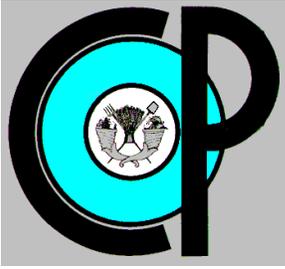


COLEGIO DE POSTGRADUADOS



INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD-
FISIOLOGÍA VEGETAL

HONGOS MICORRÍZICOS ERICOIDES Y SUS EFECTOS EN PLANTAS DE ARÁNDANO AZUL (*Vaccinium corymbosum* L.) cv BILOXI MICROPROPAGADAS

JORGE HUMBERTO LEÓN OSORIO

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, MÉXICO

Enero de 2016

La presente tesis titulada: **HONGOS MICORRÍZICOS ERICOIDES Y SUS EFECTOS EN PLANTAS DE ARÁNDANO AZUL (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. BILOXI MICROPROPAGADAS**, realizada por el alumno: Jorge Humberto León Osorio, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FISIOLOGÍA VEGETAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



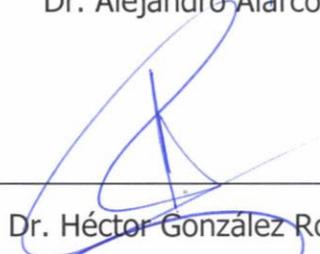
Dr. Ronald Ferrera Cerrato

ASESOR



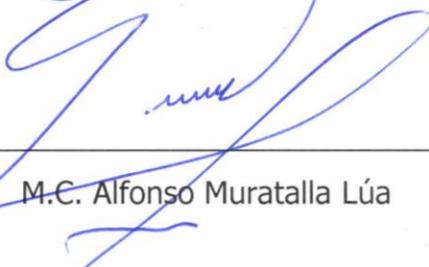
Dr. Alejandro Alarcón

ASESOR



Dr. Héctor González Rosas

ASESOR



M.C. Alfonso Muratalla Lúa

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Enero de 2017

HONGOS MICORRÍZICOS ERICOIDES Y SUS EFECTOS EN PLANTAS DE ARÁNDANO AZUL (*Vaccinium corymbosum* L.) CV BILOXI MICROPROPAGADAS

Jorge Humberto León Osorio, M. en C.
Colegio de Postgraduados

RESUMEN

Se realizó la búsqueda de hongos micorrízicos ericoides mediante aislamientos a partir de raíces de *Vaccinium confertum* HKB, de los aislamientos se identificó por métodos moleculares a *Leptodontidium orchidicola*, el cual se inoculó en el proceso de enraizamiento de microestacas de arándano azul *Vaccinium corymbosum* L. cv. Biloxi. Se desarrolló un protocolo para la obtención masiva de plantas de alta calidad fitosanitaria, por cultivo *in vitro*. La aplicación de 2iP ejerció un efecto favorable sobre la regeneración de brotes a partir de yemas axilares, así como el efecto de AIB en el proceso de enraizamiento de microestacas. A partir del aislamiento de hongos, se observó que *L. orchidicola* desarrolló un complejo de hifas dentro de las células de la epidermis de raíces de arándano azul, similar a los enrollamientos hifales típicos de la micorriza ericoide. La inoculación de este hongo también promovió el crecimiento radical y vegetativo; así como, la acumulación de mayor cantidad de biomasa en esta planta. Este es el primer reporte de *L. orchidicola* como endófito en raíces de *V. confertum*, y de su asociación con *V. corymbosum*. La inoculación de *L. orchidicola* podría utilizarse como herramienta biotecnológica importante para el enraizamiento plantas de arándano azul con alta calidad fitosanitaria, obtenidas por técnicas de cultivo *in vitro* utilizando el protocolo generado en esta investigación.

Palabras clave: Cultivo *in vitro*, *Vaccinium*, enraizamiento, hongos, *Leptodontidium*, *Cenococum*, micorriza ericoide, enrollamientos hifales.

**ERICOID MYCORRHIZAL FUNGI AND EFFECTS ON MICROPROPAGATED
BLUEBERRY (*Vaccinium corymbosum* L.) PLANTLETS, CV BILOXI**

**Jorge Humberto León Osorio, M. en C.
Colegio de Postgraduados**

ABSTRACT

This research isolated potential ericoid mycorrhizal fungi from roots of *Vaccinium confertum* HKB, and *Leptodontidium orchidicola* was identified by means of molecular techniques and then, inoculated during the rooting of microcuttings of blueberry plants (*Vaccinium corymbosum* L. cv. Biloxi). First, an *in vitro* protocol was developed for the massive propagation of plantlets with high health quality. The application of 2iP had significant effects on shoot regeneration from axillary buds; the IBA also favored the rooting of microcuttings. Regarding fungi isolation, *L. orchidicola* developed hyphal complexes in epidermal cells resembling the typical hyphal coils of the ericoid mycorrhiza. The inoculation of this fungus resulted in improved vegetative and root growth, and plant biomass. Results provide the first report of *L. orchidicola* as an endophyte in roots of *V. confertum*, and as potential symbiont for *V. corymbosum*. The inoculation of *L. orchidicola* may be utilized as a biotechnological tool for improving the rooting of blueberry plants obtained from the *in vitro* culture protocol developed in this research.

Keywords: *in vitro* culture, *Vaccinium*, seed germination, rooting, fungi, *Leptodontidium*, *Cenococcum*, ericoid mycorrhiza, hyphal coils.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por el don de la Vida y por las infinitas bendiciones recibidas.

Al pueblo de México que a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología ha financiado esta investigación.

Al Colegio de Postgraduados por abrirme las puertas y por todo el apoyo recibido.

Al Dr. Ronald Ferrea Cerrato por sus sabios consejos y por la disciplina aplicada a la investigación y a mi persona.

Al Dr. Alejandro Alarcón por el tiempo dedicado a la revisión del presente documento.

Al Dr. Héctor González Rosas por el apoyo en el desarrollo del protocolo de cultivo *in vitro* de la planta estudiada.

Al M.C. Alfonso Muratalla Lúa, por los invaluable conocimientos compartidos.

Al Dr. Roberto Garibay Origel por la identificación de los hongos en el Laboratorio de Sistemática y Ecología de Micorrizas (Facultad de Biología de la UNAM).

Al M.C. Jorge Valdez por el apoyo, con las valiosas fotografías del presente trabajo.

DEDICATORIAS

Al pueblo de México esperando que esta investigación sea de utilidad y tarde o temprano se beneficie con lo aquí encontrado.

A mi Padre Antonio León y a mi Madre Guadalupe Osorio, por los consejos y por su ejemplo de trabajo, rectitud y justicia.

A mis Hermanos Reynol. Abel, Julio, Neli, Carmen, Gloria y Viky por toda una vida de experiencias compartidas.

A Mi esposa Ada Rodríguez por todo el apoyo y la paciencia para con mi persona.

A mi hija Sofía por la motivación recibida cada vez que la veo o recuerdo.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT	iv
INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN.....	4
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	5
Objetivo general	5
Objetivos específicos	5
Hipótesis general	5
Hipótesis particulares.....	5
Importancia de la Familia Ericaceae	6
Descripción de Arándano azul	7
La realidad de los arándanos en México.....	8
Crecimiento de la superficie cultivada en México.....	9
Rentabilidad del cultivo en México	10
Crecimiento de la producción y la demanda a nivel Mundial	11
CULTIVO <i>IN VITRO</i>	13
Etapa 0. Cuidados de la Planta Madre	13
Etapa 1. Establecimiento.....	13
Etapa 2. Multiplicación.....	14
Etapa 3. Enraizamiento	14
Etapa 4. Aclimatación.....	14
REGULADORES DE CRECIMIENTO	15

Triacontanol	15
Brasinoesteroides	15
Citocininas	16
Auxinas	16
<i>Vaccinium corymbosum</i> L. cv. Biloxi	17
Importancia ecológica de la micorriza ericoide en los grandes biomas en el mundo	20
Morfología de la micorriza ericoide	21
Hongos micorrízicos ericoides en Ericáceas.....	26
Atributos fisiológicos de la micorriza ericoide en cultivos puros	29
Actividad enzimática de la micorriza ericoide.....	30
Atributos fisiológicos de la simbiosis micorrízica ericoide	31
Asimilación de nitrógeno por la micorriza ericoide	32
Asimilación de P por la micorriza ericoide.....	34
CAPÍTULO 1.	36
DESARROLLO DEL PROTOCOLO PARA LA PROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i> DE ARÁNDANO AZUL (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) CV. BILOXI	36
RESUMEN	36
CHAPTER 1.....	37
PROTOCOL FOR THE <i>in vitro</i> PROPAGATION OF BLUEBERRY PLANTS (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) CV. BILOXI	37
ABSTRACT	37
INTRODUCCIÓN.....	38
MATERIALES Y MÉTODOS.....	40

Propagación vegetativa en medio WPM.....	40
Enraizamiento	43
Aclimatación.....	44
Peso seco de plántulas obtenidas después de la aclimatación.....	44
RESULTADOS	45
Establecimiento.....	45
Multiplicación.....	45
Enraizamiento	48
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIONES.....	52
CAPÍTULO 2.	53
INOCULACIÓN DE HONGOS AISLADOS DE RAÍCES DE <i>Vaccinium confertum</i> HKB EN PLÁNTULAS DE ARÁNDANO AZUL (<i>V. corymbosum</i> L cv. Biloxi) OBTENIDAS POR CULTIVO <i>IN VITRO</i>	53
RESUMEN	53
CHAPTER 2.....	54
INOCUATION OF FUNGI ISOLATED FROM ROOTS OF <i>Vaccinium confertum</i> HKB ON <i>in vitro</i> CULTURED BLUEBERRY PLANTLETS (<i>V. corymbosum</i> L cv. Biloxi).....	54
ABSTRACT	54
INTRODUCCIÓN.....	55
MATERIALES Y MÉTODOS.....	56
Recolecta de material vegetal	56
Estudio de las raíces.....	57

Aislamientos de hongos de raíces de <i>V. confertum</i>	57
Microcultivos de Riddell.....	58
Inoculación de <i>Cenococcum geophilum</i> en semillas de <i>Vaccinium corymbosum</i> L. pregerminadas.....	59
Inoculación de <i>Cenococum geophilum</i> , <i>Leptodontidium orchidicola</i> , y cepas A1 y A2 en plántulas de arándano azul micropropagadas	60
RESULTADOS	61
Caracterización morfológica.....	61
Inoculación de <i>Cenococcum geophilum</i> en semillas de <i>Vaccinium corymbosum</i> pregerminadas.....	63
Inoculación de <i>Cenococcum geophilum</i> , <i>Leptodontidium orchidicola</i> , las cepas A1 y A2 en plántulas de arándano azul micropropagadas	64
DISCUSIÓN	67
CONCLUSIONES	71
CAPÍTULO 3	73
CONCLUSIONES GENERALES	73
LITERATURA CITADA	76
ANEXO 1	94
ANEXO 2	95
ANEXO 3	96
ANEXO 4	97

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Planta de arándanos con frutos cv. Biloxi. (Tomado de Fall Creck, 2016).	17
Figura 2. Raíces de <i>Vaccinium corymbosum</i> L., en una plantación de producción intensiva (Tomado de León, 2012).	22
Figura 3. Características anatómicas y morfológicas de la micorriza ericoide en raíces de <i>Vaccinium myrtillus</i> . A) Corte longitudinal de la raíz que muestra zona ocupada por las hifas. Las hifas forman una capa (flechas) que penetran las paredes de las células epidérmicas (puntas de flecha) y forman densos enrollamientos hifales típicos de la micorriza ericoide (asteriscos). Tinción con azul tripano barra=20µm. B) Vista de la superficie de la micorriza ericoide que muestra una capa densa de hifas que cubre el falso pelo radical teñido con azul tripano, barra=20µm. C) Sección transversal del falso pelo radical cubierto por una capa de hifas (puntas de flecha), células de la epidermis (rc) llena de enrollamientos hifales (flechas). El micobionte nunca avanza al cortex (c), endodermis (e), o el cilindro vascular (vc), barra= 20µm. D) Vista superficial de una raíz con un hongo micorrízico ericoide que muestra una densa capa de hifas, barra=50µm (Tomado de Vohnik <i>et al.</i> 2012).	23
Figura 4. Raíz fina de <i>Calluna vulgaris</i> . El tejido de la planta se muestra en color claro y el hongo en rojo. Finas hifas (hy) rodean las células de la epidermis (ep), y los enrollamientos de hifas son visibles a través de las paredes transparentes de las células epidérmicas barra=50µm (Tomado de Rath <i>et al.</i> 2014).	24
Figura 5. Apotecios formados por diferentes especies de <i>Hymenoscyphus</i> = <i>Rhizoscyphus</i> . A) <i>H. brevicellulus</i> ; B) <i>H. hyaloexcipulus</i> ; C) <i>H. microcaudatus</i> ; D) <i>H. subsymmetricus</i> ; E) <i>H. subpallenscens</i> (Tomado de Zheng y Zhuang, 2012).	24

Figura 6. A) Crecimiento de hongo micorrízico ericoide en medio agar suplementado con fosfato de zinc y alanina. B) Segmentos de hifas de hongos micorrízicos ericoides formando artroconidios creciendo en forma de zig-zag; barra= 30 μ m (Tomado de Gibson, 2004).....	25
Figura 7. Número de brotes de arándano regenerados por sub-cultivo, cada 6 semanas. n= 100.....	46
Figura 8. Brotes de <i>Vaccinium corymbosum</i> L. cv. Biloxi bien definidos después de seis semanas después de la siembra, en medio WPM.....	47
Figura 9. A) Plántula de arándano aclimatada extraída de la caja plástica con sustrato. B) Raíces de una plántula de arándano sumergidas en agua en un recipiente transparente.	49
Figura 10. A) <i>Vaccinium conferum</i> HBK. B) <i>Vaccinium corymbosum</i> L cv. Biloxi.....	56
Figura 13. Aspectos de raíces de <i>Vaccinium corymbosum</i> . Testigo sin inocular (A), e inoculadas con <i>Leptodontidium orchidicola</i> : B) presencia de enrollamientos de hifas en las células de la epidermis, C) hifas en las células de la epidermis, y D) hifas melanizadas en células de la epidermis, a los 120 días después de la inoculación.	66

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Arándanos silvestres (<i>Vaccinium</i> sp.) presentes en México colectados en México y guardados en las colecciones biológicas del herbario nacional a cargo del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM, 2015).....	8
Cuadro 2. Crecimiento de la producción de Arándanos (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) en México.	10
Cuadro 3. Superficie plantada de arándanos por estado en el 2014 de acuerdo al Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP).....	11
Cuadro 4. Hongos que con frecuencia forman micorriza ericoide con las raíces de plantas ericáceas (Modificado de Xiao y Berch, 1995).	28
Cuadro 5. Enzimas producidas por HMEr para degradar diferentes sustratos (Modificado de Leake y Read, 1997).	31
Cuadro 6. Tratamientos evaluados para contrastar el efecto de diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento en la producción <i>in vitro</i> de brotes de arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) azul cv Biloxi.....	43
Cuadro 7. Tratamientos probados para la inducción de enraizamiento de microestacas de arándano azul <i>Vaccinium corymbosum</i> cv. Biloxi.....	44
Cuadro 8. Efecto de diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento en la producción <i>in vitro</i> de brotes de arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) azul cv Biloxi.....	46
Cuadro 9. Perspectiva de producción de entrenudos, brotes, y plántulas de arándano ejecutando el protocolo desarrollado en esta investigación.	48
Cuadro 10. Enraizamiento y aclimatación de arándano Azul (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) cv. Biloxi, después de 60 días de cultivo.....	49

Cuadro 11. Protocolo para la producción de plántulas de arándano <i>Vaccinium corymbosum</i>	
cv. Biloxi.....	50

INTRODUCCIÓN

Los arándanos azules son considerados como una “super fruta”, por sus beneficios nutricionales, como lo es su alto contenido de antioxidantes (Routray *et al.* 2011). El mercadeo utilizando este mensaje ha sido clave para que la demanda de arándanos frescos, congelados, o deshidratados, haya crecido de forma importante, considerando que en Estados Unidos de América existe demanda de arándanos frescos durante todo el año, no importándoles a los consumidores si es invierno o es verano, situación por la cual la estacionalidad en su producción, pasa a ser un tema secundario (Campos, 2012). Lo anterior explica por qué es tan importante abastecer el mercado durante todo el año, ya que con un suministro continuo, la demanda se mantiene activa (Bascopé, 2011).

En el año 2000, el North American Blueberry Council (NABC) emitió un mandato federal para la promoción y el mercadeo del arándano, en el que el NABC estableció un aporte monetario por parte de los productores para ser administrado por el U.S. Highbush Council (USDA, 2000). Estos fondos fueron invertidos en estudios de investigación médica sobre los beneficios para la salud asociados al consumo de arándanos, específicamente sobre las propiedades antioxidantes (USDA, 2002). Los resultados de estas investigaciones han sido muy exitosos, y las cifras así lo revelan con un aumento en el consumo per cápita de arándanos de 117 g, en el año 2000 a 565 g, en 2011 sólo en E.U.A. (Villata, 2014).

Como resultado de las investigaciones realizadas por sugerencia del NABC, se encontró que el arándano es una fuente rica en antioxidantes tales como compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas (Wu *et al.* 2004; Prior *et al.* 2001). Estas sustancias tienen efectos antiinflamatorios

y antioxidantes que están implicados en la mejora de la condición cardiovascular y tienen propiedades anticancerígenas y antienvjecimiento, debido a la estabilización de la membrana celular (Bunea *et al.* 2011; Liu *et al.* 2015; McAnulty *et al.* 2014). Las antocianinas tienen la capacidad de absorber los radicales libres (Skarede *et al.* 2000) y pueden prevenir diferentes tipos de cáncer (Li-Shu *et al.* 2008), tal es el caso de la delfinidina, antocianina contenida en frutos de arándano azul, la cual es un potente compuesto preventivo del cáncer de próstata (Hyeonseok *et al.* 2015).

Dada la limitada disponibilidad de mano de obra y regulaciones restrictivas, la industria de arándanos en Estados Unidos se enfrenta a una situación donde la tendencia hacia la cosecha mecanizada va en aumento, cosa que limita el uso de la fruta sólo para el mercado de procesados (SDR Jalisco, 2011). Además, la seguridad alimentaria y trazabilidad asociadas al consumo de fruta fresca, seguirán siendo un área prioritaria para la industria de arándanos. La inversión en plantaciones de variedades tempranas y tardías y el uso de tecnologías como la producción bajo túneles, pueden ofrecer a los productores en México la oportunidad de mejorar la rentabilidad del negocio apuntando a la ventana de precios para fruta fresca entre noviembre y marzo (SDR Colima, 2010).

Debido a lo anterior, empresas nacionales y extranjeras procedentes principalmente de Chile y E.U.A., han decidido invertir en México para impulsar la producción de arándanos para consumo en fresco, por su parte los gobiernos regionales, como el caso del estado de Jalisco, en coordinación con la Fundación Produce Jalisco, pretenden establecer en las regiones sur y sureste del estado en un plazo de cinco años, una superficie de 4,000 hectáreas de arándano,

involucrando a 800 productores aproximadamente (Bascopé, 2011). Desde febrero de 2010 se encuentra en operaciones un vivero en Jalisco que empezó produciendo 300 mil plantas de arándano cv. Biloxi en dos naves, y ha crecido para el 2014 a 1 millón de plantas. Sin embargo, el vivero ampliará sus instalaciones para producir hasta tres millones de plantas por año; aunado a esto existen alianzas con empresas especializadas para el empaque y la comercialización del producto para garantizar el mercado de exportación de arándanos frescos (SDR, Jalisco, 2014).

Vaccinium es un género con 450 especies aproximadamente, las cuales se encuentran distribuidas en el hemisferio norte, Mesoamérica, el Este de India, Sudamérica, Este de África y Madagascar, Malasia y el Pacífico (Wilbur y Luteyn 2008), en donde se han descrito 27 especies pertenecientes a ese género y que son endémicas en una región que va desde México hasta Panamá, entre las que se encuentra *V. confertum* HBK, sobre la cual no existen estudios de diversidad de hongos que se asocien a sus raíces.

Los hongos micorrízicos ericoides (HMEr) son simbioses en raíces de plantas de la familia Ericaceae, entre las que se encuentra el género *Vaccinium* (Gibson y Mitchell 2004). Esta asociación ha permitido a estas plantas adaptarse a diferentes hábitats, desde los suelos con altos contenidos de materia orgánica del hemisferio norte, hasta los suelos arenosos del hemisferio sur (Mitchell y Gibson, 2006). La asociación de las plantas ericáceas con HMEr mejora la eficiencia en la asimilación de N y P por la planta (Vohník *et al.* 2005). Por ejemplo, de HMEr en plantas de rododendron en condiciones *in vitro* aumentó el crecimiento vegeta (Jansa y Vosátka, 2000). De manera similar diferentes HMEr promovieron el crecimiento radical y vegetativo de *V. corymbosum in vitro* (Eccher y Noé, 2002).

JUSTIFICACIÓN

La importancia de realizar este trabajo de investigación radica en tres razones importantes.

1. No existen investigaciones que aborden la diversidad de HMEr en arándanos silvestres en México, por lo que el aislamiento de hongos que provengan de raíces de *Vaccinium confertum* HKB, recolectado en Tenejapa Chiapas, aportará información relevante, sobre la diversidad de hongos simbioses en esta planta.
2. Dado el incremento continuo en la superficie plantada en México de arándano azul para exportación en fresco, existe una creciente demanda por plantas de la más alta calidad genética y fitosanitaria, por lo que el protocolo de propagación *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* L. cv. Biloxi a desarrollar, aportará información fundamental en esta área del conocimiento.
3. Las investigaciones sobre hongos aislados de Ericáceas silvestres de México, e inoculados en arándanos cultivados, son nulas, por lo que esta investigación aportará información de importancia biotecnológica, la cual podría mejorar la fase de producción masiva de plantas producidas *in vitro*.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general

- Analizar los efectos de la inoculación de hongos micorrízicos ericoides en plantas de arándano azul (*Vaccinium corymbosum* L.) obtenidas por técnicas de cultivo *in vitro*.

Objetivos específicos

- Aislar hongos micorrízicos ericoides presentes en raíces de arándano silvestre *Vaccinium confertum* HBK.
- Desarrollar un protocolo para obtener plántulas de arándano cv Biloxi mediante técnicas de cultivo *in vitro*.
- Evaluar el efecto de la inoculación de hongos micorrízicos ericoides en la fase de enraizamiento de plántulas de arándano *Vaccinium corymbosum* L.

Hipótesis general

- Los hongos micorrízicos ericoides aislados de *Vaccinium confertum* HKB favorecerán el crecimiento radicular y vegetativo de plántulas micropropagadas de arándano azul *V. corymbosum*, cv. Biloxi.

Hipótesis particulares

- Se aislarán hongos micorrízicos ericoides de raíces *V. confertum*. HBK.
- Se desarrollará un protocolo para la propagación *in vitro* de arándano azul.
- La inoculación de hongos micorrízicos ericoides en plántulas de arándano *V. corymbosum* L. micropropagadas favorecerá el crecimiento radicular y vegetativo.

REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia de la Familia Ericaceae

Las plantas de la familia Ericaceae se encuentran ampliamente distribuidas en el Ártico, regiones templadas y tropicales; además, este grupo domina los brezales que son suelos pobres en nutrientes en los hemisferios norte y sur (Read, 1996). Hasta la década de 1990, las relaciones entre las plantas que comprenden el orden Ericales eran abordadas mediante enfoques evolutivos tradicionales que implicaban en gran medida, el uso de caracteres morfológicos (Cronquist, 1981). En ese sentido, Ericaceae, Epacridaceae y Empetraceae fueron reconocidas como familias distintas, tiempo después con la aplicación combinada de metodologías morfológicas y moleculares, el uso de secuencias de ADN nuclear y del cloroplasto, han permitido una profunda re-evaluación de las relaciones que guardan las plantas que pertenecen al orden Ericales (Kron *et al.* 2002). En este análisis, las plantas que tradicionalmente fueron vistas como miembros de Epacridaceae y Empetraceae, pierden su categoría de Familia y se colocan en las tribus Styphelioideae y Ericoideae respectivamente, dentro de la familia Ericaceae. Una característica estructural adicional de las principales tribus de la familia Ericaceae es que se han especializado únicamente en sus raíces distales en las que las células epidérmicas son invadidas por hongos (principalmente ascomicetos), formando la típica micorriza ericoide (Mitchell y Gibson, 2006).

En el reordenamiento de las plantas que pertenecen a la familia Ericaceae, basándose en características morfológicas, anatómicas y moleculares, Kron *et al.* (2002) dividen a la Familia Ericaceae en las siguientes tribus: Arbutoideae, Ericoideae, Cassiopoideae, Vaccinioideae, Styphelioideae, Monotropeoideae y Enkianthoideae.

Descripción de Arándano azul

El arándano azul (*Vaccinium corymbosum* L.) es un arbusto nativo de Norte América, mide entre 1.80 y 3.5 metros de altura y crece erecto, cuyo arbusto crece en forma de corona; sus ramas son de color amarillo-verde y rojizas en invierno, las hojas son caducas, alternas, simples, elípticas u ovals de 2.5 a 5 cm de largo, con una ligera pubescencia por encima de la cera, en las venas y en el envés (USDA, 2002). Las flores son blancas teñidas de color rosa con cinco pétalos en forma de urna, y se producen en grupos de ocho a diez, la fructificación se produce 62 días después de la floración, los frutos son bayas de color azul-negro con muchas semillas (Fall creek, 2016). *Vaccinium* es un género con 450 especies aproximadamente, las cuales se encuentran distribuidas en el Hemisferio Norte, Mesoamérica, el Este de India, Sudamérica, Este de Africa y Madagascar, Malasia y el Pacífico; en ese sentido, Wilbur y Luteyn (2008) describieron 27 especies pertenecientes a ese género y que son endémicas en una región que va desde México hasta Panamá.

Los arándanos tienen un alto valor nutricional y propiedades antioxidantes, cualidades que se reflejan en una creciente demanda para consumo en fresco y para la industria farmacéutica (Bunea *et al.* 2011). Estas frutas son una fuente rica de antioxidantes tales como fenoles, flavonoides y antocianinas, sustancias que tienen efectos antiinflamatorios y antioxidantes que están implicados en la mejora de la condición cardiovascular y tienen propiedades antienvjecimiento, debido a la estabilización de la membrana celular (McAnulty *et al.* 2014). Por ejemplo, la delfinidina contenida en frutos de arándano es un potente compuesto preventivo del cáncer de próstata (Hyeonseok *et al.* 2015). Las antocianinas tienen la capacidad de absorber radicales libres (Skarede *et al.* 2000), y pueden prevenir diferentes tipos de cáncer (Li-Shu *et al.* 2008).

México cuenta con una gran diversidad de especies de plantas, de las cuales para muchas, la única característica estudiada es su descripción botánica para ubicarla dentro de algún taxón, en esa circunstancia se encuentran diferentes especies de arándanos (UNAM, 2015) que habitan de forma silvestre en nuestro país. Las especies citadas en el cuadro 1, han sido colectadas en regiones con altitudes superiores a 1800 msnm, y todas ellas corresponden a sierras, donde la vegetación es bosque de pino-encino, los cuales son el hábitat natural de éste género de plantas.

Cuadro 1. Arándanos silvestres (*Vaccinium* sp.) presentes en México colectados en México y guardados en las colecciones biológicas del herbario nacional a cargo del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM, 2015).

Especie	Estado	Municipio	Localidad	msnm
<i>V. confertum</i>	Chiapas	Tenejapa	Tenejapa	2060
<i>V. confertum</i>	Guatemala	Huehuetenango	Santa Eulalia	2397
<i>V. confertum</i>	Oaxaca	Ixtlan	Cerro del humo chico	3240
<i>V. confertum</i>	Tamaulipas	Miquihuana	La peña	1892
<i>V. confertum</i>	Hidalgo	Ixmiquilpan	Lagunita	2540
<i>V. consanguineum</i>	Oaxaca	San Felipe	Santa Cruz	2850
<i>V. cordatum</i>	Veracruz	Xico	Las cruces	2600
<i>V. costaricense</i>	Oaxaca	San Juan Q.	Santa María T	1120
<i>V. geminiflorum</i>	México		-	-
<i>V. kunthianum</i>	Tamaulipas	Hidalgo	Puerto Purificación	400
<i>V. leucanthum</i>	Oaxaca	Totontepec	Tamazulapan	2029
<i>V. lundellianum</i>	Chiapas	Motozintla	Niquivil	2786
<i>V. matudae</i>	Chiapas	Siltepec	Barranca Honda	1280
<i>V. minarum</i>	Chiapas	Villaflores	Cerro Tres Picos	2250
<i>V. stramineum</i>	San Luis P.	Guadalcázar	Mina de Plata	2050
<i>V. wilburri</i>	Guerrero	Puerto de Gallo	Toro Muerto	2530
<i>V. chihuahuense</i>	Chihuahua	Mojarachic	Mojarachic	2180

La realidad de los arándanos en México

La industria mexicana del arándano es relativamente nueva y se está convirtiendo en un actor importante de la producción mundial ya que está experimentando un gran impulso dado principalmente por las ventajas comparativas competitivas que ofrece para la producción de este cultivo (Bascopé, 2011), entre las que se mencionan:

- ✓ Costo de mano de obra relativamente bajo comparado con otros países productores.
- ✓ Cercanía con los mercados de exportación, principalmente E.U.A.
- ✓ Condiciones de suelo y clima óptimas para el cultivo.
- ✓ Época de producción en los meses de precios altos (noviembre a marzo).
- ✓ Disponibilidad de agua de buena calidad.

Con las ventajas competitivas que ofrece el cultivo de arándanos, expuestas anteriormente, empresas locales y extranjeras principalmente de Chile y E.U.A. han decidido invertir en México para impulsar el desarrollo de esta industria (SDR, Jalisco 2011). Por su parte, los gobiernos regionales, como el caso del estado de Jalisco, en coordinación con la Fundación Produce Jalisco, pretenden establecer en las regiones sur y sureste del estado en un plazo de cinco años, una superficie de 4,000 hectáreas de arándano, involucrando a 800 productores aproximadamente (SDR Jalisco, 2011).

Con la intención de coadyuvar al desarrollo de la industria de arándanos, en el estado de Jalisco se encuentra en operaciones desde febrero de 2010, un vivero que cuenta con 300 mil plantas en dos naves; sin embargo, el vivero ampliará sus instalaciones para producir hasta tres millones de plantas por año, aunado a esto existen alianzas con empresas especializadas para el empaque y la comercialización de la fruta fresca (Bascopé, 2014).

Crecimiento de la superficie cultivada en México

Debido al incremento del consumo per cápita de arándanos frescos a nivel mundial, ha propiciado que países como México se sumen a producir arándanos para satisfacer esa demanda

(SIAP, 2015), este crecimiento ha sido importante en los últimos años y se refleja en la superficie cultivada así como la producción por estados como se observa en el cuadro 2.

Cuadro 2. Crecimiento de la producción de Arándanos (*Vaccinium corymbosum* L.) en México.

Año	Superficie Hectáreas	Producción toneladas	Rendimiento Tonelada/hectárea	Precio Tonelada
2014	1,843	18,031	10	51,966
2013	1,517	10,160	7.88	45,887
2012	1,153	7,190	8.13	44,356
2011	783	6,704	10.54	23,296
2010	402	1,059	9.99	19,568
2009	196	1,595	8.4	6,737
2005	60	260	4.33	20,000
2000	60	285	4.75	6,105

Rentabilidad del cultivo en México

Comparado con cultivos tradicionales como maíz y caña de azúcar, la rentabilidad que provee el cultivo de arándanos de exportación para su consumo en fresco se encuentra por encima de éstos (SDR Colima, 2010). Con datos obtenidos de una empresa productora de arándanos en el estado de Jalisco, se puede apreciar que este cultivo ofrece una alta rentabilidad con una utilidad de 59,000 dólares anuales por hectárea a partir del tercer año de producción (Bascopé, 2011). Dado que la superficie cultivada en México ha aumentado de forma importante en los últimos 15 años (SIAP, 2015), los estados que más destacan en su participación en ese aumento son Jalisco y Michoacán respectivamente, así como Puebla, Colima, Sinaloa y Baja California que también suman a esa superficie como se muestra en el cuadro 3.

Cuadro 3. Superficie plantada de arándanos por estado en el 2014 de acuerdo al Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP).

Estado	Superficie
Jalisco	835
Michoacán	150
Puebla	113
Baja California	193
Colima	406
México	15
Sinaloa	97
Sonora	34

Crecimiento de la producción y la demanda a nivel Mundial

Estados Unidos de América es el mayor productor mundial de arándanos con una producción de 230 millones de kilos en 2011, entre variedades arbustivas (highbush) y silvestres (lowbush), con un valor comercial de \$860 millones de dólares, siendo el segundo berry en importancia económica de ese país (OCPM, 2011). Este crecimiento en E.U.A. se ha sido impulsado por un mayor interés de los consumidores en seguir una alimentación sana, en gran parte gracias a los esfuerzos de la industria, la cual realizó una gran campaña de sensibilización en los consumidores sobre los beneficios para la salud, derivados del consumo de arándanos (Bains, 2013). Así, la demanda por arándano fresco ha crecido rápidamente en la última década gracias a la expansión de la producción destinada al mercado fresco y al rápido aumento de sus importaciones (Bains, 2014). Si bien en la década de los 90 y a comienzos del año 2000 los consumidores prefirieron los arándanos congelados, desde el año 2002 esta tendencia cambió a una preferencia por el producto fresco, superando al consumo de congelados (Villata, 2014).

Desde entonces la demanda por fruta fresca ha seguido en aumento, alcanzando un consumo per cápita record de 0.565 kg en el año 2011. Por su parte, el consumo per cápita de arándano congelado aumentó de 0.1 kg anuales en la década de los 80 a 0.256 Kg anuales en el año 2010 (Villata, 2014).

En el año 2000, el North American Blueberry Council (NABC) emitió un mandato federal para la promoción y marketing del arándano. El programa estableció un aporte monetario por parte de los productores para ser administrado por el U.S Highbush Council (USHBC) (USDA, 2000). Estos fondos fueron invertidos en estudios de investigación médica sobre los beneficios para la salud asociados con el consumo de arándanos, específicamente sobre las propiedades antioxidantes y al mismo tiempo en marketing y promoción (USDA, 2002). Los resultados han sido exitosos, obteniendo un aumento en el consumo per cápita de arándanos de 0.117 kg en el año 2000 a 0.565 kg por persona en 2011 (Bains, 2013).

Como resultado de la limitada disponibilidad de mano de obra y regulaciones restrictivas, la industria del arándano de Estados Unidos se enfrenta a una situación donde la tendencia hacia la cosecha mecanizada va en aumento, esta situación limita de forma sustancial el uso de la fruta sólo para el mercado de procesados (Brazelton, 2013). En ese sentido, la inversión en plantaciones de variedades tempranas y tardías y el uso de tecnologías como la producción bajo túneles, puede ofrecer a los productores la oportunidad de mejorar la rentabilidad del negocio para exportar fruta fresca que satisfaga la demanda entre noviembre y marzo en ese país (Brazelton, 2013).

CULTIVO *IN VITRO*

El cultivo de tejidos puede ser definido ampliamente como un conjunto heterogéneo de técnicas que presentan en común el hecho de que un explante que consiste en separar del vegetal pudiendo ser protoplastos, células desprovistas de pared celular, tejidos u órganos como raíces, hojas, yemas vegetativas, yemas florales entre otras y cultivarlas asépticamente en condiciones ambientales controladas (Mroginski *et al.* 2008).

Etapa 0. Cuidados de la Planta Madre

Esta etapa consiste en los cuidados con los que se atiende a la planta madre, para que sea donadora de explantes jóvenes, no endurecidos, con la menor carga de agentes estresantes que puedan oxidarlos, esto con el objetivo de obtener fragmentos vegetales lo más asépticos posibles con las condiciones fisiológicas y óptimas para el cultivo *in vitro*, así como con la calidad fitosanitaria adecuada (Hartman y Kester 1995). Si existe la posibilidad, es preferible que los explantes provengan de plantas donantes que crecen en condiciones de invernadero, con ello se reduce sustancialmente la tasa de contaminación (Pérez, 1998).

Etapa 1. Establecimiento

Durante la etapa de establecimiento, el explante pasa por una etapa de desinfección con productos químicos que sean letales para los microorganismos que se alojan en ellos, para que éstos no funjan como agentes contaminantes del medio y/o del material que se establece *in vitro* (Debergh y Zimmerman, 1991). Así mismo es recomendable evitar el uso de explantes sucios que provienen de plantas crecidas en macetas o en el campo dado que en la mayoría de los casos no es posible conseguir una buena desinfección de los mismos (Hurtado y Merino, 1991).

Etapa 2. Multiplicación

En el método de cultivo *in vitro* de plantas, la técnica que más avances ha tenido es la micropropagación, en particular en algunas especies ornamentales y frutales, donde su propagación es asexual y se desea conservar intacto el genotipo (Mroginski *et al.* 2008). En el cultivo de tejidos vegetales encontramos varias vías principales a seguir para multiplicar y regenerar plantas, entre ellas se encuentran: el desarrollo de yemas axilares o apicales, otra técnica es la organogénesis o diferenciación de brotes adventicios y por último, la embriogénesis asexual o diferenciación de embriones somáticos (Mroginski *et al.* 2008).

Etapa 3. Enraizamiento

La organogénesis consiste en establecer *in vitro*, tejidos organizados como yemas, ápices o meristemas, para obtener rápidamente brotes, que posteriormente se enraízan para obtener plantas completas (Doménech, 2010). La organogénesis somática, es el proceso mediante el cual se da lugar a la formación de órganos adventicios, que no son originados por el proceso natural del desarrollo de la planta, sino que se forman por un proceso de diferenciación celular (Doménech, 2010). Esta formación de órganos de *novo* puede darse de manera directa a partir del explante o bien indirectamente a partir de cultivo de callos (Davey *et al.* 2010).

Etapa 4. Aclimatación

Durante el periodo de incubación, los cultivos son expuestos a condiciones ambientales distintas al ambiente externo, la atmósfera interna se caracteriza por presentar una considerable variación diurna en la concentración de CO₂, humedad relativa elevada, temperatura constante e intensidad lumínica baja (Pospíšilová *et al.* 1999). A su vez, el medio de cultivo compuesto por

concentraciones elevadas de azúcares y reguladores de crecimiento, sumado a la ausencia de microorganismos, genera anomalías morfológicas y fisiológicas que las plantas deberán corregir cuando son transferidas al ambiente externo (Pospíšilová *et al.* 1999).

REGULADORES DE CRECIMIENTO

Triacantanol

Triacantanol (Tria) fue descubierto como regulador del crecimiento vegetal (Ries *et al.* (1977) en alfalfa (*Medicago sativa* L.), el cual es un componente natural de la cera epicuticular de diversos géneros como *Croton californicus*, *Vaccinium ashei*, *Copernicia cerífera*, *Phaseolus multiflorus*, *Trifolium repens*, *Medicago sativa* y *Jatropha curcas* (Hufford y Oguntimein 1978; Luzbetak *et al.* 1978; Freeman *et al.* 1979;). Cuando se usó Tria en cultivo *in vitro* de manzana (*Malus domestica*), se mejoró la elongación de múltiples brotes y raíces en plántulas micropropagadas (Tantos *et al.* 2001). Tria aumentó de forma significativa el número y longitud de brotes así como el número y la longitud de raíces de *Melissa officinalis* L. cultivada *in vitro* (Tantos *et al.* 1999). Además, el Tria indujo la formación de raíces en brotes de *Capsicum frutescens in vitro* (Reddy *et al.* 2002).

Brasinoesteroides

Los brasinoesteroides (Brs) son reguladores de crecimiento presentes en las plantas, que pertenecen al grupo de los esteroides que controlan la división y la elongación celular, la diferenciación del xilema, el crecimiento del tubo polínico, la reproducción y el desarrollo vascular, la polarización de la membrana, la activación de la bomba de protones, la activación de enzimas, la fotosíntesis y respuestas al estrés (Krisha, 2003; Talaat y Shawky 2012). Los efectos

de los Brs en el crecimiento y desarrollo de las plantas muestran sinergismo con otros reguladores de crecimiento vegetal, particularmente con auxinas (Hartdtke *et al.* 2007). Al respecto, la adición exógena de Epibrassinolide (Eb) en bajas concentraciones al medio de cultivo WPM suplementado con Zip y AIA muestran cambios positivos cuantitativos y cualitativos en la cantidad y calidad de brotes de *Vaccinium corymbosum* regenerados *in vitro* (Kudryashova *et al.* 2012). El Epibrassinolide promueve el crecimiento de la raíz de *Arabidopsis thaliana* en bajas concentraciones (Müssig *et al.* 2003).

Citocininas

Estas fitohormonas, estimulan la división celular y retrasan el envejecimiento en plantas. Las citocininas influyen en múltiples procesos bioquímicos, como la estimulación de la biosíntesis de los ácidos nucleicos y de diferentes enzimas como proteasas y ribonucleasas. También estimulan la germinación de semillas que necesitan luz y acortan el periodo de latencia de las yemas. Además, suprimen el crecimiento apical y estimulan la brotación de las yemas laterales (Jankiewicz, 2003).

Auxinas

En el cultivo *in vitro*, las auxinas promueven la formación de las raíces laterales y adventicias, y la inhibición correlativa de yemas y brotes laterales por el ápice del brote principal y por sus hojas jóvenes (Jankiewicz, 2003). Por ejemplo, los brotes de arándano azul fueron inducidos a enraizamiento en cajas plásticas usando peat moss (turba) como sustrato y tratadas con diferentes concentraciones de este regulador, en el que se encontró que un 15% de brotes de las cuatro variedades que se probaron producen raíces sin el tratamiento con auxina, y que para

superar el 70% de enraizamiento se necesitan entre 5 y 10 g del agente enraizador (Mihaljević *et al.* 2012).

***Vaccinium corymbosum* L. cv. Biloxi**

Biloxi es una variedad de arándano que originariamente fue desarrollada en Mississippi, para uso en el sureste de Estados Unidos. No obstante, ha llegado a ser la variedad principal para uso en zonas sin frío, en áreas de producción siempre verdes en el centro de México y Perú. Las principales características del cv. Biloxi la hacen una variedad ideal para regiones que no acumulan horas frío, sus hojas son fuertemente perennes, posee floración “primo caña” y poco daño (“desgarro”) al fruto al momento de cosechar (Fall Creek, 2016). Biloxi (Figura 1) es extremadamente vigorosa y produce buen rendimiento incluso en bloques sólidos” sin otras variedades, siempre y cuando haya suficientes abejas para asegurar una buena polinización; los frutos se caracterizan por ser de calibre mediano, color azul medio, buena firmeza y un sabor dulce (Spiers y Stringer 2002), uno de los desafíos principales de Biloxi es que el calibre de la fruta disminuye cuando las condiciones, o polinización, no son las adecuadas.



Figura 1. Planta de arándanos con frutos cv. Biloxi. (Tomado de Fall Creek, 2016).

La información vertida en páginas anteriores y considerando que es la especie frutícola que más rentabilidad ofrece, se observa un aumento importante la superficie plantada para la producción de arándanos en México. Además, por los bajos costos de producción, las ganancias en México se obtienen a partir del segundo o tercer año de establecida una huerta, a diferencia de Estados Unidos donde el cultivo es rentable a partir del séptimo año. Por lo anterior varias empresas procedentes principalmente de Chile, y Estados Unidos, han establecido plantaciones en nuestro país, considerando las bondades que México ofrece y que además se han alcanzado precios muy altos; por ejemplo en 2012, para las huertas que exportaron en la segunda semana de septiembre, alcanzaron un precio de 50 dólares por cada caja que contiene 6 paquetes de 160 g. Haciendo la conversión, eso significa que por cada kilo obtuvieron poco más de 50 dólares, situación que convierte a esta fruta en la más rentable de las especies frutícolas (Dato propio).

Un alto porcentaje de las empresas extranjeras que establecen plantaciones en México, han desarrollado sus propias variedades y eligen la que más les conviene para plantar en este país, o en su defecto hacen contratos con empresas que se dedican al desarrollo genético, para tener exclusividad, el usufructo de alguna variedad en particular. En ese sentido, la limitante del pequeño productor o empresario mexicano es que no tiene acceso a plantas con alta calidad genética, por lo que la opción más pertinente es optar por material de libre acceso, por el cual no se tengan que pagar regalías. Este caso Biloxi es el cultivar de libre acceso que mejor se ha adaptado a las condiciones edafoclimáticas de México, a su vez como es de libre acceso muchos de los viveros no producen plantas con la suficiente calidad sanitaria, por lo que cuando éstas son establecidas en nuevas plantaciones, un alto porcentaje muere por patógenos (Dato propio).

De acuerdo con la información citada en la presente revisión se aprecia un claro potencial que existe en México, para la producción tanto para la exportación de fruta fresca, como para el mercado nacional que poco a poco demanda cada vez más fruta fresca o derivados de éstas. Esa demanda implica que se establezcan más plantaciones, lo cual implica que haya empresas que produzcan plantas certificadas con la mejor genética y sanidad.

Las investigaciones sobre diversidad, ecología y simbiosis en el género *Vaccinium* endémicos de México, son nulas por lo que existe un gran potencial para generar conocimientos a partir de esas plantas. Lo cual abre una ventana para generar una línea de investigación que incluya a plantas de este género desde el ámbito botánico, fisiológico, y como fuente de germoplasma para la generación de nuevas variedades. En ese sentido y dado la importancia económica de este cultivo, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, aprobó en el 2015, presupuesto para que centros de investigación en ciencias agrícolas generaran tres nuevas variedades de arándano de uso libre para productores mexicanos.

Por lo anterior, en la presente investigación se plantea el estudio de los hongos que viven en las raíces de estas plantas y su posible potencial biotecnológico sobre plantas micropropagadas, ya que se ha observado, que muchas plantaciones han fracasado en gran parte por la mala sanidad con la que las plantas salen del vivero. En ese sentido, uno de los principales objetivos de la presente investigación es producir plantas libre de enfermedades, y como segundo objetivo y no menos importante, valorar el beneficio biotecnológico que pueda tener la planta por efecto de la inoculación de hongos aislados de raíces del arándano silvestre.

Importancia ecológica de la micorriza ericoide en los grandes biomas en el mundo

Los brezales y biomas de bosques boreales cubren aproximadamente el 70% de la superficie terrestre en el hemisferio norte. Dado que los suelos que lo conforman contienen las reservas más grandes de carbono en el mundo, el clima del planeta puede depender en un futuro de las interacciones entre las plantas que dominan estos biomas y sus simbioses microbianos, coexistiendo en suelos con altas cantidades de materia orgánica (Smith y Read, 2008). En uno de los menos apreciados sistemas continuos suelo-planta-atmósfera en brezales y bosques boreales, los nutrientes se movilizan a través de la interfase biótica con la materia orgánica del suelo y los minerales que están dominados por el sistema micelial de hongos micorrízicos. Por otra parte, la familia de plantas dominantes en los sistemas de brezales corresponden a ericáceas, y los hongos proliferan dentro de las células de la epidermis de sus raíces (Read *et al.* 2003).

En el análisis de brezales como uno de los principales ecosistemas en el mundo, Specht (1979) lo define como un lugar caracterizado por el empobrecimiento extremo de nutrientes y el predominio de arbustos de la familia Ericaceae. Los géneros de plantas más generalizados de importancia ecológica en este bioma corresponden a los géneros *Calluna*, *Rhododendron*, *Erica*, *Gaultheria* y *Vaccinium*. Los representantes de estos géneros pueden conformar bosques puros en zonas latitudinales o altitudinales por arriba de la línea del bosque. Estas unidades estructurales son conocidas como tundra, donde las plantas ericáceas constituyen el mayor componente de plantas vasculares de las extensas turberas del norte, y contribuyen a su entorno como “ingenieros del ecosistema” para el desarrollo de montículos secos y se encuentran entre pasto *Sphagnum* y plantas leñosas que crecen en los suelos más empobrecidos en nutrientes (Read *et al.* 2003). Las principales especies de plantas ericáceas a menudo se producen en suelos

con una capa continua por debajo del dosel del bosque boreal en una unidad estructural denominada Taiga. Dada la importancia de las plantas ericáceas como componentes subdominantes en las comunidades forestales, y su importancia en los brezales, tienen en común una arquitectura bien conservada de sus raíces, las cuales carecen de pelos radicales, y en su lugar generan delgadas raíces las cuales se asocian con hongos micorrízicos ericoides (HMEr) (Read *et al.* 2003).

Morfología de la micorriza ericoide

Las raíces de las plantas que pertenecen a la familia Ericaceae (Figura 2,) son estructuras delicadas, cuya anatomía muestra uniformidad en todas las tribus de esta familia. Se caracterizan principalmente por la ausencia de pelos absorbentes; pero, debido a que sus diámetros son pequeños, ya que van de 50 a 100 μm en las regiones distales, se refieren a ellos como falsos pelos radicales (Peterson *et al.* 1980). Las raíces tienen una estela constituida por pequeñas traqueidas, que son elementos dentro de un anillo de células pericíclicas conocida como cilindro vascular, alrededor de los elementos vasculares se encuentra la endodermis seguida de una doble capa de células que conforman el córtex. La capa de células más externa es la epidermis, que proporciona la interfase con el suelo y éstas células son colonizadas con HMEr (Peterson *et al.* 2004). Cuando las células de la epidermis son colonizadas por HMEr, éstas se hinchan y su volumen es totalmente ocupado por un complejo de hifas (Figura 3). La capa epidérmica de la raíz es una estructura efímera, la cual desaparece en las raíces más viejas. Las células suberizadas y engrosadas derivadas de las dos capas corticales, pasan a formar la superficie exterior de la raíz (Peterson *et al.* 1980). La colonización micorrízica se limita a las células expandidas de la epidermis, los procesos de maduración de la raíz definen el espacio y tiempo de

la simbiosis, el micelio externo es corto, y no va más allá de 1 cm de la superficie de la fina raíz, y la asociación micorrízica dura alrededor de 11 semanas (Mitchell y Gibson, 2006).



Figura 2. Raíces de *Vaccinium corymbosum* L., recolectada en una plantación de producción intensiva (Tomado de León, 2012).

La micorriza ericoide (Figura 3) representa un tipo único de micorriza confinado a importantes plantas en la familia Ericaceae. En estas plantas se ha desarrollado esta relación mutualista debido a que no forma pelos absorbentes y en su lugar crecen raíces finas o falsos pelos radicales de diámetros menores a los de plantas leñosas, y poseen una simple anatomía que comprende un limitado crecimiento. Cada raíz consiste de un cilindro vascular, una o dos capas de células corticales incluyendo la endodermis y células de la epidermis. La asociación micorrízica involucra la colonización de células de la epidermis (Figura 4) y de un complejo hifal en cada célula colonizada (Peterson *et al.* 2004).

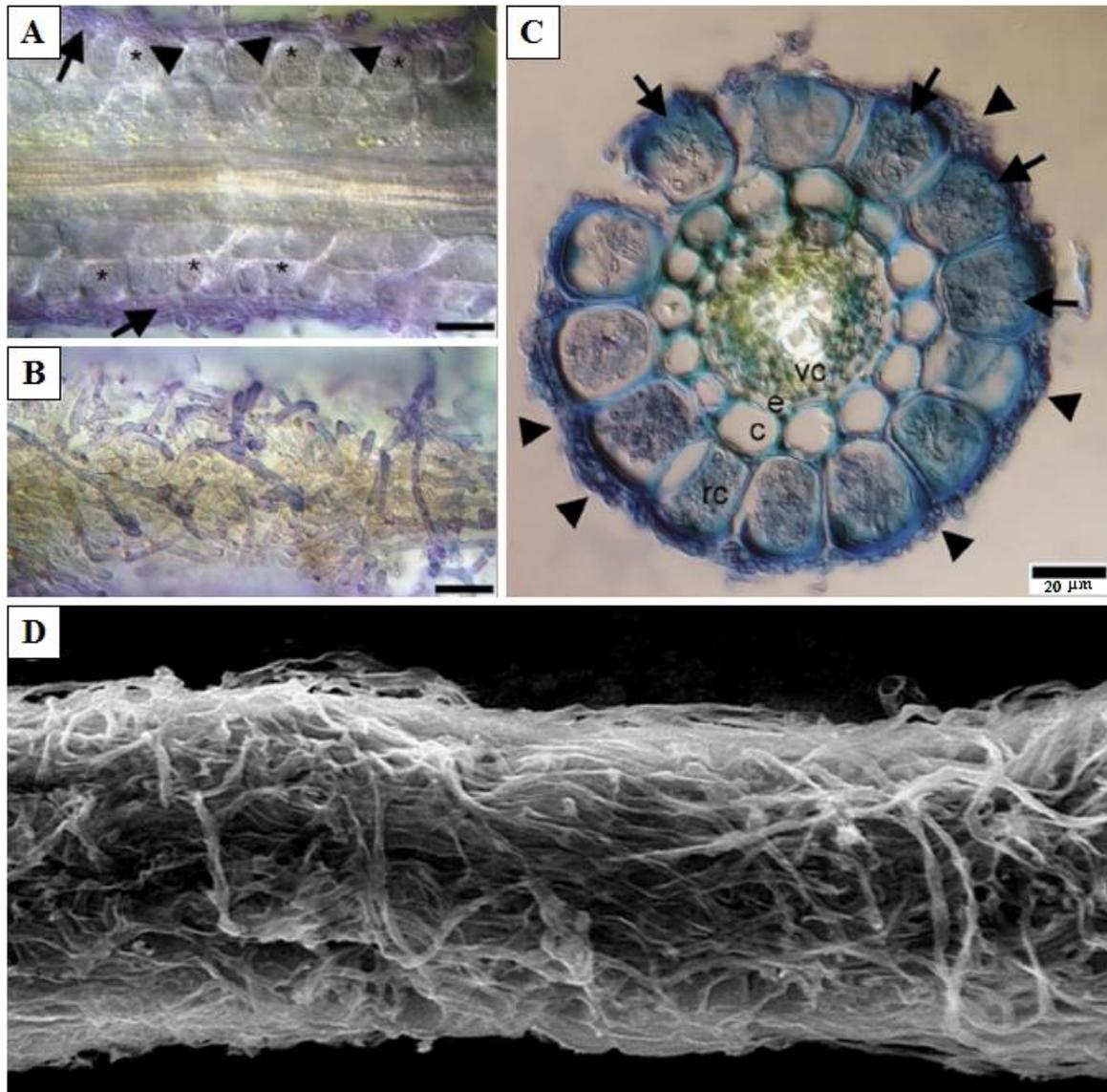


Figura 3. Características anatómicas y morfológicas de la micorriza ericoide en raíces de *Vaccinium myrtillus*. A) Corte longitudinal de la raíz que muestra zona ocupada por las hifas. Las hifas forman una capa (flechas) que penetran las paredes de las células epidérmicas (puntas de flecha) y forman densos enrollamientos hifales típicos de la micorriza ericoide (asteriscos). Tinción con azul tripano barra=20 μm . B) Vista de la superficie de la micorriza ericoide que muestra una capa densa de hifas que cubre el falso pelo radical teñido con azul tripano, barra=20 μm . C) Sección transversal del falso pelo radical cubierto por una capa de hifas (puntas de flecha), células de la epidermis (rc) llena de enrollamientos hifales (flechas). El micobionte nunca avanza al cortex (c), endodermis (e), o el cilindro vascular (vc), barra= 20 μm . D) Vista superficial de una raíz con un hongo micorrízico ericoide que muestra una densa capa de hifas, barra=50 μm (Tomado de Vohnik *et al.* 2012).

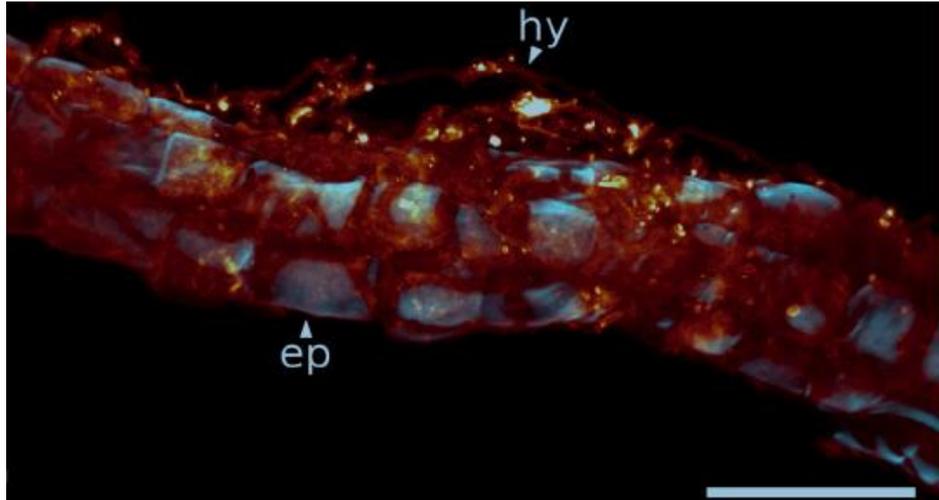


Figura 4. Raíz fina de *Calluna vulgaris*. El tejido de la planta se muestra en color claro y el hongo en rojo. Finas hifas (hy) rodean las células de la epidermis (ep), y los enrollamientos de hifas son visibles a través de las paredes transparentes de las células epidérmicas barra=50 µm (Tomado de Rath *et al.* 2014).

Hymenoscyphus Gray es un género fúngico cosmopolita de la familia Helotiaceae (Helotiales, Leotiomyces, Ascomycota), con 155 especies, que comúnmente son saprófitos de madera, ramas, hojas y tallos (Zheng y Zhuang, 2012). El hongo forma pequeños apotecios (Figura 5) sésiles estipitados a discoides, con himenio de color amarillo a blanco en la superficie y con ascosporas de forma subelipsoides o fusiodes (Zheng y Zhuang, 2012).



Figura 5. Apotecios formados por diferentes especies de *Hymenoscyphus*=*Rhizoscyphus*. A) *H. brevicellulus*; B) *H. hyaloexcipulus*; C) *H. microcaudatus*; D) *H. subsymmetricus*; E) *H. subpallenscens* (Tomado de Zheng y Zhuang, 2012).

Los HMEr pueden producir poco micelio extramatricial y una interfase intracelular hongo-raíz, que comprende enrollamientos de hifas de densidad variable dentro de las células epidérmicas de las finas raíces de las Ericáceas (Smith y Read, 1997). Los hongos que forman micorriza ericoide aislados de células de la epidermis de las raíces finas de Ericáceas, producen un micelio típico oscuro de lento crecimiento en cultivos de agar (Figura 6A), muchos de estos aislamientos forman cadenas de arthroconidios en zig-zag (Mitchel y Gibson, 2004) (Figura 6B), una característica que ha llevado a los taxónomos a agruparlos dentro del género *Scytalidium*. Algunas de estas cepas forman apotecios que han permitido identificarlos como *Hymenoscyphus ericae*=*Ryzoscyphus ericae* (Zang). El análisis comparativo de ADN ribosomal sugiere que existe una relación anamorfo-teleomorfo entre *Scytalidium vaccinii* e *Hymenoscyphus ericae* (Egger y Sigler, 1993).

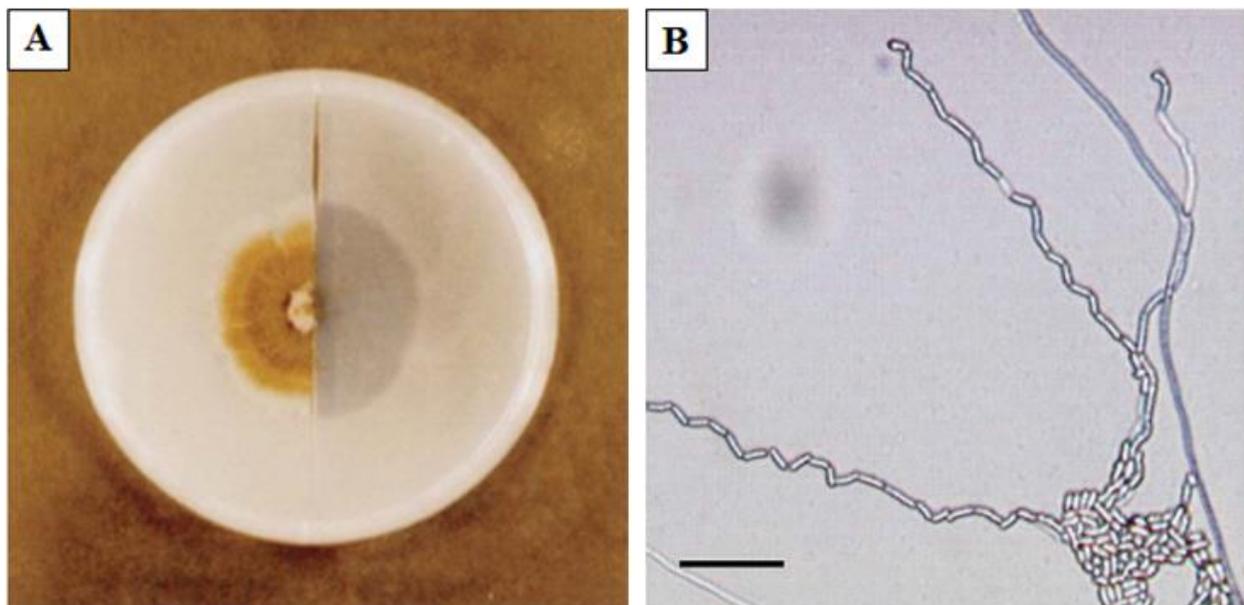


Figura 6. A) Crecimiento de hongo micorrízico ericoide en medio agar suplementado con fosfato de zinc y alanina. B) Segmentos de hifas de hongos micorrízicos ericoides formando arthroconidios creciendo en forma de zig-zag; barra= 30 μ m (Tomado de Gibson, 2004).

Hongos micorrízicos ericoides en Ericáceas

Doak (1928) fue el primero en reportar el aislamiento de un endófito que forma micorriza ericoide con raíces de *Vaccinium*, confirmando su estatus micorrízico mediante la re-inoculación. Este tipo de experimento se repitió por Bain (1937) utilizando una serie de plantas de Norte América, así como por, Pearson y Read (1973) en Europa, y por Read (1983) en Australia. Las observaciones sistemáticas revelaron que los hongos aislados del complejo hifal ericoide, correspondían predominantemente a la forma asexual de HMEr de crecimiento lento, y de coloración oscura (Read 1991).

Un aislamiento típicamente oscuro obtenido por Pearson y Read (1973) produjo pequeños apotecios en medio de cultivo, por lo cual se categorizó en el género *Pezizella*, como *P. ericae* (Read, 1974), mismo que después se reubicó al género *Hymenoscyphus* como *H. ericae* (Read) Korf y Kerman (Kerman y Finocchio, 1983) y finalmente, en el género *Rhizoscyphus* como *R. ericae* (Read) Zhang y Zhuang (Zhang y Zhuang, 2004). Ambos géneros *Rhizoscyphus* e *Hymenoscyphus*, pertenecen a la Clase Letiomycetes en el orden Helotiales. Una alta proporción de hongos oscuros de crecimiento lento obtenidos por Pearson y Read (1973), entre ellos un teleomorfo septado que produjo artroconidios en medio agar, posteriormente fue identificado por Dalpé *et al.* (1989) como *Scytalidium vaccinii*, que años más tarde, mediante técnicas moleculares Egger y Sigler (1993) confirmaron que se trataba de la fase anamorfa de *Hymenoscyphus ericae*.

Recientemente se ha puesto más atención a cuestiones relativas respecto a las relaciones filogenéticas de los hongos de lento crecimiento aislados de raíces de ericáceas, los cuales

forman micorriza ericoide. El interés particular se ha centrado en las amplias relaciones que comprenden a los que se han agregado al género *Hymenoscyphus*, incluyendo a *Rhizoscyphus ericeae*. Con la creciente cantidad de datos de secuencias de ADN disponibles, se ha concluido por consenso, que el género *Hymenoscyphus*, comprende un agregado de hongos genéticamente relacionados; Vralstad *et al.* (2000) demostraron que el hongo *R. ericae* tiene la facultad de formar ectomicorrizas de nombre *Piceirhiza bicolorata*, este trabajo cuestionó la opinión de que *R. ericae* se encuentra genéticamente bien definido, ya que expuso la posibilidad de que dentro del género *Hymenoscyphus*, existan genotipos capaces de formar ectomicorriza y micorriza ericoide.

Otro ascomiceto frecuentemente aislado del complejo hifal de HMEr, es *Oidiodendron* (Ascomycota: Onygenales) (Dalpé, 1986; Douglas *et al.* 1989; Hambleton *et al.* 1998; Monreal *et al.* 1999; Bougoure y Cairney, 2005a y 2005b; Addy *et al.* 2005). Mientras un número de especies pertenecientes a este género han sido reportados, muchos de éstos parecen ser la misma especie que *Oidiodendron maius* (Hambleton *et al.* 1998). Este hongo ha sido confirmado como micorrízico en experimentos de reinoculación con *Gaultheria shallon* (Monreal *et al.* 1999), así como con *Calluna vulgaris* (Leake y Read, 1991). *Rhododendron spp.* (Douglas *et al.* 1989), y *Erica arborea* (Bergero *et al.* 2000) en Europa.

Así mismo, otros aislamientos identificados como *Oidiodendron sp.* obtenidos por Bougoure y Cairney (2005b) de raíces de *Rhododendron lochiaie* produjeron un complejo hifal típico de la micorriza ericoide en *Vaccinium macrocarpon*. El número de hongos conocidos por formar esta

micorriza, es pequeño, sin embargo en el cuadro 4, se aprecian algunas especies y sus respectivos hospederos (Xiao y Bearch, 1995).

Cuadro 4. Hongos que con frecuencia forman micorriza ericoide con las raíces de plantas ericáceas (Modificado de Xiao y Berch, 1995).

Endófito	Hospedero
<i>Oidodendron griseum</i> Robak	<i>Vaccinium angustifolium</i> Ait. <i>Vaccinium corymbosum</i> L. <i>Calluna vulgaris</i> L. <i>Gaulderia shallon</i> Pursh
<i>Meliniomyces variabilis</i>	<i>Rhododendron decorum</i>
<i>Hymenoscyphus ericae</i> = <i>Rhizoscyphus ericae</i> (Read) Zhang y Zhuang	<i>Vaccinium macrocarpon</i> L. <i>Calluna vulgaris</i> L. <i>Erica arborea</i> <i>Vaccinium mirtillus</i> L. <i>Rhododendron decorum</i> <i>Epacris pulchella</i> <i>Vaccinium oxycoccus</i> L.
<i>Scytalidium vaccinii</i>	<i>Vaccinium vitis-idea</i> Ait. <i>Vaccinium angustifolium</i> Ait.
<i>Oidodendron maius</i> Szilvinyi	<i>Gaulderia shallon</i> Pursh <i>Rhododendron decorum</i> L. <i>Vaccinium mirtillus</i> L.
<i>Oidodendron citrinum</i> Barrow	<i>Vaccinium angustifolium</i> Ait.
<i>Oidodendron flavum</i> Robak	<i>Vaccinium angustifolium</i> Ait.
<i>Oidodendron periconioides</i>	<i>Vaccinium angustifolium</i> Ait.

Atributos fisiológicos de la micorriza ericoide en cultivos puros

Los estudios de HMEr en cultivos axénicos, indican probables funciones de su simbiosis en las Ericaceas, aunque existe la necesidad de confirmar que tales atributos se expresan en el sistema planta-hongo. Así, *Rhizoscyphus ericae* ha demostrado tener la habilidad de asimilar azúcares simples, formas orgánicas de N y P y aminoácidos (Pearson y Read, 1975; Bajwa y Read 1986).

Algunas diferencias intraespecíficas en los patrones de asimilación de N por *Rhizoscyphus ericae*, están bien reconocidas (Cairney *et al.*, 2000; Grellet *et al.*, 2005). Las habilidades de *R. ericae* de utilizar nitrato, amonio y glutamina, están directamente influenciadas por la disponibilidad de carbono orgánico en el medio (Grellet *et al.* 2005).

Dos cepas de *Oidiodendron maius*, hongo formador de micorriza ericoide aislado de suelos contaminados por residuos de la actividad minera, mostraron tolerancia a altas concentraciones de metales tóxicos, movilizándolo compuestos de zinc, y compuestos orgánicos insolubles (Martino *et al.* 2003). Las cepas aisladas de suelos contaminados presentaron mayor capacidad de solubilizar Zn tanto de ZnO y $Zn_3(PO_4)_2$ (Martino *et al.* 2003).

Dos aislamientos de *Hymenoscyphus ericae* y dos micobiontes ericoides aislados de suelos contaminados por la actividad minera se cultivaron en placas de agar suplementado con fosfato de zinc (0.25%), diferentes de fuentes de N (nitrato, amonio o alanina) y diferentes concentraciones de carbono (glucosa) y fósforo (KH_2PO_4). Los cuatro micobiontes fueron capaces de solubilizar fosfato de zinc en presencia de todas las fuentes de nitrógeno y en los

medios que no contenían nitrógeno, pero uno de los micobiontes fue capaz de solubilizar bajas cantidades de fosfato de calcio; dicha solubilización de estos metales puede atribuirse a protonación o a la liberación de ácidos orgánicos (Gibson y Mitchell, 2004).

Fomina *et al.* (2005) investigaron la capacidad de HMEr y ectomicorrízicos, de solubilizar metales tóxicos (Cd, Cu, Pb y Zinc) en medio mineral. Un efecto letal se observó para los aislamientos ectomicorrízicos en presencia de fosfato de Pb; en contraste, los HMEr fueron capaces de crecer en medios con Pb-mineral. Una proporción significativa de HMEr (70-90%) fue capaz de solubilizar Cd y fosfato de cobre. Ninguno de los HMEr y ectomicorrízicos fue capaz de producir un halo en medio agar con minerales; sin embargo, muchos hongos fueron capaces de acumular y movilizar Pb en su micelio.

Actividad enzimática de la micorriza ericoide

En cultivos puros, los HMEr tienen una actividad fosfatasa ácida que rompe compuestos fosfatados y esta cualidad es estimulada en suelos con bajos niveles, pero inhibida por altos niveles de fosfatos solubles en medio de cultivo (Pearson y Read 1975; Shaw y Read 1989; Straker y Mitchell 1986); la actividad enzimática de HMEr para degradar diferentes tipos de sustratos es alta como se aprecia en el cuadro 5, en la que se citan las enzimas extracelulares producidas por HMEr, que le proporcionan la capacidad de degradar los componentes estructurales en brezales y en otras comunidades de plantas Ericáceas, afectando los procesos de descomposición y la transformación de nutrientes para facilitar la asimilación de N y P.

Cuadro 5. Enzimas producidas por HMEr para degradar diferentes sustratos (Modificado de Leake y Read, 1997).

Proceso	Sustrato	Enzima
Degradación de pared celular de planta	Pectina	Poligaracturonasa
	Celulosa	Celulasa
	Celobiasa	Celobiohidrolasa
	Hemicelulosa	Xilanasa β - Xilosidasa β -D-Manosidasa β – D-Galactosidasa β D-Arabidonasa β 1,3-Glucanasa
Degradación de pared celular fúngica	Quitina	Quitinasa
Oxidación de ácidos fenólicos y taninos	Polifenoles	Polifenol oxidasa Lacasa Catecol oxidasa
Hidrolisis de lignina	Lignina	Lignasa
Degradación de complejos de proteínas polifenólicas	Polifenoles	Polifenol oxidasas
Degradación de polímeros nitrogenados	Proteínas	Ácido proteinasa
Desdoblamiento de fósforo orgánico		Fosfatasa ácida Fosfodiesterasa

Atributos fisiológicos de la simbiosis micorrízica ericoide

Los suelos en los que crecen las Ericáceas son característicamente muy pobres en nutrientes por lo que suena lógico que exista un beneficio nutricional aportado por la presencia del huésped en estas plantas (Smith y Read 1997). El progreso de la investigación aplicada respecto de las funciones que ejercen los HMEr sobre su planta hospedera ha tomado dos rutas diferentes; por un lado la evaluación de los atributos fisiológicos de HMEr en cultivos puros, mientras que por

otro lado se utiliza un análisis comparativo de las respuestas de los HMEr en plantas micorrizadas y no micorrizadas, cultivadas en condiciones experimentales definidas (Smith y Read 1997).

Asimilación de nitrógeno por la micorriza ericoide

En los suelos ácidos de los brezales, las cantidades de nitrógeno orgánico disponibles son insignificantes debido a su lenta tasa de descomposición (Stracker 1996; Haselwandter 1997). Las plantas que pertenecen a la familia Ericaceae dependen de hongos formadores de micorriza ericoide para asimilar una amplia gama de diferentes formas de nitrógeno que se encuentra en el suelo. En ese sentido, plantas de arándano micorrizadas y no micorrizadas, se cultivaron en suelos enmendados con sulfato de amonio (Stribley y Read, 1974), y los resultados revelaron que las plantas no micorrizadas asimilaron nitrógeno en forma de amonio, pero las plantas micorrizadas tuvieron acceso a otras fuentes de nitrógeno en el suelo, así como nitrógeno en forma de amonio. Los datos indicaron que el nitrógeno orgánico en el suelo estaba siendo utilizado y esta situación era posible debido a la presencia de la asociación con HMEr. Este trabajo fue continuado con plantas micorrizadas y no micorrizadas creciendo en un sustrato a base de arena, adicionado con una gama de aminoácidos, mostrando que las plantas micorrizadas crecieron mejor y tuvieron mayor contenido de nitrógeno total (Stribley y Read, 1980).

En otro experimento se inocularon plántulas de *Calluna vulgaris* con una abundante diversidad de HMEr, en medio agar en el que la forma de nitrógeno disponible era proteína. El inóculo más eficaz para el crecimiento de las plántulas fue *Himenoscyphus ericae* y *Syrialidum vaccinii* (Leake y Read 1991).

Los HMEr pueden utilizar una amplia gama de proteínas como fuentes de nitrógeno y carbono (Bajwa y Read 1985), así como otras fuentes orgánicas de nitrógeno tales como quitina (Leak y Read 1990b; Kerley 1993). La capacidad de HMEr de utilizar glutamina, amonio o nitrato se ve afectada por la disponibilidad de carbono en el medio de crecimiento (Grellet *et al.* 2005). Cuando estos investigadores suministraron altas cantidades de carbono al medio de cultivo, las cepas acumularon también una alta cantidad de nitrógeno, lo que indica una variación en la cinética de absorción. Bajo condiciones limitadas de carbono, las cepas registraron diferencias en el uso del nitrógeno, lo que indica que existen diferencias intraespecíficas en la eficiencia del uso del nitrógeno por los diferentes aislamientos.

Hymenoscyphus ericae tiene la capacidad de degradar enzimáticamente un número de compuestos complejos que contienen nitrógeno, se ha demostrado que este hongo libera polifenol oxidasas activas durante mineralización de nitrógeno orgánico a partir de compuestos recalcitrantes (Bending y Read, 1996). Esta enzima fue identificada como carboxil (ácido) proteinasa del tipo pepsina y mostró actividad óptima a pH 2.2, que es considerablemente más baja que la encontrada en los suelos ácidos de brezales (Leake y Read 1990a). Sin embargo, en la interfase de suelos arenosos, donde se encuentra la mayoría de las raíces de plantas ericáceas, normalmente se encuentran a un pH más bajo que la mayor parte del suelo debido a la actividad liberadora de H⁺ de los procesos (Read *et al.* 1989). Esta interfase es el lugar en el suelo donde se acumulan sustratos que son fuente de proteínas. La actividad proteinasa del hongo es, por lo tanto, adaptada al microentorno específico en el que se encuentra. El pH bajo óptimo de la proteinasa puede proteger a la planta mediante la degradación de proteínas, y no representar un riesgo de degradar células de la planta, ya que el pH en el interior de la planta es cercano a la

neutralidad (Read, 1989). Se ha propuesto que la actividad proteínasa se regula por una estrategia llamada “Arca de Noé”, en el que pequeñas cantidades de la enzima se lanzan como “emisarios” en ausencia de sustrato (Leake y Read, 1990). Cuando los productos finales son detectados por *Himenoscyphus ericae*, da lugar a una liberación rápida de proteínasa (Leake y Read, 1990), el exceso de proteínasa se libera solo si el sustrato presente en el suelo es adecuado. Los productos finales o aminoácidos pueden ser asimilados directamente por el HMEr y ser transferidos a la planta.

Asimilación de P por la micorriza ericoide

En suelos ácidos de brezales, los contenidos de fosfato inorgánico son insignificantes y las principales formas de fósforo se encuentran en forma orgánica, identificados como fosfomonodiesteres, principalmente fitato o fosfodiesteres tales como ácidos nucleicos (Griffiths y Caldwell, 1992). Los fitatos son generalmente complejos de hierro o aluminio y los hongos formadores de HMEr pueden acceder a estas fuentes de P (Mitchel y Read, 1981). Se ha demostrado que un número de aislamientos pueden producir fosfatasas extracelulares ligada a diferentes sustratos (Straker y Mitchell 1986). Este estudio también demostró la hidrólisis de ATP, ADP, AMP por la fosfatasa de bajo peso molecular (Straker y Mitchell 1986). Los fosfomonodiesteres se encuentran en concentraciones relativamente bajas en la mayoría de los suelos (usualmente <1%), pero son un fuente de fósforo potencialmente valiosa (Griffiths y Caldwell 1992). Leake y Miles (1996) demostraron la capacidad de *Hymenoscyphus ericae* para degradar la ADN fosfodiester utilizando fosfodiesterasa. Una investigación adicional reveló que plántulas de arándano rojo inoculadas con *Hymenoscyphus ericae* crecieron mejor en medio que contiene fósforo contenido en ARN o ADN (Leake y Miles, 1996). La adición de 0.25 mM de

cobre al medio de crecimiento no afectó la actividad fosfatasa de la pared de HMEr aislados de escombros de minas, estimulando la actividad fosfodiesterasa (Gibson y Mitchell 2005b). Van Leerdam *et al.* (2001) investigaron la capacidad de solubilización de fosfato de diversos HMEr; cuando el amonio estaba presente, la mayoría de los hongos aislados fueron capaces de solubilizar fosfato a partir de roca hidroxiapatita; sin embargo, cuando se añadió nitrato como fuente de nitrógeno, ninguno de los aislamientos solubilizó hidroxiapatita ni fluorapatita. Además, los aislamientos de *Oidiodendron maius*, fueron capaces de solubilizar fosfato de zinc, poco solubles en medio agar (Martino *et al.* 2003).

CAPÍTULO 1.

DESARROLLO DEL PROTOCOLO PARA LA PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE ARÁNDANO AZUL (*Vaccinium corymbosum* L.) CV. BILOXI

RESUMEN

Se desarrolló un protocolo eficiente para la producción *in vitro* de arándano azul (*Vaccinium corymbosum* L.; Ericaceae) cv. Biloxi, en el que se evaluó el efecto de 2-isopentil adenina (2iP) conjugado con dos reguladores de crecimiento (Triacontanol y Epibrassinolide) en la regeneración y enraizamiento de brotes de arándano azul. Se obtuvieron yemas axilares a partir de plantas de un año de edad, y se establecieron en medio WPM (Woody Plant Medium) suplementado con diferentes concentraciones de 2ip, combinado con Triacontanol (Tria) y Epibrassinolide (Eb) para inducir la formación de brotes. La regeneración de brotes se registró a las seis semanas de cultivo. La óptima regeneración se obtuvo en el medio con 5 mg de 2iP; además, promovió la producción de múltiples brotes en comparación con el efecto de 3 y 4 mg de 2iP que resultó en menor producción de brotes. El enraizamiento fue inducido usando arena de río como sustrato, contenida en cajas de plástico, donde se obtuvo 100% de enraizamiento en ocho semanas después de la inducción, y 97 % de sobrevivencia en los brotes inducidos con 10 g L⁻¹ de AIB, comparado con el testigo que mostró 40% de sobrevivencia. El protocolo para la micropropagación de arándano azul cv. Biloxi basado en el uso de reguladores de crecimiento desarrollado en esta investigación, podría ser usado para la propagación masiva de este cultivar.

Palabras clave: Arándano azul, micropropagación, organogénesis, enraizamiento, aclimatación, reguladores de crecimiento.

CHAPTER 1.

PROTOCOL FOR THE *in vitro* PROPAGATION OF BLUEBERRY PLANTS (*Vaccinium corymbosum* L.) CV. BILOXI

ABSTRACT

An efficient protocol was developed for the *in vitro* culture of blueberry plants (*Vaccinium corymbosum* L.; Ericaceae) cv. Biloxi, in which the effect of 2-isopentyl adenine (2iP) in combination with two plant growth regulators (Triacontanol and Epibrassinolide) was evaluated in the regeneration and rooting of shoots of blueberry plants. Axillary buds were obtained from one year plants, and established in the WPM culture medium (Woody Plant Medium) supplied with different concentrations of 2ip, in combination with Triacontanol (Tria) and Epibrassinolide (Eb) for inducing the shoot generation. Shoot regeneration was recorded after six weeks. The optimal regeneration and multiple shoot production were achieved by using 5 mg of 2iP when compared to the application of 3 or 4 mg. The rooting was induced after 8 weeks by using river sand as substrate; thus, 100% of rooting with 97% of plant survival was achieved with 10 g IBA L⁻¹ in comparison to the control with 40% of plant survival. This protocol based on the application of plant growth regulators may be directed for the micropropagation and massive propagation of blueberry plants cv. Biloxi.

Keywords: blueberry, micropropagation, organogenesis, rooting, acclimatization, growth regulators.

INTRODUCCIÓN

El arándano azul (*Vaccinium corymbosum* L.) es un arbusto perenne de la familia Ericaceae, nativo de bosques de Estados Unidos, pero popular en todo el mundo debido al sabor de sus frutos y por la alta cantidad de antioxidantes que aporta (Whang *et al.* 2015). Sus frutos tienen un alto valor nutricional y fuertes propiedades antioxidantes, cualidades que se reflejan en una creciente demanda para su consumo en fresco y para la industria farmacéutica (Williamson y Lyrene 2004). Los frutos de arándano fueron eficientes para tratar la artritis juvenil (Zhong *et al.* 2015). Las hojas, tallos y frutos del arándano son recomendados para el tratamiento alternativo de varias enfermedades incluyendo la diabetes tipo II en Canadá (Martineau *et al.* 2006).

Debido a que poseen propiedades medicinales, los frutos de arándano han sido objeto de numerosas investigaciones científicas sobre sus actividades fármaco-biológicas; en las que se ha encontrado que éstos son una fuente rica de antioxidantes tales como compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas (Bunea *et al.* 2011). Estas sustancias tienen efectos antiinflamatorios y antioxidantes que están implicados en la mejora de la condición cardiovascular y poseen propiedades antienvjecimiento (Buena *et al.* 2011; Liu, 2015).

Los estudios han demostrado que el extracto de frutos de arándano es rico en antocianinas y que estos compuestos son capaces de atenuar la hipertrofia cardiaca inducida en ratones (Liu *et al.* 2015). Así mismo, se ha encontrado evidencia que indica que frutos de blueberry contienen compuestos bioactivos que reducen ciertos tipos de cáncer e hipertensión (McAnulty *et al.* 2014; Shu 2008). En ese sentido, se encontró que la delfinidina que es una antocianina contenida en frutos de arándano, es un potente compuesto preventivo del cáncer de próstata (Hyeonseok *et al.*

2015), y tiene la capacidad de absorber los radicales libres (Hong *et al.* 1997), y pueden prevenir diferentes tipos de cáncer (Shu, 2008). Además, se ha encontrado que el extracto de arándano azul tiene propiedades antibacterianas (Lagha *et al.* 2015).

Triacantanol (Tria) fue descubierto como regulador del crecimiento vegetal por Ries *et al.* (1977) en alfalfa (*Medicago sativa* L.). El Tria es un componente natural de la cera epicuticular de diversos géneros como *Croton californicus*, *Vaccinium ashei*, *Copernicia cerífera*, *Phaseolus multiflorus*, *Trifolium repens*, *Medicago sativa* y *Jatropha curcas* (Hufford y Oguntimein 1978; Luzbetak *et al.* 1978; Freeman *et al.* 1979). Cuando se usó Tria en cultivo *in vitro* de manzana (*Malus domestica*) se mejoró la elongación de múltiples brotes y raíces en plántulas micropropagadas (Tantos *et al.* 2001). También se encontró que el Tria aumentó de forma significativa el número y la longitud de brotes así como el número y la longitud de raíces de *Melissa officinalis* L. cultivada *in vitro* (Tantos *et al.* 1999). Además, este regulador indujo la generación *in vitro* de raíces, en brotes de *Capsicum frutescens* (Reddy *et al.* 2002).

Los brasinoesteroides (Brs) son reguladores de crecimiento presentes en las plantas que controlan la división y la elongación celular, la diferenciación del xilema, el crecimiento del tubo polínico, la reproducción y el desarrollo vascular, la polarización de la membrana, la activación de la bomba de protones, la activación de enzimas, la fotosíntesis y respuestas al estrés (Krisha 2003; Talaat y Shawky 2012). Los efectos de los Brs en el crecimiento y desarrollo de las plantas muestran sinergismo con otros reguladores de crecimiento vegetal, particularmente con auxinas (Hartdtke *et al.* 2007). De este grupo, el epibrassinolide (Eb) es uno de los compuestos químicos más activos cuando se aplica en bajas concentraciones en cultivo *in vitro*. Por ejemplo, la adición

de Eb en el micropropagación de *Vaccinium corymbosum* en medio WPM suplementado con 2ip y AIA, muestran cambios positivos cuantitativos y cualitativos en la cantidad y calidad de brotes regenerados (Kudryashova *et al.* 2012). También, el Epibrassinolide promueve el crecimiento de la raíz de *Arabidopsis thaliana* en muy bajas concentraciones (Müssig *et al.* 2003).

El arándano azul es una especie prometedora para su cultivo intensivo con fines de exportación para algunas regiones de México, especialmente en las zonas frías, boscosas y con suelos arenosos. En este capítulo se aborda la micropropagación de arandano azul (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. Biloxi, propagada axénicamente *in vitro* en medio de cultivo con diferente composición hormonal. El objetivo del presente estudio fue desarrollar un protocolo para la rápida y eficiente regeneración de plantas de *Vaccinium corymbosum* L. cv. Biloxi utilizando yemas axilares como explantes, en el que se evaluó el efecto conjugado de 2iP, Tria y Eb en la regeneración y en el enraizamiento de brotes de este cultivar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Propagación vegetativa en medio WPM

Compuestos Químicos

El 2ip (2 isopentil adenina) se obtuvo de Sigma[®]. Se pesaron 10 mg y se disolvieron agregando 3 gotas en hidróxido de sodio, directamente sobre los cristales y se esperó por 2 minutos tiempo en que se disolvió eficientemente. Enseguida se agregaron gradualmente gotas de agua hasta lograr la dilución completa; esta mezcla se vació en un matraz aforado de 100 mL, quedando una concentración de 1 mg por cada 10 mL de solución.

El Triaccontanol (Tria) fue obtenido de Sigma[®]. Se pesaron 10 mg de Tria en un pequeño recipiente de vidrio y se agregó 1 mL de cloroformo al 100% para su dilución, ya que Tria es una sustancia no polar y no se disuelve en agua. Esta mezcla se diluyó en un matraz aforando a 100 mL, posteriormente se tomó 1 mL y se disolvió en 100 mL de agua en un matraz aforado dando como resultado una concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

El epibrassinolide (Eb) fue obtenido de Sigma[®]. Se disolvieron 2 mg de Eb directamente sobre el recipiente de Sigma, agregando 3 gotas de formaldehído al 100%. Esta mezcla se vació en un matraz aforando a 200 mL. De esta mezcla se tomó 1 mL y se disolvió en agua en un matraz aforando a 100 mL, dando como resultado una concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de solución.

Material Vegetal

Plantas de arándano cv. Biloxi de un año de edad, fueron obtenidas del vivero Biotique ubicado en Usmajak, Jalisco, y se trasladaron al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Las plantas se podaron con el objetivo de generar brotes nuevos, los cuales fueron usados en la fase de establecimiento *in vitro*. Cuando los brotes empezaron a crecer se asperjó sobre ellos una solución de Oxidate[®] 5 mL L^{-1} más Kasumin[®] 0.5 mL L^{-1} cada siete días, para disminuir el crecimiento de hongos y bacterias, hasta que los brotes estuvieron listos para el establecimiento.

Se obtuvieron brotes jóvenes a partir de plantas de arándano, se envolvieron en papel, se humedecieron con agua limpia, y se trasladaron al Laboratorio de Embriogénesis del Colegio de Postgraduados. Para la desinfección, los brotes sin hojas se lavaron suavemente en agua con jabón, posteriormente se sumergieron en H_2O_2 al 20% por 5 minutos, y después se sumergieron

en alcohol al 70% por 1 minuto. Seguido, se sumergieron en hipoclorito de sodio al 20 % por 15 minutos solución a la que se agregaron 2 gotas de tween 20. Después de la desinfección se hicieron cinco enjuagues con agua esterilizada y se procedió con el establecimiento.

Establecimiento

Una vez realizada la desinfección, los brotes se seccionaron en segmentos de 1.5 cm conservando 1 yema axilar y se sembraron en medio WPM (Woody Plant Medium) (Lloyd y McCown 1980) suplementado con 30 g de sacarosa, 5 mg de 2ip, y 5g de Agar (Merk®), contenido en tubos de ensaye de 150 X 25 mm conteniendo 10 mL de medio cada uno, los cuales se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a 120 °C, y se incubó durante un periodo de 6 semanas.

Multiplicación

Los brotes obtenidos en la fase de establecimiento se subcultivaron cinco veces cada 30 días en medio WPM, suplementado con 5 mg de 2iP para uniformizar el tamaño y número de brotes que pasaron al experimento de multiplicación. En esta fase los explantes de arándano se cultivaron en medio basal WPM suplementado con diferentes concentraciones de 2iP (0, 3, 4 y 5 mgL⁻¹) en combinación con 1 µg de Tria y 1 µg de Eb, como se muestra en el cuadro 6. La producción de brotes se llevó a cabo en tubos de ensaye durante 8 semanas. El medio WPM sin reguladores fungió como control.

Cuadro 6. Tratamientos evaluados para contrastar el efecto de diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento en la producción *in vitro* de brotes de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) azul cv Biloxi.

Tratamientos	Reguladores de crecimiento		
	2iP mg	Triacantanol µg	Epibrassinolide µg
1 (Control)	0	0	0
2	3	0	0
3	3	0	1
4	3	1	0
5	3	1	1
6	4	0	0
7	4	1	0
8	4	0	1
9	5	0	0

Análisis estadístico

Las variables evaluadas en la fase de multiplicación fueron número de brotes, y longitud de brotes. En la fase de enraizamiento, se evaluó el porcentaje de enraizamiento, y en la fase de aclimatación, el porcentaje de sobrevivencia. Los datos obtenidos fueron analizados mediante una prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha=0.05$), con el procedimiento Proc GLM del programa estadístico SAS Systems.

Enraizamiento

Para promover el enraizamiento se aplicaron a la base de brotes de aproximadamente 2 cm sin hojas, diferentes concentraciones de AIB, Tria y Eb (Cuadro 7), y se plantaron en cajas de plástico limpio, usando como sustrato arena de río esterilizada en autoclave por dos horas a 120 °C. Se sembraron 30 brotes inducidos por cada tratamiento, con tres repeticiones más un testigo. La arena de río se humedeció con agua esterilizada con un atomizador, y las cajas fueron selladas con una película plástica para evitar la deshidratación. Las cajas se colocaron en la cámara de

incubación, expuestas a un fotoperiodo de 16/8-h (luz/oscuridad) a 25 ± 2 °C. Se evaluó el tiempo en el que aparecieron las primeras raíces hasta que se estabilizó el enraizamiento.

Cuadro 7. Tratamientos probados para la inducción de enraizamiento de microestacas de arándano azul *Vaccinium corymbosum* cv. Biloxi

Tratamiento	Regulador
1	Radix 10000
2	Radix 1500
3	AIB 10 gL^{-1}
4	Tria $1 \mu\text{g}$ + Eb $1 \mu\text{g}$
5	Testigo

Aclimatación

La aclimatación se llevó a cabo haciendo diariamente durante un mes, pequeñas perforaciones en las cajas con los brotes, a partir de la cuarta semana después del tratamiento de inducción de raíces. Se evaluó la sobrevivencia de las plántulas de arándano después de un mes de iniciada la perforación de los agujeros. Los datos obtenidos de los experimentos de multiplicación, enraizamiento y aclimatación fueron analizados mediante una prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$) mediante el procedimiento Proc GLM del programa estadístico SAS System.

Peso seco de plántulas obtenidas después de la aclimatación

Se tomaron tres repeticiones de 20 plantas de cada tratamiento, se lavaron suavemente hasta retirar toda la arena de su sistema radical, se colocaron en un sobre de papel y se introdujeron en la estufa de secado a 70°C durante siete días. Posteriormente, se pesaron en una balanza analítica para obtener el peso seco de cada tratamiento. Se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$), con el procedimiento Proc GLM del programa estadístico SAS System.

RESULTADOS

Establecimiento

Se evaluó la capacidad de regeneración de brotes de arándano azul (*Vaccinium corymbosum* L) cv Biloxi a partir de segmentos internodales con yemas axilares, probados para la inducción de organogénesis directa en medio WPM que contiene 5 mg de 2iP, donde se evaluó la concentración óptima del regulador de crecimiento, para inducir mayor número de brotes. La organogénesis directa de segmentos nodales asépticos ocurrió después de dos semanas. Las yemas axilares presentaron un porcentaje de oxidación de 64 % y 23 % de contaminación. Las yemas axilares contenidas en los explantes más jóvenes (no lignificados) fueron las que brotaron más rápido. Los brotes crecidos en la fase de establecimiento se fraccionaron en explantes conteniendo 1 segmento internodal cada uno y se subcultivaron 5 veces en medio WPM que contiene 5 mg de 2iP para homogenizar la generación de brotes. A medida que aumentaron los subcultivos, el número de brotes por explante aumentó hasta estabilizarse en un promedio de cuatro brotes por explante después de 5 cultivos, como se aprecia en la Figura 7. La organogénesis ocurrió formándose un pequeño callo circular en la base de los explantes. Después de 5 subcultivos los brotes bien definidos fueron observados pasadas 6 semanas después de la siembra para comparar que la producción de brotes por segmento intermodal fuera estable.

Multiplicación

Entre todas las combinaciones de 2iP, Tria y Eb probadas, la mejor respuesta para el número de brotes se observó en el medio WPM suplementado con 5 mg de 2iP con un promedio de 4 brotes por explante. La mejor respuesta para la longitud de brotes se observó en el tratamiento compuesto por el medio WPM suplementado con 3 mg de 2iP más 1 µg de Eb (Cuadro 8).

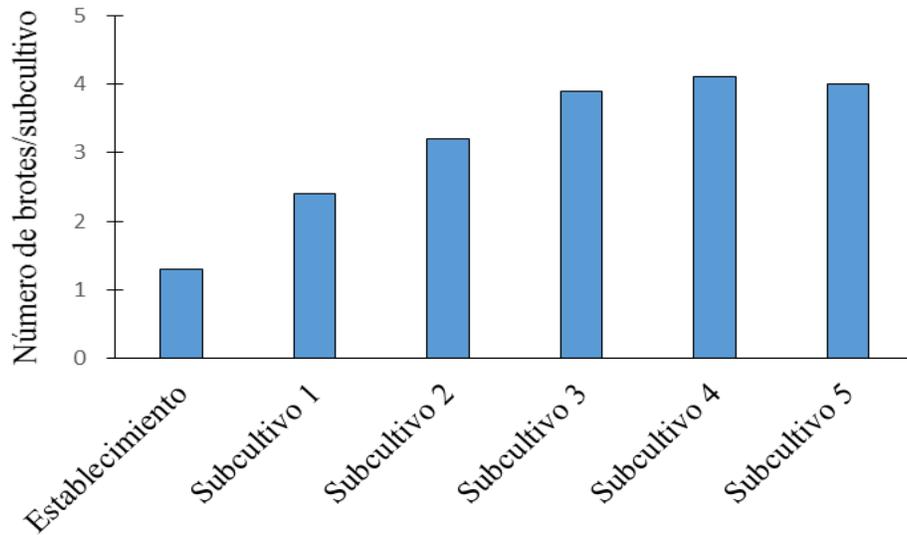


Figura 7. Número de brotes de arándano regenerados por sub-cultivo, cada 6 semanas en medio WPM suplementado con 5 mg de 2iP. n= 100.

Cuadro 8. Efecto de diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento en la producción *in vitro* de brotes de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) azul cv Biloxi.

Reguladores de crecimiento			Número de Brotes	Longitud (cm)
2iP (mg)	Triacontanol (µg)	Epibrassinolide (µg)		
0	0	0	0.93 d	0.36 d
3	0	0	1.93 c	1.56 bc
3	0	1	1.76 c	2.17 a
3	1	0	2.26 c	1.84 b
3	1	1	3.11 b	1.87 b
4	0	0	3.10 b	1.49 c
4	1	0	3.90 a	1.67 bc
4	0	1	3.20 b	1.86 b
5	0	0	4.03 a	1.46 c

Medias con la misma letra en la misma columna son estadísticamente iguales, (Tukey $\alpha=0.05$).

La producción de microestacas fue directamente dependiente del número de brotes y de la longitud de éste, ya que al ser más largo, se fracciona y da lugar a más microestacas; en este caso, se observó la formación del brote después de seis semanas de cultivo, como se observa en la figura 8A. Sin embargo, para obtener mayor número de microestacas, se esperó por dos semanas más y se obtuvieron brotes más largos como se muestra en la figura 8B.

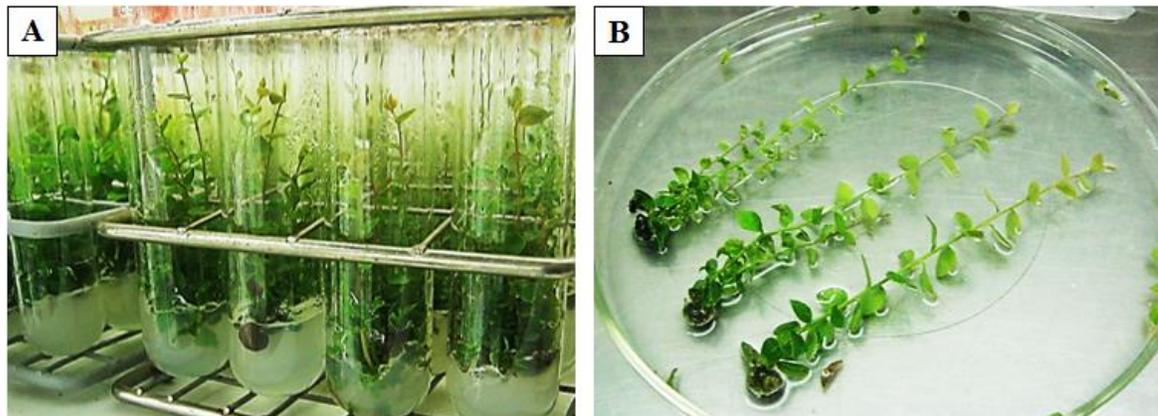


Figura 8. Brotes de *Vaccinium corymbosum* L. cv. Biloxi bien definidos después de seis semanas después de la siembra (segundo subcultivo), en medio WPM suplementado con 5 mg de 2iP.

A modo de perspectiva, si un entrenudo produce 4 brotes, y se subcultivan consecutivamente cada 8 semanas, tenemos una productividad de plántulas enraizadas aproximada a la que se detalla en el cuadro 9; ya que, un segmento internodal genera cuatro brotes y cada brote genera diez nuevos entrenudos. Entonces, si a partir de 1 entrenudo se realizan seis subcultivos consecutivos sin desviar microestacas a enraizamiento, se puede alcanzar una productividad aproximada de diez millones de plántulas enraizadas durante el primer año de cultivo *in vitro*, lo cual da una idea clara de la importancia del uso de esta técnica para la propagación masiva de arándano azul.

Cuadro 9. Perspectiva de producción de entrenudos, microestacas, y plántulas de arándano ejecutando el protocolo desarrollado en esta investigación.

Mes	Subcultivo	Entrenudos	Microestacas	Plántulas enraizadas
0	0	1		
2	1	40	4	
4	2	1,600	160	4
6	3	64,000	6,400	160
8	4	2,560,000	256,000	6,400
10	5	102,400,000	10,240,000	256,000
12	6	4,096,000,000	409,600,000	10,240,000

Enraizamiento

Las raíces comenzaron a aparecer 30 días después de haber inducido los brotes y terminaron de formarse 60 días después de la siembra, cuando se estabilizó el enraizamiento. Un brote se consideró enraizado cuando presentó al menos una raíz bien definida; en este experimento se registró el porcentaje de microestacas enraizadas que se muestra en el cuadro 10. Se registró un porcentaje de enraizamiento de 53.3% para el tratamiento Radix 1500, que aunque mostró un porcentaje bajo, éste fue mayor al testigo que tuvo un enraizamiento de 16.6%. Los mejores tratamientos fueron con AIB, así como Radix 10000, ambos con una concentración de 10000 mg L⁻¹. La prueba de comparación de medias mostró que existen diferencias significativas entre tratamientos, destacando aquél con una concentración de 10,000 mgL de AIB el cual obtuvo 100% de microestacas enraizadas como se muestra en el cuadro 10. Para el caso del testigo aunque mostró un 16 % de microestacas enraizadas, ésta no fue de buena calidad ya que se observó que desarrollaron un menor tamaño de plántulas en comparación con las inducidas con AIB.

Cuadro 10. Enraizamiento y aclimatación de arándano Azul (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. Biloxi, después de 60 días de cultivo.

Tratamiento	Regulador	Enraizamiento (%)	Aclimatación (%)
1	Radix 10000	92.10 b	91.36 b
2	Radix 1500	51.96 d	84.47 c
3	AIB 10 g.L ⁻¹	100 a	97.52 a
4	Tria (1 µg)+Eb (1µg)	65.43 c	90.48 b
5	Testigo	17.28 e	42.24 d

Letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey $\alpha=0.05$.) n= 90.

Las raíces finas generadas en la base de la microestaca, mostraron color blanco-crema (Figura 9B), de la cual se generan raíces más delgadas que las primeras en posición casi horizontal. Cuando la plántula enraizada se extrajo del sustrato (Figura 9A), ésta fue capaz de sostener el sustrato que rodea a las raíces, por lo que se deduce que aunque esta planta no genera pelos absorbentes, realiza la misma función con sus raíces finas, las cuales tienen diámetros menores a 100 µm, como lo describe la literatura.

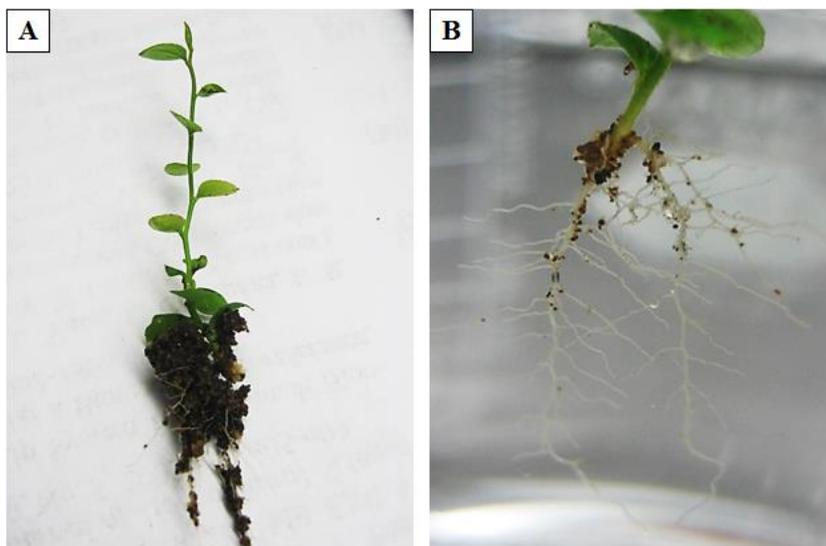


Figura 9. A) Plántula de arándano aclimatada extraída de la caja plástica con sustrato. B) Raíces de una plántula de arándano sumergidas en agua en un recipiente transparente.

El protocolo para la producción de plántulas de arándano desarrollado en este trabajo de investigación (Cuadro 11), comprende la fase de establecimiento de yemas axilares en medio WPM + 5 mg L⁻¹ de 2iP; esta fase ocurrió en un tiempo de cuatro semanas para la brotación de las yemas. La fase de multiplicación se registró en un tiempo de 6 a 8 semanas, utilizando el medio WPM + 5 mg L⁻¹ de 2ip, tiempo en el que se obtuvo la mayor cantidad de microestacas para el enraizamiento *ex vitro*. La fase de enraizamiento ocurrió en un tiempo de ocho semanas utilizando como sustrato arena de río, e impregnando la base de las microestacas en una solución que contiene AIB en una concentración de 10 g L⁻¹. La fase de aclimatación se llevó a cabo a partir de dos meses después de la inducción de los brotes, tiempo suficiente en el que éstos desarrollaron raíces. Durante este periodo, se expone a la planta gradualmente a las condiciones externas; así, la aclimatación ocurrió durante cuatro semanas, tiempo suficiente en el que las plántulas se adaptaron al ambiente externo.

Cuadro 11. Protocolo para la producción de plántulas de arándano *Vaccinium corymbosum* cv. Biloxi.

Medio	Fase
WPM + 5 mg L ⁻¹ de 2iP	Establecimiento/4 semanas
WPM + 5 mg L ⁻¹ de 2ip	Multiplicación/6-8 semanas
Arena de Río + 10 g L ⁻¹ AIB/Charola	Enraizamiento/8 semanas
Arena de Río/Charola	Aclimatación/4 semanas

DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de reguladores del crecimiento vegetal (2ip, Tria y Eb), en la propagación *in vitro* de arándano azul (*V. corymbosum* L.) cv. Biloxi para la producción masiva de plantas de este cultivar, que es el que mejor se adapta a las condiciones edafoclimáticas de México. Las yemas axilares fueron capaces de regenerar abundantes brotes en medio WPM que contiene citocininas (2ip). El efecto sinérgico del Epibrassinolide con citocininas ha sido demostrado en *V. corymbosum* highbush blueberry cv. Briguitta (Kudriashova *et al.* 2012) y en frambuesa, *Rubus ideaus* L. (Robres-Torres *et al.* 2015). Por su parte, el efecto sinérgico de Tria con citocininas fue reportado por Tantos *et al.* (2001), en la micropropagación de manzana, con respecto al número de brotes regenerados, observándose que la adición de Eb en combinación con 2ip produjo un mayor número de brotes en comparación con la aplicación de 2ip sin Eb.

El número de brotes de arándano producidos *in vitro* depende en gran medida de la concentración de citocininas, particularmente de 2ip, y del cultivar propagado (Kudriashova *et al.* 2012; Vescan *et al.* 2012). En los tratamientos a los que se adicionó 1µg de Eb al medio que contiene 3 y 4 mg de 2ip, se observó mayor longitud de brotes. En este trabajo, se observó también que la aplicación exógena de Eb al medio de multiplicación está directamente relacionada con una mayor longitud de brotes. Datos similares fueron observados en *Vaccinium corymbosum* cv. Briguitta por Kudriashova *et al.* (2012), en el que se observó que la aplicación de Eb al medio WPM aumentó la longitud de los brotes a medida que se aumenta la concentración de Eb. Los resultados obtenidos en esta investigación son similares a los reportados previamente en la literatura ya que se observó que en el medio donde se combinó Eb con 2ip aumentó también la longitud de brotes.

El tratamiento que contiene 3 mg de 2ip+1µg de Tria+1µg de Eb, superó en el número de brotes a los tratamientos con la misma concentración de 2ip a las que se agregó Tria o Eb por separado. En el presente trabajo, la aplicación exógena de Eb al medio de cultivo mostró una respuesta positiva en la longitud de los brotes; mientras que, el efecto de Tria registró una respuesta positiva en el número de brotes. Este es el primer trabajo en el que se registra un efecto sinérgico de la combinación de Tria y Eb con citocininas (2iP), en el número de brotes de arándano azul regenerados *in vitro*.

CONCLUSIONES

Se obtuvo un protocolo para la micropropagación de *Vaccinium corymbosum* L. cv. Biloxi, el cual es una herramienta importante para la obtención masiva de plantas con alta calidad fitosanitaria.

El efecto de las citocininas en la micropropagación de brotes de arándano mejoró en forma importante, la longitud y el número de brotes cuando se agregó Tria o Eb en forma conjugada con 2iP, a diferencia de cuando se aplican por separado.

Se obtuvo 100 % de enraizamiento de microestacas de arándano azul, con el tratamiento de 10 gL⁻¹ de AIB; así mismo, se obtuvo 92% de enraizamiento con Radix 10000.

El protocolo para el cultivo *in vitro* de arándano azul desarrollado en este estudio, puede ser usado para la producción masiva de plantas con alta calidad fitosanitaria, representando una herramienta fundamental que de ser usada por los viveros, mejoraría de forma importante la calidad de la planta.

CAPÍTULO 2.

INOCULACIÓN DE HONGOS AISLADOS DE RAÍCES DE *Vaccinium confertum* HKB EN PLÁNTULAS DE ARÁNDANO AZUL (*V. corymbosum* L cv. Biloxi) OBTENIDAS POR CULTIVO *IN VITRO*

RESUMEN

Se obtuvieron raíces de *Vaccinium confertum* HKB, y *Rhododendron* sp., se lavaron con agua potable y se desinfectaron; posteriormente se sembraron en medio PDA, y EMA 2%. Se aislaron cepas fúngicas que fueron identificadas molecularmente como *Leptodontidium orchidicola*, *Humicola* sp., *Fusarium oxysporum* y una especie desconocida del orden Chaetosphaeriales. Cuatro hongos (*Leptodontidium orchidicola*, *Cenococcum geophilum*, y dos cepas oscuras de identidad desconocida aisladas de raíces de *Rhododendron* sp.), se inocularon en plántulas de arándano azul *Vaccinium corymbosum* L. cv. Biloxi obtenidas por cultivo *in vitro* después de su enraizamiento. Los hongos *L. orchidicola*, y *C. geophilum*, desarrollaron hifas en las células de la epidermis de las raíces finas, lo que da una clara certeza de la presencia de estructuras características de la micorriza ericoide. Además, se observó que existe un beneficio en el crecimiento radical y vegetativo de las plántulas inoculadas con *C. geophilum*, *L. orchidicola*, así como con la cepa A2 (de identidad desconocida), ya que se obtuvo un aumento importante en el número de raíces, en la longitud de la plántula, así como mayor producción de biomasa vegetal.

Palabras clave: Aislamientos fúngicos, identificación, inoculación, micorriza ericoide, *Leptodontidium*, *Cenococcum*.

CHAPTER 2.

INOCUATION OF FUNGI ISOLATED FROM ROOTS OF *Vaccinium confertum* HKB ON *in vitro* CULTURED BLUEBERRY PLANTLETS (*V. corymbosum* L cv. Biloxi)

ABSTRACT

Roots of *Vaccinium confertum* HKB, and *Rhododendron* sp., were rinsed with tap water, disinfested, and set on two culture media (PDA and EMA 2%). Fungal strains were isolated and molecularly identified as *Leptodontidium orchidicola*, *Humicola* sp., *Fusarium oxysporum* and one unknown species belonged to the Chaetosphaeriales Order. In addition, four fungi (*Leptodontidium orchidicola*, *Cenococcum geophilum*, and two dark strains isolated from roots of *Rhododendron* sp.), were inoculated to micropropagated blueberry plantlets (*Vaccinium corymbosum* L. cv. Biloxi) after being rooted. The fungi *L. orchidicola*, and *C. geophilum*, showed hyphal development in epidermal cells of fine roots, which denotes the presence of fungal structures resembling the typical ericoid mycorrhiza. Furthermore, there was observed benefits on plant growth (shoots and roots) due to the inoculation of *C. geophilum*, *L. orchidicola*, as well as due to the strain A2 (unknown species). Overall, these fungi enhanced the number of roots, shoot length and the plant biomass production.

Keywords: fungal strains, identification, inoculation, ericoid mycorrhiza, *Leptodontidium*, *Cenococcum*.

INTRODUCCIÓN

Vaccinium es un género conformado por 450 especies aproximadamente, las cuales se encuentran distribuidas en el hemisferio norte, Mesoamérica, el Este de India, Sudamérica, Este de África y Madagascar, Malasia y el Pacífico (Wilbur y Luteyn 2008), y se han descrito 27 especies pertenecientes a ese género y que son endémicas en una región que va desde México hasta Panamá, entre las que se encuentra *Vaccinium confertum* HBK, sobre la cual no existen estudios sobre diversidad de hongos que se asocien a sus raíces.

Los hongos micorrízicos ericoides (HMEr) son simbioses en raíces de plantas de la familia Ericaceae, entre las que se encuentra el género *Vaccinium* (Gibson y Mitchell 2004). Esta asociación ha permitido a estas plantas adaptarse a diferentes hábitats, desde los suelos ricos en humus del hemisferio norte, hasta los suelos arenosos del hemisferio sur (Mitchell y Gibson, 2006). La asociación de las plantas ericáceas con HMEr mejora la eficiencia en la asimilación de N y P hacia la planta (Vohník *et al.* 2005). Por ejemplo, la inoculación en plantas de *Rhododendron* en condiciones *in vitro* con HMEr, aumentó el crecimiento vegetativo (Jansa y Vosátka, 2000). De manera similar, diferentes HMEr promovieron el crecimiento radical y vegetativo de *Vaccinium corymbosum* en condiciones *in vitro* (Eccher y Noé, 2002).

Dado el desconocimiento de los hongos que se encuentran asociados con las raíces de *V. confertum* HBK, se planteó la presente investigación, con el objetivo de encontrar HMEr, que pudieran ser de utilidad agronómica al inocularlos en plántulas de arándano azul (*V. corymbosum* L.) cv. Biloxi, obtenidas por cultivo *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolecta de material vegetal

Se recolectaron plantas con suelo rizosférico, de arándano silvestre (Figura 10A, *Vaccinium confertum* HBK) en el bosque de pino encino, localizado en el municipio de Tenejapa, Chiapas, en el paraje llamado Winiktón (16°48' 59.61"N y 92° 30' 21.27" W). Estas plantas fueron trasladadas al laboratorio de micorrizas del Colegio de Postgraduados campus Montecillo para los estudios correspondientes. Similarmente, también se obtuvieron plantas de arándano azul (Figura 10B, *V. corymbosum* L.) cv Biloxi del Vivero Biotique, ubicado en Usmajak, Jalisco, y plantadas durante 5 meses en San Pablo Ixayoc, Texcoco, México, para obtener explantes para su uso en la micropropagación (Capítulo 1).

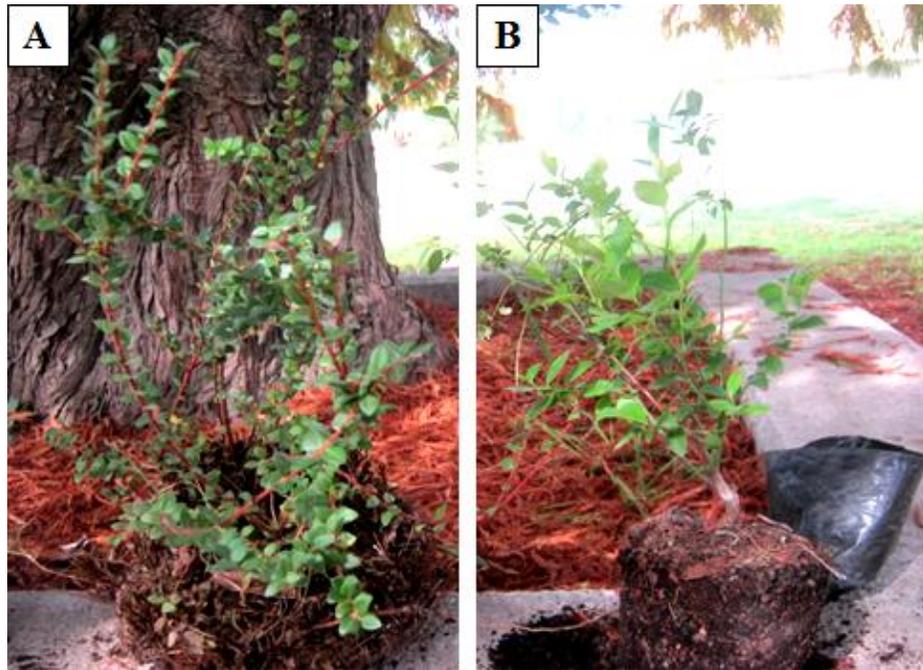


Figura 10. A) *Vaccinium confertum* HBK. B) *Vaccinium corymbosum* L. cv. Biloxi.

Estudio de las raíces

Para observar las estructuras fúngicas en las raíces, se utilizó el procedimiento de Phillips y Hayman (1970). Las raíces libres de suelo se colocaron en cápsulas para tinción, y se aclararon con hidróxido de potasio (KOH) al 10%, y se cambió por una solución limpia cada vez que esta se tornó oscura por la despigmentación; se repitió esta práctica hasta que las raíces dejaron de liberar pigmentos. Se retiró el KOH y las cápsulas con las raíces se enjuagaron con agua potable y se agregó peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 10% por 15 min; después, se retiró el exceso de H_2O_2 y las raíces se enjuagaron con agua. Posteriormente, se agregó ácido clorhídrico (HCl) al 10% por 15 min, se eliminó el ácido sin enjuagar, y se tiñeron con azul tripano al 0.05%, durante 24 h. El exceso de colorante se eliminó sumergiendo las raíces en lactoglicerol.

Se colocaron raíces paralelamente (18 segmentos de raíz de 1 cm, aclaradas y teñidas), sobre un portaobjetos, las cuales fueron observadas bajo un microscopio compuesto para determinar las estructuras. Este procedimiento también se aplicó a las raíces de *V.confertum*; así como a las plántulas inoculadas, con el objetivo de observar las estructuras que se desarrollan en la raíz por la presencia del hongo.

Aislamientos de hongos de raíces de *V. confertum*

Se utilizó la técnica de aislamiento de HMEr propuesta por Pearson y Read (1973) a partir de raíces de *Vaccinium confertum*. Las raíces se lavaron con agua potable y se desinfectaron superficialmente con agua estéril, por seis veces en agitación. Posteriormente, las raíces se sumergieron en una solución de cloro al 30%, por tres minutos. Enseguida se transfirieron a una solución de peróxido de hidrógeno al 5% por tres minutos, y se enjuagaron con agua esterilizada. En cada paso se agregó una gota de Twen 80 para mejorar la humectación de la superficie de las

raíces. Las raíces se fraccionaron con tijeras esterilizadas, en segmentos de aproximadamente 1 cm de largo y se colocaron tres segmentos en cada caja de Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA Merck®), y Extracto de Malta Agar (EMA Merck®). Para evitar el crecimiento de bacterias, los medios se suplementaron con 30 mg L⁻¹ de estreptomicina y se ajustó el pH a 4.5. Las cajas de Petri sembradas con los segmentos de raíz se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad, revisándolas cada 48 h. Cuando se observó crecimiento fúngico, con la punta de una aguja estéril, se tomó micelio de colonias físicamente separadas, y se resembró en medio EMA hasta obtener la purificación de la cepa en la caja de Petri.

Una vez purificadas las cepas fueron enviadas al Laboratorio de Sistemática y Ecología de Micorrizas a cargo del Dr. Roberto Garibay Origel (Facultad de Biología de la UNAM) para la identificación molecular de las cepas, que fueron aisladas de raíces de *Vaccinium confertum*.

Microcultivos de Riddell

En una caja de Petri esterilizada se colocó un soporte para portaobjetos y sobre éste, el portaobjetos. Enseguida se extrajo con un sacabocados una fracción circular de medio EMA y se colocó sobre el portaobjetos. Con una aguja fina y estéril se tomó una fracción de micelio activo de la cepa purificada y se inoculó por punción en cuatro puntos en el medio antes mencionado. Posteriormente, se colocó el cubreobjetos sobre el medio inoculado, se agregó 10 mL de agua esterilizada al fondo de la caja de Petri para mantener la humedad del ambiente interno y favorecer el crecimiento del hongo, se colocó la tapa de la caja de Petri y se depositó en el cilindro metálico. Una vez que crecieron los hongos de cada preparación, se obtuvo el cubre objetos con delicadeza y se colocó sobre un portaobjetos limpio que contiene una gota de azul tripano; así mismo, se obtuvo el portaobjetos, del cual se retiró con suavidad el medio de cultivo,

y se depositó una gota de azul tripano y enseguida se colocó el cubreobjetos. Las observaciones de las preparaciones se realizaron en el microscopio óptico a 40X y 60X. Se utilizó la fórmula revisándose 180 campos por cada hongo.

$$\text{Porcentaje de colonización} = \frac{\text{Número de campos colonizados}}{\text{Número de campos observados}} \times 100$$

Inoculación de *Cenococcum geophilum* en semillas de *Vaccinium corymbosum* L. pregerminadas

Se fraccionaron bayas frescas de arándano azul y con una aguja, se extrajeron las semillas contenidas en su interior, las cuales se colocaron en un recipiente con agua destilada. Enseguida se procedió a desinfectarlas de la siguiente manera. Las semillas se enjuagaron con agua destilada limpia hasta remover todos los residuos de la fruta; posteriormente, se decantó el agua y se vaciaron las semillas en un recipiente de vidrio esterilizado en autoclave. Después se aplicó agua oxigenada al 10% por 15 min, se decantó y se enjuagó con agua esterilizada, y se agregó alcohol al 70% por 30 s y se enjuagó con agua esterilizada. A continuación, se agregó NaCl al 20% por 10 min, se decantó y se enjuagó con abundante agua destilada esterilizada durante 10 ocasiones. Se tomaron 100 semillas desinfectadas y se colocaron en cada caja de Petri esterilizada; se agregó 5 mL de agua esterilizada a cada caja y se incubaron a temperatura ambiente ($27 \pm 2^\circ\text{C}$) en oscuridad. Una vez que las semillas comenzaron a germinar, éstas se inocularon pasándolas suavemente por la superficie de medio de cultivo PDA que contenía al hongo *Cenococcum geophilum*, éste fue obtenido del cepario de Microbiología del Colegio de Postgraduados. Posteriormente, se colocaron en cajas de plástico con arena de río esterilizada a 121°C por 2 h, y se asperjó agua estéril para humedecer el sustrato. Las cajas de plástico sembradas e inoculadas se sellaron con un película plástica para evitar la deshidratación y se

colocaron en la cámara de crecimiento con condiciones de 16 h de fotoperiodo; $200 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ de luz blanca, temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad relativa de 75%. Después de tres meses de incubación se evaluó el porcentaje de germinación y se inoculó el hongo antes mencionado en las semillas que mostraron el rompimiento de la testa y la emergencia de la radícula.

Inoculación de *Cenococum geophilum*, *Leptodontidium orchidicola*, y cepas A1 y A2 en plántulas de arándano azul micropropagadas

Para confirmar el estatus micorrízico de los hongos que fueron aislados de raíces de arándano silvestre, éstos se inocularon en brotes de *Vaccinium corymbosum* cv Biloxi previamente enraizados. La inoculación se realizó un mes después de la inducción de los brotes, con los cuatro hongos, de acuerdo a la siguiente metodología. Se obtuvieron brotes de siete semanas de edad cultivados en medio WPM (Woody Plant Medium) desarrollado por Lloyd y McCown (1980). El medio se suplementó con 5 mg de 2iP, se indujo el enraizamiento de los brotes aplicando polvo enraizador $10,000 \text{ mg kg}^{-1}$ de AIB en la base del brote, y se sembraron en cajas de plástico con arena de río esterilizada por 2 h en autoclave a 121°C . Después de un mes de la inducción, se inoculó con fragmentos de micelio puro obtenido con un pequeño sacabocados, para lo cual se separó la arena que cubre la base de los brotes hasta encontrar las raicillas y se colocó junto a éstas la fracción del micelio puro. Enseguida se cubrió con la misma arena y una vez inoculadas todas las plantas, se cerraron las cajas de plástico y se colocaron en una cámara de crecimiento en las siguientes condiciones: 16 h de fotoperiodo; $200 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ de luz; $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura. Pasados 120 días después de la inoculación se evaluó el número de raíces, la longitud de la raíz, el número de brotes, la longitud de los brotes y el peso seco total.

RESULTADOS

Se lograron aislar y purificar 4 cepas las cuales se identificaron por métodos moleculares. La identificación de las cepas enviadas al Laboratorio de Sistemática y Ecología de Micorrizas, muestra la identidad de las cepas (Cuadro 12); donde, la cepa CF5 tiene 99.8 % de similitud a *Leptodontidium orchidicola*, la cepa CFP3 tiene 98.5 % de similitud a *Humicola* sp., la cepa CFP5 100% de similitud a *Fusarium oxysporum*, y la cepa CF4 99.8% de similitud a una especie desconocida del orden Chaetosphaeriales.

Cuadro 12. Identificación de las cepas aisladas de *Vaccinium confertum* por métodos moleculares.

Cepa	Identidad	Similitud
CF5	<i>Leptodontidium orchidicola</i>	99.8 %
CFP3	<i>Humicola</i> sp.	98.5%
CFP5	<i>Fusarium oxysporum</i>	100 %
CF4	Especie desconocida del orden Chaetosphaeriales	99.8%

Las secuencias de ADN obtenidas para los hongos para realizar la identificación taxonómica se muestran en el Anexo 1.

Caracterización morfológica

La caracterización morfológica de las cepas puras, se llevó a cabo mediante la descripción de los aspectos físicos visibles de las cepas en la caja de Petri. Entre los criterios que se registraron, se consideró el tipo de colonia, su aspecto, consistencia, desarrollo, color y presencia de pigmento.

La cepa CF5 tiene aspecto aterciopelado, consistencia seca, desarrollo radial, color negro, pigmento circunscrito a la colonia (Figura 12A). La cepa CFP3 de aspecto aterciopelado-lanoso, consistencia seca, desarrollo radial, color blanco-oscuro y pigmento circunscrito a la colonia. (Figura 12B). La cepa CFP5 de aspecto lanoso, consistencia seca, desarrollo radial, color blanco-

rosa y pigmento circunscrito a la colonia (Figura 12C). La cepa CF4 de aspecto aterciopelado, consistencia seca, desarrollo radial-irregular, color café-claro y pigmento (Figura 12D). La cepa A1 de aspecto aterciopelado, consistencia seca, desarrollo radial, color negro, y pigmento circunscrito a la colonia (Figura 12E). La cepa A2 de aspecto aterciopelado, consistencia seca, desarrollo radial, color negro-verdoso, y pigmento circunscrito a la colonia (Figura 12F).

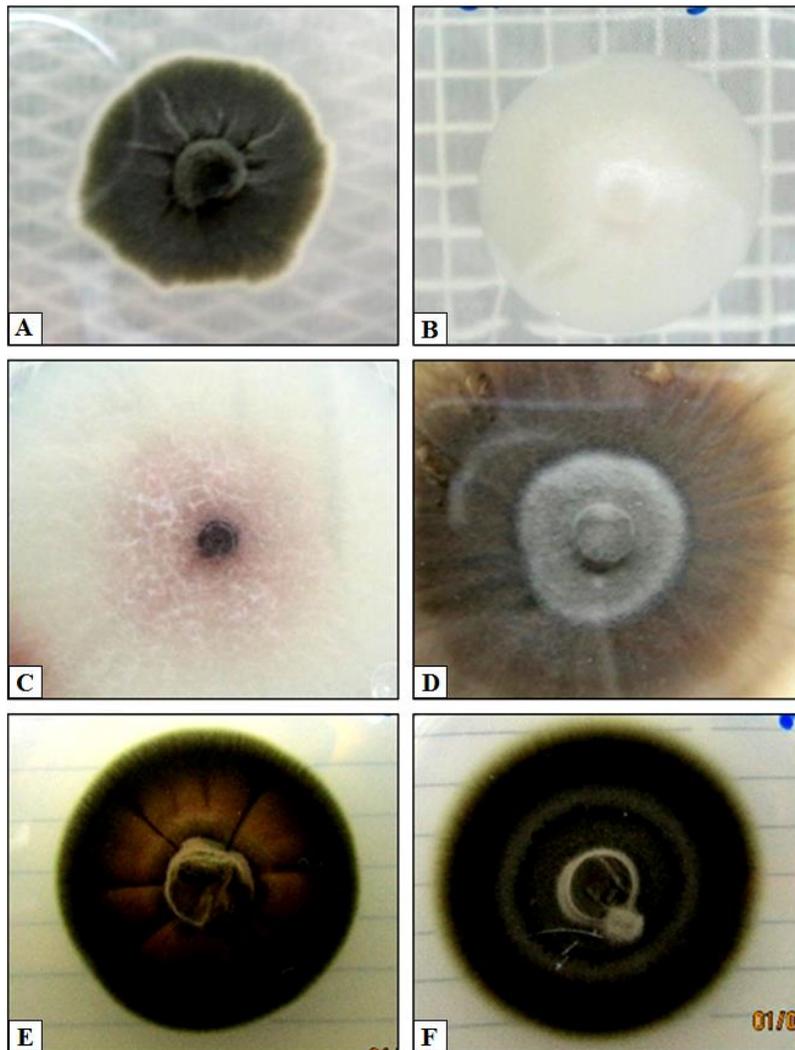


Figura 12. Aislamiento de hongos de raíces de *Vaccinium confertum*. A) *Leptodontidium orchidicola*, B) *Humicola* sp. C) *Fusarium oxysporum* D) Especie desconocida del orden Chaetosphaeriales. Cepas oscuras aisladas de *Rhododendron* sp.: E) A1 cepa no identificada y F) A2 cepa no identificada.

El crecimiento de los hongos aislados de *Vaccinium confertum* en medio EMA fue diferente para cada cepa (Cuadro 13). *Fusarium oxysporum* mostró mayor velocidad de crecimiento con un promedio diario de 6 mm, seguido de *Humicola* sp., el cual creció 3 mm por día. En contraste, *Leptodontidium orchidicola*, la especie desconocida del orden Chaetosphaeriales, y los dos hongos oscuros aislados de *Rhododendron* sp., mostraron similar velocidad de crecimiento, de 1 mm aproximadamente, en promedio (Cuadro 13).

La morfología de la cepa CF5 ya identificada previamente, se obtuvo mediante observaciones al microscopio, de las preparaciones realizadas por microcultivo Riddell como se aprecia el anexo 4.

Cuadro 13. Velocidad de crecimiento de hongos aislados de *Vaccinium confertum* y *Rhododendron* sp. en medio Extracto de Malta Agar.

	Especie	Crecimiento diario	Crecimiento radial
CF 5	<i>Leptodontidium orchidicola</i> *	1.3 mm	20 mm en 15 días
CFP3	<i>Humicola</i> sp*	3.2 mm	19 mm en 6 días
CFP5	<i>Fusarium oxysporum</i> *	6.3 mm	38 mm en 6 días
CF4	Chaetosphaeriales*	1.1 mm	45 mm en 42 días
A1	No identificada**	1.1 mm	16 mm en 15 días
A2	No identificada**	0.9 mm	14 mm en 15 días

*Aislados de *V. confertum*

**Aislados de *Rhododendron* sp.

Inoculación de *Cenococcum geophilum* en semillas de *Vaccinium corymbosum* pregerminadas

Se obtuvo un porcentaje de germinación de 92%. En las semillas pregerminadas inoculadas se encontró una clara diferencia significativa influenciada por la inoculación de *Cenococcum geophilum*, la cual mejoró en 40% el número de raíces (Cuadro 14). La altura de la planta

registró un aumento de poco más de 1 cm, lo mismo para el peso seco se observó un aumento del 100% por efecto de la inoculación del hongo (Cuadro 14).

Cuadro 14. Efecto de la inoculación de *Cenococcum geophilum* en el número de raíces, y brotes, altura y peso seco de plántulas de arándano *Vaccinium corymbosum*, después de 120 días.

Tratamiento	Número de raíces	Número de brotes	Altura de la planta (cm)	Peso seco (g)
<i>Cenococcum geophilum</i>	10.46 a	1 a	2.77 a	0.1250 a
Testigo	6.58 b	1 a	1.59 b	0.0689 b

Medias con letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha \leq 0.05$).

Inoculación de *Cenococcum geophilum*, *Leptodontidium orchidicola*, las cepas A1 y A2 en plántulas de arándano azul micropropagadas

Después de cuatro meses de la inoculación de tres cepas aisladas de *V. confertum*, o de *Cenococcum geophilum* en microestacas enraizadas de *V. corymbosum* obtenidas mediante cultivo *in vitro*, no se observaron efectos parasíticos; es decir, que no se presentó sintomatología de patogenicidad sobre las plántulas. Sin embargo, el peso seco total de plántulas inoculadas con la cepa oscura A1 aislada de *Rhododendron* sp., tuvo un efecto adverso en las plantas al reducir en 50 % aproximadamente, la biomasa en comparación con el testigo (Cuadro 15).

Las raíces que no se inocularon se encontraron libres de hifas tanto en su exterior, como en las células de la epidermis (Figura 13A), que es donde comúnmente se lleva a cabo la asociación

de hongos endófitos con las raíces de plantas ericáceas; además, no se observaron estructuras internas fúngicas tales como, enrollamientos de hifas o microesclerocios.

Cuadro 15. Efecto de la inoculación de *Leptodontidium orchidicola*, *Cenococcum geophilum*, las cepas oscuras A1, y A2 de identidad desconocida, en el número y longitud de raíces, altura, número de brotes, número de hojas y peso seco de plántulas de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv Biloxi, 120 días después de la inoculación.

Tratamientos	Número de raíces	Longitud de raíces (cm)	Altura de plántula (cm)	Número de brotes	Número de hojas	Peso seco (g)
Testigo	6.20 b	1.66 b	3.70 b	1.35 b	7.51 c	0.45 c
CF 5	12.37 a	3.10 a	7.68 a	1.83 a	14.70 a	0.63 b
CC	12.53 a	3.56 b	7.67 a	1.86 a	17.40 a	0.90 a
A1	7.33 b	1.89 b	3.27 b	1.46 b	9.00 c	0.29 d
A2	11.23 a	3.02 a	6.15 c	1.40 b	13.73 b	0.71 b

Medias con letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha \leq 0.05$).

Al observar las raíces inoculadas con la cepa CF5 (*Leptodontidium orchidicola*) se encontró que en las células de la epidermis se formaron enrollamientos de hifas, teñidos con azul tripano (Figura 13B). También en las células de la epidermis, se observó el desarrollo de hifas que se bifurcan (Figura 13C), así como hifas de color café, que se desarrollan en las bifurcaciones de las raíces (Figura 13D).

Por su parte *Cenococcum geophilum* desarrolló también enrollamientos hifales en las células de la epidermis (Figura 14B, 14C y 14D), también se observaron hifas que se desarrollan sobre los ápices radicales, las cuales entran a las células de la epidermis (Figura 14A). Mediante las observaciones realizadas se determinó el porcentaje de colonización el cual se aprecia en el anexo 3.

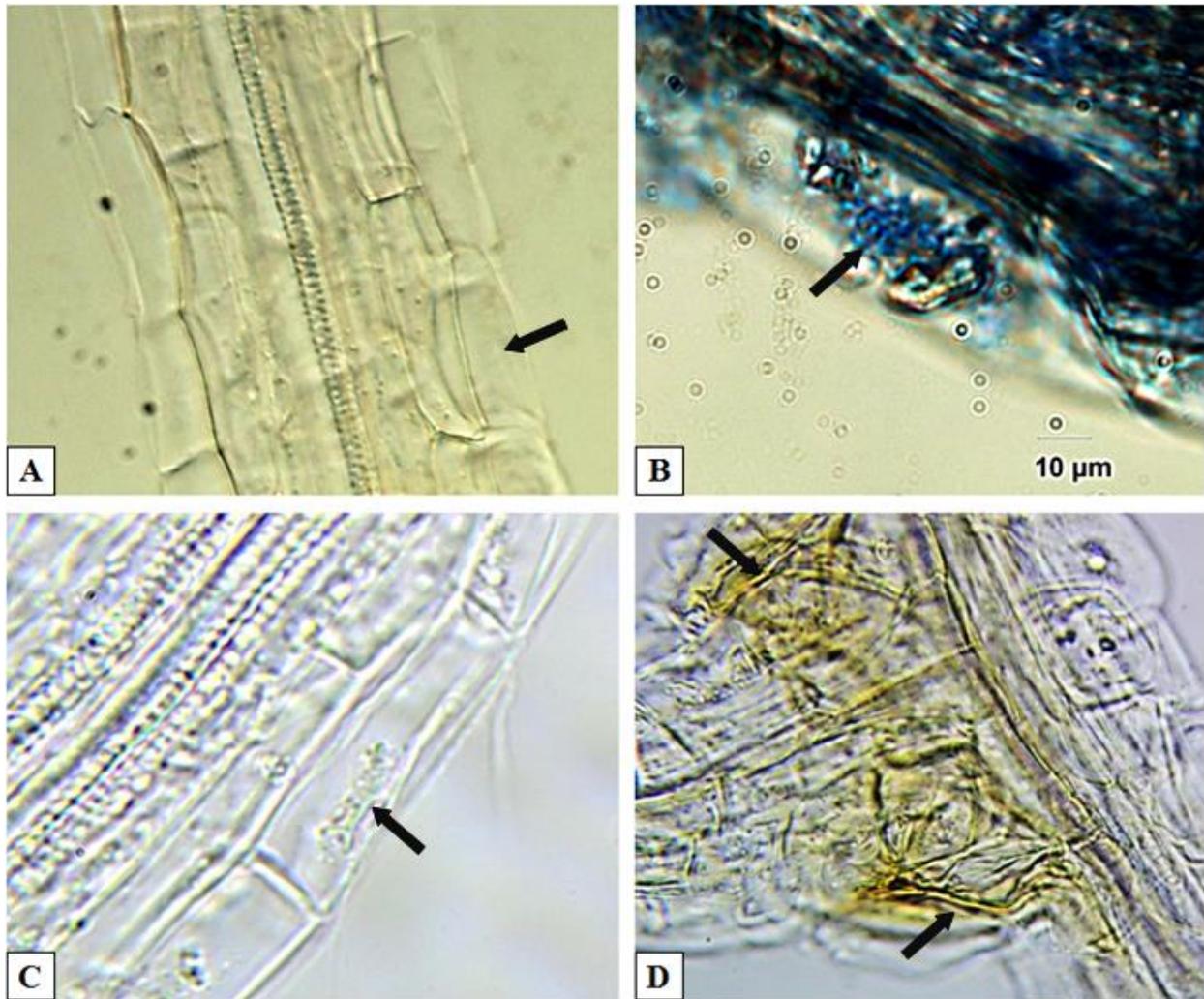


Figura 11. Aspectos de raíces de *Vaccinium corymbosum*. Testigo sin inocular (A), e inoculadas con *Leptodontidium orchidicola*: B) presencia de enrollamientos de hifas en las células de la epidermis, C) hifas en las células de la epidermis, y D) hifas melanizadas en células de la epidermis, a los 120 días después de la inoculación.

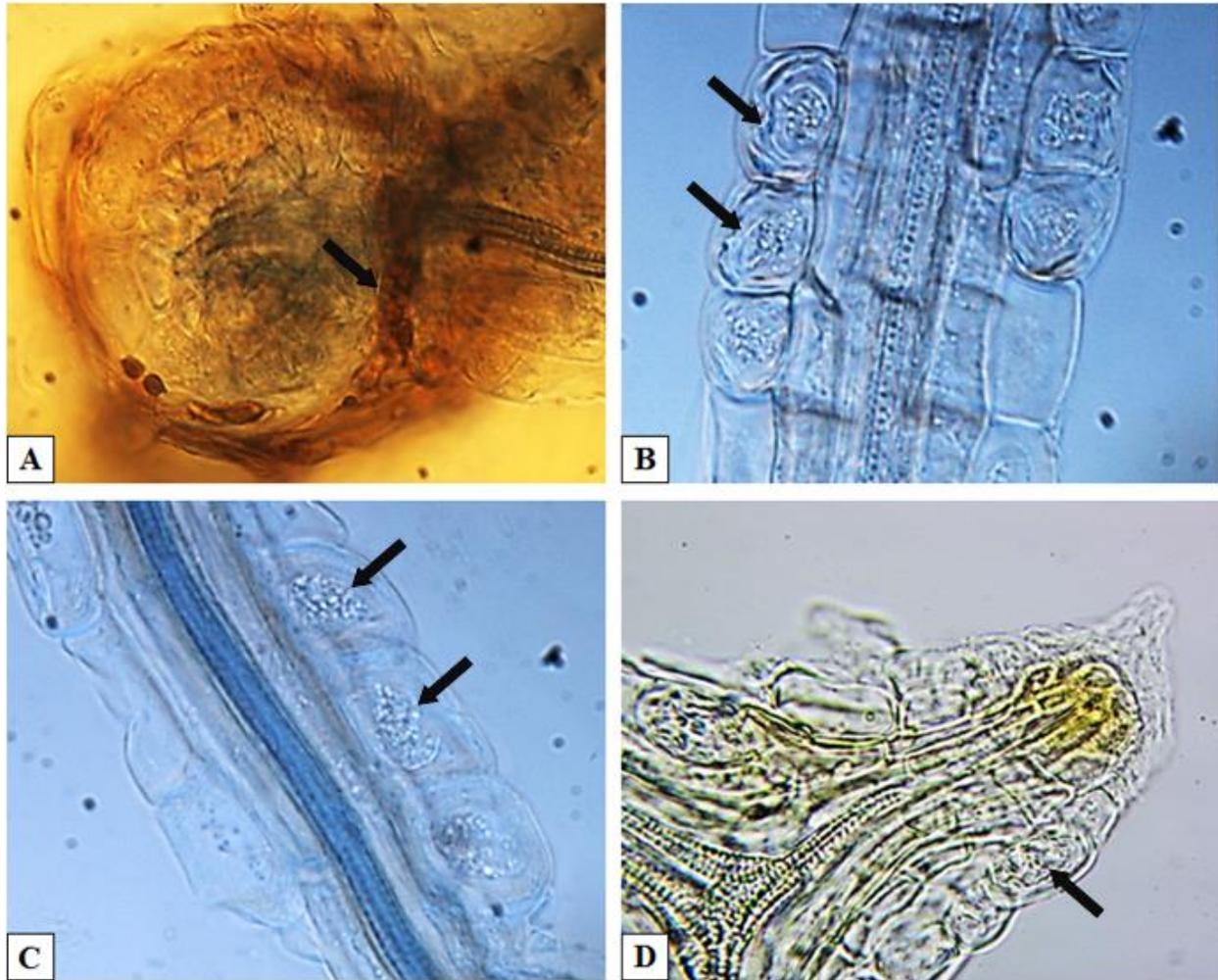


Figura 14. A) Estructuras fúngicas de *Cenococcum geophilum* en la cofia de la raíz de *Vaccinium corymbosum*. B), C), D) enrollamientos de hifas en las células de la epidermis, a los 120 días después de la inoculación.

DISCUSIÓN

Un endófito de color oscuro fue aislado de *Vaccinium confertum* HKB, y sometido a pruebas moleculares para su ubicación taxonómica, mediante las cuales se identificó como *Leptodontidium orchidicola*, este es el primer reporte de este hongo con esta planta Ericácea. El hongo *L. orchidicola* se asocia con una amplia gama de plantas de diferentes familias, y no tiene

hospederos específicos, sus efectos podrían ser considerados desde micorrízicos hasta parasíticos sobre su hospedante, lo cual depende en gran parte de la cepa y de la especie vegetal con la cual se asocie (Fernando y Currah, 1996). *Leptodontidium orchidicola* fue aislado de raíces de *Platanthera hyperborea*, *Corallorhiza maculata*, *Calypso bulbosa* y *Coeloglossum viride*, orquideas terrestres, en Alberta Canadá, e identificado en 1987 por Currah *et al.* (1987) como una especie nueva. Este hongo se caracteriza por presentar conidios laterales, sésiles y piriformes que surgen de una hifa fértil no diferenciada; sin embargo, no formó los típicos pelotones, y su presencia como endófito en orquídeas aún no está bien entendida (Currah *et al.* 1987).

La identidad de *Leptodontidium orchidicola* ha sido varias veces analizada, De Hoog, fue el primero en ubicarlo en el género *Leptodontium* en 1977, y lo renombró *Leptodontidium* en 1979 (De Hoog, 1977, 1979). Currah *et al.* (1987) lo caracterizaron morfológicamente como *Leptodontidium orchidicola* dándole ese nombre a la especie porque fue aislado de varias orquideas terrestres; aun así, el nombre fue dado con algunas dudas por la difícil observación de la conidiogénesis, la cual es necesaria para la clasificación taxonómica. Por otra parte, dos cepas de *L. orchidicola* fueron aisladas de raíces de *Pedicularis bracteosa* (Orobanchaceae) y de *Betula platyphylla* var. *japonica* (Betulaceae), e identificadas por métodos moleculares por Hou y Guo (2009), además se probó el estatus micorrízico confirmando la formación de pelotones en *Dendrobium nobile* (Orquidaceae). En el presente estudio, *L. orchidicola* creció 2 cm en 15 días con una tasa de crecimiento diario de 1.33 mm, en medio EMA 2%, lo que difiere del aislamiento original en el que en medio PDA, este hongo mostró un crecimiento diario de 3.9 mm (Currah *et al.* 1987), lo cual posiblemente se deba a que el medio EMA es más pobre en fuente de carbono en comparación con el PDA. Además, *L. orchidicola* fue capaz de asociarse

con raíces de *Vaccinium corymbosum* cv. Biloxi, desarrollando enrollamientos hifales típicos de la micorriza ericoide en las células de la epidermis. El presente trabajo es el primero en describir el aislamiento de *L. orchidicola* a partir de *V. confertum*, y sobre todo de establecer la simbiosis con raíces de *V. corymbosum*.

En esta investigación, *L. orchidicola* incrementó de forma importante el número y la longitud de raíces de *Vaccinium corymbosum* L. cv. Biloxi, en condiciones controladas; así mismo, incrementó el número y la longitud de los brotes, y la biomasa vegetal. Estos resultados son similares a los obtenidos por Fernando y Currah (1996) en el que *L. orchidicola* aumentó la longitud de la raíz de *Salix glauca* (Salicaceae) en un experimento en condiciones axénicas. También, *L. orchidicola* forma una simbiosis con raíces de *Potentilla fruticosa* (Rosaceae), *Dryas octopetala* (Rosaceae), y *Picea glauca* (Pinaceae) que podrían considerarse micorrízicas (Fernando y Currah, 1996); sin embargo, en ese mismo trabajo, un aislamiento de ese mismo hongo disminuyó el crecimiento en *P. fruticosa*, pero sin mostrar síntomas de patogenicidad.

Cenococcum geophilum (Gloniaceae, Dothideomycetes, Mytilinidiales) reclasificado por Spatafora *et al.* (2016), es un hongo ectomicorrízico omnipresente (Trappe 1964; Obase *et al.* 2014), y se ha encontrado en raíces de *Vaccinium oldhamii* Miq. en Japón (Takashi *et al.* 2016). Un aislamiento de este hongo del cepario de Microbiología del Colegio de Postgraduados fue inoculado en plantas de Arándano azul cv. Biloxi, obtenidas por cultivo *in vitro*, y en el presente trabajo este hongo formó enrollamientos hifales en las células de la epidermis de las raíces finas de *V. corymbosum*. Este es el primer reporte que menciona la asociación de este hongo con Ericáceas. La habilidad de *C. geophilum* de asociarse con diversos hospederos leñosos, incluye a

plantas gimnospermas como especies de la familia Pinaceae, y angiospermas pertenecientes a las familias Betulaceae, Fagaceae, y Salicaceae (Trappe 1962). En esta investigación se encontró que *C. geophilum*, hongo que frecuentemente forma ectomicorriza con plantas de la familia Pinaceae, se asocia con *Vaccinium corymbosum* (Ericaceae); resultados que coinciden con los reportados por Villareal-Ruíz *et al.* (2012), los cuales encontraron que hongos ectomicorrízicos como *Laccaria bicolor*, *Lactarius musteus*, *Suillus variegatus* y *Tomentellopsis submollis* fueron capaces de colonizar raíces de *Vaccinium myrtillus*, *V. vitis-idaea*, *V. macrocarpon* y *Calluna vulgaris* un experimento *in vitro* utilizando un medio de cultivo pobre en fuente de carbono.

Otro de los aislamientos obtenidos de *Vaccinium confertum* fue *Humicola* sp. En este género fúngico existen especies como *Humicola phialophoroides*, el cual es capaz de producir sustancias que activan la resistencia contra *Phytophthora capsici* en plantas de Chile (Wen-Hsiung *et al.* 2011); así como, *Humicola insolens* Y1 con potencial para la aplicación en la industria por producir β -1,4-Glucanasa termoestable la cual podría ser útil en la industria textil y cervecera (Xu *et al.* 2015). Por lo anterior, este hongo podría tener potencial para el control biológico de enfermedades en plantas (Ching-Hui *et al.* 2014), así como posibles usos industriales.

También se logró aislar de *Vaccinium confertum* en medio PDA, un hongo de color café-claro identificado como una especie desconocida que pertenece al orden Chaetosphaeriales, y aún se desconoce el estatus que guarda con esta Ericácea. Este orden fúngico comprende a las familias Chaetosphaeriaceae, Helminthosphaeriaceae y Pleurotremataceae, en las que se ubican especies saprófitas, patógenas y endófitas (Maharachchikumbura *et al.* 2016).

Los microorganismos endófitos incluyendo hongos y bacterias, pueden ser simbióticos que conviven con tejidos u órganos de las plantas y no causan obvios o visibles síntomas de infección (Stone *et al.* 2000). Estos endófitos se distribuyen en todas las plantas que crecen en condiciones naturales (Arnold, 2007). Esta es la razón por la que un aislamiento fúngico que fue identificado como *Fusarium oxysporum* en esta investigación, por métodos moleculares obtenido a partir de raíces desinfectadas de *V. confertum*. El género *Fusarium* corresponde a hongos del suelo bien descritos (Gordon y Martyn, 1997). Así, los aislamientos de este género han sido reportados como endófitos en raíces de *Dendropanax arboreus* (Ramos-Garza *et al.* 2016). Existen trabajos en los que se indica que la inoculación de la cepa *Fusarium* sp. CXC-13 en *Vitis vinífera* mejora las cualidades organolépticas de esta fruta (Ming-Shi *et al.* 2016); sin embargo, hace falta hacer el estudio de re-inoculación de este hongo con *V. confertum* y con otras ericáceas para probar el estatus que guarda con plantas de esta familia ya que la mayoría de los hongos de este género aislados de raíces de plantas son patógenos (Lecomte *et al.* 2016).

CONCLUSIONES

Los aislamientos fúngicos obtenidos a partir de raíces de *Vaccinium confertum*, fueron identificados por métodos moleculares como *Leptodontidium orchidicola*, *Humicola* sp., *Fusarium oxysporum* y una cepa oscura no identificada del orden Chaetosphaeriales. Además, se aislaron dos cepas oscuras (A1 y A2) no identificadas a partir de raíces de *Rhododendron* sp.

Bajo condiciones controladas, *Leptodontidium orchidicola* es capaz de asociarse con raíces de *Vaccinium corymbosum*, obtenidas por técnicas de cultivo *in vitro*, desarrollando enrollamientos hifales típicos de la micorriza ericoide en las células de la epidermis.

Leptodontidium orchidicola promueve el crecimiento radical y vegetativo de arándano azul, así como la acumulación de biomasa, lo que denota un potencial biotecnológico, de este hongo en la propagación de plantas de arándano en vivero.

Cenococcum geophilum fue capaz de asociarse con arándano azul (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. Biloxi, obtenidas por técnicas de cultivo *in vitro*, desarrollando enrollamientos hifales en las células de la epidermis. Además, este hongo también promovió el crecimiento radical y vegetativo de las plántulas.

CAPÍTULO 3

CONCLUSIONES GENERALES

El protocolo de micropropagación de arándano azul (*Vaccinium corymbosum* L.) cv Biloxi obtenido en esta investigación, es una herramienta que aporta información importante para el área de producción masiva de plántulas en vivero, ya que de ejecutarse se puede potencialmente obtener diez millones de plántulas con alta calidad fitosanitaria en un año.

El uso de 2iP como regulador del crecimiento para la multiplicación de brotes de arándano azul cv. Biloxi, a partir de yemas axilares, fue un factor fundamental en la propagación *in vitro* de esta planta, ya que produjo abundantes brotes, que al ser fraccionados (disectados en microestacas) dan lugar a un número importante de microestacas, todas con calidad para el enraizamiento.

Se logró con éxito el enraizamiento de microestacas de arándano azul, para lo cual fue necesaria la inducción con una dosis alta de Radix 1000 aplicada en la base del brote, logrando un porcentaje de 92 %. Sin embargo, el AIB grado reactivo aplicado en 10 g L⁻¹, incrementó significativamente el porcentaje de enraizamiento (100%).

El uso de las cajas plásticas para el enraizamiento y aclimatación de plántulas de arándano azul es una herramienta que cumple dos objetivos; ya que, al mismo tiempo se enraízan brotes, y se aclimatan las plántulas enraizadas de forma eficiente en el mismo recipiente. Lo anterior ahorra la preparación y el costo de medio de cultivo para enraizamiento, Así como el trabajo de la transferencia de las plántulas enraizadas *in vitro* a una cámara de aclimatación.

Este es el primer estudio sobre la diversidad de hongos endófitos en raíces de arándano silvestre *Vaccinium confertum*, en el que se encontró a *Leptodontidium orchidicola*, *Humicola* sp., *Fusarium oxysporum*, y una especie desconocida del orden Chaetosphaeriales. Además de estos hongos se obtuvieron otras dos cepas de hongos oscuros, aisladas de *Rhododendron* sp. que aún no han sido identificadas.

Leptodontidium orchidicola tiene potencial biotecnológico, para usarse en la fase de aclimatación ya que promovió el crecimiento radical y vegetativo de arándano azul (*Vaccinium corymbosum* L. cv. Biloxi). Para *Humicola* sp., la especie desconocida del orden Chaetosphaeriales, y *Fusarium oxysporum*, hace falta un estudio que analice sus efectos en esta Ericácea.

De los hongos que se aislaron de *V. confertum*, se identificó por métodos moleculares las cepas CF1 y CF5 como *Leptodontidium orchidicola*, el cual mostró la capacidad de formar enrollamientos hifales típicos de la micorriza ericoide, en las células de la epidermis de raíces de arándano azul, en condiciones controladas usando arena de río estéril como sustrato.

Este es el primer estudio en el que *Leptodontidium orchidicola*, aislado de *Vaccinium confertum* HKB e inoculado en *V. corymbosum* L., mostró la capacidad de formar enrollamientos

hifales típicos de la micorriza ericoide en las células de la epidermis; así mismo, favorece el crecimiento radical y vegetativo de plantas de arándano azul micropropagadas.

Se encontró que *Cenococcum geophilum*, un hongo común por formar ectomicorriza con plantas de la familia Pinaceae, se asocia con raíces de *Vaccinium corymbosum* L. cv. Biloxi (Ericaceae), en condiciones controladas. Este hongo desarrolló enrollamientos hifales típicos de la micorriza ericoide en las células de la epidermis. *Cenococcum geophilum* además de asociarse con *V. corymbosum*, favoreció el crecimiento radical y vegetativo; por lo que, existe un potencial biotecnológico que este hongo puede aportar en la producción masiva de plantas, que podría aprovecharse en la fase de enraizamiento *ex vitro*, para inducir mayor crecimiento en las plántulas. Este es el primer reporte en el que este hongo forma estructuras típicas de la micorriza ericoide, asociado con *V. corymbosum*.

Se encontró también a un hongo oscuro no identificado (A2), aislado de *Rhododendron* sp. fue capaz de promover el crecimiento de *V. corymbosum*; sin embargo, el estatus que guarda con esta planta aún no es conocido, por lo que hace falta un estudio de re-inoculación para conocer la relación entre este endófito con plantas ericáceas.

LITERATURA CITADA

- Addy HD, Hambleton S, Currah RS 2000 Distribution and molecular characterization of the root endophyte *Phialocephala fortinii* along an environmental gradient in the boreal forest of Alberta. *Mycological Research* 104(10): 1213-1221
- Addy HD, Piercey MM, Currah RS 2005 Microfungal endophytes in roots. *Canadian Journal of Botany* 83: 1-13
- Arnold AE (2007) Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews* 21: 51–66.
- Bain HF 1937 Production of syntetic mycorrhiza in the cultivated cranberry. *Journal of Agricultural Research* 55:811-835
- Bains P 2013 Highbush Blueberry Council. *Annual Report* URL. <http://docplayer.net/7541892-2013-2014-u-s-highbush-blueberry-council-annual-report.html> consulta junio de 2016.
- Bascopé JA 2011 Realidad productiva del arándano en EE.UU. y México. Agrimundo. 30p URL. <http://www.agrimundo.cl/wp-content/uploads/Informe-ArandanoVF21012013.pdf> Consulta mayo de 2016.
- Bajwa R, Read DJ 1985 The biology of mycorrhiza in the Ericaceae. IX Peptides as nitrogen sources for the ericoid endophytes and for mycorrhizal and non-mycorrhizal plants. *New Phytologist* 101: 459-467
- Bajwa R and Read DJ 1986 Utilisation of mineral and amino N sources by the ericoid mycorrhizal endophyte *Hymenoscyphus ericae* and by mycorrhizal and non-mycorrhizal seedlings of *Vaccinium*. *Transactions of the British Mycological Society* 87, 269-277.
- Bending GD, Read DJ 1996 Nitrogen mobilization from protein-polyphenol complex by ericoid and ectomycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 28: 1603-1612

- Bergero R, Perotto S, Girlanda M, Vidano G, Luppi AM 2000 Ericoid mycorrhizal fungi are common root associates of a Mediterranean ectomycorrhizal plant (*Quercus ilex*). *Molecular Ecology* 9:1639-1649
- Bougoure DS, Cairney JW 2005a Assamblages of mycorrhizal and other root-associated fungi from *Epacris pulchella* (Ericaceae) as determined by culturing and direct DNA extraction from roots. *Enviromental Microbiology* 76:819-827
- Bougoure DS, Cairney JW 2005b Fungi associated with hair roots of *Rhododendron lochiaie* (Ericaceae) in an Australian tropical cloud forest revealed by culturing and culture-independent molecular methods. *Enviromental Microbiology* 11:1743-1754
- Bougoure DS Cairney JW 2006 Chitilotic activities of ericoid mycorrhizal and other root-associated fungi from *Epacris pulchella* (Ericaceae). *Mycological research* 110: 328-334
- Bradley R, Burt AJ, Read DJ 1981 Mycorrhizal infection and resistance to heavy metal toxicity in *Calluna vulgaris*. *Nature* 292: 335-337
- Brazelton D, 2013 A current update on blueberries & health science discoveries. *Health Research*
- Bunea A, Rugina D, Pintea A, Sconta Z, Socaciu C 2011 Comparative Polyphenolic Content and Antioxidant Activities of Some Wild and Cultivated Blueberries from Romania. *Agrobotanic* 39(2):70-76
- Burt AJ 1984 Ecophysiological studies of heavy metal resitance in *Calluna vulgaris* (L.) Hull, with special reference to mycorrhizal infection. Ph.D thesis, Departament of Animal y Plant Science, University of Sheffield.
- Cairney JWG, Sawyer NA, Sharples JM, Meharg AA 2000 Intraspecific variation in nitrogen

- source utilisation by isolates of the ericoid mycorrhizal fungus *Hymenoscyphus ericae* (Read) Korf and Kernan. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1319-1322
- Campos P 2012 Especial arándanos. Comportamiento de las principales variedades de arándano en Chile. *Revista Frutícola*. No. 3
- Ching-Hui Y, Mei-Ju L, Jue-Yen S, Wen-Hsiung K 2014 Multiple resistance-activating substances produced by *Humicola phialophoroides* isolated from soil for control of *Phytophthora* blight of pepper. 1: 55:40
- Couture M Fortin JA 1983 *Oidiodendron griseum* Robak: an endophyte of ericoid mycorrhiza in *Vaccinium* spp. *New Phytologist* 95: 375-380
- Currah RS, Niemi M, Huhtinen S 1999 *Oidiodendron maius* y *Scytalidium vaccini* from the mycorrhizas of Ericaceae in northern Finland. *Kastenia* 39: 65-68
- Currah RS, Sigler L, Hambleton S, 1987 New records and new taxa of fungi from the mycorrhizae of terrestrial orchids of Alberta. *Canadian Journal of Botany* 65:2473-2482
- Cronquist A 1981 An integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press. 1262
- Dalpe Y 1986 Axenic synthesis of ericoid mycorrhiza in *Vaccinium angustifolium* Ait. By *Oidiodendron* species. *New Phytologist* 103:391-396
- Dalpe Y, Litten W, Siegler L 1989 *Scytalidium vaccinii* a new species, an ericoid endophyte of *Vaccinium angustifolium* roots. *Mycotaxon* 35:371-378
- Davey MR, Antony P 2010 Plant Cell Culture. Wiley-Blackwell, Singapore
- Debergh PC and Zimmermann RH 1991 Micropropagation and Application. Klumer Academic Publishers USA 479p

- De Hoog, GS 1977 Rhinocladiella and allied genera. Centraal bureau voor Schimmel cultures
Study Mycology 15: 1 - 140.
- De Hoog GS 1979 Nomenclatural notes on some black yeast-like Hyphomycetes. *Taxon* 28:
347-348.
- Doak KD 1928 The mycorrhizal fungus of *Vaccinium*. *Phytopathology* 18:102-208
- Doménech GC 2010 Morfogénesis: La ruta organogénica versus la ruta embriogénica.
Universidad Politecnica de Valencia. 1-5p
- Douglas GC, Heslin MC, Reid C 1989 Isolation of *Oidiodendron maius* from *Rhododendron* and
ultrastructural characterization of synthesized mycorrhizas. *Canadian Journal of Botany*
67:2206-2212
- Eccher T, Noé N 2002 Influence of ericoid endomycorrhizae inoculated in vitro on rooting and
early growth of micropropagated plants of *Vaccinium corymbosum* L. *Acta Horticultura*
574:373-378
- Egger KN, Siegler L 1993 Relatedness of the ericoid endophytes *Scytalidium vaccinii* and
Hymenoscyphus ericae inferred from analysis of ribosomal DNA. *Mycologia* 85:219-230
- Fall Creek, 2016 Fall Creek México, variety sheet Biloxi México. URL.
<http://www.fallcreeknursery.com/home/international/mexico/blueberry-varieties/>
- Gibson BR, Mitchell DT, 2004 Nutritional influences on the solubilization of metal phosphate by
ericoid mycorrhizal fungi. *Mycological Research* 108: 947–954.
- Gibson BR, Mitchell DT 2005 Phosphatases of ericoid mycorrhizal fungi: kinetic properties
and the effect of copper on activity. *Mycological Research* 109, 478-486.

- Fernando AA, Currah RS 1996 A comparative study of the effect of the root endophytes *Leptodontidium orchidicola* and *Phiolocephala fortinii* (Fungi Imperfecti) on the grow of some subalpine plants in culture. *Canadian Journal of Botany* 74: 1071-1078
- Freeman B, Albrigo LC, Biggs RH 1979 Cuticular waxes of developing leaves and fruit blueberry, *Vaccinium ashei* Reade cv. Blugreen. *Journal American Society Horticultural Science* 104:398-403
- Hartmann H, Kester D 1995 Propagación de plantas. Cuarta edición México CECSA 760 p
- Hambleton S, Egger KN, Currah RS 1998 The genus *Oidiodendron*: species delimitation and phylogenetic relationships based on nuclear ribosomal DNA analysis. *Mycologia* 90:854-868
- Hardtke CS, Dorcey E, Osmont KS, and Sibout R. 2007 Phytohormone Colaboration. Zooming in on Auxin-Brassinosterid Interaction. *Trends Cell Biol* 17: 485-495.
- Hurtado DV, Merino ME 1991 Cultivo de Tejidos Vegetales. Ed Trillas México. 232p
- Haselwanter K 1997 Soil micro-organism, mycorrhiza and restoration ecology. In: Urbanska KM, Webb NR, Edwards PJ (eds), *Restoration Ecology and Sustainable Development*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 65-80
- Hashem AR 1995 The role of mycorrhizak infection in the resistance of *Vaccinium macrocarpon* to manganese. *Mycorrhiza* 5:289-291
- Hou XQ, Guo SX 2009 Interaction between a Dark Septate Endophytic Isolate of *Dendrobium* sp. and Roots of *Dendrobium nobile* Seedling. *Journal of Integrative Plant Biology* 51(4): 374-381
- Hufford CD, Oguntimein BO. 1978. Non-polar constituents of *Jatropha curcas*. *Lloydia* 41:161-165

- Hyeonseok K, Mi-Hyeon J, Hyelin J, Gi-Jun S, Youngsin S, Inki K, Jeakyong S, Sang-wook, *et al.* 2015 Delphinidin sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis, by inducing DR5 and causing caspase-mediated HDAC3 cleavage. *Oncotarget* 6(12): 9970-9984
- Gianinazzi-Pearson V, Bonfante-Fasolo P, Dexheimer J 1986 Ultrastructural studies of surface interaction during adhesion and infection by ericoid mycorrhizal fungi. *Cell Biology* 4:273-282
- Gibson BR and Mitchell DT 2004 Nutritional influences on the solubilization of metal phosphate by ericoid mycorrhizal fungi. *Mycological Research* 108, 947-954.
- Grellet G, Merharg AA, Alexander IJ 2005 Carbon availability affects nitrogen source utilization by *Hymenoscyphus ericae*. *Mycological Research* 109: 469-477
- Griffiths RP, Caldwell BA 1992 Mycorrhizal mat communities in forest soils. In Read DJ, Lewis DH, Fitter AH, Alexander IJ, (eds). *Mycorrhizas in Ecosystems*. Wallingford, pp 98-105
- Fomina MA 2005 Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi. *Soil Biology & Biochemistry* 37: 851-866
- Jankiewicz, LS 2003 Reguladores de Crecimiento, Desarrollo y Resistencia en Plantas. 1ra Ed. Ediciones Mundi-Prensa. D.F. México. 487 p
- Jansa J, Vosátka M 2000 *In vitro* y *post vitro* inoculation of micropropagated *Rhododendrons* with ericoid mycorrhizal fungi. *Applied Soil Ecology* 15:125-163
- Johnson SA, Arjmandi BH 2013 Evidence for anti-cancer properties of blueberries: a mini-review. *Anti-cancer Agent Med Chem* 13:1142–1148

- Kerley SJ 1993 The role of mycorrhizal fungi mineralization of nitrogen from arganic compounds with special reference to aseptically produced natural substrates Ph. D. thesis, Department of Animal and Plant Sciences, University of Sheffield.
- Kerley SJ, Read DJ 1995 Chitin degradation by *Hymenoscyphus ericae* y transfer of chitin-nitrogen to the host platn. *New Phytologist* 131: 369-375
- Kerman MJ, Finocchio AF 1983 A new Discomycete associated with the root of *Monotropa uniflora* Ericaceae. *Mycologia* 75:916-917
- Kevin RK, RK, Workmaster BA, Piero AS 2007 Inoculation of cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) whit the ericoid mycorrhizal fungus *Rhizoscyphus ericae* increases nitrate influx. *New Phytologist* 176:184-196
- Krishna P 2003 Brassinosteroid-mediated stress responses. *Journal Plant Growth Regulation* 22:289–297
- Kron KA, Judd PF, Stevens WS, Stevens PF, Crayn DM, Anderberg AA, Gadek PA, Quinn CJ, Luteyn JL 2002 Phylogenetic Clasification of Ericáceae: Molecular and Morphological Evidence. *Botanical Review. The New York Botanical Garden* 68 (3): 335-423
- Kudryashova OA, Volotovich AA, Vasilevskaya TI, Varavina NP, Rupasova ZA, Khripach VA 2012 Effects of 24-epibrassinolide on *in vitro* micropropagation of highbush blueberry. *Russian Journal of Plant Physiology* 59 (4): 632-640
- Lagha AB, Dudonné S, Desjardins Y, Grenier D 2015 Wild Blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) Polyphenols Target *Fusobacterium nucleatum* and the Host Inflammatory Response: Potential Innovative Molecules for Treating Periodontal Diseases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63:6999-7008
- Leake JR and Miles W 1996 Phosphodiesterases as mycorrhizal P sources. I. Phosphodiesterase

- production and the utilisation of DNA as a phosphorus source by the ericoid mycorrhizal fungus *Hymenoscyphus ericae*. *New Phytologist* 132: 435-444.
- Leake JR, Read DJ 1990a Proteinase activity in mycorrhizal fungi. I. The effect of extracellular pH on the production and activity of proteinase by ericoid endophytes from soils of contrasted pH. *New Phytologist* 115:243-250
- Leake JR, Read DJ 1990b Proteinase activity in mycorrhizal fungi II. The effect of mineral and organic nitrogen sources on induction of extracellular proteinase in *Hymenoscyphus ericae* (Read) Korf and Kerman. *New Phytologist* 116:123-128
- Leake JR, Read DJ 1990c Chitin as a nitrogen source for mycorrhizal fungi. *Micological research* 94: 993-995
- Leake JR, Read DJ 1991 Experiments with ericoid mycorrhiza. In: Norris JR, Read DJ, Varma AK (eds), *Techniques for the study of mycorrhiza. Methods in Microbiology*. 23. Academic Press, London, pp. 435-459
- Leake JR, Read DJ 1997 Mycorrhizal fungi in terrestrial habitats, In: Read DJ, y Perez-Moreno, 2002. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems- a journey towards relevance? *New Phytol* 157:475-492
- Lecomte C, Alabouvette C, Edel V, Robert F, Steninberg C 2016 Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: A review. *Biological Control* 101: 17-30
- León OJ 2012 Especies de gallinas ciegas asociadas al arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) en Ciudad Guzman, Jalisco. Tesis, UACH. 79p
- Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski L 2008 Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Argen Bio. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

URL. http://intainforma.inta.gov.ar/wp-content/uploads/2010/09/bio_WEB.pdf Consulta
Junio de 2016

Li-Shu W, Gary DS 2008 Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters* 269:281-290

Liu Y, Tan D, Lin S, Liu X, Zhang Y, Tong C Song D, Hou M 2015 Blueberry Anthocyanins-Enriched Extracts Attenuate Cyclophosphamide-Induced Cardiac Injury. *Plos One*. 10(7): 1-18

Luzbetak DJ, Torrance SJ, Hoffman JJ, Cole JR 1978 Isolation of levo hardwickiic-acid and 1-triacontanol from *Croton californicus*. *Journal of Natural Products* 42:315-316.

LoBuglio KF 1999 *Cenococcum*. In: Cairney JWG, John WG, Chambers SM (eds) Ectomycorrhizal Fungi Key Genera in Profile. Springer Berlin, Heidelberg, pp 287–309
Lloyd E, McCown BH (1980) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Proc Intl Plant Prop Soc* 30:421–427

Luzbetak DJ, Torrance SJ, Hoffman JJ, Cole JR 1978 Isolation of levo hardwickiic-acid and 1-triacontanol from *Croton californicus*. *Journal of Natural Products* 42:315-316.

Maharachchikumbura S, Hyde K, Jones B McKenzie EH, Bhat JD, Dayarathne MC, Huang SK, Norphanphoun C 2016 Families of Sordariomycetes. *Fungal Diversity*. 79:1–317

Martineau LC, Couture A, Spoor D, Benhaddou-Adaloussi A, Harris C, Meddah B, Leduc C, Burt A, Vuong T, Mai LP, Prentki M, Bennett SA, Arnason JT, Haddad PS 2006 Anti-diabetic properties of Canadian lowbush blueberry *Vaccinium angustifolium* Ait. *Phytomedicine* 13:612-623

Martino E 2000 Ericoid mycorrhizal fungi from heavy metal polluted soils: their identification and grow in the presence of zinc ions. *Mycology. Research*. 104(3): 338-344

- Martino E, Perotto S, Parsons R, Gadd GM 2003 Solubilization of insoluble inorganic zinc compounds by ericoid mycorrhizal fungi derived from heavy metal polluted sites. *Soil Biology and Biochemistry* 35: 113-141
- McAnulty LS, Collier SR, Landram MJ, Whittaker DS, Isaccs SE, Klemka JM, Cheek SL, Arms JC, McAnulty SR 2014 Six weeks daily ingestion of whole blueberry powder increases natural killer cell counts and reduces arterial stiffness in sedentary males and females. *Nutrition Research* 34: 577-584
- Mihaljević S, Salopek B 2012 Alanine conjugate of indole-3-butyric acid improves rooting of highbush blueberries. *Plant soil environ* 58 (5): 236–241
- Mitchell DT, Gibson BR 2006 Ericoid mycorrhizal association: ability to adapt to a broad range of habitats. *Mycologist* 20:2-9
- Mitchell DT, Gibson BR 2006 Ericoid mycorrhizal association: ability to adapt to a broad range of habitats. *Mycologist* 20:2-9
- Mitchell DT, Read DJ 1981 Utilization of inorganic and organic phosphates by the mycorrhizal endophytes of *Vaccinium macrocarpon* and *Rhododendron ponticum*. *Transaction of the British Mycological Society* 76:225-260
- Monreal M, Berch SM, Barbee M 1999 Molecular diversity of ericoid mycorrhizal fungi. *Canadian journal of Botany* 77:1580-1594
- Mroginski L, Sansberro P, Flaschland E 2008 Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. En *Biotechnología y Mejoramiento Vegetal II*. Argen Bio. Instituto de Tecnología Agropecuaria. Argentina. URL. http://intainforma.inta.gov.ar/wp-content/uploads/2010/09/bio_WEB.pdf Consulta Junio de 2016

- Müssig C, Shin G, Altmann 2003 Brassinosteroids Promote Root Growth in Arabidopsis *Plant Physiology*. 133: 1261-1271
- Obase K, Douhan GW, Matsuda Y, Smith ME 2016 Revisiting phylogenetic diversity and cryptic species of *Cenococcum geophilum* sensu lato. *Mycorrhiza* 26:529-540
- Oficina Comercial de Perú en Miami, 2011 Perfil de mercados de Arándanos en los Estados Unidos de América. URL. <http://www.siicex.gob.pe/siicex/documentosportal/alertas/documento/doc/679028340radE80FF.pdf> Consulta junio de 2016
- Ohtaka N, Narisawa K 2008 Molecular characterization y endophytic nature of the root-associated fungus *Meliniomyces variabilis* (LTVB3). *J Gen Plant Pathol* 74: 24-31
- Pearson V, Read DJ 1973 The biology of mycorrhiza in the Ericaceae. The isolation of the endophytes and synthesis of mycorrhizas in aseptic culture. *New Phytologist* 72:371-379
- Pearson V, Read DJ 1975 The physiology of the mycorrhizal endophyte of *Calluna vulgaris*. *Trnasactions British Mycological Society* 64:1-7
- Peterson RL 2004 Ericoid.Mycorrhizas. In *Mycorrhizas: Anatomy and cell Biology* (ed) NRC.CNRC. Chapter 4:83-95
- Peterson TA, Mueller WC, Englander RL 1980 Anatomy and ultrastructure of a *Rhododendron* root-fungus association. *Canadian Journal of Botany* 58, 2421-2433.
- Pérez P 1998 Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biología de Plantas. Santa Clara. Cuba 390p
- Phillips JM, y Hayman DS 1970 Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment to infection. *Transactions British Mycological Society* 55: 158-161.

- Pospíšilová J, Tichá I, Kadlec P, Hishel D, Plzákova S 1999 Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions *Biologia plantarum* 42(4):481-497
- Prior RL, Lazarus SA, Cao G, Muccitelli H, Hammerstone JF 2001 Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* sp.) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:1270-1276
- Ramos-Garza J, Rodríguez-Tovar A, Flores-Cotera B, 2016 Diversity of fungal endophytes from the medicinal plant *Dendropanax arboreus* in a protected area of Mexico. *Annals of Microbiology* 66(3): 991-1002
- Rath M, Groling F, Hauelsen J, Imhof S 2014 Combining microtomy and confocal laser scanning microscopy for structural analyses of plant-fungus associations. *Mycorrhiza* 24: 293-300
- Read DJ 1974 *Pezizella ericae* sp. Nov. the perfect state of a typical mycorrhizal endophyte of Ericaceae, *Traslocations of the British Mycological Society*. 63: 381-383
- Read DJ, Leake JR, Langdale AR 1989 The nitrogen nutrition of mycorrhizal fungi and their host plants. In Boddy LL, Marchant R, Read (eds), *Nitrogen, Phosphorus and Sulphur Utilization by fungi*. Cambridge University Press, Cambridge 181-204.
- Read DJ 1989 Mycorrhizas and nutrient cycling in sand dune ecosystem. *Proceedings of the Royal Society, Edinburgh* 96: 80-110
- Read DJ 1983 The biology of mycorrhiza in the Ericales. *Canadian Journal of Botany* 61, 985-1004.
- Read DJ 1991 Mycorrhizas in ecosystem. *Experientia* 47:376-391

- Read DJ 1996 The structure and function of the ericoid mycorrhizal root. *Annals of Botany* 77: 365-374
- Read DJ, Leake JR, Perez-Moreno J 2003 Mycorrhizal fungi as drivers of ecosystem processes in heathland and boreal forest biomes. *Canadian Journal of Botany* 82: 1243-1263
- Reddy BO, Giridhar P, Ravishankar GA 2002 the effect of triacontanol on micropopagation of *Capsicum frutescens* and *Decalepis hamiltonii* W &A. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 71: 253-258
- Ries SK, Wert VF, Sweelev CC, Leavitt RA 1977 Triacontanol: a new natural occurring plant grow regulator. *Science* 195: 1339-1341
- Robres-Torres E, López-Medina J, Rocha-Granados MC 2015 Adventitious shoot elongation of raspberry *Rubus ideaus* L. is influenced by brassinosteroids. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6(5): 991-999
- Routray W, Orsat V 2011 Blueberries and Their Anthocyanins: Factors Affecting Biosynthesis and Properties. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 10:303-320
- SDR Colima, 2010 Secretaría de Desarrollo Rural -Dirección de Comercialización y Planeación. Arándano Perfil Comercial.
- SDR Jalisco, 2011. Secretaría de Desarrollo Rural-Agenda de Innovación Tecnológica del Estado de Jalisco.
- Shaw G, Read DJ 1989 The biology of mycorrhiza in the Ericaceae. XIV. Effect of iron and aluminium on the activity of acid phosphatase in the ericoid endophyte *Hymenoscyphus ericae* (Read) Korf y Kernan. *New Phytologist* 113: 529-533

- SIAP, 2015 Servicio de Información alimentaria y Pesquera. URL. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/> Consulta Agosto de 2016.
- Sharples JM, Chambers SM, Meharg AA, Cairney JW 2000 Genetic diversity of root-associated fungal endophytes from *Calluna vulgaris* at contrasting field sites. *New Phytologist* 148:153-162
- Skarede G, Wrolstad RE, Durst RW 2000 Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Food Science* 65:357-364
- Smith SE and Read DJ 1997 *Mycorrhizal Symbiosis*, 2nd edn. Academic Press Ltd, London, UK.
- Smith FA, Read DJ 2008 Ericoid Mycorrhizas. In *Mycorrhizal Symbiosis*. Chapter 11:389-419
- Spatafora JW, Douhan GW, Boehm WA, Schoch CL 2012 Phylogenetic placement of the ectomycorrhizal genus *Cenococcum* in Gloniaceae (Dothideomycetes). *Mycologia* 104(3):758–765
- Stone JK, Bacon CW, White J (2000) An overview of endophytic microbes: endophytism defined. *Microbial endophytes* 3: 29–33
- Stribley DP, Read DJ 1980 The biology of mycorrhiza in the Ericaceae. VII. The relationship between mycorrhizal infection and the capacity to utilize simple and complex organic nitrogen sources. *New Phytologist* 86: 365-371
- Stracker CJ Mitchell DT 1986 The activity and characterization of acid phosphatases in endomycorrhizal fungi of the Ericaceae. *New Phytologist* 104:243-256
- Stracker CJ 1996 Ericoid mycorrhiza: ecological and host specificity. *Mycorrhiza* 6:215-225

- Specht, RL 1979 Heathland and related shrubland of the wors. *In* Ecosystems of the world. Vol 9a. Edited by RL, Specht, Elsevier, Amsterdam 1-18
- Srivastava M, 2014 Sapodilla Plum (*Achras sapota*) Induces Apoptosis in Cancer Cell Lines and Inhibits Tumor Progression in Mice. *Science of Reports* 4:6147
- Takashi B, Hirose D, Sasaki N, Watanabe N, Kobayashi N, Kurashige F, Takuya B 2016 Mycorrhizal formation and diversity of endophytic fungi in hair roots of *Vaccinium oldhamii* Miq. in Japan. *Microbes Environment* 31 (2): 186-189
- Talaat NB, Shawky BT 2012 24-Epibrassinolide alleviates salt-induced inhibition of productivity by increasing nutrients and compatible solutes accumulation and enhancing antioxidant system in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Acta Physiologia Plantarum* 35: 729–740.
- Tantos Á, Mészáros A, Kissimon J, Horváth G, Farkas T 1999 The effect of triacontanol on micropropagation of balm, *Melissa officinalis* L. *Plant Cell Reports* 19: 88-91
- Tantos Á, Mészáros A, Farkas T, Szalai J, Hortváth G 2001 Triacontanol-supported micropropagation of woody plants. *Plant Cell Report* 20:16-21.
- Tian W, Zhang CQ, Quiao P, Milne R 2011 Diversity of culturable ericoid mycorrhizal fungi of *Rhododendron decorum* in Yunnan, China. *Mycologia* 103(4) 703-709
- Trappe JM 1962 *Cenococcum graniforme* – its distribution, ecology, mycorrhiza formation, and inherent variation. Dissertation, University of Washington
- Trappe JM 1964 Mycorrhizal hosts and distribution of *Cenococcum graniforme*. *Lloydia* 27:100–106.
- UNAM, 2015 Colecciones biológicas del Herbario Nacional a cargo del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México. Especies del género *Vaccinium* en México.

- URL. <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/URN:catalog:IBUNAM:MEXU:PV135613> Consulta Mayo de 2016
- USDA, 2000 Blueberry promotion, research and information order. Agricultural Marketing Service Department. of agricultural In <https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2016-02-23/pdf/2016-03806.pdf> Consulta Agosto de 2016
- USDA, 2002 Highbush blueberry *Vaccinium corymbosum* L. United States Department of Agriculture Natural Resources Conservation Service. *Plant Fact Sheet* URL. https://plants.usda.gov/factsheet/pdf/fs_vaco.pdf Consulta Agosto de 2016
- Valenzuela-Estrada L, Vera-Carballo V, Ruth, LE, Eissenstat DM 2008 Root anatomy, morphology, and longevity among root orders in *Vaccinium corymbosum* (Ericaceae). *American Journal of Botany* 95 (12): 1506-1514
- Van Leerdam DM, Williams PA, Cairney JW 2001 Phosphate-solubilising abilities ericoid mycorrhizal endophytes of *Wolsia pungens* (Epacridaceae) *Australian Journal of Botany* 49:75-80
- Vescan LD, Pamfil D, Clapa D, Fira A, Sisea RS, Pop IF, Petricele IV, Ciuzan O, Pop R 2012 Efficient micropropagation protocol for highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. "Elliot" *Romanian Biotechnological letters*. 17(1):6893-6902.
- Villata 2014 U.S. Market research shows increasing demand and use. Highbush Blueberry Council Annual Report. URL. <https://www.blueberry.org/wp-content/uploads/2016/09/2014-2015-USHBC-Annual-Report.pdf> Consulta Agosto de 2016

- Villareal-Ruiz JL, Neri-Luna C, Anderson IC, Alexander IJ 2012 In vitro interactions between ectomycorrhizal fungi and ericaceous plants. *Symbiosis* 56:67-75
- Vohník M, Albrechtová, Vosátka M 2005 The inoculation with *Oidiodendron maius* and *Phialocephala fortinii* alters phosphorus and nitrogen uptake, foliar C:N ratio and root biomass distribution in *Rhododendron cv. Azurro*. *Symbiosis* 40:87-96
- Vohník M, Sadowsky JJ, Kohout P, Lhotáková Z, Nestby R, Kolarík M 2012 Novel root-fungus symbiosis in ericaceae: sheathed ericoid mycorrhiza formed by a hitherto undescribed Basidiomycete with affinities to Tectisporales. *Plos ONE* 7(6):1-16
- Vraslad T, Fossheim T, Shumacher T 2000 *Piceirhiza bicolorata*- the ectomycorrhiza expression of the *Hymenoscyphus ericae* aggregate? *New Phytologist* 145, 549-563
- Wen-Hsiung KO, Ching-Hui Y, Mei-Ju L, Chi-Yu C, Yi-Jung T 2011 *Humicola phialophoroides* sp. nov. from soil with potential for biological control of plant diseases. *Botanical Studies* 52: 197-202.
- Wilbur RL, Luteyn JL 2008 A synopsis of the Mexican y Central American species of *Vaccinium* (Ericaceae) Institute Texas. *Journal Botanical Research* 2(1): 207-241
- Williamson JG, Lyrene PM 2004 The Florida blueberry industry: A decade of growth. Proc. Fla. State Hort. Soc. 117:234-235
- Wu X, Beecher GR, Holden MJ, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior R 2004 Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common food in the United States. *Journal Agricultural of Food Chemical* 52:4026-4037
- Xiao G, Berch SM 1995 The ability ericoid mycorrhizal fungi to form mycorrhizae with *Gaultheria shallon*. *Mycologia*. 87(4), 467-470

- Xu X, Li J, Zhang W, Huang H, Shi P, Luo H, Liu B, Zhang Y, Fan Y, Yao B 2015 A Neutral Thermostable β -1,4-Glucanase from *Hemicola insolens* Y1 with Potential for Applications in Various Industries. *Plos One*. 1: 1-13
- Zhang YH, Zhuang WY 2004 Phylogenetic relationships of some members in the genus *Hymenoscyphus* (Ascomycetes, Helotiales). *Nova Hedwigia* 78, 475-484
- Zheng HD, Zhuang WY 2012 Four new species of fungus *Hymenoscyphus* (fungi) based on morphology and molecular data. *China Life Science* 1:1-12
- Zhong Y, Guo YW, Chu H, Gao Y, Pang L 2015 Blueberry Improves the Therapeutic Effect of Etanercept on Patients with Juvenile Idiopathic Arthritis: Phase III Study. *Tohoku Journal Experimental Medicine* 237: 183-191

ANEXO 1

Secuencias obtenidas al introducir el ADN fúngico al secuenciador, de las cepas aisladas de *Vaccinium confertum* HBK.

Cf1 (*Leptodontidium orchidicola*)

TAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTTAAAAAATTAGGGGTTGCTGGCAAGTAGACCTACCGGAC
TCAATCGCGAGGAGTATTACTACGCGTAGAGCCGACAGGCACCGCCACTGATTTTAGGGGCCGCGAAAGCGCAACCCCA
ATACCAAGCGAGAGCTTGAGTGGTTATAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGAGGGCGCAATGTGCGT
TCAAAGATTGATGATTACTGAATTCGCAATTCACATTACTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAAC
CAAGAGATCCGTTGTTGAAAAGTTTAACTATTATATAGTACTCAGACATCACTAAAAACAAGAGTTGGGGTCCCTGGCG
GGCACTCAACAGCCGAAGCCGCTGGCAGGAGCGGCCGCCAAAGCAACAAGGTAGTTTATCAAGGGTGGAGTTCAGG
ACCGAGCTTCTCCGAGAGGCCGACGACTTAAACCCTACGGGAGTAGGGTAGCCCCGGGAGCGAGCTCCGCGGGCGCTG
TCTATCCTTTGCTCTAGTAATGATCCTCCGAGGTTACCTACGGAAACCTTGTACGACTTTTACTTCTCTAA

Cf4 (*Chaethosphaerales no identificado*)

TTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCTACCTGATCCGAGGTCAACCACTTAGAAAAGTTGGGGGTTTTACGGCCGGAG
CGCGCGCCGAGCCAGAACGAGAAAAGCATTACTGCGCTCGGTTCCGGGGCGCGCCCGCGTGTCTTTGGGAGCCTGCGCT
GCGCAGGGCTCCAACGCCAGGCGGGGCTGAGGGTTGAAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCGCCAGAGTGTGGCGGGC
GCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTACTGAATTCGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATC
GATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAAGTTTGTACTGTTTATAGTCTGCTCGGAGATGCCAACGTTACAGAGACA
GAGTTTAGGGGCCCGGGGGCTGGAGCGCACCGGAGCGCCGAAGACGCGCCCGGAGCACCCGCGAGGCAACGGGTT
GTAGGTAAGTTCACAATGGTTTACGGGAGTCTTGCAGTCTGTAATGATCCCTCCGCTGGTTACCAACGGAGACCTG
TTACGACTTTTACTTCTCTA

Cf5N (*Leptodontidium orchidicola*)

ATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCTACCTGATCCGAGGTCAACATTCAGAAGTTGGGGTTTAAACGGCGTGCCGCGAC
GATTACAGTAACGAGGGTTTTACTACTACGCTATGGAAGCTCGACGTGACCGCAATCAATTTGAGGAACGCGAATTA
CGGAGTCCCAACACCAAGCTGTGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCG
AATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTACTGAATTCGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGA
TGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAAGTTTGTATTTATGTTTACTCAGAAGTTACATATAGAAAACAGAGTT
TAGGGTCTCTGGCGGGCGTCCCGTTTTACCGGAGCGGGCTGATCCGCGAGGCAACAAGTGGTATGTTACAGGGG
TTTGGGAGTTGTAACCTCGGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTACGACTTTTACTTC

CfP3 (*Humicola* sp.)

TGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTCTTCTACCTGATCCGAGGTCAACCTTGGGTAATAAGGCTTTTAAACGGCCGGAACC
CGCAGCACGTCAGAGCGAGATGATTACTACGCTCGGAGTGACAGCGAGCCCGCCACTGCATTTACGGGCTGCGGCAG
CCGAGGTCCCAACACAAGCCGGGGCTTGATGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGG
CGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTACTGAATTCGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCAT
CGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAAGTTTGTACTTATTCAGTACAGAAAGACTCAGAGAGGCCATACAATCAA
TAGTTTGGTTTACCTCCGGCGGGCGCCCGGAGGGCCGGGGGCGCCGGGAGTGACCCGGCCCGCCCGGAAGCAACGG
TTTTGGTAACGTTACAATGGTTTGGGAGTTTTGCAACTCTGTAATGATCCCTCCGCTGGTTACCAACGGAGACCTTGT
TACGACTTTTACTTCTCTA

CfP5 (*Fusarium oxysporum*)

TGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCTACCTGATCCGAGGTCAACATTCAGAAGTTGGGGTTTAAACGGCGTGCCGCG
ACGATTACAGTAACGAGGGTTTTACTACTACGCTATGGAAGCTCGACGTGACCGCAATCAATTTGAGGAACGCGAATT
AACGCGAGTCCCAACCAAGCTGTGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGC
GCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTACTGAATTCGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATC
GATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAAGTTTGTATTTATGTTTACTCAGAAGTTACATATAGAAAACAGAG
TTTAGGGTCTCTGGCGGGCCGTCCTGTTTTACCGGAGCGGGCTGATCCGCGAGGCAACAAGTGGTATGTTACAGG
GGTTTGGGAGTTGTAACCTCGGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTACGACTTTTACTTCC

ANEXO 2

Efecto de la inoculación de las cepas CC, CF5, A1 y A2 en plántulas de arándano azul micropropagadas.

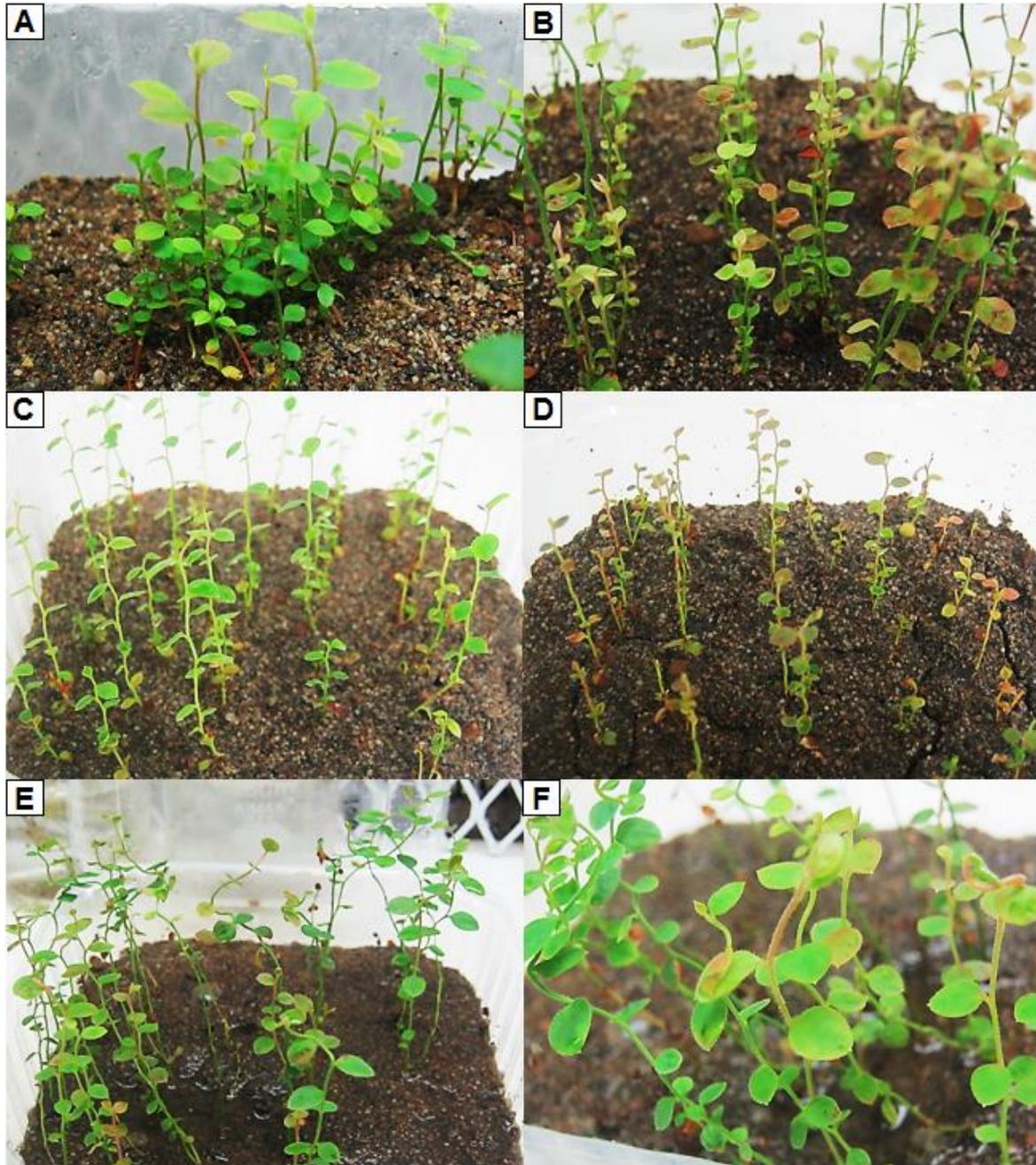


Figura 15. Aspecto de las plántulas de arándano azul (*Vaccinium corymbosum* L.) cv Biloxi, después de 120 días de la inoculación con los hongos *Leptodontidium orchidicola* (E y F), *Cenococcum geophilum* (A) y las cepas oscuras A1 (B), y A2 (C).

ANEXO 3

Porcentaje de colonización de raíces de arándano azul, 120 días después de la inoculación con *Cenococcum geophilum*, *Leptodontidium orchidicola*, y las cepas oscuras A1 y A2.

Cepa	Porcentaje de campos colonizados	Porcentaje de campos con enrollaminetos hifales
<i>Leptodontidium orchidicola</i> *	82	18
<i>Cenococcum geophilum</i> **	76	39
A1***	0	0
A2***	0	0
Testigo	0	0

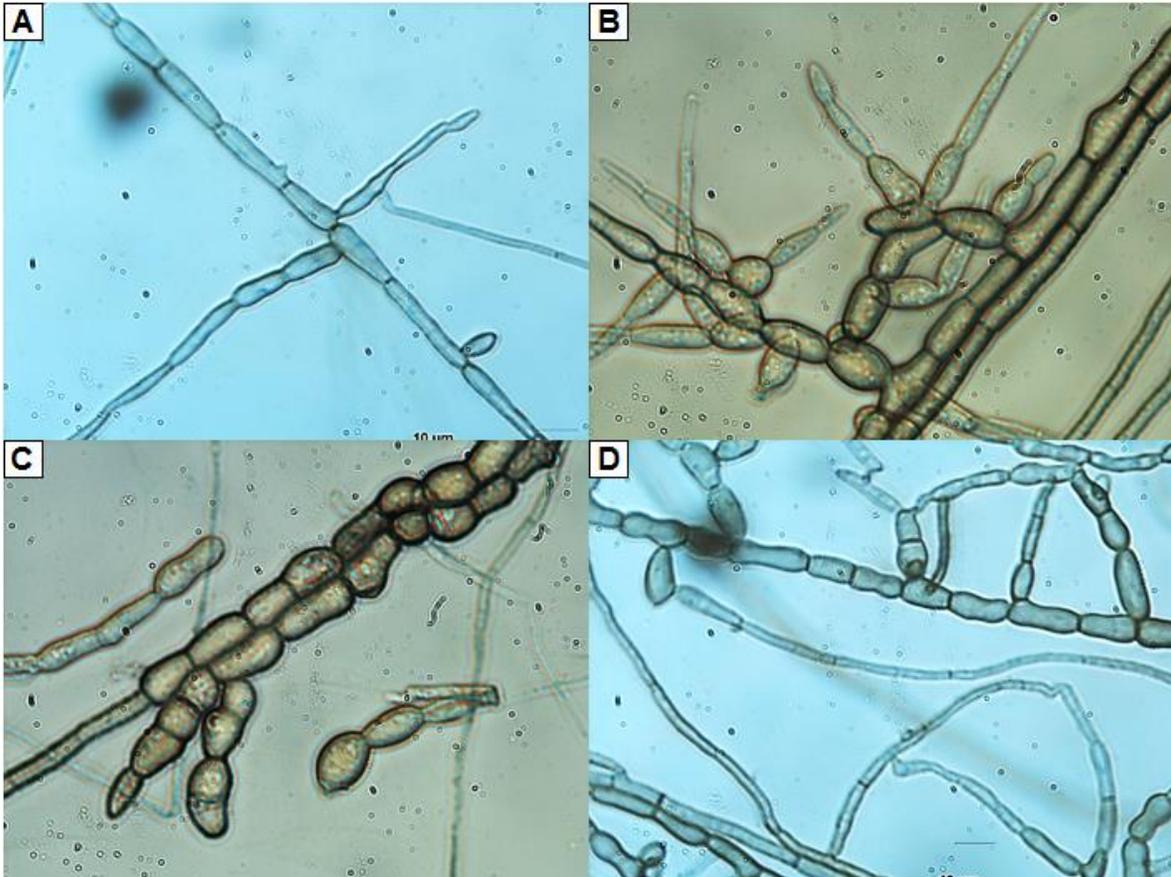
*Aislada de *Vaccinium confertum*

** Obtenida del cepario de Microbiología del CP.

*** Aisladas de *Rhododendron* sp.

ANEXO 4

Morfología de *Leptodontidium orchidicola* observada mediante microcultivo de Riddell



Hifas septadas con bifurcaciones casi en 90° (A), hifas septadas hinchadas (B y C), hifas septadas en la que se observan anastomosis (D).