



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS CÓRDOBA**

**® PROGRAMA DE POSGRADO EN INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA  
SUSTENTABLE**

**INOCULACIÓN DE HONGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR (*Glomus intraradices*) DURANTE LA ACLIMATIZACIÓN DE PLÁNTULAS DE CAÑA DE AZÚCAR**

**ING. MARÍA DEL ROSARIO MORENO HERNÁNDEZ**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**AMATLÁN DE LOS REYES, VERACRUZ, MÉXICO**

**2022**

**INOCULACIÓN DE HONGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR (*Glomus intraradices*) DURANTE  
LA ACLIMATIZACIÓN DE PLÁNTULAS DE CAÑA DE AZÚCAR**

La presente tesis titulada: **“Inoculación de hongo micorrízico arbuscular (*Glomus intraradices*) durante la aclimatización de plántulas de caña de azúcar”** realizada por el (la) estudiante: **“María del Rosario Moreno Hernández”** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS  
INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO (A)

---

DR. JERICÓ JABÍN BELLO BELLO

CO-DIRECTOR (A)

---

DR. LINO SÁNCHEZ SEGURA

ASESOR (A)

---

DR. RÉGULO CARLOS LLARENA HERNÁNDEZ

ASESOR (A)

---

DRA. OBDULÍA BALTAZAR BERNAL

Amatlán de los Reyes, Córdoba, Veracruz, 28 de octubre de 2022

# **Inoculación de hongo micorrízico arbuscular (*Glomus intraradices*) durante la aclimatización de plántulas de caña de azúcar**

María del Rosario Moreno Hernández, M.en C

Colegio de Postgraduados, 2022

## **RESUMEN**

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) establecen interacciones simbióticas que mejoran la productividad de los cultivos agrícolas. El objetivo fue evaluar el efecto de diferentes dosis de hongo *Glomus intraradices* sobre desarrollo *in vitro* de plántulas de caña de azúcar en etapa de aclimatización. Plántulas obtenidas *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp. cv Mex 69-290) fueron inoculadas en diferentes dosis (0, 50, 100, 200 y 400 esporas por planta) de *G. intraradices* durante la aclimatización. A los 60 d de aclimatización e invernadero, se analizó el porcentaje de supervivencia, porcentaje de colonización, materia seca, contenido de clorofila total, contenido de macro y micronutrientes. Además, se realizó la caracterización de las micorrizas por microscopía de campo claro y multifotón. Se observaron efectos en las variables evaluadas. Las dosis de 50 y 100 esporas por planta, con 30 y 58 % de colonización, respectivamente, lograron una eficiente interacción simbiótica; mientras que, las dosis de 200 y 400 esporas por planta, con los mayores porcentajes de colonización (80 y 86 %) tuvieron efectos negativos sobre la supervivencia, desarrollo, contenido de clorofila y estado nutricional. Mediante microscopía se puede observar el crecimiento de la hifa en los tejidos vasculares de la planta. La aplicación temprana de micorrizas en dosis adecuadas en plántulas durante la aclimatización podría representar una ventaja de acondicionamiento previo al trasplante para el establecimiento de semilleros básicos.

**Palabras clave:** *Glomus intraradices*, colonización, clorofila, microscopía, macro y micronutrientes.

**Inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus intraradices*) during the  
acclimatization of sugarcane plantlets**

María del Rosario Moreno Hernández, M. en C

Colegio de Postgraduados, 2022

**ABSTRACT**

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) establish symbiotic interactions that improve the productivity of agricultural crops. This study aimed to evaluate the effect of different doses of the fungus *Glomus intraradices* on *in vitro* development of sugarcane plantlets in the acclimatization stage. Sugarcane (*Saccharum* spp. cv Mex 69-290) plantlets obtained *in vitro* were inoculated with different doses (0, 50, 100, 200, y 400 spores per plant) of *G. intraradices* during acclimatization. After 60 d of acclimatization under greenhouse conditions, the survival percentage, colonization percentage, plant development, dry matter, total chlorophyll content y macro- y micronutrient content were evaluated. In addition, mycorrhizae were characterized by bright field y multiphoton microscopy. Effects on the evaluated variables were observed. The doses of 50 y 100 spores per plant, with 30 y 58 % colonization, respectively, achieved an efficient symbiotic interaction, while doses of 200 y 400 spores per plant, with the highest colonization percentages (80 y 86 %), had negative effects on survival, development, chlorophyll content y nutritional status. Using microscopy, it is possible observe the growth of the hyphae in the vascular tissues of the plant. Early application of adequate mycorrhizal doses in plantlets during acclimatization could represent a conditioning advantage prior to transplanting for the establishment of basic sugarcane seedbeds.

**Keywords:** *Glomus intraradices*, colonization, chlorophyll, microscopy, macro- y micronutrients.

## **DEDICATORIA**

A mis padres

Al Sr. Maximino Moreno Blanco y Sra. Dolores Hernández Ruiz agradezco su apoyo moral, sus muestras de cariño que durante toda la vida me han manifestado, por estar junto a mí en los momentos más difíciles. Por todos su amor y consejos, gracias.

A mis hermanos

Enrique, Carmen, Miguel, Guadalupe, Lucia, Luis, Jesús, Max, Lázaro, Caridad, Rafael y David, porque parte de este logro es gracias a ustedes, cuando existe el amor y la unión de familia todo se puede lograr y este trabajo es muestra de ello.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al CONACYT por la beca asignada.

Al CINVESTAV Unidad Irapuato. Al departamento de microscopia y de manera especial al Dr. Lino Sánchez Segura por el apoyo brindado.

Al COLPOS Campus-Córdoba. Por brindarme las instalaciones, equipo y recursos económicos para realizar mi proyecto.

A mi consejero, el Dr. Jericó Jabín Bello Bello, a mis asesores, Dr. Lino, Dr. Carlos y Dra. Obdulia.

Al Dr. Jericó Jabín Bello Bello, por la orientación brindada, consejos, apoyo y dirección de esta investigación.

Al Dr. José Luis Spinoso por el apoyo brindado en la revisión de tesis, la confianza y paciencia que me ha tenido.

A mis compañeros del laboratorio: Tania, Sandra, Cris, Dr. Mancilla, y al Dr. Spinoso por ayudarme a resolver dudas, por regalarme momentos divertidos durante estos dos años de maestría.

A mis profesores, compañeros, amigos de toda la vida y en general a cada persona que formo parte de estos dos años en que realice mi maestría, Gracias.

# CONTENIDO

RESUMEN .....	IV
ABSTRACT.....	V
DEDICATORIA .....	VI
AGRADECIMIENTOS .....	VII
CONTENIDO .....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTAS DE CUADROS.....	XI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....	3
2.1 Objetivo General.....	3
2.2 Objetivos Específicos.....	3
2.3 Hipótesis .....	3
3. REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
3.1 <i>Saccharum</i> spp .....	4
3.1.1 Importancia del cultivo.....	5
3.1.2 Problemática del cultivo .....	5
3.1.3 Biotecnología Vegetal .....	5
3.1.4 Cultivo de Tejidos Vegetal y sus aplicaciones .....	6
3.1.5 La micropropagación.....	6
3.2. Interacciones Simbióticas.....	8
3.2.1 Micorrizas.....	9
3.2.2 Importancia de las micorrizas.....	11
3.2.3 Efecto de las micorrizas en el crecimiento de las plantas.....	14
3.2.4 Hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA).....	14
3.2.5 Micorrizas arbusculares en plántulas <i>en vitro</i> .....	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
4.1 Estrategia experimental.....	16
4.2 Material vegetal y micropropagación.....	17
4.3 Inoculación de micorrizas y condiciones del cultivo .....	17
4.4 Caracterización de la inoculación micorrizica .....	18

4.5 Contenido de clorofila.....	19
4.7 Diseño experimental y análisis estadístico.....	19
5. RESULTADOS .....	20
5.1 Porcentaje de supervivencia y colonización micorrízica .....	20
5.2 Efecto de las micorrizas sobre el desarrollo <i>en vitro</i> .....	21
5.3 Contenido de macro y micronutrientos .....	23
5.4 Caracterización de la inoculación micorrizica .....	24
6. DISCUSIÓN .....	26
6.1 Efecto de las micorrizas sobre el desarrollo <i>en vitro</i> .....	26
6.2 Contenido de clorofila.....	27
6.3 Contenido de macro y micronutrientos .....	27
6.4 Caracterización de la inoculación micorrizica .....	28
7. CONCLUSIONES .....	29
8. LITERATURA CITADA .....	30

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Esquema general de la micropropagación y sus fases de cultivo .....	7
<b>Figura 2.</b>	Esquema de los tipos de micorrizas.....	8
<b>Figura 3.</b>	Diagrama comparativo de los tipos de micorrizas .....	10
<b>Figura 4.</b>	Estrategia experimental.....	16
<b>Figura 5.</b>	Efecto de los hongos micorrízicos arbusculares ( <i>Glomus intraradices</i> ) sobre la supervivencia.....	20
<b>Figura 6.</b>	Efecto de los hongos micorrízicos arbusculares ( <i>Glomus intraradices</i> ) sobre la materia seca y clorofila.....	22
<b>Figura 7.</b>	Efecto de los hongos micorrízicos arbusculares ( <i>Glomus intraradices</i> ) sobre el desarrollo de plántula <i>en vitro</i> .....	23
<b>Figura 8.</b>	Colonización de <i>Glomus intraradices</i> sobre el desarrollo de plántula <i>en vitro</i> .....	25

## LISTAS DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b>	Clasificación taxonómica de la caña de azúcar.....	4
<b>Cuadro 2.</b>	Estudios que demuestran los efectos positivos de los HMA en diversos cultivos.....	12
<b>Cuadro 3.</b>	Efecto de HMA sobre el contenido de macro y micronutrientes de plántula <i>en vitro</i> .....	24

## ABREVIATURAS

HMA	Hongos micorrízicos arbusculares
PIB	Producto Interno Bruto
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
KOH	Hidróxido de potasio
HCL	Ácido clorhídrico
BAP	Bencilaminopurina
KIN	Kinetina
AIA	Ácido indoloacético
MS	Murashige y Skoog
PH	Potencial de hidrógeno

# 1. INTRODUCCIÓN

La biotecnología es una herramienta que utiliza sistemas biológicos y organismos vivos para la modificación de productos o procesos para usos específicos (Convenio de Diversidad Biológica 2022). Por lo tanto, las interacciones ecológicas entre diferentes especies pueden tener una aplicación práctica en la biotecnología vegetal en cultivos de interés agrícola y forestal (Sales *et al.*, 2021; Barbosa *et al.*, 2021). La micorriza brinda algunas ventajas en el desarrollo, supervivencia y éxito de las especies que la conforman (plantas y hongos) (De Souza-Ferrari *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2022). Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son biótropos obligados que establecen asociaciones endosimbióticas con las raíces del 85 % de las plantas vasculares, incluidos diversos cultivos agrícolas (Di Martino *et al.*, 2019). Los HMA mejoran la absorción de nutrientes minerales en la planta huésped (Lambers *et al.*, 2017; Di Martino *et al.*, 2019; Ortas, 2019), tienen efectos positivos sobre la actividad fotosintética (Al-Karaki y Williams 2021), inducen la esclerificación del tejido foliar, contribuyen indirectamente a reducir el ataque de insectos herbívoros (Damin *et al.*, 2020), disminuye la invasión de fitopatógenos (Trinidad-Cruz *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2021) y confiere la tolerancia al estrés abiótico en plantas como sequía, salinidad, cambios bruscos de temperatura (Chandrasekaran *et al.*, 2021) y metales pesados (Gupta *et al.*, 2021). Los efectos positivos de los HMA se han demostrado en cultivos agroalimentarios como tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Di Martino *et al.*, 2019), caña de azúcar (*Saccharum* spp.) (Fors *et al.*, 2020), arroz (*Oryza sativa*) (Campo *et al.*, 2020), melón (*Cucumis melo*) (Meddich *et al.*, 2021) y planta leñosa (*Cinnamomum migao*) (Xiao *et al.*, 2022).

La caña de azúcar pertenece a la familia Poaceae, se cultiva principalmente en zonas tropicales y subtropicales del mundo (Bigott *et al.*, 2019; Tripathi *et al.*, 2022). Es uno de los principales cultivos agroindustriales y económicamente importantes del cual se obtienen diversos productos y subproductos utilizados en la industria alimentaria, energética, química, farmacéutica, entre otras (Sentíes-Herrera *et al.*, 2017; Rivero *et al.*, 2020; Shabbir *et al.*, 2021). Sin embargo, la caña de azúcar tiene grandes retos en materia de producción debido a que el método de propagación convencional por yemas no garantiza el saneamiento y rejuvenecimiento de plantaciones comerciales (Bello-Bello *et al.*, 2018). Recientemente, la biotecnología vegetal ofrece alternativas para afrontar estas limitaciones, una de ellas es mediante la micropropagación utilizando técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales. Esta técnica garantiza la obtención de plantas rejuvenecidas con

alta calidad genética y fitosanitaria. La aclimatización es la etapa final de la micropropagación que consiste en la transferencia de las plántulas a condiciones externas e inicio de su crecimiento *en vitro* (Gómez-Kosky *et al.*, 2021). Además, la aclimatización es un proceso que permite la inoculación temprana de micorrizas previo al trasplante en campo para el establecimiento de semilleros básicos (Vergara *et al.*, 2019). El objetivo fue evaluar el efecto de diferentes dosis de HMA de la especie *Glomus intraradices* sobre el desarrollo *en vitro* de caña de azúcar en etapa de aclimatización.

## 2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 2.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de diferentes dosis de HMA de la especie *Glomus intraradices* sobre el desarrollo *en vitro* de caña de azúcar en etapa de aclimatización.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Evaluar el desarrollo de las plántulas *en vitro* *Saccharum* spp. cv Mex 69-290
- Determinar el contenido de clorofila en plántulas *en vitro* *Saccharum* spp. cv Mex 69-290
- Determinar la cantidad micro y macronutrientes absorbido por las plántulas *en vitro* de caña de azúcar micorrizadas.
- Visualizar y describir las diferentes etapas de micorrización en plántulas *ex-vitro* de caña de azúcar mediante microscopía.

### 2.3 Hipótesis

La aplicación de diferentes dosis de micorrizas arbusculares de la especie *Glomus intraradices* adicionadas al sustrato tiene efectos sobre el porcentaje de supervivencia, colonización y fisiología en plántulas *en vitro* de *Saccharum* spp. cv Mex 69-290 durante la etapa de aclimatización.

### 3. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1 *Saccharum* spp

*Saccharum* spp., es un cultivo de la familia de las poaceas, se cultiva principalmente en zonas tropicales y subtropicales (Bigott *et al.*, 2019). Es originaria de Nueva Guinea, donde se cultiva desde hace aproximadamente 4500 años, llegó a México en la época de la Colonia; su primera plantación tuvo lugar en el estado de Veracruz, entidad que a la fecha sigue ocupando el primer lugar con más de la tercera parte de la producción nacional (SADER, 2020).

Actualmente es el cultivo agroalimentario más productivo del mundo. Debido a la naturaleza química y bioquímica de la materia prima que produce presenta gran potencial para la diversificación productiva. (Gómez-Merino *et al.*, 2017). Es un producto comercial en 130 países y territorios donde se cultiva (Moore *et al.*, 2014; Senties-Herrera *et al.*, 2017). Brasil ocupa el primer lugar con 19.2 % de la producción mundial, seguido de India con 16.1 %, Unión Europea con 9.9 % y México ocupa el octavo lugar con 3.4 % (CONADESUCA, 2020).

De acuerdo a Strasburger *et al.* (1988) la caña de azúcar se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Clasificación taxonómica de la caña de azúcar**

<b>Taxones</b>	<b>Clasificación</b>
Reino	Plantae
División	Spermatophyta
Sub-división	Magnoliophytina
Clase	Liliatae
Sub-clase	Lilidae
Orden	Poales
Familia	Poaceae
Sub-familia	Panicoideae
Tribus	Andropogoneae
Sub -tribus	Saccharastrae

Género	<i>Saccharum</i>
Especie	<i>Saccharum</i> spp. Híbridos

---

### **3.1.1 Importancia del cultivo**

La caña de azúcar representa una gran importancia agroalimentaria e insumos para la industria sucroquímica y bioenergética (Gómez-Merino *et al.*, 2017). De esta planta se pueden obtener más de 200 productos, coproductos, subproductos y derivados, incluyendo su uso en la biofábrica de nuevos productos innovadores (Rivero *et al.*, 2020; Zan *et al.*, 2020).

En México hay 267 municipios rurales en 15 estados del país, lo que genera un motor económico y de desarrollo con el 2.6 % del Producto Interno Bruto (PIB) manufacturero, el 13.8 % del PIB agropecuario y el 11.6 % del PIB en la industria alimentaria (CONADESUCA, 2020). La zafra 2020-2021 se realizó en 49 ingenios, en una superficie cosechada de 789,996 hectáreas, alcanzando una molienda de 51,292,545 toneladas de caña y una producción 5,715,448 toneladas de azúcar, posicionó al país en el octavo lugar a nivel mundial en producción de azúcar y caña molida (CONADESUCA, 2021).

### **3.1.2 Problemática del cultivo**

La agroindustria de la caña para México es importante en la vida económica y social. Debido a la sobredemanda, se hace necesario el empleo de técnicas que aumenten la productividad y competitividad del cultivo (Rivera *et al.*, 2010); el método de propagación convencional con semilla vegetativa, si bien es simple y rentable, no garantiza el saneamiento y rejuvenecimiento de las variedades seleccionadas en el campo (Bello-Bello *et al.*, 2018). Una alternativa a este problema es el uso del Cultivo de Tejidos Vegetales esta herramienta biotecnológica permite el establecimiento, manipulación y desarrollo de células, tejidos u órganos permitiendo así la regeneración de plantas rejuvenecidas, genéticamente homogéneas, libres de plagas y enfermedades (Bello-Bello *et al.*, 2014).

### **3.1.3 Biotecnología Vegetal**

La biotecnología es una herramienta que utiliza sistemas biológicos y organismos para la modificación de productos o procesos para usos específicos (Convenio de

Diversidad Biológica 2022). En donde los microorganismos, células de animales y plantas, enzimas, material genético aislado y clonado (Sasson, 1989; Roca y Ramírez, 2000).

La biotecnología comprende un conjunto de técnicas aplicables a diversas actividades de la sociedad, cuya base fundamental es multidisciplinaria, con disciplinas básicas como la biología celular y molecular, bioquímica, genética, microbiología, inmunología, ingeniería química y de procesos (Roca y Ramírez, 2000).

#### **3.1.4 Cultivo de Tejidos Vegetal y sus aplicaciones**

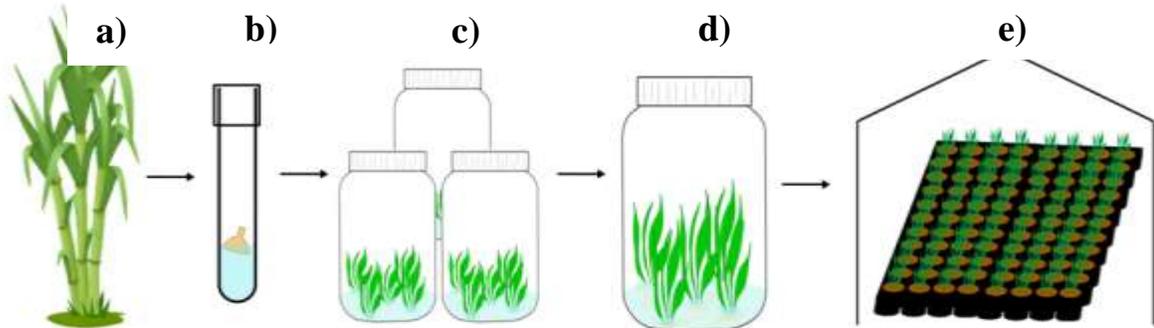
El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) es una técnica de la biotecnología vegetal que permiten el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de cualquier parte de una planta, desde una célula hasta un organismo completo, bajo condiciones artificiales, axénicas y controladas (Pérez *et al.*, 1999; Phillips y Garda, 2019).

Existen dos principales vías para la regeneración de plántulas: la embriogénesis somática y la organogénesis. La organogénesis, hace referencia a producción de órganos vegetales como raíces o brotes y la embriogénesis somática es formación de embriones a partir de células somáticas (Pérez *et al.*, 1999). Tanto la organogénesis como la embriogénesis somática se originan directamente a partir de los tejidos parentales o indirectamente a través de la formación de un callo, y están principalmente afectada por el tipo de explante y la señalización del regulador del crecimiento de la planta (Loyola y Ochoa, 2018). Los cultivos resultantes pueden usarse posteriormente para la producción masiva de plantas micropropagadas (Espinosa-Leal *et al.*, 2018).

#### **3.1.5 La micropropagación**

Se le llama micropropagación o clonación *in vitro* a la propagación asexual de plantas utilizando las técnicas de CTV (Pérez *et al.*, 1999). La micropropagación es un método eficiente para el cultivo de tejidos, la multiplicación y conservación del germoplasma (Chirumamilla *et al.*, 2020). Entre las principales ventajas que ofrece son: sanidad vegetal, plantas libres de plagas y enfermedades, homogeneidad genética y vigorosidad (rejuvenecimiento *in vitro*). Estas ventajas hacen a la propagación *in vitro* una práctica comercial rentable con alto valor agregado. El proceso

de micropropagación de cualquier especie vegetal consta de cinco etapas básicas (Figura 1), (Pérez *et al.*,1999).



**Figura 1.** Esquema de la micropropagación. a) selección de planta madre, b) establecimiento *in vitro*, c) multiplicación del tejido, d) elongación y enraizamiento, e) aclimatización.

**Etapa 0.** Selección de planta madre: en esta fase se seleccionan y acondicionan las plantas madre para asegurar el éxito de la micropropagación, partiendo de una planta con características vigorosas (plantas elite).

**Etapa I.** Establecimiento *in vitro*: En esta etapa se lleva a cabo la elección y desinfección del explante para iniciar el cultivo axénico. El éxito puede ser bajo por los problemas de adaptación y contaminantes que la planta puede presentar, sin embargo, es muy poco el material vegetal que se necesita para iniciar la siguiente etapa.

**Etapa II.** Multiplicación de tejido: se realiza de manera concreta la micropropagación donde se obtiene un gran número de brotes nuevos. En esta etapa se ajustan las concentraciones de hormonas y micronutrientes para obtener un efecto en el número de brotes.

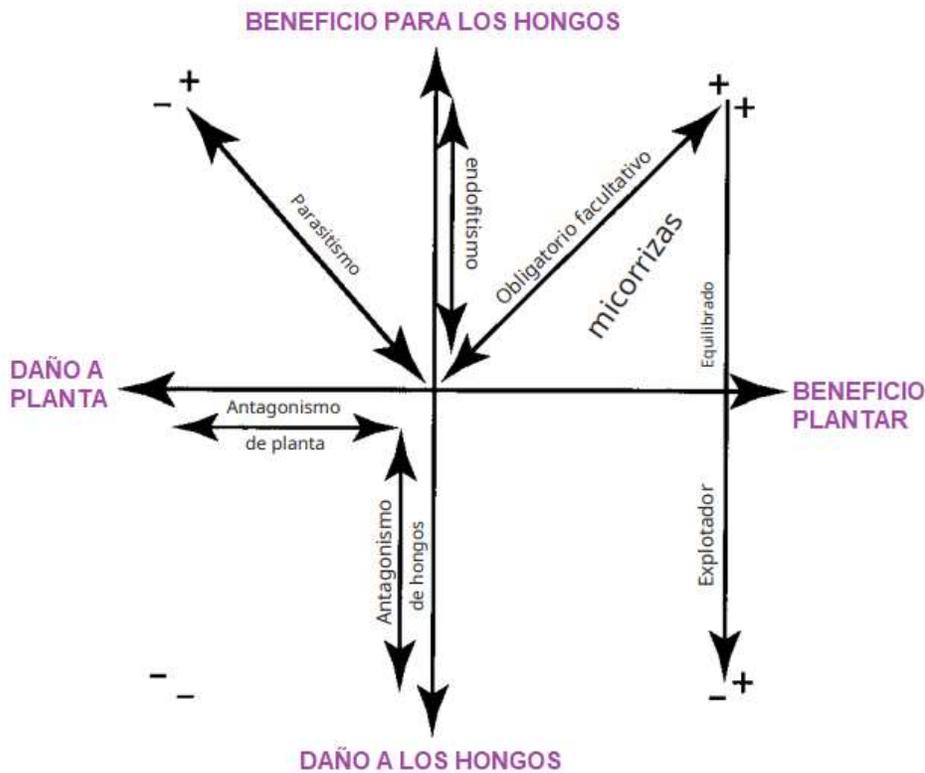
**Etapa III.** Elongación y enraizamiento: se pretende que los brotes generados en la multiplicación crezcan y desarrollen un sistema radical para hacer más fácil su manejo y adaptación a un ambiente *en vitro*.

**Etapa IV.** Aclimatización: su objetivo principal es obtener la supervivencia de las plantas al momento del trasplante y el inicio del crecimiento *en vitro*. En esta etapa las plantas *in vitro* pasan a condiciones externas, para la cual deben tomarse en cuenta características importantes; humedad

relativa, incremento paulatino en la intensidad luminosa, trabajar bajo condiciones higiénicas para el control de microorganismos.

### 3.2. Interacciones Simbióticas

Los microorganismos del suelo son responsables de diversos servicios ecosistémicos, como la descomposición de residuos orgánicos, la estructuración del suelo y la simbiosis de raíces. Las relaciones simbióticas explican la interacción entre dos organismos de distinta especie biológica (Andrade-Torres, 2010; Flores-Juárez *et al.*, 2020). Cuando se carece de la transferencia de nutrientes del hongo a la planta se denomina simbiosis parasítica o parasitismo (Brundrett, 2004). También existen asociaciones que pueden ser beneficiosas para ambas partes, y entonces se trata de una simbiosis mutualista o mutualismo (Figura 2). Las micorrizas son asociaciones mutualistas "equilibradas" en las que el hongo y la planta intercambian los productos necesarios para su crecimiento y supervivencia (Brunetto, 2004). Los hongos reciben carbono derivado de la fotosíntesis y proporcionan a la planta huésped nutrimentos como fósforo y nitrógeno (Genre *et al.*, 2020).



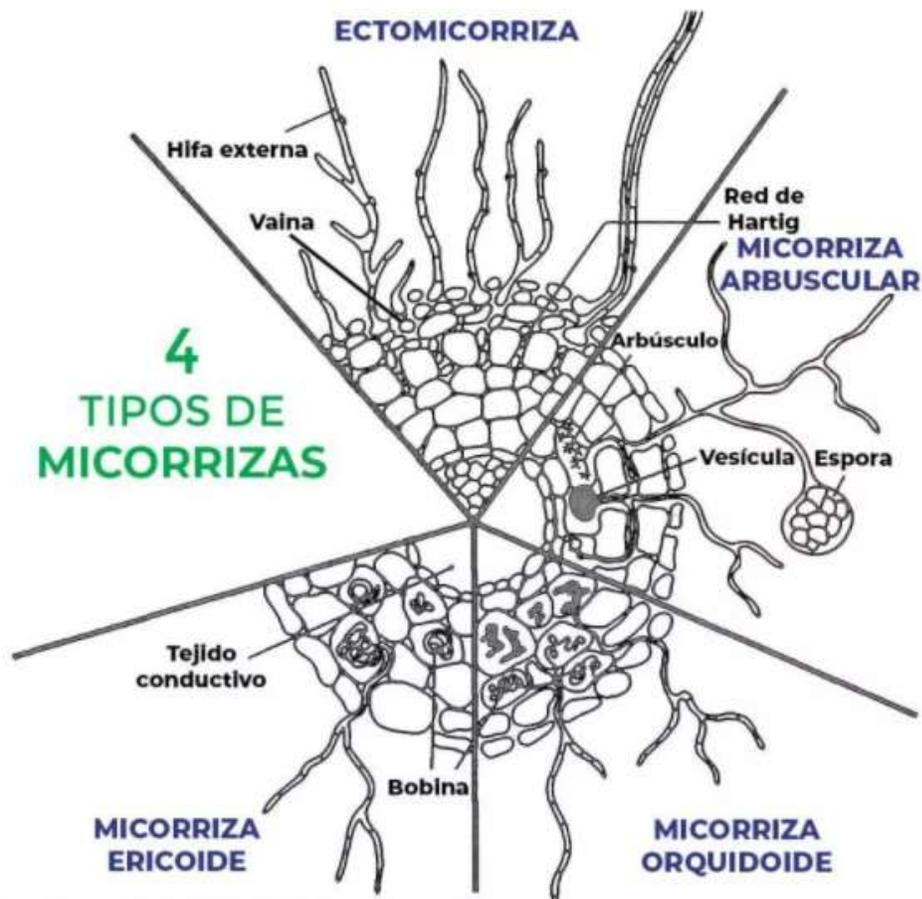
**Figura 2.** Diagrama comparativo de los tipos de micorrizas y otras categorías de interacciones planta-hongo.

### **3.2 1 Micorrizas**

El término micorriza (que significa hongo-raíz) fue originado por Frank (1885), para describir una asociación que observó en las raíces de árboles de los bosques templados (Latef *et al.*, 2016). Recientemente se definen como asociaciones entre hifas fúngicas y órganos de plantas encargados de la absorción de nutrimentos (Brundrett, 2004).

Se considera el órgano primordial en la captación de nutrientes en 90 % de los ecosistemas naturales y agrícolas (Brundrett, 2002; Camarena-Gutiérrez, 2012). Los hongos son seres vivos heterótrofos y por tal razón se benefician con los hidratos de carbono y vitaminas sintetizados por la planta (Smith y Read, 2008). A su vez, estos toman y transfieren nutrientes principalmente fósforo y nitrógeno del suelo a la raíz. Los hongos micorrízicos proporcionan protección contra patógenos y condiciones hídricas desfavorables (Lambers *et al.*, 2018; Di Martino *et al.*, 2019). Cuando se establecen las interacciones, se modifica la morfología de la raíz, lo cual genera nuevas estructuras que caracterizan a los diferentes tipos de micorrizas.

De acuerdo a criterios morfológicos tanto de las plantas como de los hongos, se reconocen cuatro grupos de micorrizas: **a)** ectomicorriza, **b)** micorrizas arbusculares (endomycorrizas), **c)** Orchidaceae y **d)** Ericoides (Figura 3). A continuación, se describe cada una de ellas.



**Figura 3.** Esquema de los tipos de micorrizas, Traducido y adaptado de Selosse y Le Tacon (1998).

**a) Ectomicorrizas** Este tipo de hongo no entra a la célula, se caracteriza por tener un manto hifal. Se encuentran en árboles de zonas templadas, siendo especialmente característico en hayas, pinos, robles entre otros. Este tipo de hongos son tanto ascomycetes, basidiomicetes y phycomycetes.

**b) Micorriza arbuscular (endomicorrizas)** es la más común, se presenta en más del 85 % de las especies vegetales de importancia agrícola. Se le conoce también como endomicorriza, no forma un manto externo. Las hifas se introducen en las células epidérmicas de la raíz y penetran en el interior de éstas. Dentro de la raíz, el hongo coloniza las células de la corteza, pero no alcanza la endodermis.

**c) Orquidoide** pertenece al grupo de las orquídeas, intervienen en el desarrollo y vida juvenil de la planta. Forma ovillos espirales dentro de las células. Su micelio es claro y ausente. Su principal

característica es la formación de pelotones. Los hongos de este tipo de micorriza son basidiomycetes.

**d) Ericoides** penetra en las células para formar ovillos y no presenta manto externo. Pertenece a la clase de hongos ascomycetes y basidiomycetes.

### **3.2.2 Importancia de las micorrizas**

Las micorrizas son importantes en la agricultura sostenible, pues modulan activamente la absorción de nutrientes (Lambers *et al.*, 2018; Di Martino *et al.*, 2019; Malhi *et al.*, 2021). Además del beneficio nutricional para las plantas, los hongos también pueden aumentar la tolerancia de estrés abiótico (Lenoir *et al.*, 2016; Al-Karaki y Williams. 2021) y metales pesados (Brunetto *et al.*, 2019; Gupta *et al.*, 2021). Se sabe que los hongos micorrízicos arbusculares estimulan la actividad fotosintética de las plantas (Frew *et al.*, 2017; Santana *et al.*, 2018; Brunetto *et al.*, 2019; Al-Karaki y Williams 2021; Sales *et al.*, 2021) y mejoran la resistencia a enfermedades (Trinidad-Cruz *et al.*, 2017; Damin *et al.*, 2020). Se exponen algunos estudios sobre los efectos positivos que tienen las micorrizas en diversos cultivos (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Estudios que ejemplifican algunos de los efectos positivos de los hongos micorrízicos arbusculares en diversos cultivos.

<b>Cultivo</b>	<b>Dosis</b> (esporas / planta)	<b>Resultados</b>	<b>Referencia</b>
Agave ( <i>Agave cupreata</i> )	100	Mejoró la biomasa seca total de las plantas, en un intervalo entre 148 y 239 % más con respecto al testigo sin HMA.	(Trinidad-Cruz <i>et al.</i> , 2017)
Frijol de bibijagua ( <i>Canavalia ensiformis</i> L.)	100	Los HMA aumentó la fitoestabilización de Cobre, especialmente a dosis de vermicompost de 10 y 20 mg fósforo kg <sup>-1</sup> .	(Santana <i>et al.</i> , 2018)
Uva ( <i>Vitis vinífera</i> )	100	En raíces y brotes aumentó la concentración de fósforo.  Redujo la toxicidad del Cobre en uvas jóvenes.	(Brunetto <i>et al.</i> , 2019)
Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> )	120-150	Aumento de pigmentos fotosintéticos.  Mejoró la eficiencia del uso del agua.  Restauró la alteración mediada por arsénico.	(Gupta <i>et al.</i> , 2021)
Soja ( <i>Glycine max</i> )	250	Los inóculos de micorrizas son efectivos para apoyar el crecimiento de la soja y contrarrestar los efectos de la sequía.	(Al-Karaki y Williams., 2021)

Alcaparra ( <i>Capparis spinosa</i> )	30	Observaron que el crecimiento de las plántulas mejoró considerablemente debido a una mayor acumulación de P, K, Mg, Fe y Zn.	(Bouskout <i>et al.</i> , 2022)
Malanga ( <i>Colocasia esculenta</i> L. Schott)	100	Induce tolerancia a salinidad durante la etapa de aclimatización. Efectos positivos en el desarrollo de las plántulas mejora biomasa.	Baltazar -Bernal <i>et al.</i> , 2022

### **3.2.3 Efecto de las micorrizas en el crecimiento de las plantas**

Entre las principales ventajas que aportan las micorrizas a las plantas se encuentran, mayor tolerancia a sequía, desequilibrios en el pH y altos contenidos de sales (Lenoir *et al.*, 2016; Al-Karaki y Williams., 2021). En planta de maíz (*Zea mays* L.) los HMA promovieron resistencia a organismos patógenos (Damin *et al.*, 2020). En suelos contaminados por metales pesados, las plantas micorrizadas poseen mayor resistencia, gracias a la capacidad para inmovilizar los metales en la raíz (Brunetto *et al.*, 2019). Otro aspecto importante es que permite mejorar significativamente la disponibilidad, absorción, asimilación y translocación de nutrientes principalmente fósforo y nitrógeno (Kamelchuk y Laman, 2021; Ortas, 2019). Se ha demostrado que los HMA influyen positivamente en la acumulación de algunos nutrimentos minerales, especialmente los de baja movilidad como P y Zn (Ortas 2019; Lotfi *et al.*, 2019).

### **3.2.4 Hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA)**

Los HMA, originalmente son conocidas como micorriza vesicular-arbuscular. Son asociaciones simbióticas mutualistas entre plantas vasculares y un pequeño grupo de hongos Glomeromycota (Schübler *et al.*, 2001; Pérez y Roja, 2011). La mayoría de HMA se caracterizan por la presencia de hifas intrarradicales, arbusculos, micelio y esporas. El término 'arbuscular' se deriva de estructuras "arbusculos" que ocurren dentro de las células corticales (Smith y Read, 2008).

Una micorriza arbuscular tiene tres componentes importantes: la raíz misma, estructura del hongo y un micelio extraradical (Smith y Read, 2008). Las estructuras de las micorrizas arbusculares son: hifas estructuras filamentosas que sirve como ruta de germinación, absorción agua y nutrientes y le da soporte a la espora (Espinoza, 2013). Arbúsculo son los sitios de intercambio simbiótico en estos ocurre la transferencia de nutrientes (Brundrett *et al.*, 1996). Esporas son células únicas multinucleadas, dan origen a las hifas (Salamanca, *et al.*, 2004). Y finalmente vesículas las cuales contienen lípidos y gránulos de glicógeno (Oehl *et al.*, 2011). Son almacenamientos importantes y que pueden actuar como propágulos para el hongo. Las micorrizas contribuyen al crecimiento de las plantas y protección contra diversos factores abióticos, como sequía, salinidad y contaminación (Mota *et al.*, 2020; Cheng *et al.*, 2021).

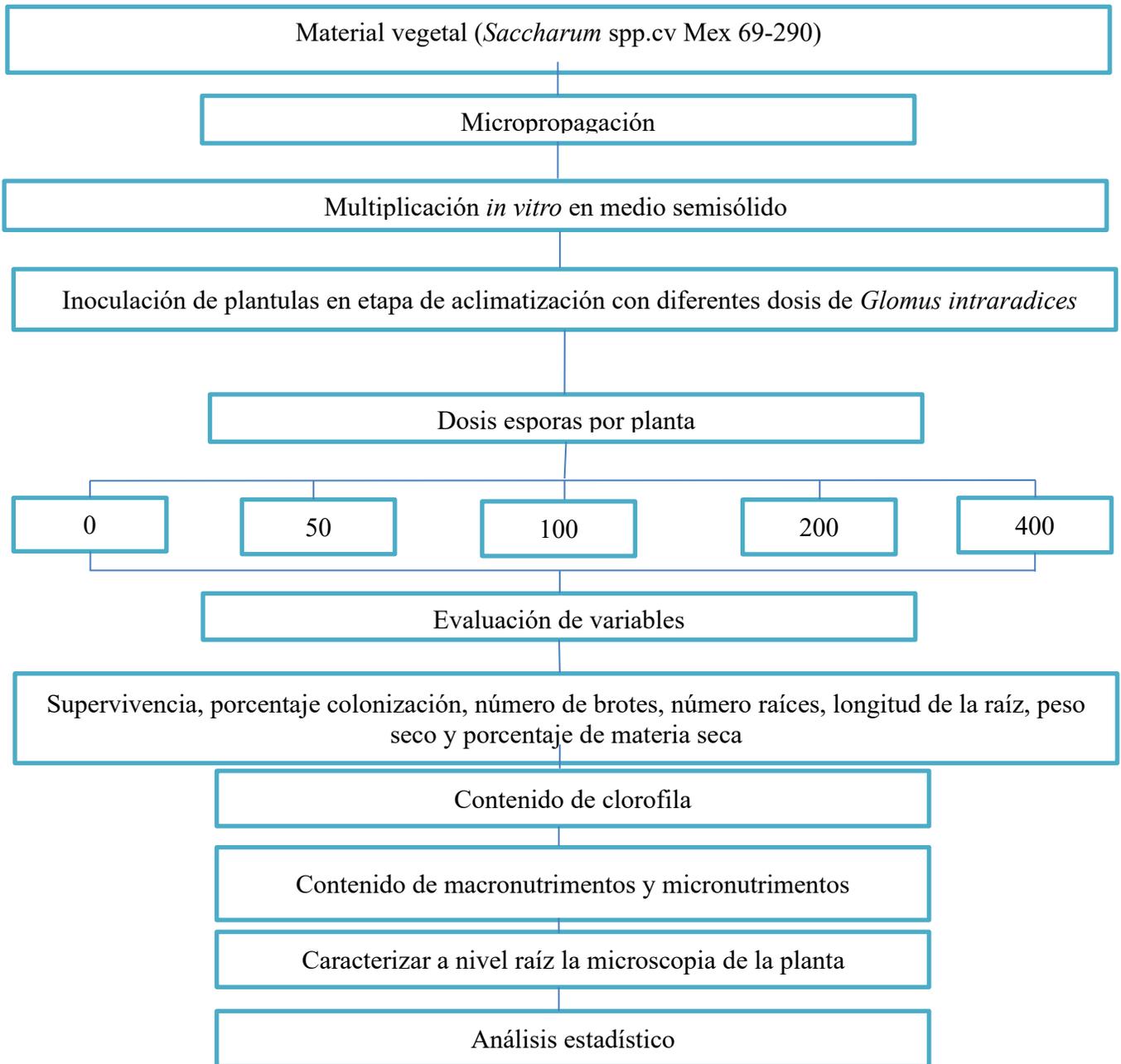
### **3.2.5 Micorrizas arbusculares en plántulas *en vitro***

La aplicación de hongos micorrízicos en plántulas *en vitro*, permite una mejor supervivencia al momento de su aclimatización en invernadero (De Souza *et al.*, 2020). La aclimatización es la etapa más delicada de la micropropagación, lo que dificulta la obtención de nuevas plántulas. El uso de sustratos adecuados asociados con HMA son una alternativa para el desarrollo de plántulas. Di Martino *et al.* (2019); Brunetto *et al.* (2019); Al-Karaki y Williams (2021) mencionan que los HMA establecen asociaciones mutualistas simbiótica con la mayoría de las plantas, suministrando a las raíces nutrientes y agua. Estudios reportaron que en cultivos agrícolas como, la soja (*Glycine max*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), uva (*Vitis vinifera*), caña de azúcar (*Saccharum spp.*) aumento el crecimiento y mejoró la absorción de nutrientes al inocular micorrizas arbusculares (Di Martino *et al.*, 2019; Brunetto *et al.*, 2019; Al-Karaki y Williams 2021; Sales *et al.*, 2021). Los HMA también optimizan las relaciones con el agua, es decir; las plantas pueden sobrevivir al estrés por sequía, salinidad y estrés por variación de temperatura (Dallas *et al.*, 2021; Meddich *et al.*, 2021; Sales *et al.*, 2021). En virtud de lo anterior, el uso de esta tecnología (HMA) en el campo podrían favorecer el ahorro con el uso de fertilizantes solubles, así como utilizar una tecnología más sustentable con menor impacto en el medio

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Estrategia experimental

Para la realización de esta investigación, se efectuaron diversas metodologías (Figura 4)



**Figura 4.** Estrategia experimental

## 4.2 Material vegetal y micropropagación

Para el establecimiento *in vitro* de caña, se colectaron ápices de 25 cm de la variedad Mex 69-290 de ocho meses de edad. Los ápices se lavaron con agua y jabón comercial Axion<sup>®</sup> (Mission Hills, S.A. de C.V., San José de Iturbide, Guanajuato, MX). Estos fueron envueltos en bolsas de papel y se mantuvieron en refrigeración a 4 °C durante 24 h. Los ápices se cortaron a una longitud de 15 cm y se colocaron en hidrotermoterapia en un baño termostático con circulación (Ecoshel, SC-15; TX, USA) a 50 °C durante 20 minutos. Posteriormente, en una campana de flujo laminar los ápices se redujeron a 2 cm, se enjuagaron durante 5 min en una solución al 10 % (v/v) de cloro comercial Cloralex<sup>™</sup> (Industrias Alen, S.A. de C.V., Nuevo León, MX) (5 % de i.a.) con tres gotas de Tween 20<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich<sup>®</sup> Chemical Company, Saint Louis, MO, USA) por cada 100 mL de agua. Finalmente, los explantes se colocaron individualmente en tubos de ensayo que contenían 10 mL de medio MS (Murashige y Skoog 1962) suplementado con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, sin reguladores de crecimiento. El pH del medio se ajustó a 5.8 y se añadió 2.5g L<sup>-1</sup> Phytigel<sup>™</sup> (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) como agente gelificante. Se esterilizó en la autoclave durante 15 min a 120 °C y 115 kPa. Los explantes se incubaron a 24 ± 2 °C, bajo irradiancia de 40 ± 5 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y un fotoperiodo de 16 h luz. Después de una semana de cultivo, los ápices se transfirieron para la fase de multiplicación a medio MS suplementado con 1 mg L<sup>-1</sup> kinetina (KIN, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), 1 mg L<sup>-1</sup> ácido indolacético (AIA, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) y 2 mg L<sup>-1</sup> 6-bencilaminopurina (BAP, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>). Después de cuatro subcultivos (45 d cada uno), los brotes obtenidos fueron individualizados y enraizadas en medio MS semi sólido suplementado con 2 mg L<sup>-1</sup> de carbón activado.

## 4.3 Inoculación de micorrizas y condiciones del cultivo

La inoculación con micorrizas se llevó a cabo en condiciones *en vitro* bajo invernadero utilizando plántulas *en vitro* con una longitud de 5 cm y micorrizas de la especie *Glomus intraradices* (Biofertilizante INIFAP<sup>®</sup>, Chiapas, MX). La inoculación planta-micorriza se realizó en charolas de polipropileno de 32 cavidades con un sustrato conformado por composta, turba y agrolita (2:1:1 v/v). El sustrato fue esterilizado en la autoclave durante 30 min a 120 °C y 115 kPa. Posteriormente, al sustrato fueron agregados diferentes dosis de *G. intraradices* a razón de 0, 50, 100, 200 y 400 esporas por planta. Las plántulas de caña de azúcar se cubrieron con un domo traslucido para controlar las condiciones de humedad. Las plántulas inoculadas se mantuvieron en condiciones de invernadero con 60 % sombra a 30 ± 2 °C, una humedad relativa del 60 ± 10 % y luz natural a una

irradiancia de  $80 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  durante un mes. En una segunda fase, a las plántulas se les fue retirado el domo con una temperatura de  $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , una humedad relativa del 30 % y luz natural a una irradiancia de  $150 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  durante un mes. Durante todo el experimento se aplicó riego con agua de osmosis dos veces por semana durante dos meses. Transcurridos 60 d de aclimatización en invernadero, se evaluó el porcentaje de supervivencia, porcentaje de colonización, número de brotes, longitud de la planta, número y longitud de raíces y materia seca. También, se registró contenido de clorofila total, contenido de macro y micronutrientes (N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn y B).

#### **4.4 Caracterización de la inoculación micorrizica**

***Microscopía de campo claro.*** Para visualizar el efecto de las diferentes dosis de HMA en raíces de caña de azúcar, se obtuvieron segmentos de la raíz de caña que fueron fijados en paraformaldehído al 4 % (Sigma-Aldrich, St Louis, MS, USA), incubándose durante 48 h a temperatura ambiente. Segmentos de la raíz fueron lavados tres veces con agua destilada y posteriormente fueron incubados en KOH al 10 % por 15 min a  $120^\circ\text{C}$ . Se retiró el sobrenadante y se lavó tres veces con agua destilada. Se adicionó una solución de peróxido de hidrógeno alcalino y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron las muestras con agua corriente y se incubaron en HCl al 10 % (Sigma-Aldrich, St Louis, MS, USA) durante 5 min, transcurrido el tiempo se decantó y se adicionó azul de tripano 0.05 % (Sigma-Aldrich) y se incubó 24 horas a temperatura ambiente. Por último, se retiró el azul de tripano y se adicionó una solución de acetoglicerol. Las muestras se observaron en un microscopio compuesto (BX50, Olympus, Japón) utilizo objetivos 20X/0.50, UPlan-FL ( $\alpha - 0.17$ ) y 40x/1.00 (U-Plan-Apochromat, Olympus, Japón). La adquisición de imágenes se realizó con una cámara de alta sensibilidad para fluorescencia Infinity3 (Lumenera, Canadá) sincronizada a través del programa Image Pro Premier 9.1 (Media Cybernetics, USA).

***Microscopio multifoton.*** Las raíces limpias se lavaron tres veces con agua desionizada y se cubrieron con un portaobjetos de vidrio de cubierta de alto rendimiento. ( $D = 0.17 \text{ mm} \pm 0.005 \text{ mm}$  índice de refracción =  $1.5255 \pm 0.0015$ , numero Abbe =  $56 \pm 2$ ) y se observaron en el sistema de microscopio (LSM 880-NLO, Zeiss, Germany; Walthman, MA, USA). En todos los experimentos, las condiciones de operación del microscopio fueron láseres a 458 nm y 543 nm con 1.0 % y 2.2 % de potencia, respectivamente.

Las observaciones se realizaron con un objetivo de inmersión en aceite 63X/1.40 DIC, NA  $\infty$ -0.17, Zeiss Plan NEOFLUAR. Las imágenes se adquirieron por separación de la emisión en dos canales, región verde para la tinción de solofenil flavine (481–543 nm) y región roja para la tinción de yoduro de propidio (605 – 670 nm). Todas las micrografías se capturaron en formato CZI a 2048 × 2048 píxeles y RGB.

*Colonización de micorrizas.* A partir de las observaciones por microscopía se determinaron los porcentajes de colonización micorriza utilizando la siguiente fórmula: Porcentaje de colonización de raíz (%) = No. de segmentos infectados / No. de segmentos de raíz examinados × 100.

#### **4.5 Contenido de clorofila**

El contenido de clorofila total se determinó según la metodología propuesta por Harborne (1973). Para cada muestra, se maceró 1 g de material fresco con acetona al 80 % y se dejó reposar a -4 °C durante 24 h en 80 % de acetona hasta un volumen final de 10 ml. Posteriormente, la mezcla se filtró con papel filtro No. 41, luego se ajustó a un volumen de 25 mL con acetona al 80 %. Se utilizaron 2 mL por muestra y se leyó a una absorbancia de 663 y 645 nm para clorofila a y b, respectivamente. Las lecturas se realizaron utilizando un espectrofotómetro (Genesys 10S, Thermo Scientific; MA, USA).

#### **4.6 Contenido de macro y micronutrientos**

Para evaluar los macros y micronutrientos, las muestras se secaron a 70 °C durante 72 h en una estufa de secado. Se pulverizó en una licuadora (Oster 6832, Milwaukee, WI, USA). Las muestras se sometieron a digestión húmeda en una mezcla de ácidos perclórico y nítrico a una concentración de 2:1 (v/v), según el protocolo descrito por Alcantar y Sandoval 1999. Para determinar las concentraciones de macronutrientos (P, K, Ca y Mg) y micronutrientos (Fe, Cu, Zn, Mn y B), los extractos se analizaron utilizando un espectrómetro de emisión óptica de inducción de plasma acoplado (ICP- OES, Varian 725-ES, Agilent; Mulgrave, VIC, AUS). La concentración de N se determinó mediante el método semi-microkjeldahl según el protocolo descrito por Bremner (1995).

#### **4.7 Diseño experimental y análisis estadístico**

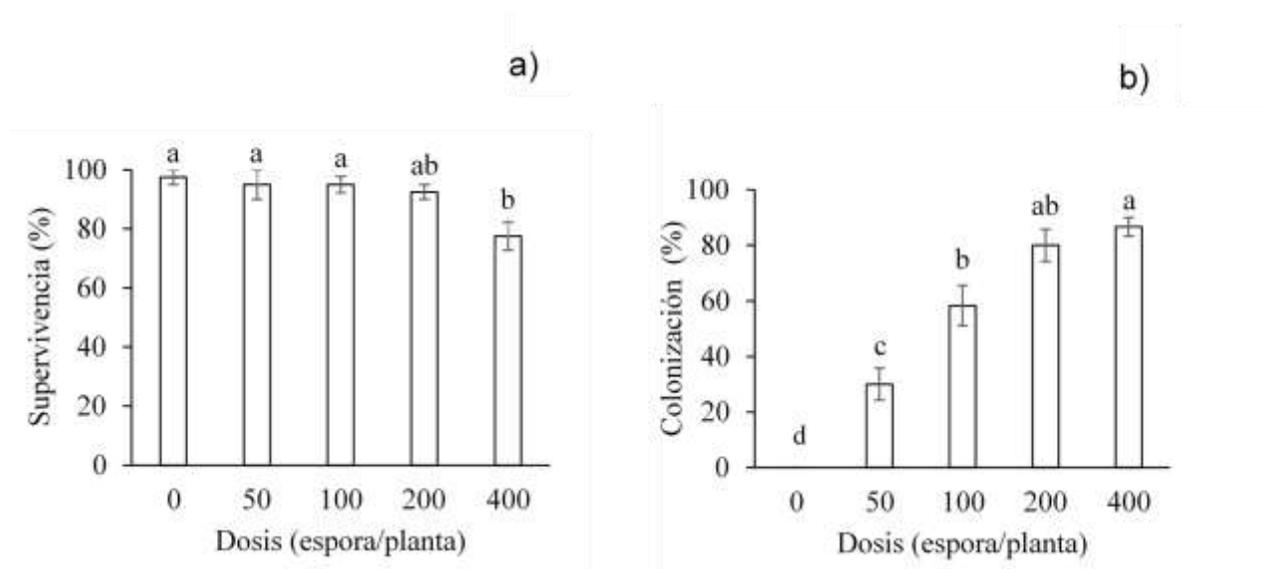
Los experimentos se realizaron con un diseño completamente al azar y por triplicados. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) seguido de una prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) mediante el

estadístico SPSS (versión 22 de Windows). Los datos porcentuales se transformaron con la fórmula  $Y = \arcseno(\sqrt{x/100})$ , donde  $x$  es el valor porcentual.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Porcentaje de supervivencia y colonización micorrízica

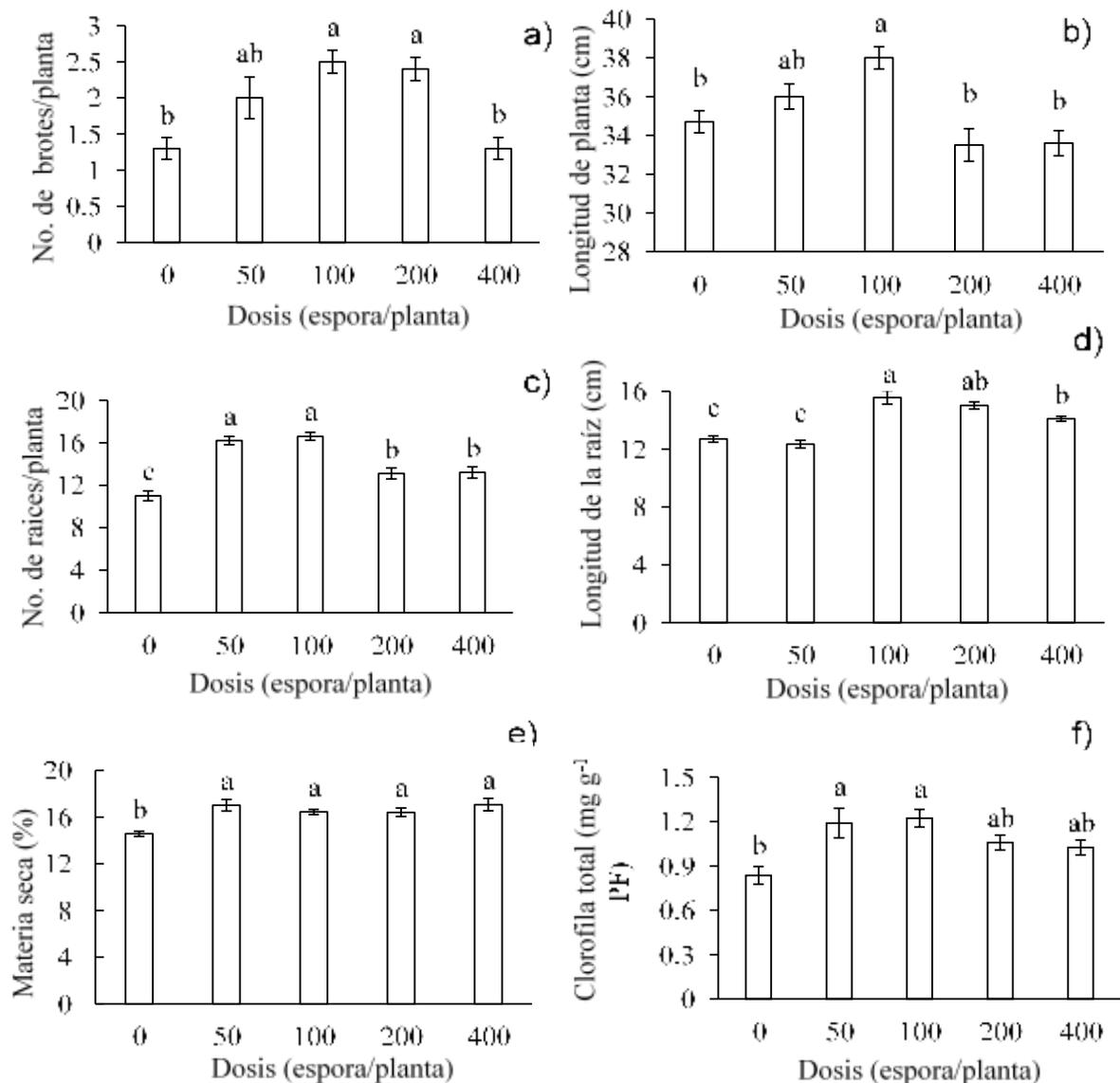
Los resultados obtenidos en este estudio demuestran un efecto de las micorrizas sobre el porcentaje de supervivencia de las plántulas y porcentaje colonización de micorrizas (Figura 5). La inoculación con HMA en dosis entre 0–100 esporas por planta no tuvieron efecto en la supervivencia, es decir se obtuvo más del 95 % de supervivencia; mientras que, las dosis 200 y 400 presentaron el mayor efecto sobre la mortalidad de las plántulas, con 92 y 77 % de supervivencia, respectivamente (Figura 5a). Respecto a la colonización, a mayor contenido de esporas por planta resultó un incremento en el porcentaje de colonización (Figura 5b).



**Figura 5.** Efecto de los hongos micorrízicos arbusculares (*Glomus intraradices*) sobre a) supervivencia y b) colonización evaluados a los 60 d de cultivo *in vitro* de *Saccharum* spp. cv Mex 69-290. Los resultados se muestran como media  $\pm$  SE (error estándar). Las medias con una letra diferente son significativamente diferentes (Tukey,  $p < 0.05$ ).

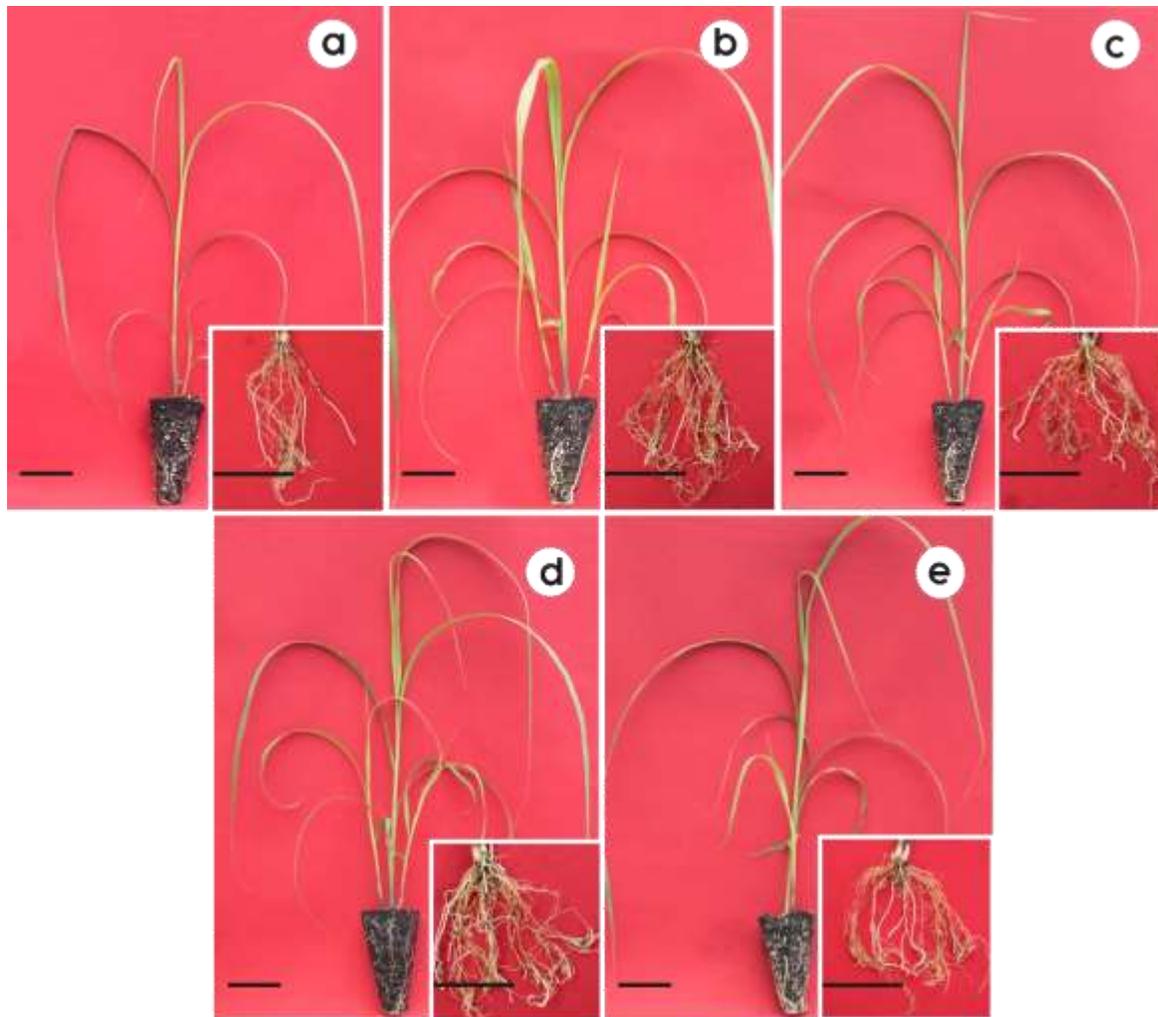
## 5.2 Efecto de las micorrizas sobre el desarrollo *en vitro*

Al evaluar el efecto de diferentes concentraciones de HMA sobre el desarrollo de plántulas de caña de azúcar se observaron diferencias significativas para el número de brotes, longitud de la planta, número de raíces, longitud de raíz, porcentaje de materia seca y contenido de clorofila durante la aclimatización (Figura 6). El mayor número de brotes por planta se observó en los tratamientos con 50, 100 y 200 esporas por planta, con 2.0, 2.5 y 2.4 brotes por planta, respectivamente; mientras que, el menor número de brotes por planta se midió en los tratamientos control y 400 con 1.25 brotes por planta, en ambos tratamientos (Figura 6a). Mientras que la longitud de las plántulas de mayor altura se observó en el tratamiento con 100 esporas por planta, con 38 cm de longitud; mientras que el resto de los tratamientos la altura de planta fue entre 33 y 36 cm de altura por plántula (Figura 6b). Respecto al número de raíces por planta, la mayor cantidad de raíces se obtuvieron en los tratamientos con 50 y 100 esporas por plantas, con 16.2 y 16.6 raíces por planta, respectivamente; mientras que, la menor cantidad de raíces se obtuvieron en los tratamientos control, 200 y 400 esporas por planta con 11, 13.1 y 13.2 raíces por planta, respectivamente (Figura 6c). Para la longitud de raíces, las de mayor tamaño se observaron en los tratamientos con 100 y 200 esporas por planta con 15.5 y 15.0 cm de longitud, respectivamente; mientras que, las raíces de menor tamaño se encontraron en el control y 50 esporas por planta, con 12.7 y 12.3 cm de longitud, respectivamente (Figura 6d). Mientras que el porcentaje de materia seca (DM), las plántulas tratadas con micorrizas mostraron los mayores porcentajes de DM, con 16 a 17 %; mientras que, la menor cantidad de materia seca se observó en el tratamiento control, con 14 % de DM (Figura 6e). En relación a la clorofila total, el mayor contenido de clorofila se observó en los tratamientos con 50, 100, 200 y 400 esporas por planta con valores entre 1, 1.1 y 1.2 mg g<sup>-1</sup> PF; mientras que, el menor contenido se encontró en el tratamiento control con 0.8 mg g<sup>-1</sup> PF (Figura 5f).



**Figura 6.** Efecto de los hongos micorrízicos arbusculares (*Glomus intraradices*) sobre el desarrollo, materia seca y clorofila. a) número de brotes, b) longitud de la planta, c) número de raíces, d) longitud de la raíz e) % de materia seca y f) clorofila total, evaluados a los 60 d de cultivo *en vitro* de *Saccharum* spp. cv Mex 69-290. Los resultados se muestran como media  $\pm$  SE (error estándar). Las medias con una letra diferente son significativamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

En la Figura 7 se muestran el desarrollo de las plántulas de *Saccharum* spp. inoculadas con diferentes dosis de *G. intraradices*.



**Figura 7.** Efecto de los hongos micorrízicos arbusculares (*Glomus intraradices*) sobre el desarrollo de plántula *en vitro* *Saccharum* spp. cv Mex 69-290 a los 60 d de la inoculación de esporas. (a-e): 0, 50, 100, 200 y 400 esporas por planta. Barra negra = 5 cm.

### 5.3 Contenido de macro y micronutrientos

Al aplicar diferentes dosis de esporas por planta se observaron diferencias en el contenido de P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn y Mn; mientras que, para los nutrientes N y B no se observaron diferencias significativas (Cuadro 3). Para los macronutrientos P, K y Mg, los mayores contenidos ( $\text{mg kg}^{-1}$  de peso seco) fueron obtenidos en la dosis de 0, 50 y 100 esporas por planta; mientras que, los menores contenidos de estos nutrientes fueron observados en las dosis de 200 y 400 esporas por planta. Para el macronutriente Ca, los mayores contenidos fueron obtenidos en las dosis de 100 y 200 esporas por planta; mientras que, los menores contenidos de este elemento fueron obtenidos en las dosis 0, 50 y 400 esporas

por planta. Respecto a los micronutrientes, los mayores contenidos de Fe y Cu se observaron en las dosis de 0, 50 y 100 esporas por planta; mientras que los menores contenidos de estos micronutrientes fueron obtenidos en las dosis de 200 y 400 esporas por planta. Para el peso de Zn y Mn, los mayores contenidos fueron obtenidos en las dosis de 0 y 50 esporas por plantas; mientras que, los menores contenidos de estos micronutrientes fueron obtenidos en las dosis de 100, 200 y 400 esporas por planta.

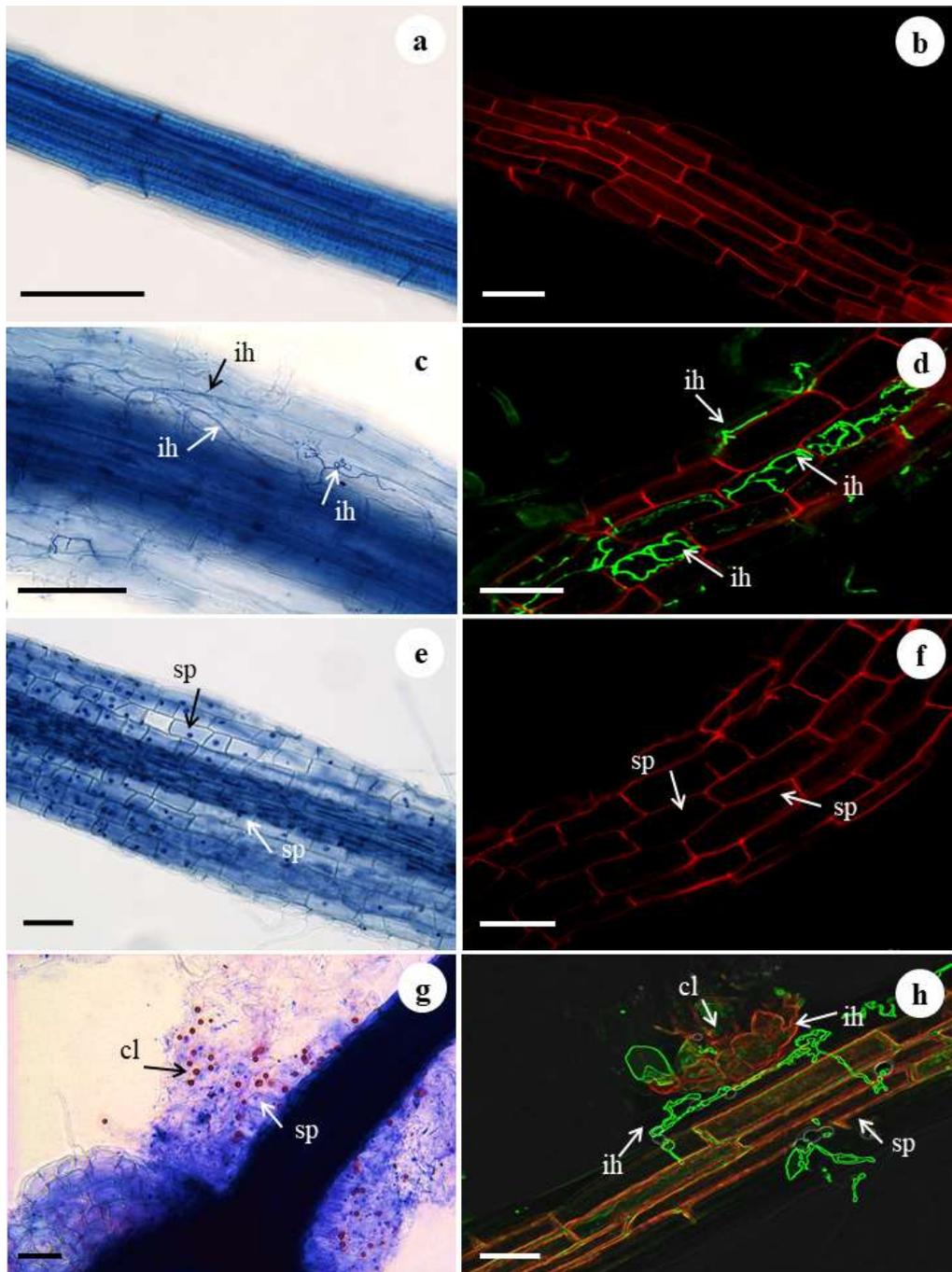
#### 5.4 Caracterización de la inoculación micorrizica

De acuerdo a la caracterización hongo-planta realizada por microscopía se puede observar una interacción simbiótica entre planta y hongo, con presencia de esporas, hifas y clamidosporas (Figura 8). Las estructuras observadas en los tratamientos con micorrizas fueron esporas e hifas. Las esporas se localizaron con mayor frecuencia en la periferia de la raíz, entre la epidermis y el mucilago de recubrimiento; mientras que las hifas se observaron internalizadas entre cilindro central y el parénquima. Se observaron estructuras arbusculares al interior de las células, como prolongaciones de las hifas al exterior de la raíz.

**Cuadro 3.** Efecto de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) sobre el contenido de macro y micronutrientes de plántula *en vitro* de *Saccharum* spp. cv Mex 69-290) en la etapa de aclimatización a los 60 d de cultivo.

HMA (espora/planta)	Macronutrientes (mg kg <sup>-1</sup> peso en seco)				
	N	P	K	Ca	Mg
0	20,833.33 ± 240.37a	5,393.33 ± 118.64a	33,333.33 ± 1068.22 <sup>a</sup>	4,253.33 ± 29.05ab	3,866.66 ± 100.88ab
50	20,600.00 ± 404.14a	5,180.00 ± 126.62a	32,800.00 ± 873.68 <sup>a</sup>	4,073.33 ± 139.20ab	4,226.66 ± 89.50a
100	20,066.66 ± 600.92a	5,333.33 ± 62.27a	32,700.00 ± 850.49 <sup>a</sup>	4,586.66 ± 98.37a	4,346.66 ± 71.72a
200	20,133.33 ± 417.66a	4,506.66 ± 129.91b	28,133.33 ± 1020.34b	4,373.33 ± 208.35a	3,640.00 ± 98.14b
400	20,600.00 ± 493.28a	4,166.66 ± 33.33b	28,033.33 ± 966.66b	3,766.66 ± 44.84b	3,496.66 ± 190.64b
	Micronutrientes (mg kg <sup>-1</sup> peso en seco)				
	Fe	Cu	Zn	Mn	B
0	112.96 ± 0.28a	14.72 ± 0.47a	68.24 ± 4.70 <sup>a</sup>	140.34 ± 2.01a	15.67 ± 0.61a
50	111.03 ± 8.85a	15.45 ± 0.34a	61.48 ± 3.98ab	130.66 ± 1.05ab	15.43 ± 0.35a
100	108.96 ± 2.70a	14.68 ± 0.34a	49.98 ± 1.53b	122.91 ± 4.80b	15.47 ± 0.65a
200	94.28 ± 4.15ab	12.69 ± 0.48b	49.08 ± 2.38b	127.37 ± 0.99b	15.67 ± 0.36a
400	83.70 ± 1.30b	11.50 ± 0.15b	48.68 ± 1.72b	122.60 ± 1.52b	13.93 ± 0.43a

Los valores representan la media ± ES (error estándar). Medias con diferente letra son significativamente diferentes (Tukey,  $p < 0.05$ ).



**Figura 8.** Colonización de *Glomus intraradices* sobre el desarrollo de plántula *en vitro* de *Saccharum* spp. cv Mex 69-290 a los 60 d de la inoculación de esporas. Se observaron estructuras fúngicas típicas, como hifas intracelulares (ih), esporas (sp) y clamidosporas (cl). Izquierda: microscopía de campo claro y derecha: fluorescencia por un microscopio multifotónico (a-b) Tratamiento de control, (c-d) presencia de esporas, (e-f) hifas y (g-h) clamidosporas. Barra = 50  $\mu$ m.

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Efecto de las micorrizas sobre el desarrollo *en vitro*

Los resultados demuestran el efecto de diferentes dosis de micorrizas sobre las diferentes variables de desarrollo evaluadas, en este estudio la dosis recomendada por planta está entre 50 y 100 esporas. El efecto positivo de estas dosis sobre el desarrollo podría deberse a que con un 30 y 58% de colonización se logra una adecuada interacción simbiótica, lo que podría favorecer en las plantas la eficiencia fotosintética, la absorción de agua y nutrientes, lo que permite un desarrollo adecuado de la plántula para su posterior transferencia al campo. En cultivos como la manzana (*Malus domestica*) (An *et al.*, 1993), las aceitunas (*Olea europaea*) (Porras-Soriano *et al.*, 2009), la vid (*Vitis vinifera*) (Trouvelot *et al.*, 2015) y la mandarina roja (*Citrus tangerine* Hort. ex Tanaka) (Wu *et al.*, 2011) se ha comprobado aumento en el número de brotes cuando se inocula con HMA. Sin embargo, los efectos de las micorrizas en el desarrollo dependen del tipo y la dosis de HMA en relación con la especie de planta huésped (Aslani *et al.*, 2019; Ren *et al.*, 2019). Según estudios de Xiao *et al.*, (2022) sobre plantas de *Cinnamomum migao*, se obtuvo una mayor longitud de planta y raíz y un mayor diámetro de brote al inocular con 1.400 esporas por planta con el hongo *Glomus etunicatum* en comparación con *Funneliformis mosseae* y plantas no inoculadas. Meddich *et al.*, (2021) observaron que al usar un consorcio micorrícico con *Glomus* sp. en el melón (*Cucumis melo*) a una dosis de 44 esporas por planta, la biomasa de brotes y raíces aumentó significativamente. Wu *et al.*, (2021) observaron que la colonización con micorrizas para vegetales a una dosis de 300 esporas por planta promovió una mayor acumulación de biomasa en las plántulas de sandía (*Citrullus lanatus* L. cv. Qilin). Sales *et al.*, (2021) en híbridos de *Saccharum* spp obtuvieron un aumento en el rendimiento al inocular con HMA nativo a una dosis de 260 esporas. En este sentido, Wu *et al.*, (2022) señalan que los HMA son bien reconocidos por mejorar en las plantas el crecimiento y la acumulación de biomasa.

En este estudio, el efecto negativo sobre diferentes variables de desarrollo a las dosis más altas de micorriza podría deberse a una interrupción de la simbiosis micorrízica causada por la colonización excesiva de la raíz. Lopes *et al.*, (2021) afirman que, en condiciones favorables, las plantas pueden obtener nutrientes y agua por sus propios medios, la micorriza es menos importante para la planta. Así, las plantas cuentan con un mecanismo de autorregulación para controlar la colonización radicular excesiva, este mecanismo consiste en suprimir la colonización una vez que se alcanza

una micorrización eficiente (López-Ráez y Pozo 2013). Además, los HMA son biotrofos obligados que habitan en el sistema radicular y obtienen el carbono que aporta la planta. La HMA puede recibir entre el 10 y el 30% de los fotosintetizados de la planta (Lopes *et al.*, 2021). Por lo tanto, las altas tasas de colonización podrían causar competencia por los fotosintetizados, lo que conduce a un menor desarrollo de las plantas. En este estudio, el aumento de la materia seca en los tratamientos de HMA puede deberse a que *G. intraradices* es un hongo endomicorrízico. Este tipo de hongo vive entre las células y los tejidos de la planta y podría provocar un aumento relativo de la materia seca radicular en comparación con el tratamiento de control, sin la presencia de colonias en las raíces.

## **6.2 Contenido de clorofila**

En todos los tratamientos con micorrizas se observó un aumento en las clorofilas. El incremento total de clorofila en dosis de 50 y 100 esporas por planta podría estar relacionado a una mayor demanda de la actividad fotosintética a consecuencia de una eficiente colonización. En estudios realizados por (Chen *et al.*, 2017; Di Martino *et al.*, 2019), sugieren que la colonización micorrícica aumenta los pigmentos fotosintéticos. Por otra parte, Campo *et al.*, (2020) y Gupta *et al.*, (2021) señalan que la colonización de HMA promueve la fotosíntesis al aumentar la carboxilación de Rubisco y la regeneración de RuBP (ribulosa-1,5-bis-fosfato). Meddich *et al.*, (2021) encontró que en plántulas de melón (*Cucumis melo*), en la que fueron administradas dosis de 44 esporas aumentó el contenido de clorofila. Wu *et al.*, (2021) en sandía (*Citrullus lanatus* L. cv. Qilin), observó el aumento en la tasa de fotosíntesis a una dosis de 300 esporas por planta. De acuerdo a Aseel *et al.*, (2019) un adecuado estado nutricional promueve el aumento de eficiencia fotosintética.

## **6.3 Contenido de macro y micronutrientos**

La inoculación de HMA tuvo efecto sobre el contenido de algunos macros y micronutrientos en las plántulas de caña de azúcar cultivadas *en vitro*. Sin embargo, a pesar de que las hifas de HMA tienen la capacidad de absorber y transferir N del suelo a las raíces, no hubo diferencias significativas en la acumulación de N. El bajo contenido de los macronutrientos P, K y Mg en dosis de 200 y 400 esporas por planta pudo haber ocurrido debido a una competencia por estos nutrientes debido a un exceso de colonización de HMA. El alto contenido de magnesio en dosis de 50 y 100 esporas por planta puede estar relacionado también al alto contenido de clorofila en

este tratamiento. El magnesio tiene un rol importante en la clorofila debido a que participa en la absorción de luz y las reacciones de asimilación de CO<sub>2</sub> en el cloroplasto (Chaudhry *et al.*, 2021). En dosis de 50 y 100 esporas se observó un mayor contenido de calcio. Esto pudo deberse a una eficiente colonización sin afectar la interacción ecológica; mientras que, la disminución de Ca a dosis de 400 esporas por planta pudo deberse también a un exceso en la colonización, ocasionando una competencia por este elemento. Los micronutrientes Fe y Cu se vieron afectados también en las dosis de 200 y 400 esporas por planta; mientras que, Zn y Mn, sólo fueron afectados en dosis superiores a 100 esporas por planta. Bouskout *et al.*, (2022) al inocular alcaparra (*Capparis spinosa*) con 30 esporas por planta de un consorcio de HMA nativos, observaron que el crecimiento de las plántulas mejoró considerablemente debido a una mayor acumulación de P, K, Mg, Fe y Zn. Al-Karaki *et al.*, (2021) informaron que hubo mayor concentración de macro (N, P, y K) y micronutrientes (Fe y Cu) en hojas de plantas inoculadas con el consorcio de micorrizas (*Rhizophagus clarus*, *Rhizophagus intraradices*, *Septoglomus deserticola* y *Funneliformis mosseae*) a una dosis de 750 esporas por planta en comparación con el control. Se ha demostrado que los HMA influyen positivamente en la acumulación de algunos nutrientes minerales, especialmente los de baja movilidad como P y Zn (Ortas 2019; Lotfi *et al.*, 2019).

#### **6.4 Caracterización de la inoculación micorrizica**

La caracterización de la interacción micorriza-caña de azúcar demostró una asociación simbiótica entre ambas especies a las dosis de 50 y 100 esporas por planta. Este hecho da una ventaja a la interacción simbiótica; sin embargo, un exceso de hifas como resultado del aumento de la colonización podría causar competencia por los elementos que mostraban deficiencias. La extensión de las hifas de HMA les permiten obtener más agua y nutrientes del suelo en comparación con las plantas no micorrizadas. La deficiencia de algunos elementos en plantas puede explicarse a una competencia de debido a que es una asociación obligada para el hongo, pero no para la planta.

Los resultados obtenidos en este estudio tienen una implicación práctica para la fase de aclimatización durante la micropropagación debido a la importancia de la inoculación temprana con micorrizas en las plántulas obtenidas *in vitro*. Con la aplicación de micorrizas se espera obtener plántulas vigorizas con un adecuado sistema radicular, un mejor aprovechamiento de la fertilización y mayor supervivencia en campo.

## 7. CONCLUSIONES

- La inoculación de *G. intraradices* a diferentes dosis tiene efectos sobre el porcentaje de supervivencia, colonización y fisiología en plántulas *en vitro* de *Saccharum* spp. cv Mex 69-290 durante la etapa de aclimatización.
- Los HMA, a dosis de 50 y 100 esporas por planta, con 30 y 58 % de colonización, respectivamente, mejoraron el desarrollo de las plántulas y promovieron un incremento en el contenido de clorofila sin afectar la supervivencia durante la aclimatización.
- Se demostró que las diferentes dosis de esporas por planta con HMA tuvieron un efecto sobre la absorción de algunos nutrimentos. Las dosis de 200 y 400 esporas por planta, que representan el mayor porcentaje de colonización, tuvieron efectos negativos sobre la supervivencia, desarrollo, contenido de clorofila y estado nutricional de algunos elementos.
- Existe una respuesta fisiológica de las plantas *en vitro* de *Saccharum* spp. cv Mex 69-290 dependiente de la dosis de hongos micorrícicos arbusculares, la cual está relacionada a la fotosíntesis y desarrollo de las hifas ya que estas permiten la absorción de nutrientes y agua, generando así un desarrollo adecuado de la plántula para su posterior transferencia al campo. La aplicación temprana de micorrizas en plántulas de caña de azúcar durante la aclimatización podría representar una ventaja de pre acondicionamiento antes del trasplante para el establecimiento de semilleros básicos.

## 8. LITERATURA CITADA

- Al-Karaki, G. N., y Williams, M. (2021). Mycorrhizal mixtures affect the growth, nutrition, y physiological responses of soybean to water deficit. *Acta Physiologiae Plantarum*, 43(5), 1-9. Doi:10.1007/s11738-021-03250-0.
- An, Z. Q., Shen, T., y Wang, H. G. (1993). Mycorrhizal fungi in relation to growth y mineral nutrition of apple seedlings. *Scientia horticulturae*, 54(4), 275-285. Doi:10.1016/0304-4238(93)90106-Z.
- Andrade-Torres, A. (2010). Micorrizas: antigua interacción entre plantas y hongos. *Ciencia*, 61, 84-90
- Aseel, D. G., Rashad, Y. M., y Hammad, S. M. (2019). Arbuscular mycorrhizal fungi trigger transcriptional expression of flavonoid y chlorogenic acid biosynthetic pathways genes in tomato against y tomato Mosaic Virus. *Scientific reports*, 9(1), 1-10. Doi:10.1038/s41598-019-46281-x.
- Aslani, F., Juraimi, A. S., Ahmad-Hamdani, M. S., Alam, M. A., Hasan, M. M., Hashemi, F.S., y Bahram, M. (2019). The role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant invasion trajectory. *Plant y Soil*, 441(1), 1-14.
- Barbosa, L. S., de Souza, T. A. F., de Oliveira Lucena, E., da Silva, L. J. R., Laurindo, L. K., dos Santos Nascimento, G., y Santos, D. (2021). Arbuscular mycorrhizal fungi diversity y transpiratory rate in long-term field cover crop systems from tropical ecosystem, northeastern Brazil. *Simbiosis*, 85(2), 207-216. Doi:10.1007/s13199-021-00805-0.
- Bello-Bello, J. J., Morales-Ramos, V., y Gómez-Merino, F. C. (2014). Conservación de recursos genéticos de Caña de azúcar (*Saccharum* spp.). *Agro productividad*, 7(2), 42-47.
- Bello-Bello, J. J., Mendoza-Mexicano, M., y Pérez-Sato, J. A. (2018). *In vitro* propagation of sugarcane for certified seed production. *In sugarcane-technology y Research*. Intech Open. Doi:10.5772/intechopen.74037.
- Bigott, A. F., Hoy, J. W., y Fultz, L. M. (2019). Soil properties, microbial communities, y sugarcane yield in paired fields with short-or long-term sugarcane cultivation histories. *Applied Soil Ecology*, 142,166-176. Doi:10.1016/j.apsoil.2019.04.027.
- Bouskout, M., Bourhia, M., Al Feddy, M. N., Dounas, H., Salamatullah, A. M., Soufan, W., y Ouahmane, L. (2022). Mycorrhizal fungi inoculation improves *capparis spinosa*'s Yield, nutrient uptake y photosynthetic efficiency under water deficit. *Agronomy*, 12(1), 149. Doi:10.3390/agronomy12010149.
- Bremner, J. T. (1965). Inorganic forms of nitrogen. Methods of soil analysis: Part 2 chemical y microbiological properties, *Agronomy monographs*. 9, (1179–1237).
- Brundrett, M. (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological reviews*, 79(3), 473-495.

- Brundrett, M. C., y Abbott, L. K. (2002). Arbuscular mycorrhizas in plant communities. In microorganisms in plant conservation y biodiversity. (Eds. K. Sivasithamparam, K.W. Dixon y R.L. Barrett) 151–193.
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., y Malajczuk, N. (1996). Working with mycorrhizas in forestry y agriculture: Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra.32, (374).
- Brunetto, G., Rosa, D. J., Ambrosini, V. G., Heinzen, J., Ferreira, P. A., Ceretta, C. A., y Tiecher, T. L. (2019). Use of phosphorus fertilization y mycorrhization as strategies for reducing copper toxicity in young grapevines. *Scientia Horticulturae*, (248), 176-183.
- Camarena-Gutiérrez, G. (2012). Interacción planta-hongos micorrízicos arbusculares. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente* 18(3): 409-421. Doi:10.5154/r.rchscfa. 2011.11.093.
- Campo, S., Martín-Cardoso, H., Olivé, M., Pla, E., Catala-Forner, M., Martínez-Eixarch, M., y San Segundo, B. (2020). Effect of root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi on growth, productivity y blast resistance in rice. *Rice*, 13(1), 1-14. Doi.org/10.1186/s12284-020-00402-7.
- Cedeño Sánchez, M. A. (2022). Análisis morfológico de grupos micorrízicos arbusculares presentes en sistemas agroforestales en la zona de Los Ríos (Bachelor's thesis, BABAHOYO: UTB).
- Chandrasekaran, M., Boopathi, T., y Manivannan, P. (2021). Comprehensive assessment of ameliorative affects of arbuscular mycorrhizal fungi in alleviating abiotic atress in tomato plants. *Journal of Fungi*. 7(4), 303. Doi:10.3390/jof7040303.
- Chaudhry, A.H., Nayab, S., Hussain, SB., Ali, M., y Pan, Z. (2021). Current understyings on magnesium deficiency y future outlooks for sustainable agriculture. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(4),1819. Doi.org/10.3390/ijms22041819.
- Chen, S., Zhao, H., Zou, C., Li, Y., Chen, Y., Wang, Z., Jiang, Y., Liu, A., Zhao, P., Wang, M., y Ahammed, G. J. (2017). Combined inoculation with multiple arbuscular mycorrhizal fungi improves growth, nutrient uptake y photosynthesis in cucumber seedlings. *Frontiers in microbiology*, 8, 2516. Doi:10.3389/fmicb.2017.02516.
- Cheng, H. Q., Giri, B., Wu, Q. S., Zou, Y. N. y Kuča, K. (2021). Arbuscular mycorrhizal fungi mitigate drought stress in citrus by modulating root microenvironment. *Archives of Agronomy y Soil Science*, 1-12.
- Chirumamilla, P., Gopu, C., Jogam, P., y Taduri, S. (2020). Highly efficient rapid micropropagation and assessment of genetic fidelity of regenerants by ISSR y SCoT markers of *Solanum khasianum* Clarke. *Plant Cell, Tissue y Organ Culture* 1-11.
- Choi, J., Summers, W., Paszkowski, U. (2018). Mechanisms underlying establishment of arbuscular mycorrhizal symbioses. *Annu Rev Phytopathol*. 56:135–160. Doi:10.1146/annurev-phyto-080516-035521.

- CONADESUCA (2020). Concluye la zafra 2019/2020. Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar. <https://www.gob.mx/conadesuca/prensa/concluye-la-zafra-2019-2020?idiom=es>.
- CONADESUCA (2021). Concluye la zafra 2020/2021. Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar. <https://www.gob.mx/conadesuca/es/articulos/cuadragésimo-reporte-de-avance-de-produccion-de-la-zafra-2020-21?idiom=es>.
- Dalla Costa, M., Rech, T. D., Primieri, S., Pigozzi, B. G., Werner, S. S., y Stürmer, S. L. (2021). Inoculation with isolates of arbuscular mycorrhizal fungi influences growth, nutrient use efficiency and gas exchange traits in micropropagated apple rootstock 'Marubakaido'. *Plant Cell, Tissue y Organ Culture (PCTOC)*, 145(1), 89-99.
- Damin, S., Carrenho, R., y Martins, S. (2020). The influence of mycorrhization on the growth of *Zea mays* L. and the sclerification of foliar tissues susceptible to chewing insect attacks. *Brazilian journal of botany*, 43(3), 493-502. Doi.org/10.1007/s40415-020-00621-8.
- De Souza Ferrari, M. P., Da Cruz, R. M. S., Dos Santos Queiroz, M., De Andrade, M. M., Alberton, O., y Magalhães, H. M. (2020). Efficient *in vitro* rooting, acclimatization, and cultivation of *Curcuma longa* L. from mycorrhizal fungi. *Journal of Crop Science y Biotechnology*, 23(5), 469-482. Doi:10.1007/s12892-020-00057-2
- Di Martino, C., Fioretto, A., Palmieri, D., Torino, V., y Palumbo, G. (2019). Influence of tomato plant mycorrhization on nitrogen metabolism, growth and fructification on P-limited soil. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38(4), 1183-1195. Doi:10.1007/s00344-019-09923-y.
- Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A., y García-Lara, S. (2018). *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248(1), 1-18.
- Espinoza, A (2013). Caracterización morfológica de esporas de micorrizas del Genero *Glomus* sp. A nivel de invernadero y de campo en el cultivo de soya *Glycine max* L. Universidad de Guayaquil. Colombia.
- Flores-Juárez, D. J., Villegas-Aparicio, Y., Castro-Rivera, R., Gómez-Vázquez, A., Carrillo-Rodríguez, J. C., y Castañeda Hidalgo, E. (2020). Inoculación de avena forrajera con hongos micorrízicos arbusculares. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 11(SPE24), 191-199.
- Fors, R. O., Saggin, O. J., Carneiro, M. A. C., Berbara, R.L. L. (2020). Selection of arbuscular mycorrhizal fungi for sugarcane in four soils with the presence of dark septate endophytes. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 42. Doi:10.4025/actasciagron.v42i1.42477.
- Frew, A., Powell, J. R., Allsopp, P. G., Sallam, N., y Johnson, S. N. (2017). Arbuscular mycorrhizal fungi promote silicon accumulation in plant roots, reducing the impacts of root herbivory. *Plant and Soil*, 419(1), 423-433.
- Genre, A., Lanfranco, L., Perotto, S., y Bonfante, P. (2020). Unique and common traits in mycorrhizal symbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 18(11), 649-660. Doi.org/10.1038/s41579-020-0402-3.

- Gómez-Kosky., R, Jaramillo., D. N., Esquiro, C. R., Villegas, A. B., Calimano, M. B., Armas, P.M., y Daniels, D. D. (2020). Effect of VIUSID Agro<sup>®</sup> y fitomas-E<sup>®</sup> on the *en vitro* acclimatization of sugarcane plants (*Saccharum* spp.) cultivar C90-469. *Sugar Tech*, 22(1), 42-51. Doi.org/10.1007/s12355-019-00752-7.
- Gómez-Merino, F. C., Trejo-Téllez, L. I., Salazar-Ortiz, J., Pérez-Sato, J. A., Sentíes-Herrera, H. E., Bello-Bello, J. J., y Aguilar-Rivera, N. (2017). La diversificación de la agroindustria azucarera como estrategia para México. *caña*, 1(1,900), 1-950.
- Gupta, S., Thokchom, S. D. y Kapoor, R. (2021). Arbuscular mycorrhiza improves photosynthesis y restores alteration in sugar metabolism in *Triticum aestivum* L. grown in arsenic contaminated soil. *Frontiers in Plant Science*, 12, 334. Doi.org/10.3389/fpls.2021.640379.
- Harborne, J. B. (1973). Compuestos fenólicos en métodos fitoquímicos. Springer: Dordrecht, Holanda. páginas. 33–88.
- Kamelchuk, Y. S., y Laman, N. A. (2021). Influence of mycorrhization of high blueberry regenerants at the stage of their adaptation to *en vitro* conditions on phosphorus content in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Biological Series*, 66(1), 37-41.
- Lambers, H., Albornoz, F., Kotula, L., Laliberté, E., Ranathunge, K., Teste, F. P., y Zemunik, G. (2018). How belowground interactions contribute to the coexistence of mycorrhizal y non-mycorrhizal species in severely phosphorus-impooverished hyperdiverse ecosystems. *Plant y Soil*, 424(1), 11-33.
- Lambers, H., Albornoz, F., Kotula, L., Laliberté, E., Ranathunge, K., Teste, F. P., y Zemunik, G. (2018). How belowground interactions contribute to the coexistence of mycorrhizal and non-mycorrhizal species in severely phosphorus-impooverished hyperdiverse ecosystems. *Plant and Soil*, 424(1), 11-33. Doi:10.1007/s11104-017-3427-2.
- Latef, A. A. H. A., Hashem, A., Rasool, S., Abd\_Allah, E. F., Alqarawi, A. A., Egamberdieva, D., y Ahmad, P. (2016). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and abiotic stress in plants: a review. *Journal of plant biology*, 59(5), 407-426.
- Lenoir, I., Fontaine, J., y Sahraoui, A. L. H. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses: a review. *Phytochemistry*, 123, 4-15.
- Lopes J. I, Correia C.M, Gonçalves A, Silva E, Martins S, Arrobas M, y Rodrigues M.A (2021) Arbuscular mycorrhizal fungi inoculation reduced the growth of pre-rooted olive cuttings in a greenhouse. *Soil Systems* 5:30. Doi.org/10.3390/soilsystems5020030 .
- López-Ráez JA y Pozo MJ (2013) Chemical signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: biotechnological applications. In *Symbiotic endophytes* (pp. 215-232). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Lotfi, M., Fernyez, K., Vermeir, P., Mars, M., y Werbrouck, S. (2019). *In vitro* mycorrhization of pear (*Pyrus communis*). *Mycorrhiza*, 29(6), 607-614. Doi: 10.1007/s00572-019-00919-w.

- Loyola-Vargas, V. M. y Ochoa-Alejo, N. (2018). An introduction to plant tissue culture: advances and perspectives. In *Plant cell culture protocols* (pp. 3-13). Humana Press, New York, NY.
- Malhi, G. S., Kaur, M., Kaushik, P., Alyemeni, M. N., Alsahli, A. A., y Ahmad, P. (2021). Arbuscular mycorrhiza in combating abiotic stresses in vegetables: An eco-friendly approach. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(2), 1465.
- Meddich, A., Ait Rahou, Y., Boutasknit, A., Ait-El-Mokhtar, M., Fakhech, A., Lahbouki, S., y Wahbi, S. (2021). Role of mycorrhizal fungi in improving the tolerance of melon (*Cucumis melo*) under two water deficit partial root drying y regulated deficit irrigation. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 1-11. Doi:10.1080/11263504.2021.1881644.
- Moore P.H., Paterson A.H., y Tew T. (2014). Sugarcane: the crop, the plant y domestication. In: P. H. Moore, F. C. Botha (Eds.). *Sugarcane: physiology, biochemistry and functional biology*. John Wiley, New York, NY, USA. pp. 1-17. Doi: 10.1002/9781118771280.
- Mota, I., Sánchez-Sánchez, J., Pedro, L. G., y Sousa, M. J. (2020). Composition variation of the essential oil from *Ocimum basilicum* L. cv. genovese gigante in response to *Glomus intraradices* y mild water stress at different stages of growth. *Biochemical Systematics y Ecology*, 90, 104021.
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth y bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497. Doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.
- Oehl, F., Sieverding, E., Palenzuela, J., Ineichen, K., y Alves da Silva, G. (2011). Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. *IMA Fungus*, 2(2), 191-199. Doi.org/10.5598/imafungus.2011.02.02.10.
- Ortas I. (2019). Under field conditions, mycorrhizal inoculum effectiveness depends on plant species y phosphorus nutrition. *Journal of Plant Nutrition*. Doi:10.1080/01904167.2019.1659336.
- Pérez, A., y Rojas, A. (2011). Hongos formadores de micorrizas arbusculares: una alternativa biológica para la sostenibilidad de los agroecosistemas de praderas en el caribe colombiano. *Colombiana cienc. Anim*, 3(2).
- Pérez, E., Ramírez, H., Núñez, H., y Ochoa, N., (1999). *Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales*. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Primera edición México.
- Phillips, G. C., y Garda, M. (2019). Plant tissue culture media y practices: an overview. *In vitro cellular and Developmental Biology-Plant*, 55(3), 242-257.
- Porras-Soriano, A., Soriano-Martín, M. L., Porras-Piedra, A., y Azcon, R. (2009). Arbuscular mycorrhizal fungi increased growth, nutrient uptake y tolerance to salinity in olive trees under nursery conditions. *J Plant Physiol* 166:1350-1359. Doi:10.1016/j.jplph.2009.02.010.
- Ren, L., Wang, B., Yue, C., Zhou, S., Zhang, S., Huo, H., y Xu, G. (2019). Mechanism of application nursery cultivation arbuscular mycorrhizal seedling in watermelon in the field. *Ann. Appl. Biol.* 174:51-60.

- Rivera, N. A., Mendoza, G. G., Martínez, J. F., y Servin, C. C. (2010). Competitividad internacional de la industria azucarera de México. *Theoria*, 19(1), 7-29.
- Rivero, A. M., Ramírez-Mosqueda, M. A., Frómeta, O. M., Morgado, M. M. E., Paneca, M. R., Escriba, R. C. R. y Bello-Bello, J. J. (2020). Influence of vitrofural® on sugarcane micropropagation using temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue y Organ Culture (PCTOC)*, 1-7. Doi:10.1007/s11240-020-01800-x.
- Roca, W. M., y Ramírez, H. (2000). Introducción a la biotecnología vegetal. CEDAF.
- SADER (2020). Caña de azúcar, una dulce producción. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/cana-de-azucar-una-dulce-produccion-237168?idiom=es>.
- Salamanca, C., y Augusto, C. (2004). La micorriza arbuscular características, producción y aplicaciones. Corpoica C.I La Libertad. Colombia.
- Sales, F. R., Silva, A. O., Sales, L. R., Rodrigues, T. L., de Souza Moreira F. M, y Carneiro, M. A. C. (2021). Native arbuscular mycorrhizal fungi exhibit biotechnological potential in improvement of soil biochemical quality y in increasing yield in sugarcane cultivars. *Sugar Tech*, 23(6), 1235-1246. Doi:10.1007/s12355-021-01016-z.
- Santana, N. A., Rabuscke, C. M., Soares, V. B., Soriani, H. H., Nicoloso, F. T., y Jacques, R. J. S. (2018). Vermicompost dose y mycorrhization determine the efficiency of copper phytoremediation by *Canavalia ensiformis*. *Environmental Science y Pollution Research*, 25(13), 12663-12677. Doi:10.1007/s11356-018-1533-1.
- Sasson, A. (1989). Biotechnologies y developing countries: present y future. *Plant Biotechnologies*.
- Schübler, A., Schwarzott, D., y Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the glomeromycota: phylogeny y evolution. *Mycological research*, 105(12), 1413-1421.
- Secretariat of the Convention on Biological Diversity, *Convention on Biological Diversity (CBD, 2022)*; [www.cbd.int/doc/legal/cbd-en.pdf](http://www.cbd.int/doc/legal/cbd-en.pdf).
- Sentíes-Herrera, H. E., Trejo-Téllez, L. I., y Gómez-Merino, F. C. (2017). The Mexican sugarcane production system: History, current status, and new trends. *Sugarcane: Production Systems, Uses and Economic Importance*; Murphy, R., Ed, 39-71.
- Shabbir, R., Javed, T., Afzal, I., Sabagh, A. E., Ali, A., Vicente, O., y Chen, P. (2021). Modern biotechnologies: Innovative and sustainable approaches for the improvement of sugarcane tolerance to environmental stresses. *Agronomy*, 11(6), 1042.
- Selosse, M. A. y Le Tacón, F. 1998. The ly flora: a phototroph–fugus partnership *Tree* 13 (1): 15–20.
- Smith, S. E. y D.J. Read. 2008. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, New York. Vol. 2, p. 787.

- Strasburger, E., Noll, F., Schenck, H., y Schimper, A. F. W. (1988). Tratado de Botánica, 6ª ed. española. Traducción de la 32ª ed. Alemana por Oriol de Bolós. Barcelona. Mirin. p 1038
- Trinidad-Cruz, J. R., Quiñones-Aguilar, E. E., Rincón-Enríquez, G., López-Pérez, L., y Hernández-Cuevas, L. V. (2017). Mycorrhization of *agave cupreata*: Biocontrol of *Fusarium oxysporum* and plant growth promotion. *Revista mexicana de fitopatología*, 35(2), 151-169. Doi:10.18781/r.mex.fit.1607-5.
- Tripathi, P., Chyra, A., y Prakash, J. (2022). Changes in physio-biochemical attributes y dry matter accumulation vis a vis analysis of genes during drought and stress recovery at tillering stage of sugarcane. *Acta Physiologiae Plantarum*, 44(1), 1-10. Doi:10.1007/s11738-021-03336-9.
- Trouvelot, S., Bonneau, L., Redecker, D., Van Tuinen, D., Adrian, M., y Wipf, D. (2015). Arbuscular mycorrhiza symbiosis in viticulture: a review. *Agronomy for sustainable development*, 35(4), 1449-1467. Doi: 10.1007/s13593-015-0329-7.
- Vergara, C., Araujo, K. E. C., Souza, S. R. D., Schultz, N., Saggin, O. J., Sperryio, M. V. L., y Zilli, J. É. (2018). Plant-mycorrhizal fungi interaction and response to inoculation with different growth-promoting fungi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 54. Doi:10.1590/S1678-3921.pab2019.v54.25140.
- Wang, L., Yang, D., Ma, F., Wang, G., You, Y. (2022). Recent advances in responses of arbuscular mycorrhizal fungi - Plant symbiosis to engineered nanoparticles. *Chemosphere*. 286(Pt 1):131644. Doi:10.1016/j.chemosphere.2021.131644.
- Wu, M., Yan, Y., Wang, Y., Mao, Q., Fu, Y., Peng, X., Yang, Z., Ren, J., Liu, A., Chen, S., y Ahammed, G. J. (2021). Arbuscular mycorrhizal fungi for vegetable (VT) enhance resistance to *Rhizoctonia solani* in watermelon by alleviating oxidative stress. *Biological Control*. 152, 104433.
- Wu, Q. S., Zou, Y. N., y Wang, G. Y. (2011). Arbuscular mycorrhizal fungi and acclimatization of micropropagated citrus. *Communications in soil science and plant analysis*, 42(15), 1825-1832. Doi:10.1080/00103624.2011.587570.
- Wu, S., Shi, Z., Chen, X., Gao, J., y Wang, X. (2022). Arbuscular mycorrhizal fungi increase crop yields by improving biomass under rainfed condition: a meta-analysis. *PeerJ*, 10, e12861. Doi:10.7717/peerj.12861.
- Xiao, X., Chen, J., Liao, X., Yan, Q., Liang, G., Liu, J., y Guan, R. (2022). Different arbuscular mycorrhizal fungi established by two inoculation methods improve growth and drought resistance of *cinnamomum migao* seedlings differently. *Biology*, 11(2), 220. Doi:10.3390/biology11020220.
- Zan, F., Zhang, Y., Wu, Z., Zhao, J., Wu, C., Zhao, Y., y Yang, X. (2020). Genetic analysis of agronomic traits in elite sugarcane (*Saccharum* spp.) germplasm. *Plos one*, 15(6), e0233752.