

# HACIA EL CULTIVO MONOXÉNICO DE *Glomus claroideum* EN RAÍCES TRANSFORMADAS DE ZANAHORIA

Towards the Monoxenic Culture of *Glomus claroideum* in Transformed Roots of Carrot

F. A. Solís-Domínguez<sup>1‡</sup>, A. Alarcón<sup>1</sup>, R. Ferrera-Cerrato<sup>1</sup>, M. Salvador-Figueroa<sup>2</sup>,  
D. Espinosa-Victoria<sup>1</sup> y E. Cárdenas-Soriano<sup>1</sup>

## RESUMEN

Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) son microorganismos rizosféricos capaces de completar su ciclo de vida sólo cuando colonizan las raíces de hospedantes susceptibles. La técnica de cultivo de tejidos vegetales acompañada de la transformación genética de raíces ha permitido la propagación *in vitro* de algunas especies de HMA. Se germinaron esporas de *Glomus claroideum* en medio mínimo para establecer la simbiosis *in vitro* utilizando raíces de zanahoria transformadas por *Agrobacterium rhizogenes*. A pesar de no haber colonizado intraradicalmente, el micelio externo presentó una forma rizada con distribución limitada; formó una masa enredada de hifas y esporas inmaduras. Las hifas presentaron protuberancias de la pared formando estructuras en forma de crestas, similares a las estructuras de contacto que poseen algunos hongos micoparásitos. La viabilidad del micelio extraradical de *G. claroideum* estimada por la tinción vital de la fosfatasa alcalina del hongo, se mantuvo hasta después de tres meses del cultivo monoxénico. Las posibles causas del comportamiento de *G. claroideum* bajo las condiciones de su cultivo monoxénico son discutidas.

**Palabras clave:** hongos micorrícicos arbusculares, micelio extraradical, cultivo *in vitro*.

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. 56230 Montecillo, Estado de México.

<sup>‡</sup> Autor responsable (fasolis76@hotmail.com)

<sup>2</sup> Centro de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. 30700 Tapachula, Chiapas.

Recibido: mayo de 2004. Aceptado: noviembre de 2008.  
Publicado como nota de investigación en  
Terra Latinoamericana 27: 35-41

## SUMMARY

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are rhizospheric microorganisms that complete their life cycle only when they colonize the root system of susceptible hosts. The plant tissue culture accompanied by genetic transformation of roots has allowed the *in vitro* propagation of some AMF species. The objective of this investigation was to establish and to study the behavior of *Glomus claroideum* in monoxenic culture of transformed carrot roots by *Agrobacterium rhizogenes*. Although *G. claroideum* did not show intraradical colonization, the curly external mycelia had limited distribution and formed an entangled mass of hyphae, and some immature spores were observed. In some regions, the hyphae presented wall elongations forming crest-like structures, resembling those contact structures exhibited by some mycoparasitic fungi. The viability of the extraradical mycelia, estimated via the fungal alkaline phosphatase vital stain, was maintained after three months of the monoxenic culture. The possible causes of the behavior of *G. claroideum* under monoxenic culture are discussed.

**Index words:** arbuscular mycorrhizal fungi, extraradical mycelium, *in vitro* culture.

## INTRODUCCIÓN

Los hongos micorrícicos arbusculares (HMAs) son biótrofos obligados que, para completar su ciclo de vida, deben colonizar las raíces de las plantas (Bianciotto *et al.*, 1996). Una de las formas más comunes para propagar HMA involucra el uso de cultivos trampa en macetas (Sylvia, 1999). A través de la técnica de cultivo de órganos vegetales y la transformación genética de raíces con la inserción del plásmido Ri (inductor de raíces) de *Agrobacterium rhizogenes*, la simbiosis micorrícica se ha establecido en cultivo monoxénico (dos organismos creciendo juntos en condiciones estériles: HMA y raíces

cultivadas *in vitro*, según Bago *et al.*, 1998a). Sin embargo, el cultivo *in vitro* de los HMA sigue siendo un desafío, ya que sólo se han logrado cultivar algunas especies. De acuerdo con las páginas electrónicas del INVAM (2008) y del GINCO (2008), sólo 18 especies de HMA dentro del grupo *Glomaceae* han sido propagadas en cultivo monoxénico, así como otras especies reportadas en la literatura como *Gigaspora margarita* (Bécard y Fortin, 1988), *Gigaspora gigantea* (Declerck *et al.*, 2005), *G. clarum* (Adriano y Berbara, 1999), *G. etunicatum* (Schreiner y Koide, 1993), *G. intraradices* (St-Arnaud *et al.*, 1996), *G. mosseae* (Douds, 1997), *G. proliferum* (Declerck *et al.*, 2000) y *G. versiforme* (Declerck *et al.*, 1996). Sin embargo, no se ha logrado la propagación exitosa de la especie *Glomus claroideum* en sistemas de cultivo monoxénico (GINCO, 2008). Mediante este sistema se han obtenido esporas libres de cualquier otro organismo y estudiado el ciclo de vida y ontogenia de algunas especies (Adriano y Berbara, 1999); el intercambio de señales químicas entre hongo-hospedante (Bécard *et al.*, 1992); la captación y el transporte del carbono en el HMA (Douds *et al.*, 2000), además de la descripción de la arquitectura y el desarrollo del micelio externo (Bago *et al.*, 1998a; b). Todos ellos aspectos imposibles de estudiar en cultivos en maceta.

Ante la necesidad de iniciar estudios sobre el comportamiento en cultivo monoxénico de especies de HMA autóctonas de México, como las que integran al consorcio *Glomus Zac-19* (Chamizo *et al.*, 1998) cuya efectividad en el crecimiento de plantas importantes para el sector agrícola, frutícola y forestal, ha sido satisfactoriamente evaluada (Manjarrez *et al.*, 2005; Alarcón y Ferrera-Cerrato, 2003; Alarcón *et al.*, 2002; 2007; Cartmill *et al.*, 2007; 2008), el presente trabajo tuvo como finalidad establecer el cultivo monoxénico de la especie *Glomus claroideum* y describir la morfología de su micelio externo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La transformación de las raíces se realizó con la inoculación de *Agrobacterium rhizogenes* (cepa 9402, resistente a 25 µg mL<sup>-1</sup> de kanamicina) en rodajas de zanahoria (*Daucus carota* L.) y, posteriormente, mantenidas en medio mínimo «M», pH 5.5. (Bécard y Fortin 1988). De acuerdo con Tepfer (1984), las raíces transformadas que se obtuvieron presentaron

geotropismo negativo, raíces laterales abundantes y de apariencia hialina.

Las esporas de *Glomus claroideum* se obtuvieron del consorcio micorrícico *Glomus Zac-19* (Chamizo *et al.*, 1998), propagado en cultivos trampa de *Sorghum vulgare* L. durante varios años, en invernadero. Las esporas se extrajeron mediante tamizado y decantación en húmedo (Gerdemann y Nicolson, 1963) y se seleccionaron bajo un microscopio estereoscópico. Después se enjuagaron en Tween 20 al 0.05% durante 1 min; se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 1% y una solución estéril de 200 mg L<sup>-1</sup> de estreptomina y 100 mg L<sup>-1</sup> de gentamicina (Bécard y Piché, 1992). Después de la desinfección, las esporas se distribuyeron en cajas de Petri con medio «M» y se incubaron horizontalmente a 24 °C durante 10 días para propiciar su germinación.

Para establecer el cultivo monoxénico, se transfirieron segmentos apicales de raíces transformadas, de 5 mm de longitud, a cajas de Petri con medio «M» y cinco esporas germinadas colocadas a 2 mm de la raíz. Las cajas se incubaron a 24 °C por 90 días. Se hizo un seguimiento no destructivo del crecimiento del micelio extrarradical y la esporulación con microscopio estereoscópico cada 15 días.

Para comprobar la viabilidad del micelio extrarradical, se utilizó la tinción vital de la fosfatasa alcalina (ALP) del hongo (Tisserant *et al.*, 1993), directamente en el cultivo monoxénico (10 repeticiones), a los 60 y 90 días de edad. Como control positivo se utilizó micelio de *Glomus intraradices* de 45 días en cultivo monoxénico. Una vez teñido el micelio, se hicieron preparaciones en portaobjetos para observar al microscopio de campo claro la reacción positiva de la ALP y tomar las fotomicrografías (fotomicroscopio III, Carl Zeiss).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contacto de las hifas germinativas de las esporas de *G. claroideum* en estas raíces transformadas se estableció a los seis días después de inocular las esporas pregerminadas. La presencia de *G. claroideum* en las células epidérmicas de las raíces se confirmó mediante microscopía electrónica de barrido, en donde se observó que las hifas del hongo recorrieron la superficie de la epidermis radical (Figura 1). Sin embargo, no se detectó la típica colonización micorrícica intrarradical al observar raíces teñidas con azul tripano (Phillips y

Hayman, 1970). La ausencia de estructuras de *G. claroideum* dentro de las raíces, a pesar de que las hifas estaban en contacto con la superficie de la raíz, pudo deberse a la ausencia de compuestos estimuladores derivadas del hospedante (Garbaye, 1994; Barker *et al.*, 1998), lo que limitó al hongo para penetrar la epidermis y desarrollarse en las células corticales, como se ha descrito para *Gigaspora gigantea* (Bécard y Piché, 1990). No obstante, otros aspectos, como la composición mineral del medio de cultivo y su pH, pueden también estar relacionados en el establecimiento exitoso de la simbiosis en las raíces transformadas. De igual forma, los aspectos relacionados con los requerimientos ambientales y nutricionales de los HMA han sido poco estudiados (Nagahashi y Douds, 2005). En este caso en particular, *G. claroideum* requiere de diferentes fuentes de nutrimentos o factores de crecimiento que le permitan desarrollarse exitosamente bajo el sistema de cultivo monoxénico, para lo cual se necesita mayor estudio.

Aun cuando no se observó colonización intraradical del *G. claroideum*, se detectó un profuso pero localizado desarrollo de micelio en el medio de cultivo, el cual se extendió en un radio de 2.5 cm a partir de la espora inoculada, en tres meses. Una vez germinadas las esporas, se observó el desarrollo de hifas principales y secundarias de 5 y 2.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, respectivamente. Durante los primeros siete días, las hifas ramificaron a intervalos más o menos regulares (210-260  $\mu\text{m}$ , Figura 2a) dirigiéndose hacia la raíz hospedante. En la cuarta semana, el micelio creció de manera irregular en forma rizada (Figura 2b y c) y se inició la formación de esporas hialinas muy pequeñas que no desarrollaron

completamente (Figura 2d y e), alcanzando de 15 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro. En promedio, se produjeron cuatro esporas inmaduras por caja de Petri.

A diferencia del micelio externo de *G. intraradices* (Bago *et al.*, 1998a), *G. claroideum* presentó escasa formación de hifas corredoras (Figura 2f). Predominaron las hifas delgadas que se desarrollaron en puntos localizados de manera desorganizada. Las hifas bifurcadas, parecidas a las estructuras ramificadas de absorción, se observaron en raras ocasiones (datos no presentados). Algunas zonas de las hifas presentaron elevaciones en forma de crestas, sobre todo en las regiones hifales cercanas a las raíces o debajo de ellas (Figura 3e).

La actividad de ALP en el micelio fue positiva, tanto para *G. claroideum* (Figura 3d y f) como para *G. intraradices* (control positivo, Figura 3b), aunque también se observaron regiones de micelio con reacción negativa a la tinción (Figura 2a y c). De acuerdo con la tinción de ALP, el micelio externo de *G. claroideum* permaneció activo luego de tres meses en cultivo monoxénico. El micelio activo estuvo libre de septos, mientras que el tejido inactivo se caracterizó por estar septado. Las regiones hifales con mayor intensidad de la reacción positiva de la fosfatasa alcalina fueron aquellas cercanas a la raíz. Lo anterior se puede relacionar con el aprovechamiento del hongo de las fuentes de energía y nutrición provistas por la raíz, lo que permitió el desarrollo observado del micelio externo. No obstante, al aumentar la distancia hacia la raíz, es probable que el suministro de carbono para el hongo fuera limitado, lo que produjo la contracción

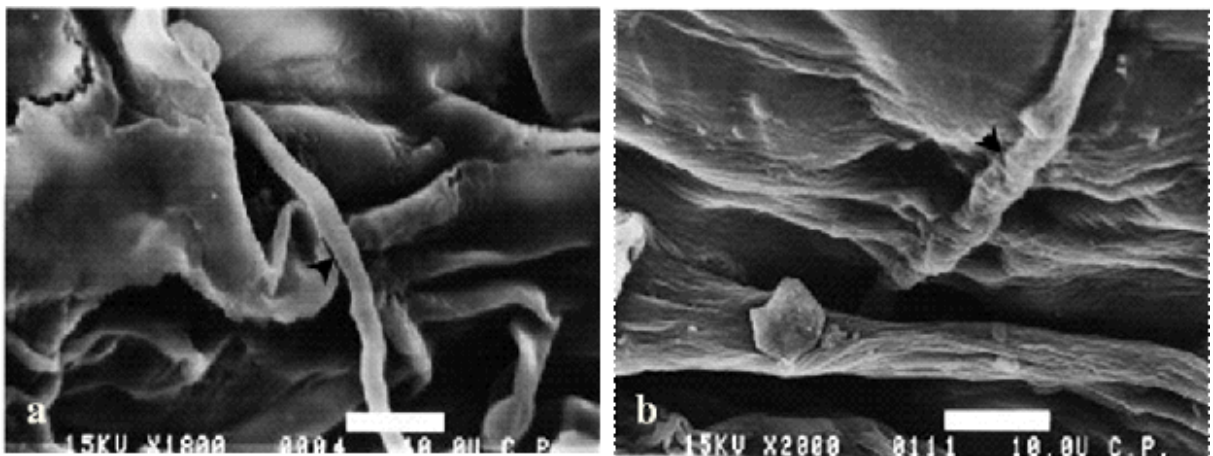


Figura 1. Raíces de zanahoria y *Glomus claroideum* en cultivo monoxénico de 90 días de edad (microfotografías tomadas al microscopio electrónico de barrido. a y b) micelio externo de *G. claroideum* recorriendo la epidermis de las raíces (flecha).

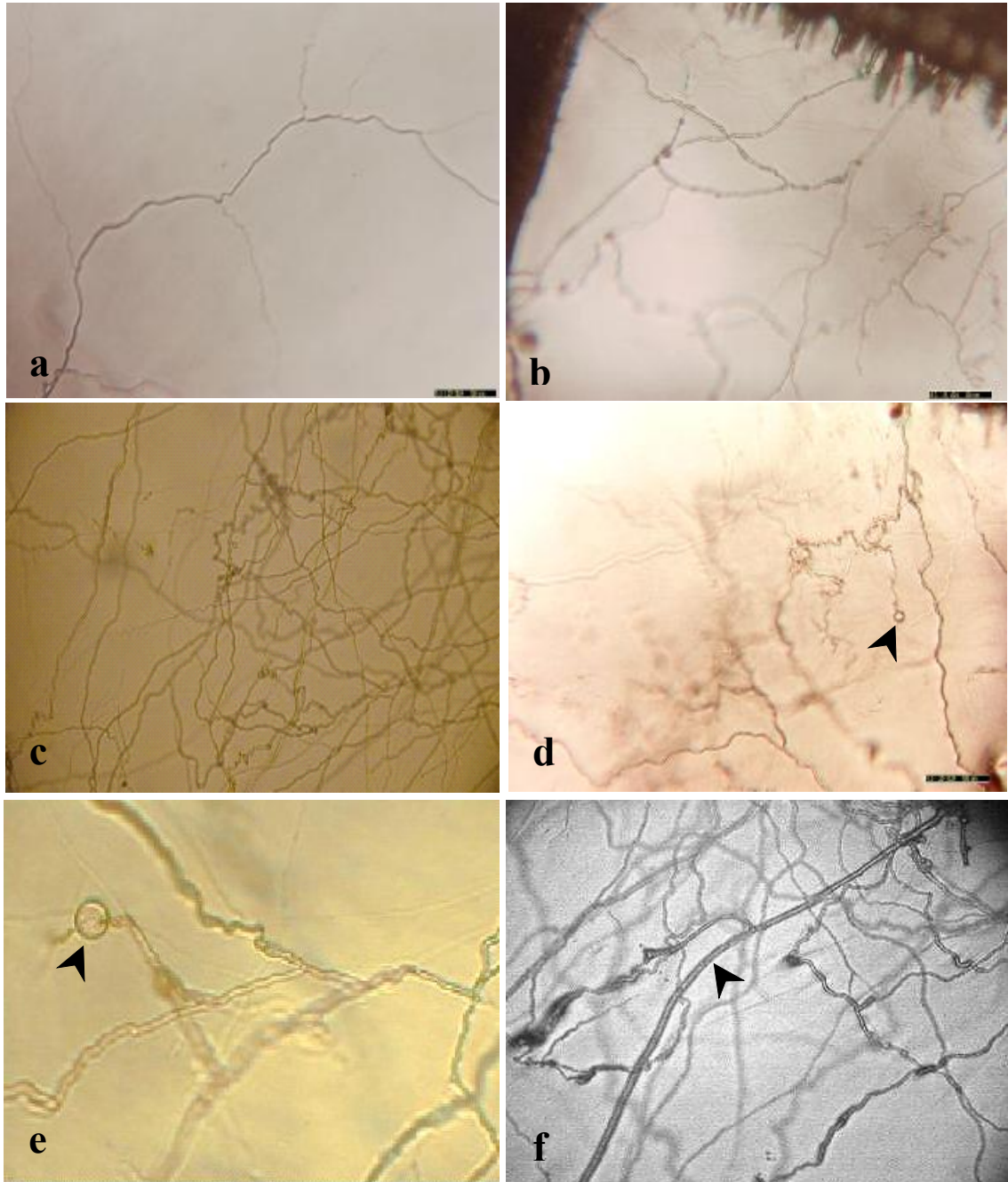


Figura 2. Morfología del micelio externo de *Glomus claroideum* en cultivo monoxénico (fotomicrografías tomadas al microscopio óptico). a) ramificación dicotómica a intervalos largos durante la primera semana de crecimiento del micelio; b) durante la cuarta semana las ramificaciones fueron más frecuentes y las hifas cada vez más rizadas; c) micelio denso creciendo desordenadamente; d y e) formación de esporas inmaduras observadas a los tres meses (flechas); f) hifa corredora entre abundante micelio (flecha); Barras = 100  $\mu$ m.



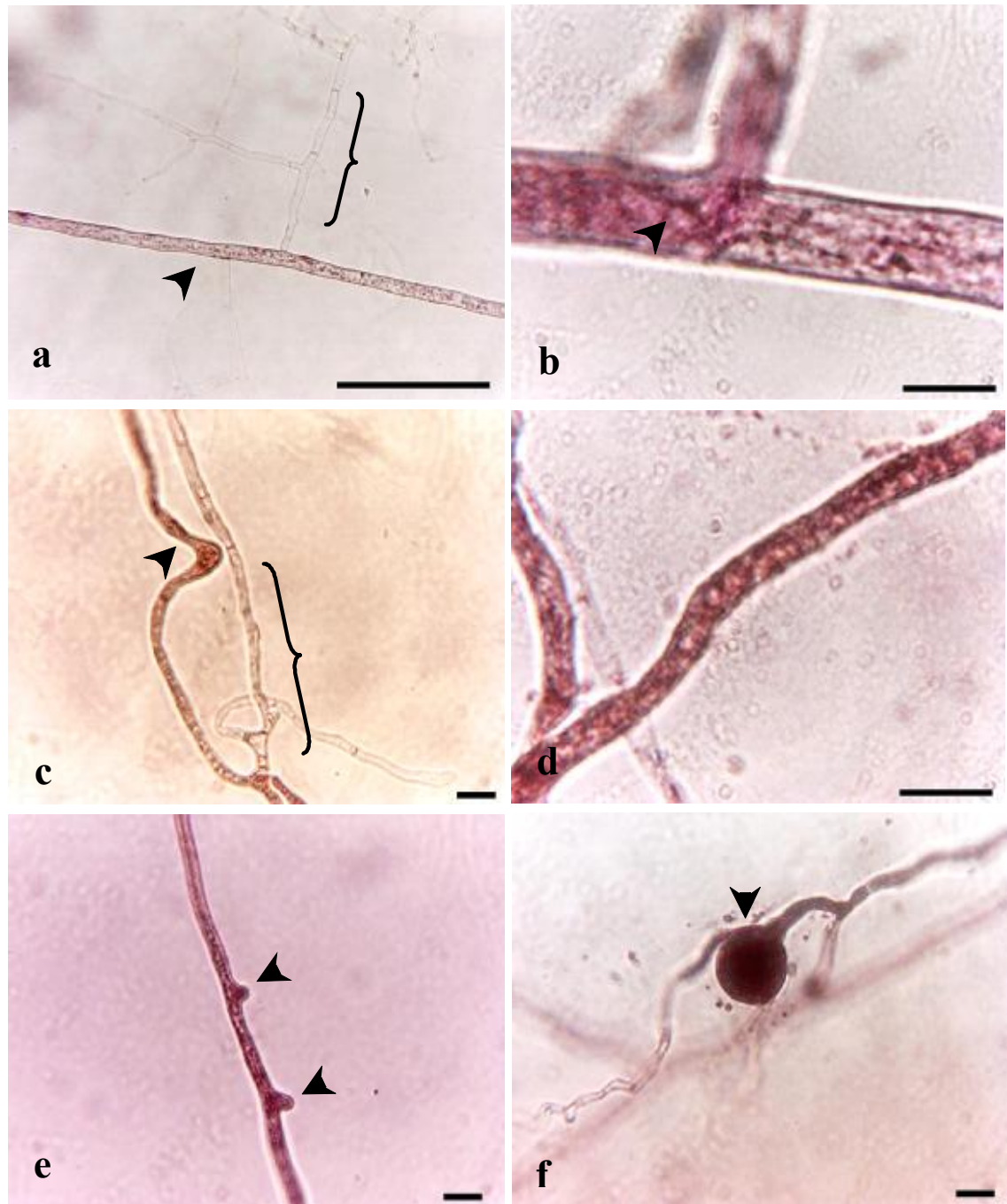


Figura 3. Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) en micelio externo detectada por una pigmentación negra. a) micelio de *Glomus intraradices* con una región septada con reacción negativa de la ALP (}) y otra con actividad positiva (flecha); b) región con reacción positiva de la ALP en *G. intraradices* (flecha); c) micelio de *G. claroideum* con reacción positiva de la ALP (flecha) y otra con reacción negativa (}); d y e) reacción positiva de la ALP en hifas de *G. claroideum* y presencia de crestas (flechas) cuya función es desconocida; f) espora inmadura de *G. claroideum* con actividad positiva de la ALP (flecha). Barras = a) 100  $\mu$ m; b - f) 10  $\mu$ m.

del citoplasma y la generación de septos, como se ha reportado para *Gigaspora rosea* (Bago *et al.*, 1998c).

No todos los HMA son establecidos fácilmente *in vitro* (Douds, 1997). A pesar de no haberse establecido exitosamente *G. claroideum*, las esporas tuvieron la capacidad de desarrollar micelio activo durante tres meses. En el caso de esporas en medio «M» sin la presencia de la raíz, se observó el desarrollo de prolongaciones de hifas de 1.12 mm de longitud en promedio, sin mostrar diferencias en crecimiento a los tres meses. Por el contrario, las esporas colocadas cerca de las raíces presentaron un continuo crecimiento de las hifas hasta llegar a formar las esporas inmaduras mencionadas.

Los resultados muestran, por vez primera, la capacidad del hongo para mantener su crecimiento hifal aun sin establecer exitosamente la simbiosis como tal, sugiriendo la habilidad de este hongo para desarrollarse a partir de sus propias reservas de carbono durante su fase asimbiótica (Bago *et al.*, 2000a; b), mantener su viabilidad por tres meses, e incluso, llegar a formar esporas inmaduras (Figura 3f). Los HMA son biótropos obligados que dependen completamente de la planta para abastecerse del carbono requerido. No obstante, *Glomus hoi* tiene aparentemente la habilidad de crecer en compartimentos ricos en materia orgánica, denotando un comportamiento saprofitico (Hodge *et al.*, 2001). Sin embargo, no hay evidencias de que los HMA tomen carbono a partir de fuentes orgánicas, tanto en suelo como en medios de cultivo (Bago *et al.*, 2000a)

Las hifas de *G. claroideum* presentaron elevaciones de la pared formando crestas (Figura 3e) cuya función es desconocida. Barnett y Binder (1973) reportan que este tipo de estructuras fúngicas (estructuras de contacto) participan en relaciones micoparasíticas biotróficas para incrementar la obtención de nutrimentos del micoparásito, a partir del hospedante. Es probable que en *G. claroideum*, este tipo de estructuras permitan al hongo asimilar nutrimentos provenientes de los exudados radicales cuando las hifas estaban en contacto directo con la superficie de la raíz o cuando estaban desarrollándose en el medio de cultivo.

## CONCLUSIONES

*Glomus claroideum* no pudo establecerse exitosamente en cultivo monoxénico, aunque se observó, por vez primera, un desarrollo profuso y localizado de micelio externo en el medio de cultivo. La actividad

metabólica del micelio revelado con la tinción vital de la enzima fosfatasa alcalina, obtenido bajo cultivo monoxénico, se mantuvo durante tres meses. El desarrollo de micelio a partir de esporas, a expensas de sus propias reservas de carbono, permitió, además, generar nuevas esporas, pero sin llegar a un estado de madurez. La presencia de estructuras atípicas del micelio de *G. claroideum* requiere de mayor estudio para establecer su posible función bajo condiciones de cultivo monoxénico.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dra. Lucía Varela Fregoso del Instituto Politécnico Nacional el haber proporcionado la cepa de *Agrobacterium rhizogenes*.

## LITERATURA CITADA

- Adriano, S. F. and R. L. L. Berbara. 1999. Ontogeny of *Glomus clarum* in Ri T-DNA transformed roots. *Mycologia* 91: 343-350.
- Alarcón, A. y R. Ferrera-Cerrato. 2003. Aplicación de fósforo e inoculación de hongos micorrízicos arbusculares en el crecimiento y estado nutricional de *Citrus volkameriana* Tan & Pasq. *Terra* 21: 91-99.
- Alarcón, A., F. T. Davies Jr., J. N. Egilla, T. Fox, A. Estrada-Luna, and R. Ferrera-Cerrato. 2002. Short term effects of *Glomus claroideum* and *Azospirillum brasilense* on growth and root acid phosphatase activity of *Carica papaya* L. under phosphorus stress. *Rev. Latin. Microbiol.* 44: 31-37.
- Alarcón, A., R. Ferrera-Cerrato, and J. Pérez-Moreno. 2007. Mycorrhizae in tropical agriculture. pp. 197-238. *In*: C. Hamel and C. Plenchette (eds.). *Mycorrhizae in crop production*. The Haworth Press. New York, NY, USA.
- Bago, B., C. Azcón-Aguilar, and Y. Piché. 1998a. Architecture and developmental dynamics of the external mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown under monoxenic conditions. *Mycology* 90: 52-62.
- Bago, B., C. Azcón-Aguilar, A. Goulet, and Y. Piché. 1998b. Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 139: 375-388.
- Bago, B., W. Zipfel, R. M. Williams, H. Chamberland, J. G. Lafontaine, W. W. Webb, and Y. Piché. 1998c. *In vivo* studies on the nuclear behavior of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora roseae* grown under axenic conditions. *Protoplasts* 203: 1-15.
- Bago, B., P. E. Pfeffer, and Y. Shachar-Hill. 2000a. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiol.* 124: 949-958.
- Bago, B., C. Azcón-Aguilar, Y. Shachar-Hill y P. E. Pfeffer. 2000b. El micelio externo de las micorrizas arbusculares como puente simbiótico entre la raíz y su entorno. pp. 78-92. *In*: A. Alarcón

- y R. Ferrera-Cerrato (eds.). Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular. Mundi Prensa. D. F., México.
- Barker, S. J., D. Tagu, and G. Delp. 1998. Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbioses. *Plant Physiol.* 116: 1201-1207.
- Barnett, H. L. and F. L. Binder. 1973. The fungal host-parasite relationship. *Annu. Rev. Phytopathol.* 11: 273-292.
- Bécard, B. G. and J. A. Fortin. 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* 108: 211-218.
- Bécard, G. and Y. Piché. 1990. Physiological factors determining vesicular-arbuscular mycorrhizal formation in host and nonhost Ri T-DNA transformed roots. *Can. J. Bot.* 68: 1260-1264.
- Bécard, G. and Y. Piché. 1992. Establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza in root organ culture: Review and proposed methodology. pp. 89-108. *In: J. R. Norris, D. J. Read, and A. K. Varma (eds.) Methods in microbiology.* Academic Press. London, UK.
- Bécard, G., D. D. Douds, and P. E. Pfeffer. 1992. Extensive *in vitro* hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO<sub>2</sub> and flavonols. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 821-825.
- Bianciotto, V., C. Bandi, D. Minerdi, M. Sironi, T. H. Volker, and P. Bonfante. 1996. An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3005-3010.
- Cartmill, A. D., A. Alarcón, and L. A. Valdez-Aguilar. 2007. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance tolerance of *Rosa multiflora* cv. Burr to bicarbonate in irrigation water. *J. Plant Nutr.* 30: 517-540.
- Cartmill, A. D., L. A. Valdez-Aguilar, D. L. Bryan, and A. Alarcón. 2008. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance tolerance of vinca to high alkalinity in irrigation water. *Sci. Hortic.* 115: 275-284.
- Chamizo, A., R. Ferrera-Cerrato y L. Varela. 1998. Identificación de un consorcio del género *Glomus*. *Rev. Mex. Micol.* 14: 37-40.
- Declerck, S., D. G. Strullu, and C. Plenchette. 1996. *In vitro* mass-production of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus versiforme*, associated with Ri T-DNA transformed carrot roots. *Mycology Res.* 100: 1237-1242.
- Declerck, S., S. Cranenbrouck, Y. Dalpé, S. Séguin, A. Grandmougin-Ferjani, J. Fontaine, and M. Sancholle. 2000. *Glomus proliferum* sp. nov.: a description based on morphological, biochemical, molecular and monoxenic cultivation data. *Mycol.* 92: 1178-1187.
- Declerck, S., S. Seguin, and Y. Dalpe. 2005. The monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi as a tool for germoplasm collections. pp. 17-30. *In: S. Declerck, D-G. Strullu, and A. Fortin (eds.) In vitro culture of mycorrhizas.* Soil Biology. Springer-Verlag. Berlin, Germany.
- Douds, D. D. 1997. A procedure for the establishment of *Glomus mosseae* in dual culture with Ri T-DNA-transformed carrot roots. *Mycorrhiza* 7: 57-61.
- Douds, D. D., P. E. Pfeffer, and Y. Shachar-Hill. 2000. Application of *in vitro* methods to study carbon uptake and transport by AM fungi. *Plant Soil.* 226: 255-261.
- Garbaye, J. 1994. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 128: 197-210.
- Gerdemann, J. W. and T. H. Nicolson. 1963. Spores of mycorrhizal endogone species extracted by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46: 235-244.
- GINCO (Glomeromycota *In vitro* Collection). 2008. <http://emma.agro.ucl.ac.be/ginco-bel/> (Consulta: abril, 2008).
- Hodge, A., C. D. Cambell, and A. H. Fitter. 2001. An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature* 413: 297-299.
- INVAM (International Culture Collection of Arbuscular & Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi). 2008. <http://invam.caf.wvu.edu/methods/cultures/GINCO.pdf> (Consulta: abril, 2008).
- Manjarrez-Martínez, M. J., A. Alarcón, and R. Ferrera-Cerrato. 2005. Foliar fertilization of *Annona cherimola* Mill. plants inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. *Terra Latinoamericana* 23: 553-562.
- Nagahashi, G. and D. D. Douds Jr. 2005. Environmental factors that affect presymbiotic hyphal growth and branching of arbuscular mycorrhizal fungi. pp. 95-110. *In: S. Declerck, D. G. Strullu, and J. A. Fortin (eds.) In vitro culture of mycorrhizas.* Springer-Verlag. Berlin, Germany.
- Phillips, J. M. and D. S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- Schreiner, R. P. and R. T. Koide. 1993. Stimulation of vesicular-arbuscular fungi by mycotrophic and nonmycotrophic plant root systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2750-2752.
- St-Arnaud, M., C. Hamel, B. Vimard, M. Caron, and J. A. Fortin. 1996. Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots. *Mycol. Res.* 100: 328-332.
- Sylvia, D. M. 1999. Mycorrhizal symbioses. pp. 408-426. *In: D. M. Sylvia, J. F. Fuhrmann, P. J. Hartel, and D. A. Zuberer (eds.) Principles and applications of soil microbiology.* Prentice Hall. Upper Saddle River, NJ, USA.
- Tepfer, D. 1984. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell* 37: 959-967.
- Tisserant, B., V. Gianinazzi-Pearson, S. Gianinazzi, and A. Gollotte. 1993. In planta histochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular mycorrhizal infections. *Mycol. Res.* 97: 245-250.