P fl 029	60.273	0.000	+	-

ANEXO 5.
FICHA TÉCNICA ROCA FOSFÓRICA

Los siguientes datos son suministrados por la empresa colombiana Fosfatos del Huila S.A, a través de su pagina web: <http://www.fosfatosdelhuila.com/fosforita.htm>. (Fecha de revisión: Noviembre 10 de 2009)

FICHA TECNICA:

ELEMENTO	ANÁLISIS QUÍMICO (%)
	30P
Fósforo como (P2O5)	30 ± 2.70
BPL (Bone Phosphate of Lime)	65.55 ± 5.90
Calcio (CaO)	40 ± 2.96
Sílice (SiO2)	11 ± 0.81
Humedad	5
Granulometría	100% pasa malla de 20

SOLUBILIDAD: La Solubilidad de la roca fosfórica en Citrato de Amonio Neutro (NAC) es del 3.1%, que equivale al 43% del fósforo contenido, lo que la clasifica como una Roca de Reactividad Media. (INTERNATIONAL FERTILIZER DEVELOPMENT CENTER (IFDC). Characterization of Phosphate Rock from the media Luna Deposit, Huila, Colombia.Marzo, 1985. Alabama, USA.).

La solubilidad de la roca fosfórica en Citrato con pH=3 está en 13.20%

PROCEDENCIA:

La Roca fosfórica molida en la Planta de Bambucá, municipio de Aipe, Departamento del Huila, procede únicamente de la Mina Media Luna, propiedad de Fosfatos del Huila, ubicada en la misma jurisdicción.

MINERALOGICA: El fósforo está presente principalmente en forma de Hidroxilapatita $Ca_5(PO_4)_3(OH)$ y compuestos de sílice amorfa (Laboratorio de Petrografía de la Facultad de Ingeniería de la UPTC – Sogamoso y Laboratorio de Difracción de Rayos X, Escuela de Química, UIS.).

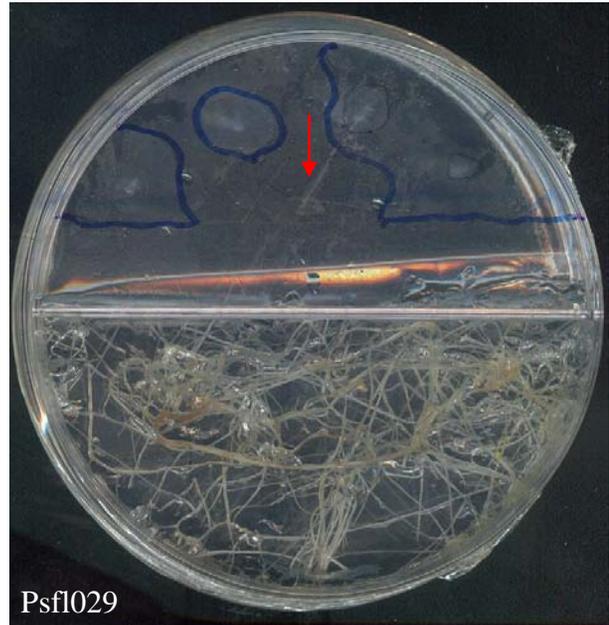
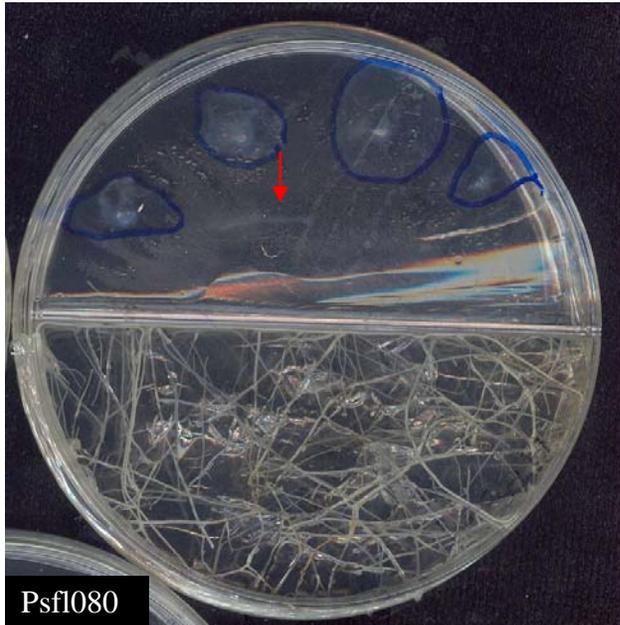
CARACTERIZACION FISICO QUÍMICA **

DENSIDAD APARENTE AIREADA (g/cm3)	DENSIDAD APARENTE EMPACADA (g/cm3)	DENSIDAD REAL	ANGULO DE REPOSO	ANGULO DE FRICCION
1.21	1.26	2.87	40.35°	30°

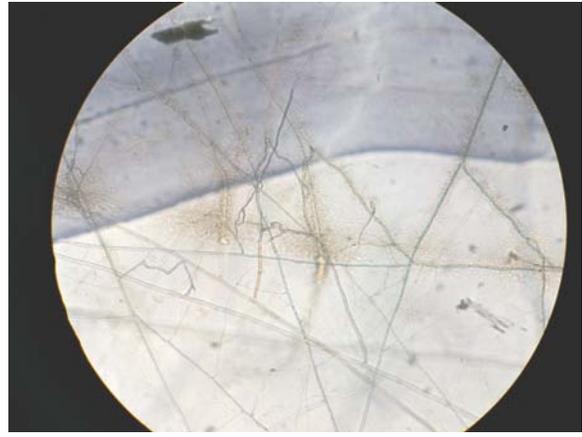
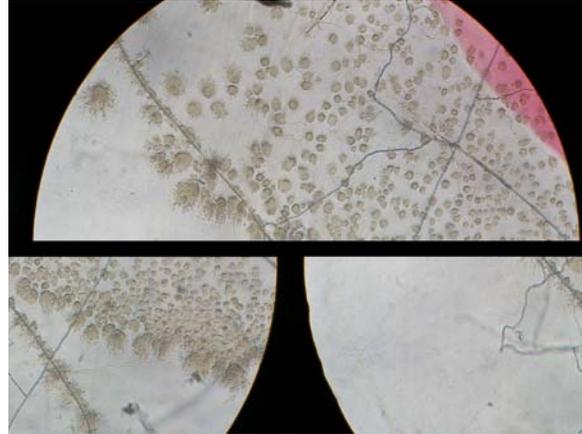
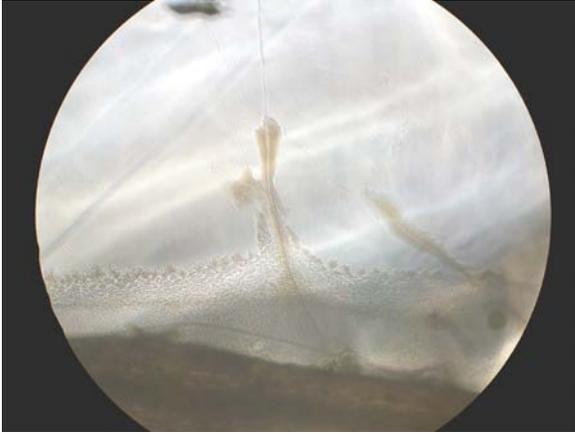
** Estudio de concentración de roca fosfórica realizado por la Universidad Industrial de Santander, 2005

ANEXO 6. IMÁGENES DEL CRECIMIENTO BACTERIANO SOBRE LAS HIFAS EXTRARADICALES DE *G. intraradices* EN EL COMPARTIMENTO DE LA HIFA EN EL ENSAYO *in vitro*.

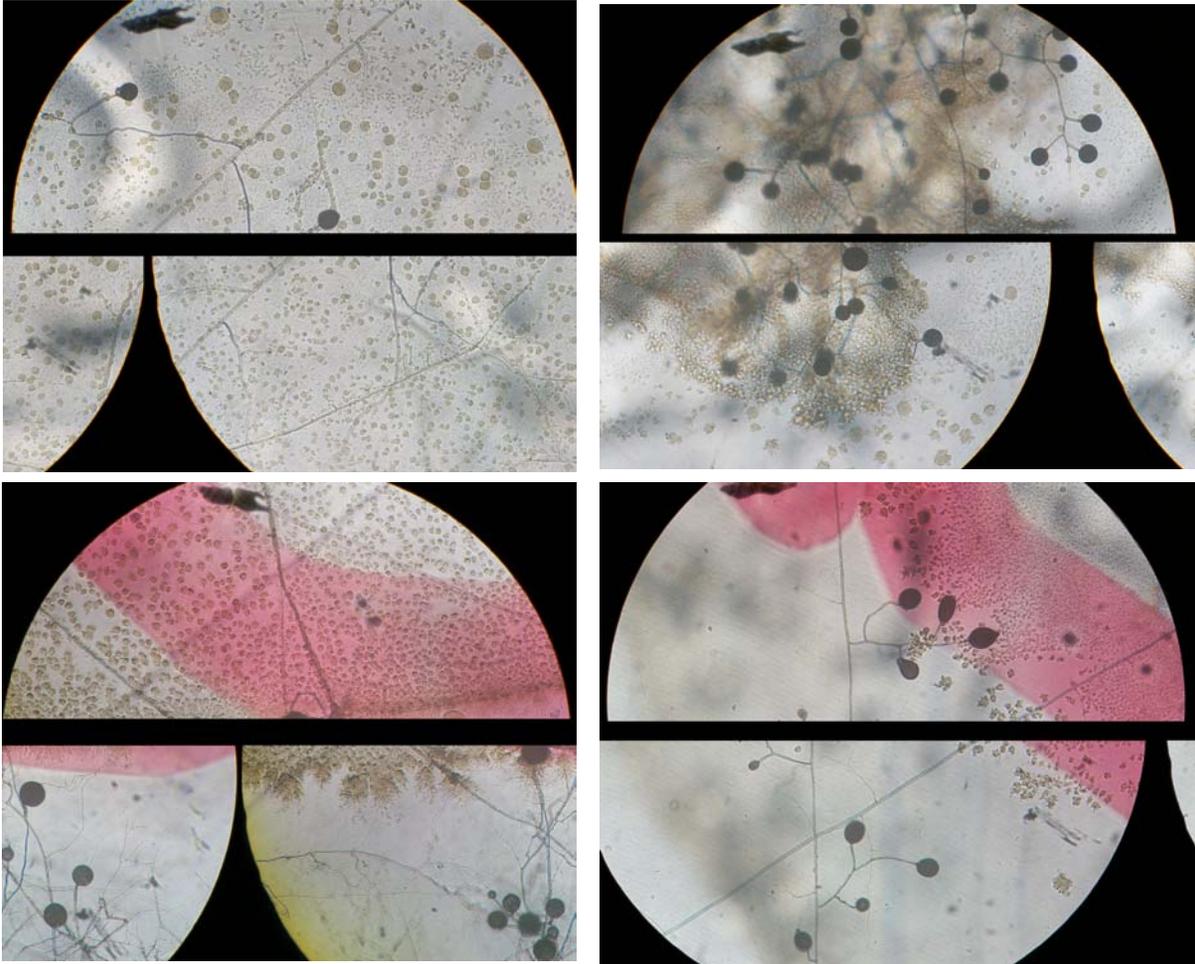
I. Se observó como las bacterias rodearon las hifas extraradicales de *G. intraradices* y crecieron lo suficiente para hacerse visibles, observándose macroscópicamente como un halo blanquecino alrededor de las hifas (Flechas rojas).



II. Microscópicamente se observan estructuras similares a un biofilm rodeando las hifas extraradicales de *G. intraradices in vitro*.



III. *Pseudomonas fluorescens* y *Glomus intraradices* lograron compartir el mismo nicho en el compartimento de la hifa del sistema *in vitro*.



ANEXO 7. PARÁMETROS MORFOLÓGICOS DEL MICELIO EXTRARADICAL EN ENSAYO *in vitro*.

TRATAMIENTO	No. Esporas/ cm²	No. BAS/ cm²	Esporas/BAS
28	118,17	186,18	0,63
29	240,68	172,36	1,40
36	145,86	131,84	1,11
63	305,18	111,20	2,74
74	90,91	190,51	0,48
80	378,42	141,71	2,67
95	362,32	129,58	2,80
102	344,61	169,08	2,04
104	245,52	150,90	1,63
108	270,63	179,24	1,51
Control	381,33	220,90	1,73

Valores promedio de los parámetros morfológicos del micelio extraradical (número de esporas y número de BAS por cm²) en el compartimento de la hifa, 20 días postratamiento.

ANEXO 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO ENSAYO *in vitro*

Interpretación del Análisis de varianza: Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las resultado medias de un nivel de tratamiento a otro para un nivel de confianza del 95,0%. Puesto que el p-valor del test F es superior o igual a 0,05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las _a medias de un nivel de tratamiento a otro para un 95,0%.

Para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras, se utilizó el test de Duncan.

ANOVA para la variable área de crecimiento bacteriano en el compartimento de la hifa

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	24,5428	9	2,72698	0,80	0,6187
Intra grupos	136,4	40	3,40999		
Total (Corr.)	160,942	49			

ANOVA para la variable longitud de la hifa en el compartimento de la hifa

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	16949,0	10	1694,9	9,68	0,0000
Intra grupos	82493,6	471	175,146		
Total (Corr.)	99442,6	481			

Contraste Múltiple de Rango para longhifa según tratamiento

Método: 95,0 porcentaje Duncan

tratamiento	Frec.	Media	Grupos homogéneos
-------------	-------	-------	-------------------

36	31	14,1935	e
63	52	16,6209	ed
102	27	19,4974	edc
104	34	21,2605	dc
80	27	21,5344	dc
74	55	22,1429	dc
95	51	24,1877	cb
29	56	24,6939	cb
28	39	24,7802	cb
108	49	29,0233	b
CONTROL	61	35,9368	a

ANOVA para la variable número de esporas de HFMA/cm² en el compartimento de la hifa.

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	4,90217E6	10	490217,0	6,72	0,0000
Intra grupos	3,43636E7	471	72958,8		
Total (Corr.)	3,92658E7	481			

Contraste Múltiple de Rango para esporas_cm2 según tratamiento

Método: 95,0 porcentaje Duncan

tratamiento Frec. Media Grupos homogéneos

74	55	90,9091	e
28	39	118,172	ed
36	31	145,863	edc
29	56	240,683	dcb
104	34	245,524	dcb
108	49	270,63	dcb
63	52	305,184	ba
102	27	344,605	ba
95	51	362,319	ba
80	27	378,422	a
CONTROL 61		381,326	a

ANOVA para la variable número de BAS/cm² en el compartimento de la hifa

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	530335,0	10	53033,5	6,10	0,0000
Intra grupos	4,10542E6	472	8697,92		
Total (Corr.)	4,63576E6	482			

Contraste Múltiple de Rango para bas_cm2 según tratamiento

Método: 95,0 porcentaje Duncan

tratamiento Frec. Media Grupos homogéneos

tratamiento	Frec.	Media	Grupos homogéneos
63	52	111,204	e
95	51	129,582	ed
36	31	131,837	ed
80	27	141,707	edc
104	34	150,895	edcb
102	27	169,082	dcb
29	56	172,36	dcb
108	49	179,237	cba
28	39	186,176	cba
74	55	190,514	ba
CONTROL	62	220,898	a

ANOVA para la variable concentración de P en raíces transformadas

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	1101,7	11	100,154	6,02	0,0001
Intra grupos	399,165	24	16,6319		
Total (Corr.)	1500,86	35			

Contraste Múltiple de Rango para **la variable concentración de P en raíces transformadas**

Método: 95,0 porcentaje Duncan

tratamiento Frec. Media Grupos homogéneos

tratamiento	Frec.	Media	Grupos homogéneos
74	3	14,1225	d
SIN FT	3	16,7333	dc
63	3	17,4577	dc
CONTROL	3	18,2477	dc
102	3	19,028	dc
95	3	22,9402	cb
28	3	23,2936	cb
108	3	23,5628	cb
104	3	24,5498	cb
36	3	28,3628	ba
29	3	28,423	ba
80	3	34,0182	a

ANEXO 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO ENSAYO EN MACETAS

Interpretación del Análisis de varianza: Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las resultado medias de un nivel de tratamiento a otro para un nivel de confianza del 95,0%. Puesto que el p-valor del test F es superior o igual a 0,05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las _a medias de un nivel de tratamiento a otro para un 95,0%.

Para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras, se utilizó el test de Duncan.

Tabla ANOVA para ufc rizósfera según cepa

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	2,05217E16	11	1,86561E15	10,59	0,0000
Intra grupos	4,05118E15	23	1,76138E14		
Total (Corr.)	2,45729E16	34			

Contraste Múltiple de Rango para ufc rizósfera según cepa

Método: 95,0 porcentaje Duncan

cepa	Frec.	Media	Grupos homogéneos
Micorriza	3	1033,33	d
Control	3	1580,0	d
63	3	20000,0	d
108	3	79000,0	d
36	3	320000,0	d
102	3	510000,0	d
95	3	4,8E6	dc
104	3	6,4E6	c
28	3	7,7E6	c
80	3	9,E6	c
29	3	1,53E7	b
74	3	8,9E7	a

ANOVA para la variable concentración de P en peciolo de *S. phureja*.

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	37454,1	11	3404,92	26,78	0,0000
Intra grupos	3050,93	24	127,122		
Total (Corr.)	40505,1	35			

Contraste Múltiple de Rango para resultado según tratamiento

Método: 95,0 porcentaje Duncan

tratamiento	Frec.	Media	Grupos homogéneos
T1	3	38,1181	e
28	3	49,0435	ed
63	3	55,1345	edc
104	3	55,6158	edc
95	3	63,503	dc
108	3	68,6218	dc
36	3	73,6775	c
M1	3	74,0383	c
80	3	105,115	b
29	3	118,198	b
74	3	120,537	b
102	3	145,985	a

ANOVA para la variable %F en raíces de *S. phureja*

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	8123,99	10	812,399	5,22	0,0006
Intra grupos	3423,88	22	155,631		
Total (Corr.)	11547,9	32			

Contraste Múltiple de Rango para %F según tratamiento

Método: 95,0 porcentaje Duncan

tratamiento	Frec.	Media	Grupos homogéneos
control	3	38,9067	e
102	3	48,3333	ed
36	3	60,32	dc
28	3	63,1133	dcb
80	3	63,4433	dcb
micorriza	3	69,05	dcb
63	3	71,3133	cb
29	3	78,0367	cba
95	3	79,2933	cba
74	3	82,4733	cba
108	3	84,28	ba
104	3	94,0667	a

ANOVA para la variable % M en raíces de *S. phureja*

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	4811,08	11	437,371	3,23	0,0079
Intra grupos	3248,89	24	135,37		
Total (Corr.)	8059,97	35			

Contraste Múltiple de Rango para %M según tratamiento

Método: 95,0 porcentaje Duncan

tratamiento	Frec.	Media	Grupos homogéneos
102	3	14,3667	d
control	3	16,4533	d
28	3	21,4467	dc
80	3	21,7567	dcb
63	3	26,0867	dcb
74	3	28,1867	dcb
36	3	29,8133	dcb
29	3	34,09	dcba
micorriza	3	39,3	cba
108	3	41,8033	cba
95	3	44,11	ba
104	3	54,2	a

ANOVA para la variable %A en raíces de *S. phureja*

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	2693,05	10	269,305	2,15	0,0646
Intra grupos	2754,2	22	125,191		
Total (Corr.)	5447,25	32			

Tabla ANOVA para la variable %m en raíces de *S. phureja*

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	3268,36	10	326,836	1,65	0,1584
Intra grupos	4369,07	22	198,594		
Total (Corr.)	7637,43	32			

Tabla ANOVA para la variable %a en raíces de *S. phureja*

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	8,59744E6	10	859744,0	1,01	0,4627
Intra grupos	1,86515E7	22	847793,0		
Total (Corr.)	2,72489E7	32			

ANOVA para la variable peso seco foliar

Source	DF	SS	MS	F	P
TRATAMIENTO	11	1,127	0,102	0,66	0,767
Error	36	5,603	0,156		
Total	47	6,731			

S = 0,3945 R-Sq = 16,75% R-Sq(adj) = 0,00%

ANOVA para la variable para peso seco raíz

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	5,56902	11	0,506275	5,84	0,0000
Intra grupos	3,11932	36	0,0866479		
Total (Corr.)	8,68835	47			

Contraste Múltiple de Rango para peso seco raíz según trata

Método: 95,0 porcentaje Duncan

trata	Frec.	Media	Grupos homogéneos
29	4	0,78	d
80	4	0,795	d
28	4	0,8975	dc
102	4	0,9325	dc
74	4	1,0725	dcb
108	4	1,205	dcb
micorriza	4	1,2275	dcb
104	4	1,3475	cb
control	4	1,3725	cb
36	4	1,4325	b
95	4	1,45	b
63	4	2,04	a

ANEXO 10. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN LINEAL DE PEARSON

CULTIVO MONOXENICO

	area bacteria	po4 en raices	longitud hif	esporas
po4 en raices	0,148 0,664			
longitud hif	-0,692 0,018	-0,170 0,616		
esporas	-0,371 0,261	0,142 0,677	0,304 0,364	
bas	-0,604 0,049	-0,328 0,325	0,777 0,005	-0,145 0,670
esporas/bas	-0,002 0,994	0,192 0,572	-0,101 0,768	0,870 0,000
esporas/bas	bas -0,589 0,057			

CULTIVO EN MACETAS

	po4 en raices	ufc en rizos	parte aerea	seco raiz
ufc en rizos	0,463 0,152			
parte aerea	0,604 0,049	0,366 0,268		
seco raiz	-0,582 0,060	-0,445 0,170	-0,424 0,194	
%F	-0,017 0,960	0,410 0,210	-0,243 0,472	0,081 0,812
%M	-0,268 0,426	0,064 0,853	-0,427 0,190	0,217 0,522
%A	-0,284 0,398	-0,048 0,889	-0,495 0,122	0,175 0,606
	%F	%M		
%M	0,867 0,001			
%A	0,821 0,002	0,977 0,000		

INTERPRETACIÓN:

Contenido de la celda: Correlación de Pearson
Valor P (Nivel de confianza 95%)

El análisis de correlación lineal es un índice estadístico que permite medir la fuerza de relación lineal entre dos variables. Su resultado fluctúa entre -1 y 1, donde -1 es una correlación negativa perfecta y 1 es una correlación positiva perfecta. Valores cercanos a cero indican ausencia de correlación.