

Comunicación corta

EVALUACIÓN DE LA INFECTIVIDAD DE *Glomus cubense* EN FORMULACIÓN LÍQUIDA SOMETIDA A DIFERENTES PRESIONES HIDROSTÁTICAS

Short communication

Evaluation of *Glomus cubense* infectivity in liquid formulation subjected to different hydrostatic pressures

Yonaisy Mujica Pérez✉, José M. Dell'Amico Rodríguez y Kalyanne Fernández Suárez

ABSTRACT. In order to confirm *Glomus cubense* infectivity in liquid formulation exposed to different hydrostatic pressures, an experiment under controlled conditions was conducted. AMF spores were exposed to different pressures (Pressure I: 0,15, Pressure II: 0,3 and Pressure III: 0,5 MPa, respectively) for one minute before applying the inoculant into seeds of sorghum and corn. Plants grew for 30 days and fungal indicators and variables related to their growth were evaluated. The effect of different pressures didn't affect the fungal structures morphologically. A positive response to fungal inoculation was found in sorghum and corn plants, as there were significant differences in relation to control plant. These results show that it is possible to include the liquid inoculant through fertigation systems.

RESUMEN. Con el objetivo de comprobar la infectividad de *Glomus cubense* en formulación líquida expuesta a diferentes presiones hidrostáticas, se condujo un experimento en condiciones controladas. Las esporas de HMA se expusieron a diferentes presiones (Presión I: 0,15; Presión II: 0,3 y Presión III: 0,5 MPa, respectivamente), durante un minuto antes de aplicar el inoculante en semillas de sorgo y maíz. Las plantas crecieron durante 30 días y se evaluaron indicadores fúngicos y variables relacionadas con su crecimiento. El efecto de las diferentes presiones no afectó morfológicamente a las estructuras fúngicas. Se encontró una respuesta positiva a la inoculación fúngica en las plantas de sorgo y maíz, al existir diferencias significativas con relación a las plantas no inoculadas. Estos resultados demuestran que es posible la inclusión del inoculante líquido, mediante los sistemas de fertirriego.

Key words: micorrhiza, spores, morphology, pressure

Palabras clave: micorrizas, esporas, morfología, presión

INTRODUCCIÓN

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) representan un grupo de microorganismos edáficos que, por sus efectos directos en la nutrición mineral, especialmente fósforo y nitrógeno (1,2); la inducción de tolerancia frente a condiciones de estrés biótico (patógenos) y abiótico (sequía y salinidad) (3,4); su participación en los procesos de fitorremediación (5,6) y su contribución en la estabilidad de los agregados del suelo (7), se emplean en la producción de inoculantes.

Por condición de simbiontes obligados, los HMA requieren un hospedante para completar su ciclo de vida (8), pero este no ha sido un factor que limite su multiplicación (9) y en la actualidad se formulan como productos comerciales (sólidos, granulados y líquidos), pero las experiencias prácticas han demostrado que la aplicación de cada inoculante depende del tipo de cultivo y de las condiciones para su manejo; siendo uno de los retos inmediatos, la obtención de productos que se ajusten a cualquier sistema agrícola (10). La experiencia cubana con el manejo de la simbiosis micorrízica, utilizando portadores sólidos, ha aportado valiosos resultados durante más de 20 años de estudios sostenidos con estos simbiontes, en los cuales se ha establecido como principios: la

Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), carretera San José-Tapaste, km 3½, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. CP 32700

✉ ymujica@inca.edu.cu

inoculación de especies eficientes de HMA y el efecto del tipo de suelo en la selección de dichas cepas, en correspondencia con el balance de nutrientes (11).

Por otra parte, el sistema agrícola en Cuba transita por un proceso de perfeccionamiento en sus modelos de producción y, recientemente, la acción conjunta de actores decisivos, centros científicos que impulsan sus investigaciones hacia ese sector y la implementación de proyectos de colaboración, fortalecen la práctica del fertirriego, como una tecnología que garantiza el uso eficiente y racional de los recursos naturales (12). En la década de los 2000, se obtuvo un inoculante líquido a base de dichos hongos, con el propósito de garantizar su aplicación mediante el fertirriego, pero se desconoce si las estructuras fúngicas conservan su integridad una vez que son expuestas a las presiones hidrostáticas de dichos sistemas.

Por tal motivo, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la inoculación de *Glomus cubense* en formulación líquida sometida a diferentes presiones hidrostáticas en plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) y maíz (*Zea mays* L.).

MATERIALES Y MÉTODOS

CONDICIONES EXPERIMENTALES GENERALES

El experimento se realizó en condiciones controladas en el laboratorio de Fisiología y Bioquímica Vegetal del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), San José de la Lajas, provincia Mayabeque, con una temperatura promedio que osciló entre los $\pm 18-25$ °C, humedad relativa del 75 % y el fotoperiodo se ajustó a 16 horas luz/8 horas oscuridad durante 30 días (julio y agosto) del 2016.

La arcilla se esterilizó en autoclave a 121 °C durante dos horas, en ciclos continuos de tres días y se clasificó como Gleysol Vértico húmico carbonatado (13) y algunas de sus características químicas así como el contenido de esporas de HMA residentes, se muestran en la Tabla I.

Determinaciones químicas: pH, potenciometría; materia orgánica (MO), Walkley Black (14); fósforo (P_2O_5), extracción con H_2SO_4 0,025 M y determinación por espectrómetro; cationes intercambiables, Ca^{2+} y Mg^{2+} (extracción con NH_4Ac 1 mol L^{-1} a pH 7 y determinación por complejometría), Na^+ y K^+

(extracción con HNO_3 hirviendo y determinación por fotometría de llama); esporas de HMA, Gerdemann y Nicholson (15).

OBTENCIÓN DEL MATERIAL FÚNGICO

PARA EL INOCULANTE LÍQUIDO

La cepa INCAM-4 de *Glomus cubense* (Y. Rodr. & Dalpé) (16), procedente de la colección de cepas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) de Cuba, se reprodujo en una arcilla estéril con plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench cv. 'CIAP 1322') y 90 días posterior a la siembra, se eliminó la parte aérea y el sustrato con las raíces micorrizadas se utilizó como fuente de inoculante. El material se homogenizó manualmente, se secó a temperatura ambiente y se almacenó durante 15 semanas a 4 °C.

Para el aislamiento de las esporas se tomaron 50 g del material homogenizado y se realizó un tamizado húmedo (15), de la pasta obtenida por mezcla del sólido con agua, entre dos tamices (40 y 400 μm de luz) con la adición de agua para facilitar el proceso. El residuo remanente se recogió en el tamiz de 40 μm , con una espátula se pasó a un tubo de centrífuga en el cual se mezcló con solución de sacarosa (720 g de sacarosa y 20 g de Tween 80 L^{-1}) y se centrifugó a 2000 rpm durante cinco minutos. Posteriormente se decantó la fracción líquida con los propágulos fúngicos que se depositaron en tubos Eppendorf de 1,5 mL, con 300 μL de solución Ringer para conservarlos hasta el momento de la desinfección. Un litro de la solución Ringer contenía NaCl 7,5 g, KCl 0,75 g, $CaCl_2$ 0,1 g y $NaHCO_3$ 0,1 g.

Los propágulos fúngicos se pusieron en contacto con una solución de Cloramina T al 2 % y dos gotas de Tween 20 durante 10 minutos. Posteriormente se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se colocaron en una solución de antibióticos que contenía sulfato de estreptomina (0,02 %) y sulfato de gentamicina (0,01 %) por igual tiempo (17). Finalmente, se lavaron con agua destilada estéril y se conservaron en una solución osmoprotectora.

Las esporas contenidas en dicha solución osmoprotectora se expusieron durante un minuto a tres presiones diferentes (0,15; 0,3 y 0,5 MPa, respectivamente) en una cámara de presión tipo Scholander, Soil Moisture, Modelo P80 L08.

Tabla I. Características químicas y contenido de esporas de HMA residentes de la arcilla empleada en el experimento

pH	MO (g kg^{-1})	P_2O_5 (mg 100 g^{-1})	Ca^{2+}	Mg^{2+} (cmolc kg^{-1})	K^+	Na^+	CIB	Esp. HMA (g suelo $^{-1}$)
7,1	26,4	14,8	12,5	3,7	0,48	0,10	16,78	2

MO: Materia orgánica; CIB: Capacidad de intercambio de bases, Esp. HMA: número de esporas de HMA por gramo de suelo seco

Posteriormente se observaron en el microscopio de disección (Carl Zeiss, Stemi 2000-C/50x) para evaluar si se produjo alguna modificación en su estructura (ruptura) y finalmente se pipeteó 1 mL del inoculante con una concentración de 20 esporas por mL. La aplicación de la formulación líquida se realizó en el momento de la siembra.

MATERIAL VEGETAL

Se emplearon semillas de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench 'CIAP 1322') y maíz (*Zea mays* L 'VSF-6'), con un 96 y 94 % de germinación respectivamente, se desinfectaron con una solución comercial de hipoclorito de sodio (10 %) durante diez minutos y se sembraron en macetas de 250 cm³ de capacidad que contenían arcilla estéril, a razón de tres semillas. A los siete días posterior a la emergencia de las plantas se realizó un raleo dejando una planta por maceta. El riego se aplicó manualmente, en correspondencia con las necesidades hídricas de las plantas y a los diez días posterior a la siembra se aplicaron 20 mL de solución nutritiva Long Ashton por maceta (modificada con 22 µg mL⁻¹ de fósforo en los tratamientos inoculados) (18).

DISEÑO EXPERIMENTAL, EVALUACIONES Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los tratamientos en estudio consistieron en las tres presiones evaluadas (Presión I: 0,15; Presión II: 0,3 y Presión III: 0,5 MPa, respectivamente), además de un control sin inocular y se dispusieron en un diseño completamente aleatorizado con diez macetas por tratamiento (n=10).

Las determinaciones se realizaron 30 días posterior a la siembra y se evaluaron los siguientes indicadores:

Indicadores fúngicos: para la determinación de las variables relacionadas con el funcionamiento micorrízico se tomaron 250 mg de raíces secundarias, se lavaron cuidadosamente con abundante agua, se secaron en una estufa a 70 °C hasta obtener masa constante y se clarificaron y tiñeron (19). Se utilizó el método de los interceptos para la determinación de la frecuencia de colonización micorrízica y la intensidad de colonización o densidad visual (DV) (20). El número de esporas se determinó a partir de 50 g de suelo seco, de acuerdo con el método de extracción basado en el tamizado y decantado húmedo (15). Las esporas se colectaron sobre una malla de 40 µm de apertura, se separaron por centrifugación con sacarosa y Tween 80 y se cuantificaron en el microscopio de disección (Carl Zeiss, Stemi 2000-C/50x).

Indicadores de crecimiento de las plantas: las masas seca aérea y de la raíz se determinaron al secar las muestras a 70 °C en la estufa, hasta masa constante y se pesaron en balanza técnica digital (Acom JW-1, nivel de precisión 0,001). Se determinó la relación masa seca raíz/masa seca aérea a partir de la ecuación:

$$R = \text{Masa Seca Raíz} / \text{Masa Seca Aérea}$$

Los datos se procesaron estadísticamente mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) de Clasificación Simple. Se realizó la comparación de las medias, según la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$), cuando se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. Todos los análisis estadísticos se ejecutaron con el paquete estadístico IBM SPSS versión 19.0 (21).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla II se describe el efecto de la inoculación en las diferentes variables estudiadas para ambos cultivos y se pudo comprobar la existencia de diferencias significativas, con respecto a las plantas controles. Se observó que la inoculación del HMA incrementó la masa seca aérea y de la raíz, efecto que se reafirmó con la relación masa seca raíz/masa seca parte aérea.

Con respecto a los indicadores fúngicos, se encontraron diferencias significativas, en relación con las plantas no inoculadas y esta respuesta puede indicar que el tratamiento de las presiones, previo a la inoculación, no limitó la eficiencia del simbionte, pues durante observación de los propágulos fúngicos, antes y después de su exposición a dicho tratamiento, se comprobó que los mismos conservaron su estructura inicial, sin encontrarse daños visibles en sus paredes externas.

El efecto directo de los HMA en el crecimiento y el desarrollo de las plantas, ha sido uno de los aspectos más profundizados en las investigaciones realizadas con estos simbiontes y esta respuesta se debe a factores relacionados con el diámetro de las hifas de los HMA, que permiten incrementar el volumen de absorción del sistema radical y, por lo tanto, potenciar la eficiencia en la toma de agua y de nutrientes de baja movilidad (22–24).

Aunque se ha señalado que la inducción de modificaciones en las estructuras celulares por la acción de presiones hidrostáticas se encuentra relacionada a la intensidad del tratamiento de presión impuesto y su tiempo de duración (25), en los resultados de este trabajo no se puso de manifiesto tal afectación ante los niveles de presión y tiempo evaluados.

Tabla II. Comportamiento de los indicadores evaluados en plantas de sorgo y maíz

Tratamientos	Masa Seca Parte Aérea (g)	Masa Seca Raíz (g)	Relación MSRaíz/ MS Parte Aérea	Frecuencia (%)	Intensidad (%)	Esporas de HMA (g suelo ⁻¹)
Sorgo						
Control	0,12 b	0,03 b	0,24 b	7,33 b	0,07 b	0 b
Presión (I)	0,38 a	0,18 a	0,47 a	30,67 a	0,57 a	0,14 a
Presión (II)	0,38 a	0,18 a	0,47 a	27,67 a	0,52 a	0,14 a
Presión (III)	0,38 a	0,19 a	0,50 a	29,67 a	0,58 a	0,14 a
Es _x	0,01	0,01	0,02	0,01	0,03	0,01
Maíz						
Control	0,56 b	0,06 b	0,11 b	8,33 b	0,08 b	0 b
Presión (I)	1,10 a	0,22 a	0,20 a	27,67 a	0,50 a	0,14 a
Presión (II)	1,09 a	0,21 a	0,19 a	29,67 a	0,57 a	0,136 a
Presión (III)	1,08 a	0,21 a	0,19 a	28,67 a	0,51 a	0,132 a
Es _x	0,02	0,01	0,01	0,02	0,03	0,01

En la literatura no se dispone de suficientes estudios relacionados con la resistencia de los propágulos fúngicos a diferentes presiones hidrostáticas, y aunque algunas investigaciones se han referido a los rangos de susceptibilidad y resistencia de cada grupo microbiano en niveles de presiones evaluadas en algunas bacterias Gram-positivas y hongos (26), los resultados de este estudio permiten develar que el comportamiento de las esporas de *Glomus cubense* ante las presiones hidrostáticas estudiadas, indican que es posible su inclusión mediante sistemas de fertirriego con una presión de hasta 0,5 MPa, sin afectar la infectividad del hongo.

CONCLUSIÓN

Con los resultados de esta investigación se demostró que el efecto de las tres presiones hidrostáticas no afectó la infectividad del simbiote, por lo que *Glomus cubense* puede ser aplicado mediante el fertirriego.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ellerbeck M, Schüßler A, Brucker D, Dafinger C, Loos F, Brachmann A. Characterization of three ammonium transporters of the glomeromycotan fungus *Geosiphon pyriformis*. Eukaryotic Cell. 2013;12(11):1554–62. doi:10.1128/EC.00139-13
2. Zhang L, Xu M, Liu Y, Zhang F, Hodge A, Feng G. Carbon and phosphorus exchange may enable cooperation between an arbuscular mycorrhizal fungus and a phosphate-solubilizing bacterium. New Phytologist. 2016;210(3):1022–32. doi:10.1111/nph.13838
3. Augé RM, Toler HD, Saxton AM. Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis. Mycorrhiza. 2015;25(1):13–24. doi:10.1007/s00572-014-0585-4
4. Sánchez B, Calvo M, Ruiz JM, Zamarreño A, Arbona V, García JM, et al. Involvement of the def-1 mutation in the response of tomato plants to arbuscular mycorrhizal symbiosis under well-watered and drought conditions. Plant and Cell Physiology. 2018;59(2):248–61. doi:10.1093/pcp/pcx178
5. Khan A, Sharif M, Ali A, Shah SNM, Mian IA, Wahid F, et al. Potential of am fungi in phytoremediation of heavy metals and effect on yield of wheat crop. American Journal of Plant Sciences. 2014;05(11):1578–86. doi:10.4236/ajps.2014.511171
6. Sadia K, Asma B, Riffat NM. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metals and effects on growth and biochemical activities of wheat (*Triticum aestivum* L.) plants in Zn contaminated soils. African Journal of Biotechnology. 2016;15(20):872–83. doi:10.5897/AJB2016.15292
7. Wu QS, Cao MQ, Zou YN, He X hua. Direct and indirect effects of glomalin, mycorrhizal hyphae and roots on aggregate stability in rhizosphere of trifoliolate orange. Scientific Reports [Internet]. 2015 [cited 2018 Aug 30];4(1). doi:10.1038/srep05823
8. Smith S, Read D. Mycorrhizal Symbiosis [Internet]. 3rd Edition. London: Academic Press; 2008 [cited 2018 Aug 30]. 800 p. Available from: <https://www.elsevier.com/books/mycorrhizal-symbiosis/smith/978-0-12-370526-6>

9. Berruti A, Lumini E, Balestrini R, Bianciotto V. Arbuscular mycorrhizal fungi as natural biofertilizers: let's benefit from past successes. *Frontiers in Microbiology*. 2016;6(1559):1–13. doi:10.3389/fmicb.2015.01559
10. Herrmann L, Lesueur D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013;97(20):8859–73. doi:10.1007/s00253-013-5228-8
11. Rivera R, Fernández F, Fernández K, Ruiz L, Sánchez C, Riera M. Advances in the management of effective arbuscular mycorrhizal symbiosis in tropical ecosystems. In: *Mycorrhizae in crop production*. Hamel C, Plenchette C, editors. Haworth Food & Agricultural Products Press; 2007. p. 151–196.
12. Almeida E, Camejo LE, Santiesteban CE. La fertirrigación inteligente, pilar de una agricultura sostenible. *Revista Cubana de Ciencias Informáticas*. 2017;11(3):36–49.
13. Hernández A, Pérez J, Bosch D, Castro N. Clasificación de los suelos de Cuba. Mayabeque, Cuba: Ediciones INCA; 2015. 93 p.
14. Walkley A, Black IA. An examination of the degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method: *Soil Science*. 1934;37(1):29–38. doi:10.1097/00010694-193401000-00003
15. Gerdemann JW, Nicolson TH. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*. 1963;46(2):235–44. doi:10.1016/S0007-1536(63)80079-0
16. Rodríguez Y, Dalpé Y, Séguin S, Fernández K, Fernández F, Rivera RA. *Glomus cubense* sp. nov., an arbuscular mycorrhizal fungus from Cuba. *Mycotaxon*. 2012;118(1):337–47. doi:10.5248/118.337
17. Cranenbrouck S, Voets L, Bivort C, Renard L, Strullu D-G, Declerck S. Methodologies for in vitro cultivation of arbuscular mycorrhizal fungi with root organs. In: Declerck S, Fortin JA, Strullu D-G, editors. *In vitro culture of mycorrhizas* [Internet]. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag; 2005 [cited 2018 Aug 30]. p. 341–75. doi:10.1007/3-540-27331-X_18
18. Alonso R, Aguilera LI, Rubí M, González A, Olalde V, Rivas IV. Influencia de hongos micorrícicos arbusculares en el crecimiento y desarrollo de *Capsicum annum* L. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2013;4(1):77–88.
19. Rodríguez Y, Arias L, Medina A, Mujica Y, Medina L, Fernández K, et al. Alternativa de la técnica de tinción para determinar la colonización micorrízica. *Cultivos Tropicales*. 2015;36(2):18–21.
20. Giovannetti M, Mosse B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*. 1980;84(3):489–500. doi:10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x
21. Gray C, Kinnear PR. *IBM SPSS Statistics 19 Made Simple*. Edición: 1. New York: Psychology Press; 2011. 686 p.
22. Priyadharsini P, Muthukumar T. Insight into the role of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable agriculture. In: Thangavel P, Sridevi G, editors. *Environmental Sustainability* [Internet]. New Delhi: Springer India; 2015 [cited 2018 Aug 30]. p. 3–37. doi:10.1007/978-81-322-2056-5_1
23. Pagano MC. Recent advances on mycorrhizal fungi [Internet]. 1st ed. Pagano MC, editor. Switzerland: Springer International Publishing; 2016 [cited 2018 Aug 30]. VI, 147. (Fungal Biology). doi:10.1007/978-3-319-24355-9
24. Igiehon NO, Babalola OO. Biofertilizers and sustainable agriculture: exploring arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2017;101(12):4871–81. doi:10.1007/s00253-017-8344-z
25. Domínguez LL. Presión hidrostática ultra alta, usos y perspectivas en las ciencias biológicas y de la salud. *Vertientes. Revista Especializada en Ciencias de la Salud*. 2015;16(2):55–61.
26. Rivalain N, Roquain J, Demazeau G. Development of high hydrostatic pressure in biosciences: Pressure effect on biological structures and potential applications in Biotechnologies. *Biotechnology Advances*. 2010;28(6):659–72. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.04.001

Recibido: 17 de abril de 2018

Aceptado: 24 de julio de 2018