



# Comunicación corta

## LA KINETINA RIBÓSIDO COMO ESTIMULADOR DE LA GERMINACIÓN *In Vitro* DE ESPORAS DE *Glomus clarum*

### Short communication

#### The kinetin riboside as *In Vitro* stimulator of *Glomus clarum* spores germination

Kalyanne Fernández Suárez<sup>✉</sup>, Eduardo Pérez Ortega y Laura R. Medina García

**ABSTRACT.** Nowadays the *in vitro* mycorrhization of plants is a challenge in agricultural biotechnology and it depends of the germination potential of arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) propagules, specially the spores, their colonization abilities and the media and systems of culture. The aim of this work was to evaluate the effect of two concentrations (0,05 mg L<sup>-1</sup> y 0,07 mg L<sup>-1</sup>) of the auxin AIA and the cytocholin kinetin riboside on *in vitro* germination and germinative tube length of *G. clarum* spores in E medium (modified MS). E and MSR media were used as controls. All culture media had influence on both variables performance. The concentration of kinetin riboside of 0,07 mg L<sup>-1</sup> had a positive effect on germination percentage, reaching values of 100 % in that medium after 10 days of incubation. Those values were statistically similar to those founded in MSR medium. However, the highest values of germinative tube length were obtained in MSR medium and they were 45 % higher to those measured in E medium combined with kinetin riboside (0,07 mg L<sup>-1</sup>). The AIA concentrations used had an inhibitory effect on spore germination and also on the germinative tubes growth.

**RESUMEN.** La micorrización de plantas *in vitro* constituye hoy en día un reto de la biotecnología agrícola y depende en gran medida del potencial germinativo de los propágulos de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) utilizados, en especial las esporas, sus habilidades colonizativas y de los sistemas y medios de cultivo. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de dos concentraciones (0,05 mg L<sup>-1</sup> y 0,07 mg L<sup>-1</sup>) de la auxina AIA y la citoquinina kinetina ribósido en la germinación y el crecimiento del tubo germinativo *in vitro* de esporas de *G. clarum* en medio de cultivo E (MS modificado). Se utilizó además el medio E y el SRM como controles. Todos los medios de cultivo influyeron sobre el comportamiento de ambas variables. La concentración de kinetina ribósido de 0,07 mg L<sup>-1</sup> tuvo un efecto positivo sobre el porcentaje de germinación, alcanzándose valores en este medio cercanos al 100 %, transcurridos 10 días de incubación. Estos valores fueron estadísticamente similares a los encontrados en el medio SRM. Sin embargo, los mayores valores de crecimiento del tubo germinativo se obtuvieron en el medio SRM y superaron en un 45 % aproximadamente a los alcanzados en medio E combinado con la concentración de kinetina ribósido de 0,07 mg L<sup>-1</sup>. Las concentraciones de AIA utilizadas tuvieron un efecto inhibitorio sobre la germinación e igualmente sobre el crecimiento de los tubos germinativos.

**Key words:** mycorrhizae, plant growth substances, spores germination, mycelium

**Palabras clave:** mycorrhizae, sustancias de crecimiento vegetal, germinación de esporas, micelio

## INTRODUCCIÓN

La capacidad de los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) de aumentar el crecimiento y la sobrevivencia de las plantas ha despertado el interés

de los científicos en todo el mundo. En la actualidad se ha potenciado el uso de estos microorganismos como sustitutos de fertilizantes químicos y plaguicidas, en armonía con el desarrollo de prácticas de producción agrícola sostenibles (1).

La micorrización de plantas *in vitro* constituye hoy en día un reto de la biotecnología agrícola y depende en gran medida del potencial germinativo

Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), gaveta postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, CP 32 700.

✉ [kalyanne@inca.edu.cu](mailto:kalyanne@inca.edu.cu)

de los propágulos de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) utilizados, en especial las esporas, de sus habilidades colonizativas y de los sistemas y medios de cultivo. El perfeccionamiento metodológico continuo de los sistemas de cultivo (composición de los medios de cultivo y las condiciones ambientales de crecimiento) contribuirá al desarrollo de sistemas que garanticen la producción masiva de plantas micorrizadas *in vitro* (2).

El medio de cultivo E (3) fue diseñado para sustituir el medio SRM (Strullu y Romand modificado), comúnmente utilizado para el cultivo *in vitro* de los HMA, ya que este no garantiza los requerimientos nutricionales de las plantas de papa *in vitro*. Este medio se obtuvo a partir de modificaciones realizadas al medio MS (Murashige & Skoog), para garantizar la micorrización de plantas de papa (*Solanum tuberosum* L. cv. Desiré) con el HMA *G. clarum* (Nicolson & Schenck), en sistemas de cultivo parcialmente *in vitro* (3). Sin embargo, en sistemas totalmente *in vitro*, también estudiados por el mismo autor, en los que usualmente se producen las plantas en estas condiciones, no se logró la germinación de las esporas en el medio E<sup>A</sup>, o no ocurrió con la rapidez necesaria. La causa probable de la ausencia o retardo en la germinación fue la presencia de etileno en los envases (2), conocido regulador del crecimiento vegetal que puede influir negativamente en la germinación de esporas de HMA (4, 5) y es producido por las plantas de papa cuando se cultivan en envases cerrados (6).

La germinación de esporas es uno de los procesos más importantes durante el ciclo de vida de estos hongos, de la cual va a depender, en gran medida, el éxito del establecimiento de la simbiosis (7), tanto en condiciones naturales como *in vitro*. Aunque las esporas, por lo general, no necesitan de factores externos para germinar (8), este es un proceso complejo que está influido por dormancia y almacenamiento, pH, temperatura, humedad, luz, aireación (oxígeno, CO<sub>2</sub>), iones inorgánicos, microorganismos, agentes oxidantes, antibióticos y pesticidas. Otras investigaciones más recientes reconocen también a factores radicales liberados por el hospedero conocidos como proteínas, CO<sub>2</sub>, flujo de protones extracelulares y estrigolactonas (9) como estimuladores de la germinación de esporas (10) y el crecimiento y la ramificación hifal presimbóticos (11, 12).

Otros reguladores del crecimiento como auxinas o citoquininas podrían tener determinada influencia sobre la germinación de esporas de HMA, ya que se conoce que las plantas micorrizadas varían los niveles de estas hormonas en relación con las plantas no micorrizadas (13), modifican su potencial colonizativo y se discute la posibilidad de que estos hongos produzcan alguna de ellas (13).

Por todo lo expuesto anteriormente, el propósito de este trabajo fue evaluar el efecto de la auxina AIA y la citoquinina kinetina ribósido en la germinación y el crecimiento del tubo germinativo de esporas de *G. clarum* en medio de cultivo E.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para dar cumplimiento al objetivo propuesto se realizó un experimento con dos repeticiones en el tiempo, en condiciones controladas de laboratorio, en el cual se evaluó el efecto de dos reguladores del crecimiento sobre la germinación y el largo del tubo germinativo *in vitro* de esporas del HMA *G. clarum* - MUCL 46238, aislado de un ecosistema cubano.

Las esporas de *G. clarum* utilizadas, de cuatro meses de cultivo, se adquirieron en GINCO (Colección *in vitro* de Glomeromycota, BCCM/MUCL, Unidad de Microbiología, Universidad católica de Lovaina, Lovaina la Nueva, Bélgica, <http://www.mbla.ucl.ac.be/ginco-bel>) y fueron suministradas en placas Petri de 90 mm de diámetro, en asociación con raíces transformadas (Ri T-DNA) de zanahoria (*Daucus carota* L.) en medio SRM (Strullu y Romand modificado) (14), solidificado con 3 g L<sup>-1</sup> de Gel Gro<sup>®</sup>.

Las esporas se extrajeron del cultivo después de solubilizar el medio SRM con una solución de ácido cítrico (1,92 g 100 mL<sup>-1</sup>) y citrato de sodio (2,94 g 100 mL<sup>-1</sup>) (15) y mantenidas en agua desionizada estéril hasta su utilización. Posteriormente, se inocularon en medio E (MS modificado) (3) sin azúcar y sin vitaminas combinado con dos concentraciones (0,05 mg L<sup>-1</sup> y 0,07 mg L<sup>-1</sup>) de kinetina ribósido (Duchefa Biochemie) y ácido indol acético (AIA - Sigma) y se utilizaron los medios E y SRM como controles.

Se inocularon cinco esporas por placa Petri de 90 mm de diámetro con ayuda de una micropipeta Eppendorf (20 µL) y se utilizaron 10 placas para cada medio de cultivo. Posteriormente, se sellaron las placas con Parafilm (Pechiney, PlasticPackaging, Chicago, IL 60631) y se incubaron a 27 °C hasta finalizar los estudios.

## EVALUACIONES

Se determinó el porcentaje de germinación (%) y la longitud del tubo germinativo (mm) de las esporas. La germinación se monitoreó cada dos días después de la incubación y hasta los 16 días. Se consideró una espora germinada cuando se apreció crecimiento del tubo germinativo a partir del esporóforo o del extremo de la hifa de sostenimiento, en el caso de que la espora tuviese. La longitud del tubo germinativo se evaluó al finalizar el experimento (16 días) empleando un micrómetro. Las evaluaciones se realizaron utilizando un microscopio de disección (10-40X, Olympus SZ40, Olympus Optical GmbH, Alemania).

<sup>A</sup> Fernández, K. Establecimiento de un sistema eficiente de micorrización *in vitro* de plántulas de *Solanum tuberosum* L. y *Medicago truncatula* Gaertn [Tesis de Doctorado], Universidad de La Habana, La Habana, Cuba, 2013, p. 100.

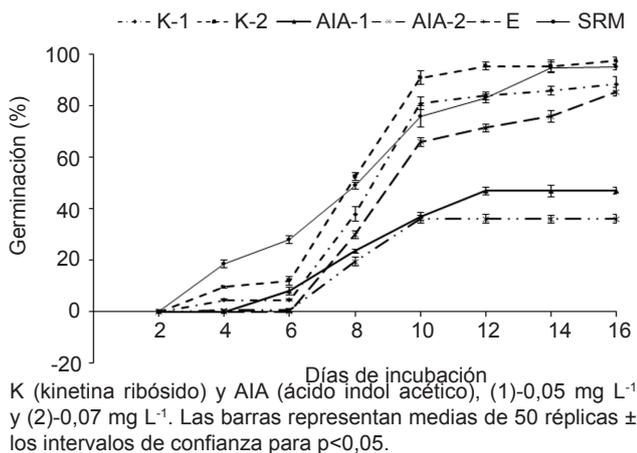
## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Después de comprobada la normalidad y la homogeneidad de varianza (Test de Brown-Forsythe), utilizando el paquete estadístico Statistica, los datos fueron sometidos a Análisis de Varianza de clasificación simple y posterior Test de Tuckey, con el fin de identificar las diferencias significativas entre los tratamientos a  $p < 0,05$ . Los valores de porcentaje de germinación fueron transformados, según la expresión  $\arcsen\sqrt{100}$  y comprobada su distribución normal. Con los valores de ambas variables se calcularon los intervalos de confianza de la media al 95 % de probabilidad, atendiendo al número de repeticiones y la reproducibilidad de los datos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al evaluar el efecto de las dos concentraciones de kinetina ribósido y AIA en medio E sobre el porcentaje de germinación de esporas de *G. clarum* (Figura 1), se obtuvo un efecto diferenciado de los medios de cultivo sobre la variable, apreciable desde los primeros cuatro días de incubación.

Los porcentajes de germinación de las esporas comenzaron a aumentar gradualmente a medida que transcurrieron los días, alcanzando un valor máximo para cada medio de cultivo en el día 10. A partir de este momento los valores de la variable se mantuvieron constantes hasta el día 16 en que finalizó el experimento, siendo mayores en las esporas que se encontraban en los medios E-kinetina 2 ( $0,07 \text{ mg L}^{-1}$ ) y el medio SRM, sin diferencias significativas entre ellos. A los 16 días, prácticamente el 100 % de las esporas se encontraban germinadas en estos dos medios.



**Figura 1.** Porcentaje de germinación de esporas de *G. clarum* después de 16 días en incubación en medio de cultivo E combinado con dos concentraciones de AIA y kinetina ribósido y los medios E y SRM como controles.

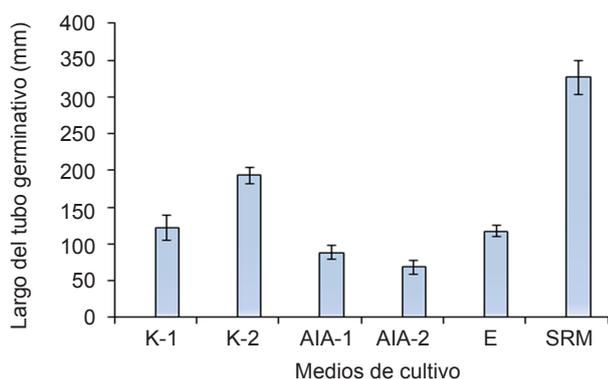
Los tubos germinativos observados mostraban un crecimiento típico de *G. clarum* con gran cantidad de contenido citoplasmático (Figura 2) y se extendían rectos dentro de los medios de cultivo, sin apreciarse efecto de la composición de los medios sobre su comportamiento, aunque sí sobre la longitud de los mismos.

En la Figura 3 puede observarse el efecto de la composición de los medios sobre el crecimiento de los tubos germinativos de esporas de *G. clarum*. A diferencia del porcentaje de germinación, los mayores valores de esta variable se obtuvieron en el medio SRM, utilizado comúnmente para el cultivo *in vitro* de HMA en raíces transformadas, seguido por el medio E combinado con  $0,07 \text{ mg L}^{-1}$  de kinetina ribósido, que en este caso mostró valores 45 % menores que los encontrados en medio SRM.



Fotos tomadas al Microscopio compuesto de campo brillante (250-500X, Olympus BH-2, Olympus Optical GmbH, Alemania).

**Figura 2A y B.** Esporas de *G. clarum* MUCL 46238. **B:** Hifa germinativa de *G. clarum* mostrando el contenido citoplasmático (CC).



K (kinetina ribósido) y AIA (ácido indol acético), (1)-0,05 mg L<sup>-1</sup> y (2)-0,07 mg L<sup>-1</sup>.

Las barras representan medias de 50 réplicas ± los intervalos de confianza para p<0,05.

**Figura 3. Influencia de dos concentraciones de AIA y Kinetina ribósido en el largo del tubo germinativo (mm) de esporas germinadas de *G. clarum* después de 16 días de incubación en medio E y SRM como controles.**

En ambos medios los valores de crecimiento de los tubos germinativos superaron estadísticamente a los observados en el resto de los medios de cultivo. Los menores valores de esta variable se obtuvieron en los medios que contenían AIA.

Las plantas micorrizadas incrementan la acumulación de citoquininas tanto en raíces como en tallos, por lo que es obvio que existe una estrecha relación entre el establecimiento micorrízico y la evolución de esta fitohormona en las diferentes partes del vegetal (12).

Si bien no existen informes en la literatura consultada que destaquen un efecto directo de las citoquininas sobre los eventos previos al proceso colonizativo de los hongos micorrízicos, no caben dudas que en el caso de este experimento existe evidencia directa de que la kinetina ribósido, a la concentración de 0,07 mg L<sup>-1</sup> en el medio E, estimula significativamente la germinación de esporas de *G. clarum* y el crecimiento de los tubos germinativos.

No obstante, en el caso de los hongos ectomicorrízicos, sí existen evidencias de que las citoquininas producidas por las plantas estimulan las ramificaciones del micelio (13). Si esto se confirmara, sería evidente que las hifas de los hongos micorrízicos tienen receptores, al menos, para algunas fitohormonas y estas podrían jugar un rol en la fase asimbiótica de su ciclo de vida.

Determinados metabolitos secundarios radicales como los flavonoides o terpenoides, dependiendo de la especie de planta, aunque no son esenciales en la simbiosis micorrízica arbuscular, pueden afectar la germinación de las esporas, la producción de

ramificaciones hifales y la colonización radical (10, 11, 12). Los isoflavonoides tienen estructuras similares a estrógenos y en *R. intraradices* se ha demostrado que existen sitios de unión similares a los que utilizan los estrógenos, que al parecer juegan un papel en la regulación del crecimiento de la hifa (16).

Por otra parte, ha sido clonado un cDNA de *R. intraradices* (Ginmyc1) con una secuencia similar a una proteína receptora de hormona esteroide y los productos del gen han sido detectados solo en las hifas externas, lo cual sugiere que puedan jugar un papel en el estado de precolonización (17).

En el medio E combinado con cualquiera de las dos concentraciones de AIA se obtuvieron valores de germinación menores significativamente que en las esporas incubadas en los otros medios de cultivo. Estos valores no superaron el 50 % de germinación, manifestando un efecto inhibitorio de esta hormona, a la concentración utilizada, sobre el comportamiento de la variable.

Es probable que las concentraciones de AIA empleadas hayan tenido un efecto negativo sobre la germinación y el crecimiento de los tubos germinativos, teniendo en cuenta los estudios realizados por Cecep *et al.* (7), al inocular, conjuntamente con las esporas, bacterias aisladas del exterior de esporas de *G. sp.*, en condiciones *in vitro*. Según estos autores los efectos encontrados en el comportamiento de ambas variables estuvieron relacionados con la producción de AIA por parte de las cepas bacterianas empleadas. Si la concentración de AIA se encontraba en valores nanomolares pues se estimulaba la germinación de las esporas y por el contrario, si los valores de AIA producidos eran del orden de los micromolares, como los empleados en este experimento, pues se inhibía la germinación.

En un estudio similar, se refirió que las fitohormonas como el AIA pueden estimular la germinación de esporas y el crecimiento hifal de *Gigaspora margarita* y *G. fistulosum* a concentraciones nanomolares e inhibirlos a altas (micromolares) (17).

## CONCLUSIONES

- ♦ La aplicación de kinetina ribósido de 0,07 mg L<sup>-1</sup> al medio E estimula la germinación de esporas de *G. clarum*, alcanzándose valores de germinación del 100 %, similares a los obtenidos en medio SRM. Sin embargo, las concentraciones de AIA utilizadas (0,05 mg L<sup>-1</sup> y 0,07 mg L<sup>-1</sup>) en el mismo medio (E), tuvieron un efecto inhibitorio, tanto sobre la germinación como sobre el crecimiento de los tubos germinativos de las esporas. Los mayores valores de longitud de los tubos germinativos se obtuvieron en el medio SRM, comúnmente utilizado para el cultivo *in vitro* de los HMA.

- ◆ Aunque en la literatura no abundan trabajos relacionados con el efecto de las citoquininas sobre la germinación de esporas, es preciso tener en cuenta los resultados de este estudio, no solo para complementar los avances alcanzados en la temática de micorrización de plantas *in vitro* en nuestro país, sino también porque constituyen resultados valiosos a considerar en los intentos por cultivar *in vitro* especies de HMA consideradas “recalcitrantes” que se resisten al cultivo en estas condiciones.
- ◆ La ausencia de descripciones sobre el papel de las fitohormonas en la biología de los hongos en general, podría simplemente ser el reflejo de que *in vivo* la acción de las hormonas está regulada por gradientes de concentración que son difíciles de reproducir experimentalmente.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Fernández, F.; Dell'Amico, J.M.; Anjoa, M.V. y la Providencia, I.E. de. “Use of a liquid inoculum of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus hoi* in rice plants cultivated in a saline Gleysol: A new alternative to inoculate”, *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, vol. 3, no. 2, 2011, pp. 24–33, ISSN 2006-9758.
2. Fernández Suárez, K. “Los sistemas de cultivo *in vitro* aplicados al estudio de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA)”, *Cultivos Tropicales*, vol. 33, no. 2, junio de 2012, pp. 33-43, ISSN 0258-5936.
3. Fernández Suárez, K.; Fernández Martín, F. y Declerck, S. “Búsqueda de un medio de cultivo para la micorrización *In Vitro* de plántulas de papa (*Solanum tuberosum* L.)”, *Cultivos Tropicales*, vol. 34, no. 4, diciembre de 2013, pp. 9-19, ISSN 0258-5936.
4. Mukherjee, A. y Ané, J.-M. “Germinating Spore Exudates from Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Molecular and Developmental Responses in Plants and Their Regulation by Ethylene”, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 24, no. 2, 2 de noviembre de 2010, pp. 260-270, ISSN 0894-0282, DOI 10.1094/MPMI-06-10-0146.
5. Fracetto, G.G.M.; Peres, L.E.P.; Mehdy, M.C. y Lambais, M.R. “Tomato ethylene mutants exhibit differences in arbuscular mycorrhiza development and levels of plant defense-related transcripts”, *Symbiosis*, vol. 60, no. 3, 14 de julio de 2013, pp. 155-167, ISSN 0334-5114, 1878-7665, DOI 10.1007/s13199-013-0251-1.
6. Taghizadeh, M. y Ehsanpour, A. “The *in vitro* effects of CoCl<sub>2</sub> as ethylene synthesis inhibitor on PI based protein pattern of potato plant (*Solanum tuberosum* L.)”, *Journal of Cell and Molecular Research*, vol. 5, no. 1, 20 de noviembre de 2013, pp. 42-46, ISSN 2008-2762, DOI 10.14677/jcmr.v5i1.28410.
7. Cecep, H.; Dedeh, H.A.; Nurbaity, A. y Sauman, J. “Rhizobacteria Selection to Enhance Spore Germination and Hyphal Length of Arbuscular Mycorrhizal Fungi *In Vitro*”, *Asian Journal of Agriculture and Rural Development*, vol. 3, no. 4, 2013, pp. 199 - 204, ISSN 2224-4433.
8. Twanabasu, B.R.; Stevens, K.J. y Venables, B.J. “The effects of triclosan on spore germination and hyphal growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*”, *Science of The Total Environment*, vol. 454-455, 1 de junio de 2013, pp. 51-60, ISSN 0048-9697, DOI 10.1016/j.scitotenv.2013.02.036.
9. Kohlen, W.; Charnikhova, T.; Liu, Q.; Bours, R.; Domagalska, M.A.; Beguerie, S.; Verstappen, F.; Leyser, O.; Bouwmeester, H. y Ruyter-Spira, C. “Strigolactones are transported through the xylem and play a key role in shoot architectural response to phosphate deficiency in nonarbuscular mycorrhizal host *Arabidopsis*”, *Plant Physiology*, vol. 155, no. 2, 2011, pp. 974–987, ISSN 1532-2548.
10. Cohen, M.; Prandi, C.; Occhiato, E.G.; Tabasso, S.; Wininger, S.; Resnick, N.; Steinberger, Y.; Koltai, H. y Kapulnik, Y. “Structure–function relations of strigolactone analogs: activity as plant hormones and plant interactions”, *Molecular plant*, vol. 6, no. 1, 2013, pp. 141–152, ISSN 1752-9867.
11. Gough, C. y Cullimore, J. “Lipo-chitooligosaccharide Signaling in Endosymbiotic Plant-Microbe Interactions”, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 24, no. 8, 6 de abril de 2011, pp. 867-878, ISSN 0894-0282, DOI 10.1094/MPMI-01-11-0019.
12. Bonfante, P. y Genre, A. “Arbuscular mycorrhizal dialogues: do you speak ‘plantish’ or ‘fungish’?”, *Trends in Plant Science*, vol. 20, no. 3, marzo de 2015, pp. 150-154, ISSN 1360-1385, DOI 10.1016/j.tplants.2014.12.002.
13. Barker, S.J. y Tagu, D. “The Roles of Auxins and Cytokinins in Mycorrhizal Symbioses”, *Journal of Plant Growth Regulation*, vol. 19, no. 2, 1 de junio de 2000, pp. 144-154, ISSN 0721-7595, 1435-8107, DOI 10.1007/s003440000021.
14. Declerck, S.; Strullu, D.G. y Plenchette, C. “Monoxenic culture of the intraradical forms of *Glomus* sp. isolated from a tropical ecosystem: a proposed methodology for germplasm collection”, *Mycologia*, 1998, pp. 579–585, ISSN 1557-2536.
15. Doner, L.W.; B&#x00E9; G. y card. “Solubilization of gellan gels by chelation of cations”, *Biotechnology Techniques*, vol. 5, no. 1, 1 de enero de 1991, pp. 25-28, ISSN 0951-208X, 1573-6784, DOI 10.1007/BF00152749.
16. Poulin, M.-J.; Simard, J.; Calford, J.-G.; Librie, F. y Piché, Y. “Response of Symbiotic Endomycorrhizal Fungi to Estrogens and Antiestrogens”, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 10, no. 4, 1 de mayo de 1997, pp. 481-487, ISSN 0894-0282, DOI 10.1094/MPMI.1997.10.4.481.
17. Delp, G.; Smith, S.E. y Barker, S.J. “Isolation by differential display of three partial cDNAs potentially coding for proteins from the VA mycorrhizal *Glomus intraradices*”, *Mycological Research*, vol. 104, no. 03, marzo de 2000, pp. 293–300, ISSN 1469-8102, DOI null.
18. Kaneko, M. y Tanimoto, E. “Auxin-regulation of hyphal elongation and spore germination in arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*” [en línea], En: *International Symposium «Root Research and Applications» RootRAP, Boku–Vienna, Austria, 2009*, pp. 2–4, [Consultado: 14 de marzo de 2015], Disponible en: <<http://asrr.boku.ac.at/fileadmin/files/RRcd/session03/poster/146.pdf>>.

Recibido: 12 de septiembre de 2014

Aceptado: 5 de febrero de 2015