Capacidad de recolonización de hongos endófitos en plantas micropropagadas de mortiño (*Vaccinium meridionale* Sw.)

Ana María Gutiérrez Uribe, Jairo Alonso Álvarez Guzmán, Diana Maritza Tamayo Londoño y Juan Carlos Pérez Naranjo

RESUMEN

Este trabajo busca determinar el efecto de 10 hongos endófitos aislados de raíces de mortiño (*Vaccinium meridionale* Sw) e inoculados en plantas propagadas *in vitro* a partir de yemas axilares sobre la sobrevivencia y el crecimiento de ellas. Además evaluar el porcentaje de colonización de las raíces. El experimento se realizó bajo condiciones de luz fluorescente plena y luz fluorescente moderada con sarán.

Se encontraron enrollamientos típicos de hongos ericoides en todos los tratamientos; estructuras de resistencia en *Cladosporium oxysporum, C. cladosporioides* y *Paraphaeosphaeria sp* e hifas septadas oscuras en *Cladosporium sp, C. cladosporioides* y *Paraphaeosphaeria sp*. Las plantas del tratamiento control presentaron ectendomicorrizas. Los mejores resultados de colonización se encontraron en *C. oxysporum* (colonia 1 y 8) y *C. cladosporioides* (colonia 4). Las plantas del tratamiento control presentan una sobrevivencia del 100% en ambas condiciones de luz y el mejor incremento en altura bajo luz fluorescente plena.

***Palabras clave*: ectendomicorrizas, hongos septados oscuros, micorrizas ericoides, *Vaccinium meridionale*.**

I. INTRODUCCIÓN

El mortiño o agraz (*Vaccinium meridionale* Sw.) es una especie Ericaceae nativa de zonas altoandinas [1], con gran potencial económico porque Colombia tiene licencia para exportarlo hacia los Estados Unidos[1]. Esta planta tiene un impacto positivo para la salud humana, por su alto contenido de fenoles y de antocianinas con actividad antioxidante [2].

Muchas especies ericáceas han logrado adaptarse en suelos de baja fertilidad porque están asociadas a hongos formadores de micorrizas ericoides que son muy eficaces en la adquisición de nutrientes orgánicos [3-6]. La asociación ha permitido que las ericáceas sean dominantes en ecosistemas del hemisferio norte a mayor latitud o altitud como los "heathland"[2] en Europa y también en zonas altas del trópico [7].

En Colombia, Lancheros-Redondo [8] reportó por primera vez la presencia simultánea de hongos ericoides, ectendomicorrizas[3], micorrizas arbusculares y hongos septados oscuros en plantas silvestres de mortiño. Además, existen algunas investigaciones sobre el enraizamiento de estacas [9, 10], propagación por microestacas [11], micropropagación por proliferación de yemas axilares [12]. Por tanto se tienen los elementos fundamentales para evaluar qué papel cumplen estos hongos en plantas propagadas vegetativamente. Pero el primer paso es obtener una colección de estos hongos, compararlas con los hongos formadores de micorrizas ericoides reportados en el resto del mundo y evaluar si al inocularlas nuevamente favorecen la sobrevivencia y el crecimiento del mortiño en plantas con raíces libres de hongos [13].

Las preguntas son 1) ¿existen hongos formadores de micorrizas ericoides reportados en otros lugares del mundo?, 2) ¿estos hongos pueden colonizar nuevamente raíces de plantas de mortiño propagadas por yemas axilares y con raíces limpias?, 3) ¿forman estructuras típicas de hongos ericoides reportadas en otros estudios? y 4) ¿las plantas inoculadas son saludables?

Para responder estas preguntas se realizaron las siguientes actividades: 1) aislar los hongos del interior de la raíz, 2) seleccionar 10 colonias de hongos con estructuras semejantes a los hongos formadores de micorrizas ericoides 3) identificar molecularmente los 10 hongos seleccionados, 4) inocularlos en plantas de mortiño libres de hongos y 5) evaluar el porcentaje de colonización de los hongos en las raíces, el incremento en altura y la sobrevivencia de las plantas inoculadas.

La hipótesis planteada es que los hongos endófitos aislados de raíces de plantas silvestres e inoculados en plantas de mortiño propagadas *in vitro* mejoran la sobrevivencia y el crecimiento de estas últimas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Muestreo de Raíces

Se recolectaron 10 plantas de mortiño que crecían bajo la sombra de árboles de ciprés (*Cupressus lusitánica* Mill.) en la vereda Puente Peláez, municipio de El Retiro, Antioquia. Cinco plantas se usaron para aislar los Ascomycetes y las otras cinco para aislar Basidiomycetes.

1 USDA / Animal Plant Health Inspection Service. Commodity Import Report. Blueberry (fruit) from Colombia to all ports. https://epermits.aphis.usda.gov/manual/index.cfm?action=cirReportP&PERMITTED_ID=9872. Consulta junio de 2014.

2 Ecosistema arbustivo dominado por especies ericáceas como *Calluna spp*, *Erica spp*, etc. en el hemisferio norte.

3 Poseen un manto externo como las ectomicorrizas, pero penetran el interior de las células como las endomicorrizas. Las hifas intercelulares de estos hongos no forman una red de Hartig o es muy rudimentaria y las hifas intracelulares penetran las células más externas de la raíz.

B. Aislamiento, almacenamiento e incremento de los hongos

Los ensayos se hicieron en el Laboratorio de Microbiología del Suelo de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Se usaron gotas de un medio de cultivo [14] y raíces maceradas, porque ellas logran aislar más hongos de lento crecimiento que la siembra de segmentos de raíz [15]. Se utilizaron tres medios de cultivo: MMN[4] [16], agar agua [15] y extracto de malta.

Para aislar Ascomycetes se cortaron segmentos de raíces finas, se lavaron, se esterilizaron superficialmente y se maceraron con agua estéril [15]. Las gotas de macerado se secaron en horno a 35° C y se cubrieron con gotas de uno de los medios de cultivo [14], aplicando antibióticos al momento de la siembra. Para aislar Basidiomycetes se usaron los mismos procedimientos, pero esterilizando las raíces y aplicando el fungicida benomyl por el método de Vohník y otros [17]. Además se establecieron tres réplicas de los controles por cada medio de cultivo (36 gotas), sin benomyl ni antibióticos.

Los hongos crecieron en la oscuridad a 25° C. Cuando se observaban hifas provenientes del macerado, el segmento de hongo se llevó a una caja de Petri con el mismo medio de cultivo en que creció. Se montaron placas de las hifas con azul de lactofenol, se observaron en un microscopio óptico a 40X para obtener un registro fotográfico que se comparó con los hongos reportados como ericoides. Estas características son: enrollamientos de hifas al interior de las células de la epidermis, crecimiento lento, estructuras de reproducción asexual y coloración oscura, aunque otros investigadores han reportado colores blancos o gris pálido [18].

Se guardó un respaldo de las colonias en nevera a 4° C en viales marcados. Para incrementarlos se utilizó el procedimiento de Newsham [19] pero utilizando bolsas de polipropileno para el sustrato y se incubaron en la oscuridad a 25° C.

C. Identificación molecular de los hongos endófitos

La identificación de los hongos fue realizada por el Servicio de Secuenciación y Análisis Molecular del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. Se extrajo ADN de las colonias. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se hizo utilizando dos "primers"[5] de la región ITS[6]: ITS5 en sentido directo e ITS4 en sentido reverso, obteniendo dos secuencias para cada muestra. Las muestras purificadas fueron comparadas con el alineamiento de las dos secuencias y se obtuvo una secuencia consenso, para realizar el Blast[7] e identificar cada una de ellas.

4 Modified Melin-Norkrans medium

5 Cebadores

6 Internal Transcribed Spacer

7 Una herramienta de búsqueda de similaridad de secuencias moleculares usando métodos no rigurosos, como el tanteo, para ajustarse a búsquedas rápidas de alineamientos locales.

D. Capacidad de recolonización de los hongos aislados

El experimento se realizó en la Universidad Católica de Oriente, Rionegro Antioquia, con plantas propagadas *in vitro* mediante yemas axilares [12], que permanecieron cuatro meses en la etapa de enraizamiento en el vivero. Las plantas se ubicaron el laboratorio bajo condiciones semicontroladas de 12 horas luz y 12 horas oscuridad.

1. Inoculación y siembra

Se esterilizaron 11 viales con 4 mL de agua destilada cada uno. Se agregó 1 g del inóculo incrementado [19]. En una cámara de flujo laminar se prepararon grupos de 24 plantas. Empezando por el tratamiento control, el vial se agitó en un Vórtex, se sumergió en él una tira de papel de lija por planta, se rasparon las raíces superficiales y se descartó la tira. Además se aplicaron 100 µL del inóculo al sustrato de siembra. Al finalizar se rotularon los vasos, se llevaron al sitio correspondiente y se limpió la cámara de flujo laminar para continuar con el siguiente hongo.

2. Seguimiento y Cosecha de raíces

Se midió la altura inicial de los brotes de las plantas de mortiño y después a las tres y seis semanas de siembra. En la semana siete se evaluó sobrevivencia de la planta y porcentaje de colonización de los hongos. Las raíces se lavaron con agua corriente, se hizo el aclareo por el método de Dalpé y Séguin [20] y se tiñeron por el método de Vierheilig, Coughlan, Wyss y Piché [21]. El porcentaje de colonización de hongos se evaluó por el método de Giovanetti & Mosse [22] en un microscopio óptico a 40X.

E. Diseño experimental y análisis estadístico

Se empleó un diseño de bloques al azar en parcelas divididas, con dos condiciones de luz blanca fluorescente como parcela principal: luz plena y luz moderada con sarán, con cuatro parcelas cada una, para comprobar si el sombrío disminuye la colonización micorrizal [23]. Los 10 hongos más el control formaron la subparcela. Los análisis se hicieron con el programa estadístico R, versión 3.2.0.

III. Resultados y Discusión

A. Aislamiento e incremento de hongos

Tabla 1. Número de hongos aislados en raíces de mortiño (*Vaccinium meridionale)* por características de su crecimiento.

Medios de cultivo	Crecimiento lento[(a)]	Crecimiento rápido	Total
+ antibióticos (gentamicina + ampicilina) 11 semanas			
MMN	1	5	**6**
Agar Agua	0	0	**0**
Extracto de Malta	1	5	**6**
+fungicida (benomyl) 6 semanas			
MMN	2	1	**3**
Agar Agua	0	0	**0**
Extracto de Malta	0	10	**10**
sin antibióticos ni fungicida 6 semanas			
MMN	7	4	**11**
Agar Agua	1	0	**1**
Extracto de Malta	1	5	**6**
TOTAL	**13**	**30**	**43**

(a) no ocuparon toda la superficie de la caja en una semana

Se aislaron 43 hongos endófitos de las raíces de mortiño. Trece de ellos crecieron lentamente, una característica propia de los hongos formadores de micorrizas ericoides, pero sólo ocho de ellos lograron incrementarse en el sustrato arena-sorgo[19]. Además, se incrementaron 10 hongos de rápido crecimiento. Tabla 1. Dos de estos 10 hongos de rápido crecimiento fueron seleccionados para completar los 10 hongos propuestos en la metodología.

B. Identificación de los hongos endófitos

Todos los hongos identificados pertenecen a la clase Ascomycete, aún en los medios que contenían el fungicida benomyl. Probablemente la concentración de 50% del benomyl en la preparación comercial utilizada no fue suficiente para lograr el aislamiento de Basidiomycetes, como se esperaba. En cambio, en la Patagonia Argentina [27] y el neotrópico [28, 29] es muy frecuente la presencia de hongos Basidiomycetes, del orden Sebacinales, en plantas de la subfamilia de los mortiños (Vaccinioideae). En los medios de cultivo los Ascomycetes más reportados como formadores de micorrizas ericoides eliminan por competencia a los Basidiomycetes, pero en la identificación molecular siempre están presentes [16].

No se aisló ninguno de los hongos ampliamente reportados como ericoides en otros estudios [15, 24, 25], pero todos formaron los enrollamientos típicos dentro de las células de la raíz. En dos aislamientos se encontraron esclerocios propios de los hongos septados oscuros [26] como en *Paraphaeosphaeria sp* (colonia 5), y *Cladosporium sp* (colonia 2), que no es un hongo septado oscuro. Fig. 2b y Tabla 2.

Tabla 2. Identificación de los hongos seleccionados para el experimento de capacidad de recolonización en las raíces de mortiño, por métodos moleculares.

Colonia	Medio de Cultivo[(a)]	Identificación	Max Ident.	Puntaje Máx.	No. Acceso
C	Control	N.N.	--	--	--
1	E+B31	*Cladosporium oxysporum*	100%	898	KJ767517.1
2	E+B69	*Cladosporium sp.*	100%	911	KF367474.1
3	E119	*Penicillium sp1.*	100%	961	KJ567452.1
4	M+B3B	*Cladosporium cladosporioides*	100%	1068	KF881779.1
5	M+B3C	*Paraphaeosphaeria sp.*	100%	976	DQ092509.1
6	M113	*Cladosporium cladosporioides*	100%	974	KF881779.1
7	M-B2	*Penicillium sp2.*	92%	749	HQ343437.1
8	M-B4A	*Cladosporium oxysporum*	100%	920	KJ767517.1
9	M-B8A	*Cladosporium cladosporioides*	100%	918	HQ327999.1
10	M-B8B	*Cladosporium cladosporioides*	100%	922	JX981454.1

(a) E = extracto de malta + antibióticos, M = MMN + antibióticos, E+B = extracto de malta + benomyl (fungicida), M+B = MMN + benomyl (fungicida), M-B = MMN sin antibióticos ni benomyl

En la superficie de las semillas de mortiño han encontrado *Cladosporium sp* y *Penicillium sp [30]*. Pearson y Read aislaron los hongos *Cladosporium* sp y *Penicillium expansum*, pero ninguno de ellos fue reportado como hongo ericoide [15].

En este estudio se observaron vesículas semejantes a las encontradas en micorrizas arbusculares, pero no arbúsculos en una planta inoculada con el hongo *C. cladosporioides,* colonia 4, (Fig. 2c). En *Gaultheria spp* sucedió lo mismo y la explicación fue que estas vesículas fueron formadas por hifas extrarradicales provenientes de plantas hospederas de micorrizas arbusculares cercanas y no forman micorrizas funcionales [27]. En este caso, existe la duda de si estas estructuras venían dentro de los meristemos apicales utilizados para su multiplicación o si se encontraban en la arena utilizada como sustrato en la etapa de vivero.

C. Capacidad de recolonización de los hongos aislados en plantas micropropagadas

Antes de iniciar el experimento se seleccionaron al azar 10 plantas micropropagadas y se observó que ocho de ellas estaban libres de hongos (Fig. 1a) y dos presentaron esclerocios en la raíz (Fig. 1b). Por tanto, al finalizar el experimento el porcentaje de colonización se determinó comenzando con el tratamiento control, para reconocer estructuras y descartarlas en los demás tratamientos.

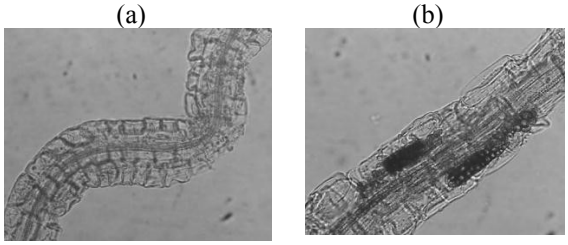

Fig. 1. Verificación del estado inicial de las raíces de plantas micropropagadas de mortiño. (a) raíces sin hongos presentadas en ocho de 10 plantas analizadas. (b) raíces con esclerocios encontrados en dos de 10 plantas analizadas.

Siete semanas después no se observaron esclerocios en los controles, sino hifas hialinas dentro y fuera de las raíces en todas sus réplicas. Fig. 2a. Esto podría asemejarse a una

ectendomicorriza [8]. Desafortunadamente los hongos no lograron ser identificados.

Las ectendomicorrizas parecen estar ampliamente distribuidas en la subfamilia Vaccinoideae de los Andes [18]. Los hongos formadores de ectendomicorrizas han sido identificados como *Sebacina spp [31]*, del orden Sebacinales. Por lo tanto, se sugiere aislar e identificar estos hongos de las raíces de las plantas micropropagadas en la Universidad Católica de Oriente, para verificar qué hongos forman estas estructuras.

La presencia de hongos endófitos ha sido reportada en plantas micropropagadas de dos especies del desierto [32]. También se registró en estacas de *Vaccinium* [33]. Por lo tanto no es extraño encontrar hongos endófitos en las plantas micropropagadas de mortiño.

El análisis de varianza para el diseño de parcelas divididas se realizó utilizando modelos mixtos, por la alta mortalidad de plantas [34]. Los hongos utilizados presentan diferencias altamente significativas en los porcentajes de colonización, pero, contrario a lo encontrado por Hofland-Zijlstra y Berendse [23], el efecto de la sombra no disminuye el porcentaje de colonización de las raíces; tampoco la interacción entre hongos inoculados y las condiciones de luz. Los mejores porcentajes se presentan en los hongos *Cladosporium oxysporum* (colonias 8 y 1) y el *C. cladosporioides* (colonia 4) sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre sí (Fig. 3).

Fig. 2. Raíces colonizadas con los diferentes hongos que presentaron las mayores sobrevivencias después de siete semanas de seguimiento. (a) tratamiento control (en ambas condiciones de luz): hongo hialino con enrollamientos internos e hifas exteriores. (b) *Cladosporium sp* (colonia 2) bajo luz fluorescente plena: formación de esclerocios y posiblemente clamidosporas. (c) *C. cladosporioides*: (colonia 4 bajo luz fluorescente plena) hifas hialinas septadas y gruesas. Presencia de Vesículas de otro hongo, semejantes a las encontradas en micorrizas arbusculares.

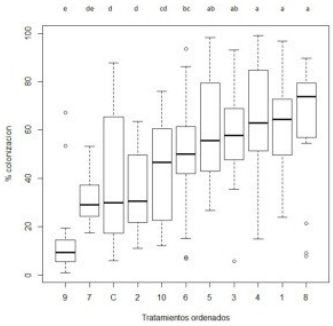

Fig. 3. Porcentaje de colonización en plantas de mortiño inoculadas con 10 hongos y un control sin inocular. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas en la respuesta. C= Control (N.N.), 1. *Cladosporium oxysporum,* 2. *Cladosporium sp.,* 3. *Penicillium sp1.,* 4. *C. cladosporioides,* 5. *Paraphaeosphaeria sp.,* 6. *C. cladosporioides,* 7. *Penicillium sp2.,* 8. *C. oxysporum,* 9. *C. cladosporioides,* 10. *C. cladosporioides*.

D. Sobrevivencia de las plantas de mortiño micropropagadas

En las plantas control se obtuvo una sobrevivencia del 100% en ambas condiciones de luz y en las plantas inoculadas con los hongos (*Cladosporium sp* (colonia 2) y *C. cladosporioides* (colonia 4), ambas bajo luz fluorescente plena.

La radiación fotosintéticamente activa en parcelas con luz fluorescente plena fue de 168.40 a 170.83 µmoles m^{-2} s^{-1} y con luz fluorescente moderada con sarán fue de 44.88 a 45.35 µmoles m^{-2} s^{-1} en promedio. La luminosidad utilizada en ensayos de germinación e inoculación de hongos en plantas ericáceas está dentro del rango de 128 a 200 µmoles m^{-2} s^{-1} [17, 35-38]. Los valores de luminosidad en las parcelas con luz fluorescente moderada con sarán son superiores al punto de compensación lumínica para *Gaultheria shallon* de 3.9 a 27.2 µmoles m^{-2} s^{-1} [39]. Por tanto, las condiciones de luz no fueron limitantes para el establecimiento de las plantas, sino el efecto del hongo inoculado.

E. Incremento en altura de las plantas de mortiño

Se hizo un análisis de varianza utilizando modelos mixtos [40] para comparar el incremento en altura a las 3 y 6 semanas. La condición de luz, los hongos inoculados y la semana de medición mostraron diferencias altamente significativas en el incremento en altura. Las plantas con mejor incremento fueron los controles (C) bajo condiciones de luz fluorescente plena y las plantas inoculadas con *Cladosporium sp* (colonia 2) bajo luz fluorescente moderada con sarán.

El incremento en altura de las plantas bajo luz fluorescente plena en la semana 6 de las plantas control y las inoculadas con el hongo *C. cladosporioides* (colonia 6) fueron superiores al resto. Fig. 4.

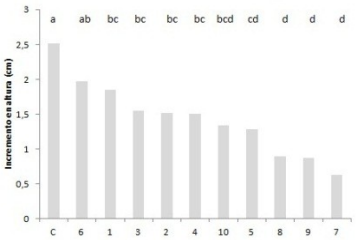

Fig. 4. Incremento en altura de las plantas de mortiño inoculadas con 10 hongos aislados y un tratamiento control (C) bajo condiciones de luz fluorescente y después de seis semanas de siembra. Tratamientos: C. NN, 1. *Cladosporium oxysporum,* 2. *Cladosporium sp.,* 3. *Penicillium sp1.,* 4. *C. cladosporioides,* 5. *Paraphaeosphaeria sp.,* 6. *C. cladosporioides,* 7. *Penicillium sp2.,* 8. *C. oxysporum,* 9. *C. cladosporioides,* 10. *C. cladosporioides*.

El hongo *Paraphaeosphaeria* no se destaca entre ninguna de las variables evaluadas. Sin embargo, varias especies de este género han sido identificadas como endófitos en *V. myrtillus,* sin mostrar síntomas de enfermedad, aunque la planta se defiende de él y activa genes que ayudan a la biosíntesis de flavonoides como mecanismo de defensa contra el hongo; también lo usa para defenderse del estrés abiótico [41]. *Paraphaeosphaeria* está reportado como endófito en el pasto del desierto *Bouteloa gracilis*. Este género de hongos ayuda a tolerar la sequía e interviene en la adquisición de nutrientes [42]. Además hay reportes que indican que el micoparásito *Coniothyrium minitans*, anamorfo del *Paraphaeosphaeria*, es un agente de control biológico, potencial biorremediador y productor de antibióticos [43].

IV. Conclusiones

Todos los hongos aislados corresponden a la clase Ascomycete, pero ninguno de ellos corresponde a especies reportadas como formadoras de micorrizas ericoides en plantas de la familia Ericaceae, a la cual pertenece el mortiño.

Aunque las plantas control presentaron bajos porcentajes de colonización de raíces, fue el tratamiento con mejor comportamiento en sobrevivencia bajo las dos condiciones de luz e incremento en altura bajo condiciones de luz fluorescente plena.

Es importante aislar los hongos que se encuentran en las plantas control, propagadas por yemas axilares en la Universidad Católica de Oriente, para observar si poseen los hongos reportados como formadores de micorrizas ericoides en otras plantas del género *Vaccinium.*

Los hongos con mejor porcentaje de colonización de raíces son *Cladosporium oxysporum* (colonias 8 y 1), y *C. cladosporioides* (colonia 4) en ambas condiciones de luz.

Agradecimientos

Al programa nacional de proyectos para el fortalecimiento de la investigación, la creación y la innovación en posgrados de la *Universidad Nacional de Colombia* 2013-2015, quien apoyó económicamente el proyecto "Nuevas simbiosis para la producción y conservación vegetal", Modalidad 2: Nuevos proyectos de investigación, creación o innovación, código 19846.

A la Universidad Católica de Oriente, por ceder gentilmente las plantas de mortiño propagadas *in vitro*, al Dr. Dagoberto Castro Restrepo – Director de Investigación por prestar sus instalaciones para establecer este ensayo.

Al Laboratorio de Microbiología del Suelo de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, especialmente al profesor Juan Carlos Pérez Naranjo, Director.

Referencias

[1] G. A. Ligarreto, M. D. P. Patiño, and S. V. Magnitskiy, "Phenotypic plasticity of *Vaccinium meridionale* (Ericaceae) in wild populations of mountain forests in Colombia.," *Revista de Biología Tropical,* vol. *59*, pp. 569-583, 2011.

[2] C. Gaviria-Montoya, J. Hernández-Arredondo, M. Lobo-Arias, C. Medina-Cano, and B. Rojano, "Cambios en la actividad antioxidante en frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale* Sw) durante su desarrollo y maduración," *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín,* vol. 65, pp. 6487-6495, 2012.

[3] D. J. Read, J. R. Leake, and J. Perez-Moreno, "Mycorrhizal fungi as drivers of ecosystem processes in heathland and boreal forest biomes.," *Canadian Journal of Botany,* vol. 82, pp. 1243-1263, 2004.

[4] D. Stribley and D. Read, "The Biology of mycorrhiza in the Ericaceae VII: The relationship between mycorrhizal infection and the capacity to utilize simple and complex organic nitrogen source," *New Phytologist,* vol. 86, pp. 365-371, 1980.

[5] D. J. Read and R. Bajwa, "Some nutritional aspects of the biology of ericaceous mycorrhizas," *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh,* vol. 85B, pp. 317-332, 1985.

[6] R. Bajwa and D. J. Read, "Utilization of mineral and amino N sources by the ericoid mycorrhizal endophyte *Hymenoscyphus ericae* and by mycorrhizal and non-mycorrhizal seedlings of *Vaccinium*," *Transactions of the British Mycological Society,* vol. 87, pp. 269-277, 1986.

[7] D. J. Read and J. Perez-Moreno, "Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems–a journey towards relevance?," *New Phytologist,* vol. 157, pp. 475-492, 2003.

[8] H. Lancheros-Redondo, "Caracterización de las micorrizas nativas en agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz) y evaluación de su efecto sobre el crecimiento plantular," M. Sc., Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2012.

[9] J. Castrillón, E. Carvajal, G. Ligarreto, and S. Magnitskiy, "El efecto de auxinas sobre el enraizamiento de las estacas de agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz) en diferentes sustratos," *Agronomía Colombiana,* vol. 26, pp. 16-22, 2008.

[10] R. Avila Díaz-Granados, O. Orozco-Silva, G. Moreno, S. Magnitskiy, and A. Rodríguez, "Influence of mycorrhizal fungi on the rooting of stem and stolon cuttings of the Colombian blueberry (*Vaccinium meridionale* Swartz)," *International Journal of Fruit Science,* vol. 9, pp. 372-384, 2011.

[11] D. Castro and J. Álvarez, "Propagación agámica del mortiño (*Vaccinium meridionale*) a partir de plantas madre libres de patógenos," Universidad Católica de Oriente, Unidad de Biotecnología Vegetal, Rionegro, Antioquia2008.

[12] D. Castro-Restrepo and J. A. Álvarez-Guzmán, "Micropropagación clonal de tres genotipos mortiño, *Vaccinium meridionale* Sw., por proliferación de yemas axilares," *Actualidades Biológicas,* vol. 35, pp. 145-160, 2013.

[13] J. R. Leake and D. J. Read, "Experiments with ericoid mycorrhiza," *Methods in microbiology,* vol. 23, pp. 435-459, 1991.

[14] V. A. Silvani, S. Fracchia, L. Fernández, M. Pérgola, and A. Godeas, "A simple method to obtain endophytic microorganisms from field-collected roots.," *Soil Biology and Biochemistry,* vol. 40, pp. 1259-1263, 2008.

[15] V. Pearson and D. Read, "The biology of mycorrhiza in the Ericaceae: I. The isolation of the endophyte and synthesis of mycorrhizas in aseptic culture," *New Phytologist,* vol. 72, pp. 371-379, 1973.

[16] T. Allen, T. Millar, S. Berch, and M. Berbee, " Culturing and direct DNA extraction find different fungi from the same ericoid mycorrhizal roots," *New Phytologist,* vol. 160, pp. 255-272, 2003.

[17] M. Vohník, J. J. Sadowsky, P. Kohout, Z. Lhotáková, R. Nestby, and M. Kolařík, "Novel Root-Fungus Symbiosis in Ericaceae:

Sheathed Ericoid Mycorrhiza Formed by a Hitherto Undescribed Basidiomycete with Affinities to Trechisporales.," *PloS one,* vol. 7, 2012.

[18] S. E. Smith and D. J. Read, *Mycorrhizal symbiosis*, 3 ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 2008.

[19] K. K. Newsham, "*Phialophora graminicola*, a dark septate fungus, is a beneficial associate of the grass *Vulpia ciliata* ssp. ambigua.," *New phytologist,* vol. 144, pp. 517-524, 1999.

[20] Y. Dalpé and S. M. Séguin, "Microwave-assisted technology for the clearing and staining of arbuscular mycorrhizal fungi in roots," *Mycorrhiza,* vol. 23, pp. 333-340, // 2013.

[21] H. Vierheilig, A. Coughlan, U. Wyss, and Y. Piché, "Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi," *Applied and environmental microbiology,* vol. 64, pp. 5004-5007, 1998.

[22] M. Giovanetti and B. Mosse, "An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots," *New phytologist,* vol. 84, pp. 489-500, 1980.

[23] J. D. Hofland-Zijlstra and F. Berendse, "The effect of nutrient supply and light intensity on tannins and mycorrhizal colonisation in Dutch heathland ecosystems," *Plant Ecology,* vol. 201, pp. 661-675, // 2009.

[24] A. V. Rice and R. S. Currah, "Oidiodendron: A survey of the named species and related anamorphs of *Myxotrichum*," *Studies in Mycology,* vol. 53, pp. 83-120, 2005.

[25] M. Couture, J. Fortin, and Y. Dalpe, "*Oidiodendron griseum* Robak: An endophyte of ericoid mycorrhiza in *Vaccinium* spp.," *New Phytologist,* vol. 95, pp. 375-380, 1983.

[26] K. K. Newsham, R. Upson, and D. J. Read, " Mycorrhizas and dark septate root endophytes in polar regions.," *Fungal Ecology,* vol. 2, pp. 10-20, 2009.

[27] M. C. Bruzone, S. B. Fontenla, and M. Vohnik, "Is the prominent ericoid mycorrhizal fungus Rhizoscyphus ericae absent in the Southern Hemisphere's Ericaceae? A case study on the diversity of root mycobionts in Gaultheria spp. from northwest Patagonia, Argentina," *Mycorrhiza,* vol. 25, pp. 25-40, Jan 2015.

[28] M. Selosse, S. Setaro, F. Glatard, F. Richard, C. Urcelay, and M. Weiß, "Sebacinales are common mycorrhizal associates of Ericaceae,". *New Phytologist,* vol. 174, pp. 864-878, 2007.

[29] S. Setaro and K. Kron, "Neotropical and North American Vaccinioideae (Ericaceae) share their mycorrhizal Sebacinales-an indication for concerted migration?," *PLoS currents,* 2011.

[30] Corantioquia, "Colecta, conservación y caracterización de diversas poblaciones de Va*ccinium meridionale (*mortiño), presentes en los bosques altoandinos de la jurisdicción de Corantioquia para promover su utilización sostenible," S. Territorial, Ed., ed. Rionegro: Corantioquia, 2004, p. 33.

[31] S. Setaro, M. Weiß, F. Oberwinkler, and I. Kottke, "Sebacinales form ectendomycorrhizas with *Cavendishia nobilis*, a member of the Andean clade of Ericaceae, in the mountain rain forest of southern Ecuador," *New Phytologist,* vol. 169, pp. 355-365, 2006.

[32] J. R. Barrow, P. Osuna-Avila, and I. Reyes-Vera, "Fungal endophytes intrinsically associated with micropropagated plants regenerated from native Bouteloua eriopoda torr. and Atriplex canescens (Pursh) Nutt," *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant,* vol. 40, pp. 608-612, // 2004.

[33] M. C. Rayner, "The biology of fungus infection in the genus *Vaccinium* " *Annals of Botany,* vol. 43, pp. 55-70, 1929.

[34] M. J. Crawley, *The R book*: John Wiley & Sons, 2007.

[35] F. Usuki and K. Narisawa, "A mutualistic symbiosis between a dark septate endophytic fungus, *Heteroconium chaetospira*, and a nonmycorrhizal plant, Chinese cabbage," *Mycologia,* vol. 99, pp. 175-184, 2007.

[36] S. J. Kerley and D. J. Read, "The biology of mycorrhiza in the Ericaceae. XX. Plant and mycorrhizal necromass as nitrogenous substrates for the ericoid mycorrhizal fungus *Hymenoscyphus ericae* and its host," *New Phytologist,* vol. 139, pp. 353-360, 1998.

[37] F. Nafar, "Studies of interactions among cultured ericoid mycorrhizal fungi of salal (*Gaultheria shallon* Pursh)," M. Sc., Department of Botany, University of British Columbia, West Point Grey, Canada, 1998.

[38] M. Monreal, S. M. Berch, and M. Berbee, "Molecular diversity of ericoid mycorrhizal fungi," *Canadian Journal of Botany,* vol. 77, pp. 1580-1594, 1999.

[39] C. Messier, T. W. Honer, and J. P. Kimmins, "Photosynthetic photon flux density, red: far-red ratio, and minimum light requirement for survival of *Gaultheria shallon* in western red cedar-western hemlock stands in coastal British Columbia," *Canadian Journal of Forest Research,* vol. 19, pp. 1470-1477, 1989.

[40] G. A. Correa-Londoño, "Análisis de medidas repetidas," ed. Medellín: Universidad Nacional de Colomiba, 2004, p. 41 p.

[41] J. J. Koskimäki, J. Hokkanen, L. Jaakola, M. Suorsa, A. Tolonen, S. Mattila*, et al.*, "Flavonoid biosynthesis and degradation play a role in early defence responses of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) against biotic stress,". *European journal of plant pathology,* vol. 125, pp. 629-640, 2009.

[42] A. Porras-Alfaro, J. Herrera, R. Sinsabaugh, K. Odenbach, T. Lowrey, and D. Natvig, "Novel root fungal consortium associated with a dominant desert grass," *Applied and Environmental Microbiology,* vol. 74, pp. 2805-2813, 2008.

[43] G. Verkley, M. da Silva, D. Wicklow, and P. Crous, "Paraconiothyrium, a new genus to accommodate the mycoparasite *Coniothyrium minitans*, anamorphs of Paraphaeosphaeria, and four new species," *Studies in Mycology,* vol. 50, pp. 323-335, 2004.