

Artículo original

Germinación y crecimiento de propágulos de *Rhizogloium* sp. *in vitro*

Lic. Sussy Saymara Perera-García^{1*}

Dra.C. Kalyanne Fernández-Suárez¹

Dr.C. Eduardo J. Pérez-Ortega¹

¹Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), carretera San José-Tapaste, km 3½, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. CP 32 700

*Autor para correspondencia. sussy@inca.edu.cu

RESUMEN

Los estudios fisiológicos relacionados con la simbiosis micorrízica se dificultan considerablemente debido a la condición de simbiosis obligados que caracteriza a los hongos que intervienen en la asociación, lo cual, hasta el momento, hace imposible su crecimiento en condiciones axénicas. Sin embargo, el empleo del cultivo de raíces *in vitro* como un sistema simplificado para establecer la simbiosis micorrízica arbuscular, ha sido muy utilizado y particularmente útil en numerosas investigaciones. El objetivo del presente estudio fue obtener esporas desinfectadas de *Rhizogloium* sp. (INCAM-11) provenientes de suelo, que expresen altos porcentajes de germinación y bajos niveles de contaminación en condiciones *in vitro* y determinar el periodo de crecimiento de la hifa de germinación. Para ello se desinfectaron propágulos de la cepa INCAM-11 y se evaluaron sus porcentajes de germinación, contaminación y el crecimiento del tubo germinativo. Se demostró que el tiempo de permanencia de las esporas en solución antibiótica durante 24 horas, antes de su inoculación en medio de cultivo Strullu y Romand modificado (SRM), disminuye los porcentajes de contaminación y la germinación se adelanta de dos a cuatro días. Las hifas de germinación se extendieron en el medio de cultivo durante aproximadamente 30 días de forma independiente antes de detener su crecimiento, contribuyendo al posterior establecimiento de la asociación con las raíces transformadas.

Palabras clave: micorrizas arbusculares, desinfección, hifa

Recibido: 19/09/2018

Aceptado: 16/05/2019

INTRODUCCIÓN

Los estudios fisiológicos relacionados con la simbiosis micorrízica arbuscular se dificultan considerablemente debido a la condición de simbioses obligados que caracteriza a los hongos que intervienen en la asociación, lo cual, hasta el momento, hace imposible su crecimiento en condiciones axénicas ⁽¹⁾. Sin embargo, el empleo del cultivo de raíces *in vitro* como un sistema simplificado para establecer dicha simbiosis, ha sido muy utilizado y particularmente útil en numerosos estudios fisiológicos que incluyen dos aspectos fundamentales: el intercambio de señales entre los simbioses y el metabolismo fúngico ^(2,3). A pesar de que existen en la actualidad diferentes especies o cepas de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) que pueden sobrevivir en el ambiente que brinda este sistema de cultivo, reportándose en la literatura alrededor de 100 ⁽¹⁾, existen aún numerosos aislados que se resisten a colonizar las raíces transformadas e incluso, a germinar en esas condiciones. El perfeccionamiento metodológico continuo del sistema, teniendo en cuenta la composición de los medios de cultivo, las condiciones de crecimiento y los propágulos utilizados, hará que muchas de estas especies puedan ser cultivadas exitosamente en diferentes hospedantes y sistemas de cultivo ⁽⁴⁾.

En Cuba, el desarrollo de inoculantes amigables con el medio ambiente forma parte de la política del estado para lograr producciones limpias y aumentar la disponibilidad de alimentos para la población. En consecuencia, el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) lidera la producción de inoculantes a base de hongos micorrízicos arbusculares (HMA). Por esta razón, contar con un cepario certificado de especies de HMA *in vitro* es una prioridad de las investigaciones que se llevan a cabo en la institución.

Por tanto, el presente estudio se planteó los objetivos de obtener esporas desinfectadas de *Rhizoglyphus* sp. (INCAM-11) provenientes de suelo que expresen altos porcentajes de germinación y bajos niveles de contaminación, así como determinar el periodo de crecimiento de la hifa de germinación de propágulos de *Rhizoglyphus* sp. (INCAM-11) en condiciones *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizó la cepa INCAM-11 de *Rhizoglyphus* sp., procedente de la colección de HMA del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) de Cuba. Los propágulos utilizados se aislaron del inoculante a través de la técnica de Tamizado húmedo y decantado y posterior extracción por centrifugación en gradiente de sacarosa + Tween 80 a 2000 rpm durante cinco minutos ⁽⁵⁾. Una vez obtenida la interfase agua – sacarosa + Tween 80, las esporas se extrajeron empleando una jeringa de 30 mL.

Se utilizó el medio SRM el cual estaba compuesto por (g L⁻¹): Macroelementos (MgSO₄·7H₂O – 73,9; KNO₃ – 7,6; KCl – 6,5; KH₂PO₄ – 0,41; Ca(NO₃)₂·4H₂O – 35,9; NaFeEDTA – 0,16); Microelementos (MnSO₄·4H₂O – 1,225; CuSO₄·5H₂O – 1,1; ZnSO₄·7H₂O – 0,14; H₃BO₃ – 0,925; Na₂MoO₄·2H₂O – 0,12; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O – 1,7); Vitaminas (Pantotenato de calcio – 0,09; Biotina – 0,0001; Ácido nicotínico – 0,1; Piridoxina – 0,09; Tiamina – 0,1 y Cianocobalamina – 0,04); Sacarosa - 10). El pH se ajustó a 5,5 antes de adicionar 4 g L⁻¹ de GellamGum y el medio se esterilizó a 121 °C por 15 min.

Desinfección de esporas de *Rhizoglyphus* sp. (INCAM–11)

Para desinfectar los propágulos de INCAM - 11 se utilizó la metodología propuesta por Cranenbrouck et al ⁽⁶⁾. Se emplearon 100 propágulos de la cepa, los cuales se colocaron sobre una membrana (0,44 µm de poro) y se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Posteriormente, se pusieron en contacto con una solución de Cloramina T al 2 % y dos gotas de Tween 20 durante 10 minutos. Seguidamente se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se trataron con una solución de antibióticos durante 10 minutos que contenía Sulfato de estreptomina (0,02 %) y Sulfato de gentamicina (0,01 %), la cual se esterilizó con ayuda de un filtro miliporo (tipo HA, 4,0 cm de diámetro y 0,22 µm de poro). Pasado este tiempo la membrana con los propágulos fue transferida a la solución antibiótica, previamente filtrada en placa Petri estéril (90 mm diámetro).

Para el control de contaminantes se colocaron aleatoriamente cuatro placas Petri en el gabinete de bioseguridad con medios específicos para hongos (Agar Maltosa Sabouraud) y para bacterias (Agar Nutriente).

En todos los casos se utilizó un Diseño Completamente Aleatorizado para el montaje de los ensayos.

Experimento 1. Evaluación del porcentaje de germinación y contaminación de propágulos de *Rhizoglyphus* sp. (INCAM-11) en condiciones in vitro

En este experimento se realizaron dos bioensayos con el propósito de evaluar la eficiencia de la metodología propuesta por Cranenbrouck et al ⁽⁶⁾ para garantizar la desinfección y posterior germinación de propágulos de INCAM-11. Cada uno de los bioensayos se repitió dos veces.

Bioensayo 1. En este estudio los propágulos se inocularon en medio SRM, inmediatamente después de concluido el tratamiento de desinfección ⁽⁶⁾. Se inocularon 20 placas Petri (90 mm diámetro), a razón de 5 propágulos por placa, para un total de 100 propágulos. Al finalizar el tratamiento se sellaron las placas con parafilm (Pechiney, Plastic Packaging, Chicago, IL 60631) y se incubaron (Incubadora Binder, Bélgica) en oscuridad durante 60 días a 27 °C.

Bioensayo 2. En el segundo ensayo se compararon dos tiempos de exposición a la solución antibiótica con el objetivo de disminuir la contaminación de los propágulos e incrementar los porcentajes de germinación. Se realizaron dos tratamientos, uno en el cual los propágulos se inocularon en medio SRM justo después de la desinfección (DD) y otro en el que los propágulos se mantuvieron en la solución durante 24 horas posteriormente al tratamiento de desinfección (24 DD). Se inocularon igualmente cinco propágulos por placa y se emplearon 20 placas por tratamiento. Al finalizar la inoculación las placas se sellaron con parafilm e incubaron en iguales condiciones al bioensayo anterior.

Las placas se examinaron cada cuatro días para evaluar los porcentajes de germinación y contaminación de los propágulos hasta llegar al día 60 posterior a la desinfección.

Determinaciones realizadas. Se realizaron las determinaciones correspondientes a porcentaje de germinación y contaminación. Se consideró un propágulo germinado cuando este presentaba crecimiento del tubo germinativo con un largo superior al diámetro de la espora, ya fuese a partir del esporóforo o del extremo de la hifa de sostén ⁽⁷⁾.

En el caso de la contaminación, se consideró el número de propágulos contaminados en una placa con respecto al número total de propágulos que se sembraron en cada una.

En el ensayo de comparación del tiempo de exposición a la solución antibiótica se calcularon, además, los porcentajes de incremento y decremento de la germinación y la contaminación, respectivamente.

Experimento 2. Evaluación del crecimiento del tubo germinativo

Este experimento se diseñó con el propósito de realizar una dinámica de crecimiento del tubo germinativo de propágulos de INCAM-11. La variable comenzó a evaluarse a partir del momento en que se observó crecimiento del tubo germinativo a partir del esporóforo o de la hifa de sustentación. Las mediciones se realizaron cada cuatro días con un micrómetro acoplado al microscopio de disección (Novel, Aumento 40X), partiendo del comienzo de la nueva hifa formada y hasta el ápice de la misma. Este estudio se extendió hasta tanto se observara que las hifas detuvieran su crecimiento.

En este estudio también se comparó el largo del tubo germinativo de propágulos a los que se les aplicaron ambos tratamientos de desinfección descritos en el bioensayo 2 del experimento 1.

Análisis Estadístico

Después de comprobada la normalidad y la homogeneidad de varianza (Test de Brown-Forsythe), utilizando el paquete estadístico SPSS Statistics 19 (IBM), 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 $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento 1. Evaluación del porcentaje de germinación y contaminación de propágulos de *Rhizoglosum* sp. (INCAM-11) en condiciones *in vitro*

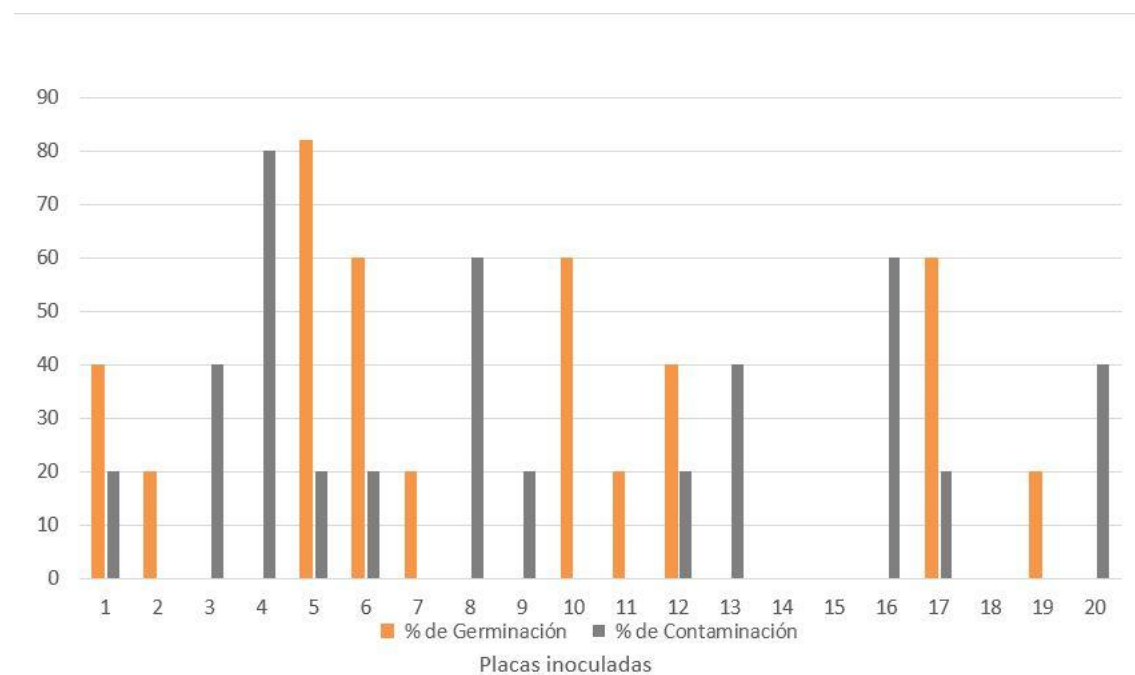
La desinfección de esporas de hongos micorrízicos empleadas como inóculo es crucial para la formación y el desarrollo exitoso de la micorrización en condiciones *in vitro*, por ser la presencia de contaminantes uno de los mayores problemas que atenta contra el estudio de estos microorganismos bajo condiciones controladas; además, las metodologías de

desinfección deben ser establecidas para cada especie de hongo en particular pues el efecto de los desinfectantes o sus combinaciones, varían en función de la especie utilizada ⁽⁸⁾.

Bioensayo 1. En este ensayo se encontró que los propágulos desinfectados de INCAM–11 comenzaron a germinar entre el sexto y octavo día posterior al tratamiento y continuaron germinando progresivamente hasta el día 28. Este comportamiento se corresponde con lo planteado por otros autores ⁽⁹⁾, quienes refirieron que los propágulos de HMA tardan en germinar de 2 a 30 días después de concluido el tratamiento de desinfección.

Los valores medios de germinación, a los 60 días, fueron inferiores a 50 %, como se puede apreciar en la Figura 1, mientras que el 60 % de las placas inoculadas mostraba algún crecimiento de contaminantes microbianos asociados a los propágulos (Figura 2).

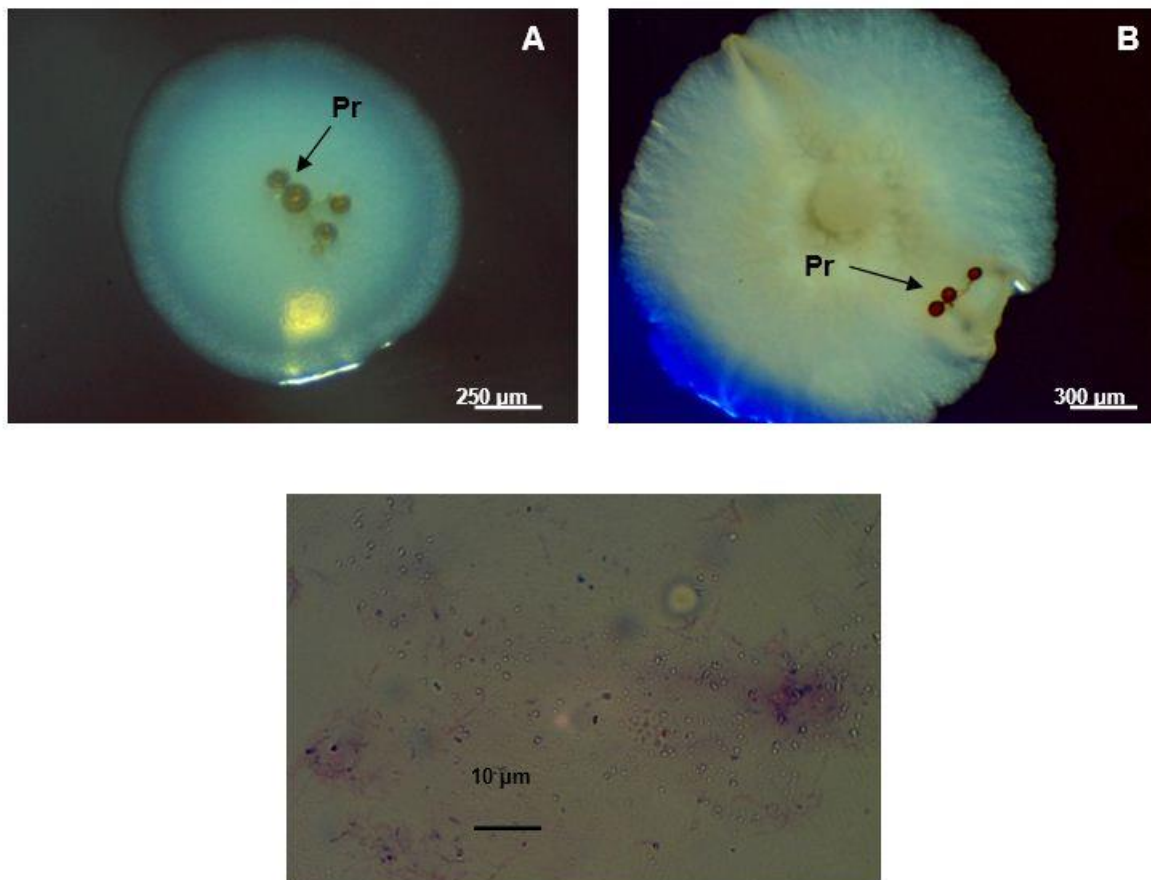
Al parecer, los contaminantes que proliferaron en las placas estaban asociados a los propágulos antes de la desinfección (Figura 2), ya que en las placas controles que contenían medios específicos para hongos (Agar Maltosa Sabouraud) y bacterias (Agar Nutriente), no se observó crecimiento microbiano, lo cual evidencia que la contaminación de los propágulos procedió de las paredes de los mismos.



Las barras representan las medias de cinco propágulos

Figura 1. Comportamiento de los porcentajes de Germinación y Contaminación estimados en cada una de las placas Petri inoculadas con propágulos de INCAM–11 en el Bioensayo 1

La eficiencia de la metodología de desinfección utilizada ha sido comprobada en numerosos estudios anteriores ^(2,8,10) y en un determinado número de cepas de HMA que hoy se encuentran formando parte de las dos colecciones de HMA *in vitro* del mundo (GINCO Bélgica y GINCO Canadá). Sin embargo, en el caso de esta cepa en particular las concentraciones de contaminantes que proliferaron después del tratamiento de desinfección son altas, con porcentajes que oscilan entre 20 y 80 en cada una de las placas (Figura 1).



Fotos tomadas al microscopio de disección (A y B) (Novel, 40X). Foto C tomada al microscopio óptico (Novel, 1000X)

Figura 2. Imágenes de contaminación bacteriana asociada a propágulos (Pr) desinfectados de INCAM – 11 (A y B). Tinción de Gram del contaminante más frecuente (C)

Los valores de germinación alcanzados son por lo general similares a los encontrados por otros autores ⁽¹¹⁾, quienes reportaron, en esporas de *Gigaspora margarita* (Becker & Hall) y *Scutellospora heterogama* (Nicolson & Gerdemann - Walker & Sander) inoculadas en medio Agar Agua, valores cercanos a 60 % en presencia de Cloramina T (2 %) y tiempos de

exposición a los desinfectantes + antibiótico entre 3 y 6 minutos. Sin embargo, Pérez et al ⁽⁸⁾, aplicando la misma metodología de desinfección que la utilizada en este estudio y utilizando igualmente el medio de cultivo SRM, informaron solo un 33 % de germinación en esporas de *Rhizogloium* sp.

La germinación de propágulos de HMA puede ocurrir en ausencia de señales derivadas del hospedante, aunque no puedan completar su ciclo de vida bajo estas condiciones. No obstante, existen algunos factores que pueden estimular la germinación e incluso inhibirla como es la composición del medio de cultivo, el pH, algunos compuestos orgánicos, la humedad y los microorganismos asociados ⁽¹²⁾.

En el caso específico de los microorganismos, existen determinados grupos microbianos que pueden, no solo estimular la germinación de los propágulos, sino también inhibirla y viven, por lo general, asociados a las esporas e hifas de los HMA, ya sea en el lumen celular, o adheridos a sus paredes. Pueden, además, tener una participación en los beneficios que estos hongos le reportan a las plantas ⁽¹³⁾.

Las investigaciones, utilizando esporas totalmente desinfectadas de *Funneliformis mosseae* permitieron aislar un gran número de microorganismos que crecían en el interior de las esporas ⁽¹⁴⁾. Estos autores lograron subcultivar 11 aislados pertenecientes a varios grupos microbianos que no solo eran capaces de estimular la germinación de las esporas y la ramificación de las hifas, sino que además solubilizaban fosfato y fijaban nitrógeno atmosférico.

Por otro lado, los estudios de desinfección en esporas de *Rhizogloium clarus* permitieron demostrar que algunos contaminantes que crecieron alrededor de las esporas obstaculizaron la emergencia y el crecimiento del tubo germinativo, por lo que la germinación de las mismas se vio limitada ⁽¹⁵⁾.

No obstante, es importante destacar que existen determinados grupos de microorganismos no considerados contaminantes que habitan las paredes de las esporas y que ejercen un papel benéfico sobre la germinación y la longitud del tubo de germinación ⁽¹²⁾, por lo que el empleo de metodologías de desinfección poco agresivas, que no eliminen totalmente los microorganismos que cohabitan con las esporas, es la clave para garantizar el éxito de la germinación ⁽¹⁴⁾.

Algunos microorganismos de los géneros *Pseudomonas* y *Corynebacterium*, pueden incrementar la germinación de esporas de *Rhizogloium versiforme* e inciden directamente en

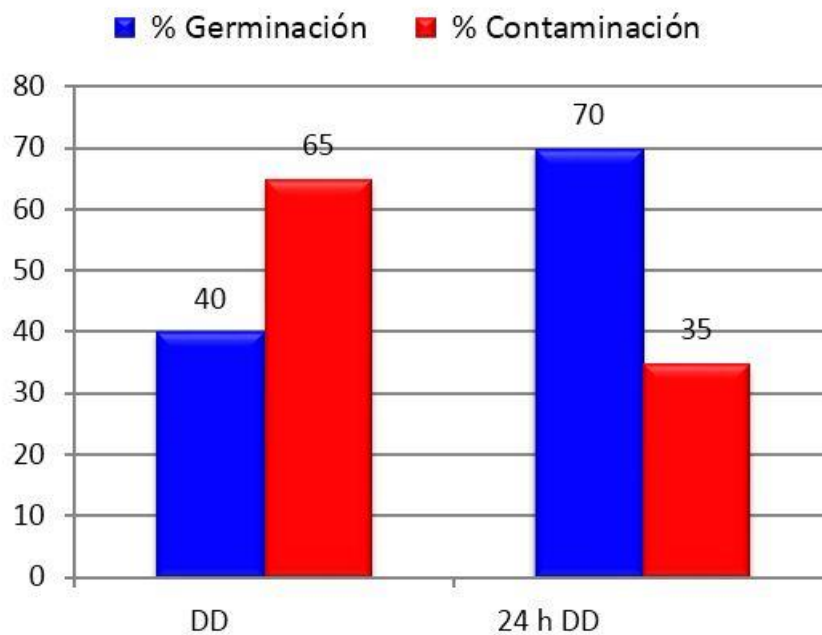
los mecanismos de destrucción de la pared externa, intercambian material molecular y combinan algunos productos finales de la síntesis de cada uno de los microorganismos involucrados ⁽¹⁵⁾.

Al respecto, en otra investigación se informó una estimulación marcada de la germinación de esporas de *Funneliformis mosseae* cuando estas se inocularon en presencia de especies microbianas previamente aisladas de su interior ⁽¹⁴⁾.

Bioensayo 2. Con el objetivo de disminuir la contaminación de los propágulos e incrementar los porcentajes de germinación se realizó este ensayo, extendiendo el tiempo de exposición a la solución de antibióticos a 24 horas, después de concluido el tratamiento de desinfección. La Figura 3 representa el efecto de esta variación sobre el comportamiento de ambas variables.

En cuanto a la germinación, se observó que los propágulos que estuvieron expuestos a la solución antibiótica durante 24 h previas a su inoculación comenzaron a germinar de dos a cuatro días antes que en el bioensayo anterior, o sea a los cuatro días, y los porcentajes de germinación aumentaron gradualmente con relación a los propágulos que no recibieron este tratamiento, alcanzando un 75 % de incremento. Así mismo, la exposición prolongada a la solución antibiótica contribuyó a reducir los niveles de contaminación en un 46 %.

Muchos estudios se han realizado con esporas de diferentes géneros de HMA bajo condiciones *in vitro* donde ha sido exitosa la implementación de agentes desinfectantes como Cloramina T, Tween 20 y soluciones de antibióticos (ej. Estreptomina, Sulfato de gentamicina, Cefalexina, etc.) a diferentes concentraciones y tiempos de exposición ^(2,5,8); sin embargo, mantener los propágulos durante 24 h expuestos a la solución antibiótica no había sido informado hasta el momento.



Barras del mismo color con letras distintas difieren entre sí. Las barras son las medias de 20 placas conteniendo cinco propágulos cada una. Diferencias significativas para $p < 0,05$ según Test de Tukey. – DD después de la desinfección; 24 h DD–24 horas después de la desinfección

Figura 3. Efecto del tiempo de permanencia en la solución antibiótica antes de la inoculación sobre los porcentajes de germinación y contaminación de propágulos de INCAM–11 en el bioensayo 2

Lo antes mencionado confirma que para obtener resultados satisfactorios en la desinfección de esporas, las concentraciones de los desinfectantes y antibióticos, así como la duración de los tratamientos deben ser adaptadas dependiendo de los niveles de contaminación y la sensibilidad de las esporas.

Aunque en este bioensayo se redujo considerablemente la contaminación con relación al bioensayo 1, los niveles que se obtuvieron son considerados altos si se comparan con los informados por Danesh et al ⁽⁵⁾, utilizando similar metodología. Estos autores obtuvieron porcentajes de contaminación menores a 5 % en esporas tratadas de *Rhizoglosum intraradices*.

Las concentraciones de microorganismos en los propágulos de HMA debe estar relacionada con la especie fúngica y el sustrato en el que se desarrollan antes de su esterilización. Durante el proceso de colonización, los HMA interactúan con numerosas bacterias y las esporas e hifas proporcionan sitios en los que ciertas poblaciones microbianas comúnmente habitan ⁽¹²⁾, por lo que ambos criterios son condicionantes para que en sus propágulos convivan con mayor o menor número de microorganismos.

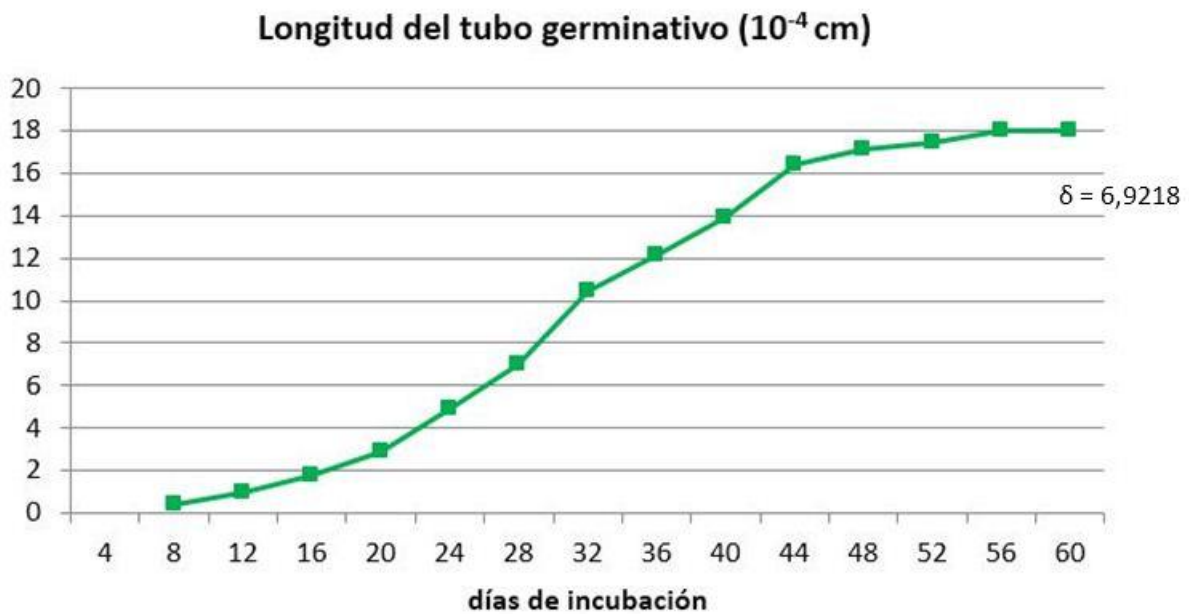
Los resultados de este primer experimento demuestran que modificando las metodologías existentes se pueden obtener los efectos esperados. De tal manera que si las esporas de INCAM-11 se mantienen en solución antibiótica durante 24 horas, utilizando la metodología de Cranenbrouck et al ⁽⁶⁾, antes de su inoculación en medio de cultivo SRM, se incrementan sus porcentajes de germinación en un 75 %, se reducen los niveles de contaminación en un 46 % y la ocurrencia del proceso germinativo se adelanta de dos a cuatro días.

El crecimiento presimbótico de los HMA es una fase decisiva para la sobrevivencia de estos hongos ya que de este depende que puedan encontrar un hospedante compatible para completar su ciclo de vida y el empleo de las técnicas de cultivo *in vitro* ha permitido estudiar cómo diferentes factores pueden, sinérgica o individualmente, afectar el crecimiento del hongo durante este temprano y sensible estadio de su desarrollo.

Experimento 2. Evaluación del crecimiento del tubo germinativo

En este experimento se realizó una evaluación de la dinámica de crecimiento de los tubos germinativos de INCAM-11, previamente desinfectados, utilizando ambos tratamientos de desinfección (Bioensayo 2) para determinar el momento en que detienen su crecimiento en condiciones axénicas.

Como puede apreciarse en las Figuras 4 y 5 los propágulos comienzan a germinar igualmente que en los ensayos anteriores, entre los días cuatro y ocho posteriores a la desinfección, dependiendo del tratamiento. A partir de este momento los tubos germinativos continúan creciendo exponencialmente hasta alcanzar valores constantes alrededor del día 56 (Figura 4).



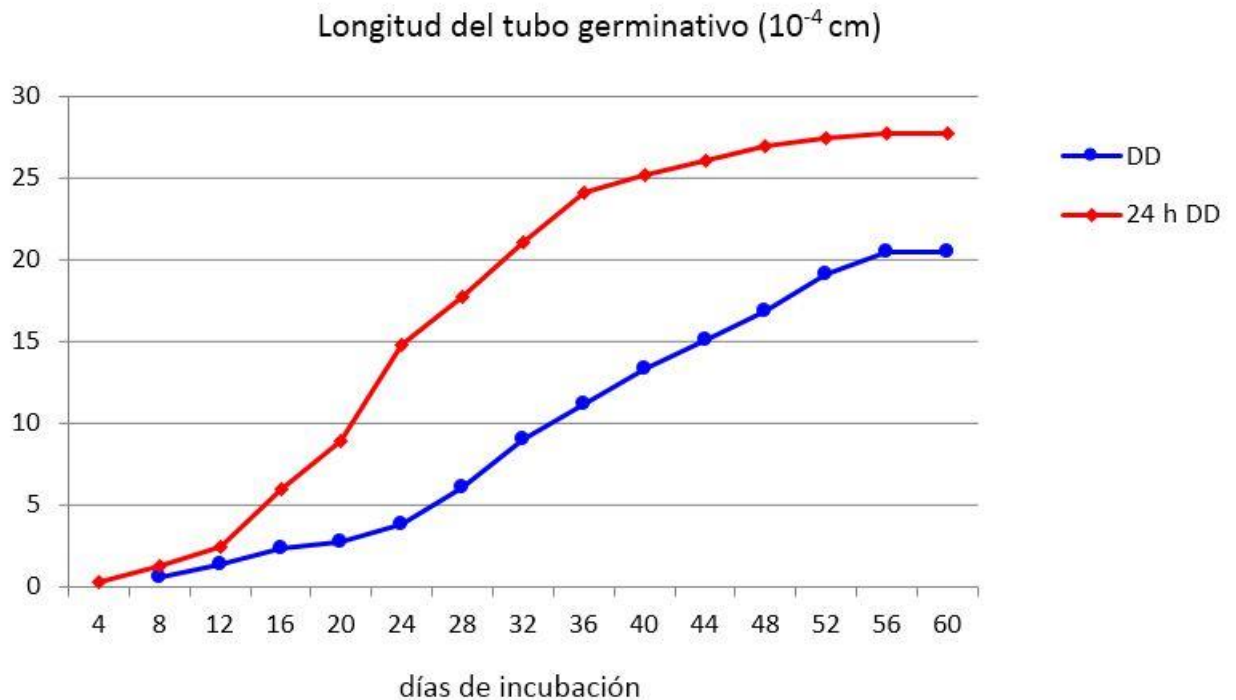
Los puntos corresponden a la media de 100 propágulos

Figura 4. Dinámica del crecimiento del tubo germinativo de propágulos de INCAM–11 inoculados para germinar en medio SRM durante 60 días

Cuando los propágulos se mantienen en la solución antibiótica durante 24 h comienzan a germinar antes y se alcanzan mayores valores de largo del tubo germinativo (LTG), mostrando, a partir del día 16, diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 5) y porcentajes de incremento de 35 % como promedio.

La germinación de los propágulos no es homogénea, sino que varía en el día de inicio, en la longitud alcanzada y en el momento que detienen su crecimiento.

En este experimento las hifas germinantes que crecieron durante más días detuvieron su crecimiento el día 56 (Figuras 4 y 5), con independencia del momento en que habían comenzado a germinar, estimándose un promedio de 30 días durante los cuales las hifas continuaron creciendo en busca de señales provenientes de un hospedante potencial antes de detener su progresión, debido probablemente al agotamiento de las reservas de los propágulos.



Los puntos corresponden a la media de 100 propágulos. Diferencias significativas para $p < 0,05$ según Test de Tukey. DD – después de la desinfección; 24 h DD – 24 horas después de la desinfección

Figura 5. Efecto del tiempo de exposición a la solución antibiótica sobre el crecimiento del tubo germinativo de propágulos de INCAM-11

Varios autores aseguran que el crecimiento del tubo germinativo es dependiente de la disponibilidad y cantidad de reservas de las esporas ⁽¹⁶⁾ y que el protoplasma contiene todos los organelos necesarios para asegurar su desarrollo posterior. Este consiste en el crecimiento recto de la hifa corredora en busca de un hospedante potencial y las sucesivas ramificaciones más finas que se producen para explorar el medio circundante. En el caso de no existir contacto con alguna raíz o que alguna señal proveniente de un hospedante no sea detectada, el tubo germinativo detiene su crecimiento, el protoplasma se retrae desde el ápice de la hifa y es secuestrado, vaciando la hifa, a través de la producción de sucesivos septos.

Otros autores han encontrado resultados similares con relación al tiempo que tardan los tubos germinativos de esporas de HMA en detener su crecimiento ⁽¹⁷⁾. Según estos autores, en un experimento de germinación de esporas de *R. intraradices* previamente desinfectadas, observaron la formación de septos en el extremo apical de la hifa, la retracción del citoplasma y el cese del crecimiento hifal, entre dos y cinco semanas después de su inoculación en medio de cultivo y en ausencia de raíces transformadas.

Al parecer no existe una alta relación entre el momento en que germinan los propágulos y el tiempo que transcurre hasta que detienen su crecimiento las hifas germinantes, lo cual pudo confirmarse con las correlaciones realizadas ($r = 0,424$ a $p \leq 0,05$).

La longitud de los tubos germinativos y la germinación de las esporas son parámetros que no están relacionados, por tanto una mayor tasa de germinación no implica que los tubos germinativos sean mayores ⁽¹⁸⁾. La longitud que puedan alcanzar estas estructuras está más relacionada con el tamaño de las esporas y las reservas que puedan almacenar ⁽¹⁸⁾ y se manifiesta tanto en esporas de géneros diferentes ⁽¹²⁾, como en individuos de la misma especie ⁽¹⁸⁾.

CONCLUSIONES

- El tiempo de permanencia de las esporas en solución antibiótica durante 24 horas antes de su inoculación en medio de cultivo SRM, incrementa los porcentajes de germinación, disminuye los porcentajes de contaminación y la germinación se adelanta de dos a cuatro días. Hasta el momento, ningún estudio anterior había tenido en cuenta esta modificación, por lo que el uso de la misma en las metodologías de desinfección favorecerá el éxito de los cultivos *in vitro*.
- Las hifas de germinación de *Rhizoglosum* sp. (INCAM-11) se extienden en el medio de cultivo durante aproximadamente 30 días de forma independiente, antes de detener su crecimiento, lo que contribuye al posterior establecimiento de la asociación con raíces transformadas.

RECOMENDACIONES

Utilizar la metodología de desinfección de esporas de Cranenbrouck et al, extendiendo el tiempo de exposición a los antibióticos a 24 horas, para incrementar los porcentajes de germinación de esporas de *Rhizoglosum* sp. (INCAM – 11) provenientes de suelo y disminuir los niveles de contaminación.

BIBLIOGRAFÍA

1. IJdo M, Cranenbrouck S, Declerck S. Methods for large-scale production of AM fungi: past, present, and future. *Mycorrhiza*. 2011;21(1):1–16. doi:10.1007/s00572-010-0337-z
2. Srinivasan M, Kumar K, Kumutha K, Marimuthu P. Establishing monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* through root organ culture. *Journal of Applied and Natural Science*. 2014;6(1):290–3. doi:10.31018/jans.v6i1.417
3. Fernández Suárez K, Declerck S, Fernández García L, Ortega Delgado E. Aplicación del sistema de Planta Donante de Micelio (PDM) en la micorrización in vitro de papa. *Cultivos Tropicales*. 2017;38(1):31–8.
4. Fernández Suárez K. Los sistemas de cultivo *in vitro* aplicados al estudio de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA). *Cultivos Tropicales*. 2012;33(2):33–43.
5. Danesh YR, Najafi S, Demir S. Using *In Vitro Culturing* Technique for Studying Life Cycle of Arbuscular Mycorrhizal Fungus (AMF) *Glomus intraradices*. *YYU JAGR SCI. J AGR SCI*. 2016;26(2):161–7.
6. 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: *In Vitro Culture of Mycorrhizas* [Internet]. Springer, Berlin, Heidelberg; 2005 [cited 2019 Oct 28]. p. 341–75. (Soil Biology). doi:10.1007/3-540-27331-X_18
7. Fernández Suárez K, Pérez Ortega E, García M, R L. La kinetina ribósido como estimulador de la germinación *In Vitro* de esporas de *Glomus clarum*. *Cultivos Tropicales*. 2015;36(3):45–9.
8. Pérez UA, Ramírez MM, Moreno LM, Franco M. Metodología para la desinfección y germinación de esporas y fragmentos de raíces micorrizadas con *Glomus sp.* (GEV02) para su uso bajo condiciones in vitro. *Revista Corpoica*. 2011;12(2):143–50.
9. Cranenbrouck S, Declerck S. Spore and root association. In: CESAMM Team, editor. 2016.
10. Fernández K, Fernández F, Rivera R, Olalde V. Metodología para la germinación de esporas de *Glomus mosseae*. *Cultivos Tropicales*. 2005;26(2):11–6.
11. Filho AC, Siqueira JO, Oliveira E de. Desinfestação superficial de esporos de fungos micorrízicos vesicular-arbusculares. I. Efeitos da concentração e tempo de exposição de

- agentes desinfectantes e antibióticos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 1994;29(7):1119–27.
12. Cruz AF, Ishii T. Arbuscular mycorrhizal fungal spores host bacteria that affect nutrient biodynamics and biocontrol of soil-borne plant pathogens. *Biology Open*. 2012;1(1):52–7. doi:10.1242/bio.2011014
 13. Jansa J, Bukovská P, Gryndler M. Mycorrhizal hyphae as ecological niche for highly specialized hypersymbionts – or just soil free-riders? *Frontiers in Plant Science*. 2013;4:1–8. doi:10.3389/fpls.2013.00134
 14. Mirabal L de los A, Ortega E. Comunidad microbiana asociada a los Hongos Micorrizógenos Arbusculares [Tesis de Doctorado]. [La Habana]: Universidad de la Habana. Facultad de Biología; 2011.
 15. Karthikeyan B, Abitha B, Henry AJ, Sa T, Melvin, M. Interaction of Rhizobacteria with Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) and Their Role in Stress Abatement in Agriculture. In: *Recent Advances on Mycorrhizal Fungi* [Internet]. Suiza: Springer International Publishing; 2016 [cited 2019 Oct 28]. p. 120–3. doi:10.1007/978-3-319-24355-9_11
 16. Bago B, Cano C. Breaking Myths on Arbuscular Mycorrhizas in Vitro Biology. In: Declerck S, Fortin JA, Strullu D-G, editors. *In Vitro Culture of Mycorrhizas* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2005 [cited 2019 Oct 28]. p. 111–38. (Soil Biology). doi:10.1007/3-540-27331-X_7
 17. Hildebrandt U, Janetta K, Bothe H. Towards Growth of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Independent of a Plant Host. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002;68(4):1919–24. doi:10.1128/AEM.68.4.1919-1924.2002
 18. Maia LC, Yano-Melo AM. Germination and germ tube growth of the arbuscular mycorrhizal fungi *Gigaspora albida* in different substrates. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2001;32(4):281–5. doi:10.1590/S1517-83822001000400005

Original Article

Germination and development of *Rhizoglomus* sp. propagules *in vitro*

Lic. Sussy Saymara Perera-García^{1*}

Dra.C. Kalyanne Fernández Suárez¹

Dr.C. Eduardo J. Pérez Ortega¹

¹Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), carretera San José-Tapaste, km 3½, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. CP 32 700

* Author for correspondence. sussy@inca.edu.cu

ABSTRACT

The physiological studies related to the mycorrhizal symbiosis have made difficult due to the condition of the symbionts that are characterized by the fungi that intervene in the association, which, up to now, can't grow in axenic conditions. However, *in vitro* root cultivation techniques, as a simplified system for the establishment of the arbuscular mycorrhizal symbiosis, have been widely used and they are very important in several investigations. The aim of this study was to obtain disinfected spores of *Rhizoglomus* sp. (INCAM-11) from soil, which express high percentages of germination and low levels of contamination on *in vitro* conditions and determine the growth period of the germination hyphae. INCAM-11 propagules were disinfected and their percentages of germination and contamination, as well as the germinative tube length were evaluated. Results show that the immersion time of spores in antibiotic solution during 24 hours, before its inoculation in the Modified Strulla and Romand (MSR) medium, can reduce the contamination percentage and the moment of germination. In the other hand, the hyphae germination spreads in the culture medium during 30 days approximately, before stopping their growth, contributing to the later establishment of the association in the transformed roots.

Key words: arbuscular mycorrhizas, disinfection, hypha

INTRODUCTION

Physiological studies related to arbuscular mycorrhizal symbiosis are considerably difficult due to the condition of obligate symbionts that characterize the fungi involved in the association, which, so far, makes it impossible to grow in axenic conditions ⁽¹⁾. However, the use of *in vitro* root culture as a simplified system to establish such symbiosis has been widely used and particularly useful in numerous physiological studies that include two fundamental aspects: the exchange of signals between symbionts and fungal metabolism ^(2,3).

Although there are currently different species or strains of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) that can survive in the environment provided by this culture system, about 100 ⁽¹⁾ are reported in the literature, there are still numerous isolates that resist to colonize the transformed roots and even to germinate in those conditions. The continuous methodological improvement of the system, taking into account the composition of the culture media, the growth conditions and the propagules used, will allow many of these species to be successfully cultivated in different hosts and culture systems ⁽⁴⁾.

In Cuba, the development of environmentally friendly inoculants is part of the state's policy to achieve clean productions and increase the availability of food for the population. Consequently, the National Institute of Agricultural Sciences (INCA) leads the production of inoculants based on arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). For this reason, having a certified strain of AMF species *in vitro* is a priority of the research carried out in the institution.

Therefore, the present study set out the objectives of obtaining disinfected spores of *Rhizoglyphus* sp. (INCAM-11) from soil expressing high germination percentages and low levels of contamination, as well as determining the growth period of the propagation germination hyphae of *Rhizoglyphus* sp. (INCAM-11) under *in vitro* conditions.

MATERIALS AND METHODS

Biological material

The INCAM-11 strain of *Rhizoglyphus* sp., From the AMF collection of the National Institute of Agricultural Sciences (INCA) of Cuba, was used. The propagules used were isolated from the inoculant through the technique of wet and decanted sieving and subsequent extraction by centrifugation in sucrose gradient+Tween 80 at 2000 rpm for five minutes ⁽⁵⁾. Once the

water-sucrose+Tween 80 interface was obtained, the spores were extracted using a 30 mL syringe.

The SRM medium was used which was composed of (g L^{-1}): Macroelements ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -73.9; KNO_3 -7.6; KCl -6.5; KH_2PO_4 -0.41; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -35.9; NaFeEDTA -0.16); Microelements ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -1.225; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -1.1; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.14; H_3BO_3 - 0.925; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0.12; $(\text{NH}_4)_6\text{Mg}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 1.7); Vitamins (Calcium pantothenate-0.09; Biotin-0.0001; Nicotinic acid-0.1; Pyridoxine-0.09; Thiamine-0.1 and Cyanocobalamin-0.04); Sucrose-10). The pH was adjusted to 5.5 before adding 4 g L^{-1} GellamGum and the medium was sterilized at 121°C for 15 min.

Spore disinfection of *Rhizoglosum* sp. (INCAM – 11)

To disinfect the propagules of INCAM-11, the methodology proposed by Cranenbrouck *et al* ⁽⁶⁾ was used. 100 propagules of the strain were used, which were placed on a membrane (0.44 μm pore) and washed three times with sterile distilled water. Subsequently, they were contacted with a 2 % Chloramine T solution and two drops of Tween 20 for 10 minutes. They were then washed three times with sterile distilled water and treated with a 10-minute antibiotic solution containing streptomycin sulfate (0.02 %) and gentamicin sulfate (0.01 %), which was sterilized with the help of a Milipore filter (type HA, 4.0 cm in diameter and 0.22 μm pore). After this time the membrane with the propagules was transferred to the antibiotic solution, previously filtered in sterile Petri dish (90 mm diameter).

For the control of contaminants, four Petri dishes were randomly placed in the biosafety cabinet with specific means for fungi (Maltose Agar Sabouraud) and for bacteria (Nutrient Agar).

In all cases a Fully Randomized Design was used for the assembly of the trials.

Experiment 1. Evaluation of the percentage of germination and contamination of propagules of *Rhizoglosum* sp. (INCAM-11) under in vitro conditions

In this experiment, two bioassays were performed with the purpose of evaluating the efficiency of the methodology proposed by Cranenbrouck *et al* (6) to guarantee the

disinfection and subsequent germination of propagules of INCAM-11. Each of the bioassays was repeated twice.

Bioassay 1. In this study the propagules were inoculated in SRM medium, immediately after the end of the disinfection treatment ⁽⁶⁾. 20 Petri dishes (90 mm diameter) were inoculated, at the rate of 5 propagules per plate, for a total of 100 propagules. At the end of the treatment, the plates were sealed with parafilm (Pechiney, Plastic Packaging, Chicago, IL 60631) and incubated (Binder Incubator, Belgium) in the dark for 60 days at 27 °C.

Bioassay 2. In the second trial two times of exposure to the antibiotic solution were compared with the objective of decreasing the contamination of the propagules and increasing the germination percentages. Two treatments were performed, one in which the propagules were inoculated in SRM medium just after disinfection (AD) and another in which the propagules were kept in the solution for 24 hours after the disinfection treatment (24 AD). Five propagules were also inoculated per plate and 20 plates were used per treatment. At the end of the inoculation the plates were sealed with parafilm and incubated under the same conditions to the previous bioassay.

The plates were examined every four days to assess the germination and contamination percentages of the propagules until the 60th day after disinfection

Determinations made. The determinations corresponding to germination and contamination percentage were made. A germinated propagule was considered when it showed growth of the germination tube with a length greater than the diameter of the spore, either from the sporophore or from the end of the support hyphae ⁽⁷⁾.

In the case of contamination, the number of contaminated propagules on a plate was considered with respect to the total number of propagules planted in each.

In the trial comparing the exposure time to the antibiotic solution, the percentages of increase and decrease in germination and contamination were calculated, respectively.

Experiment 2. Evaluation of germ tube growth

This experiment was designed with the purpose of performing a dynamics of propagation germ tube of propagules of INCAM-11. The variable began to be evaluated from the moment in which germination tube growth was observed from the sporophore or the support hyphae. The measurements were made every four days with a micrometer coupled to the dissecting microscope (Novel, 40X magnification), starting from the beginning of the new hypha

formed and to the apex of it. This study was extended until it was observed that the hyphae stopped their growth.

This study also compared the length of the germinative tube of propagules to which both disinfection treatments described in bioassay 2 of experiment 1 were applied.

Statistical analysis

After checking the normality and homogeneity of variance (Brown-Forsythe Test), using the statistical package SPSS Statistics 19 (IBM), the data were submitted to Variance Analysis of simple classification and subsequent Tuckey Test, in order to identify significant differences between treatments $p < 0.05$.

The determinations corresponding to germination and contamination percentage were made. A germinated propagule was considered when it showed growth of the germination tube with a length greater than the diameter of the spore, either from the sporophore or from the end of the support hyphae ⁽⁷⁾.

In the case of contamination, the number of contaminated propagules on a plate was considered with respect to the total number of propagules planted in each.

In the trial comparing the exposure time to the antibiotic solution, the percentages of increase and decrease in germination and contamination were calculated, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

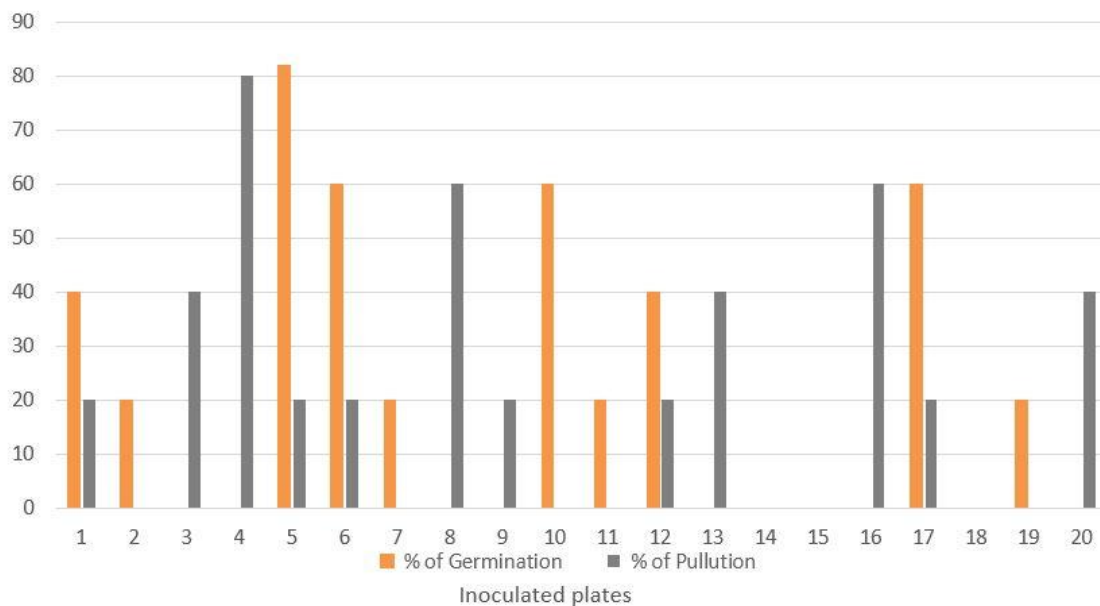
Experiment 1. Evaluation of the percentage of germination and contamination of propagules of *Rhizoglyphus* sp. (INCAM-11) under *in vitro* conditions

The disinfection of mycorrhizal fungal spores used as inoculum is crucial for the formation and successful development of mycorrhization in *in vitro* conditions, since the presence of contaminants is one of the biggest problems that undermines the study of these microorganisms under controlled conditions; In addition, disinfection methodologies must be established for each species of fungus in particular as the effect of disinfectants or their combinations vary depending on the species used ⁽⁸⁾.

Bioassay 1. In this trial it was found that the disinfected propagules of INCAM-11 began to germinate between the sixth and eighth day after treatment and continued to germinate progressively until day 28. This behavior corresponds to that proposed by other authors ⁽⁹⁾, who reported that AMF propagules take a germination 2 to 30 days after the end of the disinfection treatment.

The average germination values, at 60 days, were less than 50 %, as can be seen in Figure 1, while 60 % of the inoculated plates showed some growth of microbial contaminants associated with the propagules (Figure 2).

Apparently, the contaminants that proliferated in the plates were associated with the propagules before disinfection (Figure 2), since in the control plates containing specific means for fungi (Maltose Agar Sabouraud) and bacteria (Nutrient Agar), it was not observed microbial growth, which shows that the contamination of the propagules came from their walls.

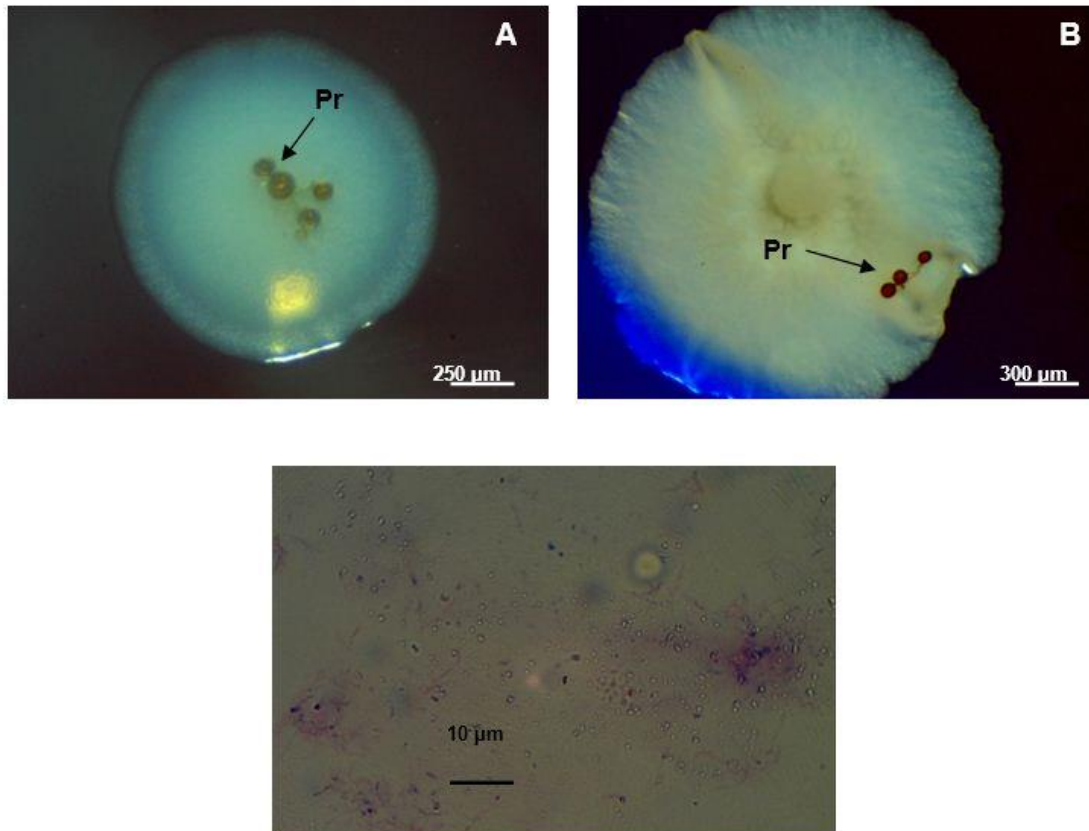


The bars represent the means of five propagules

Figure 1. Behavior of the estimated Germination and Contamination percentages in each of the Petri dishes inoculated with propagules of INCAM-11 in Bioassay 1

The efficiency of the disinfection methodology used has been proven in numerous previous studies ^(2,8,10) and in a certain number of AMF strains that are now part of the two in vitro

collections of AMF in the world (GINCO Belgium and GINCO Canada). However, in the case of this particular strain, the concentrations of contaminants that proliferated after the disinfection treatment are high, with percentages ranging between 20 and 80 in each of the plates (Figure 1).



Photos taken under the dissection microscope (A and B) (Novel, 40X). Photo C taken under an optical microscope (Novel, 1000X)

Figure 2. Images of bacterial contamination associated with disinfected propagules (Pr) of INCAM-11 (A and B). Gram stain of the most frequent contaminant (C)

The germination values reached are generally similar to those found by other authors ⁽¹¹⁾, who reported, in spores of *Gigaspora margarita* (Becker & Hall) and *Scutellospora heterogama* (Nicolson & Gerdemann - Walker & Sander) inoculated in Agar Agua medium, values close to 60 % in the presence of Chloramine T (2 %) and exposure times to disinfectants + antibiotic between 3 and 6 minutes. However, some authors ⁽⁸⁾, applying the same disinfection methodology as used in this study and also using the SRM culture medium, reported only 33 % germination in spores of *Rhizoglyphus* sp.

Germination of AMF propagules can occur in the absence of signals derived from the host, although they cannot complete their life cycle under these conditions. However, there are some factors that can stimulate germination and even inhibit it, such as the composition of the culture medium, pH, some organic compounds, moisture and associated microorganisms⁽¹²⁾.

In the specific case of microorganisms, there are certain microbial groups that can, not only stimulate the germination of the propagules, but also inhibit it and live, usually, associated with the spores and hyphae of AMF, either in the cell lumen, or attached to its walls. They may also have a share in the benefits that these fungi report to plants⁽¹³⁾.

The investigations, using totally disinfected spores of *Funneliformis mosseae* allowed to isolate a large number of microorganisms that grew inside the spores⁽¹⁴⁾. These authors managed to subculture 11 isolates belonging to several microbial groups that were not only able to stimulate spore germination and hyphae branching, but also solubilized phosphate and fixed atmospheric nitrogen.

On the other hand, the disinfection studies in *Rhizoglyphus clarus* spores allowed to demonstrate that some contaminants that grew around the spores hindered the emergence and growth of the germ tube, so that their germination was limited⁽¹⁵⁾.

However, it is important to highlight that there are certain groups of microorganisms not considered contaminants that inhabit the walls of the spores and that play a beneficial role on the germination and the length of the germination tube⁽¹²⁾, so that the use of methodologies of non-aggressive disinfection, which does not completely eliminate the microorganisms that cohabit with the spores, is the key to guarantee germination success⁽¹⁴⁾.

Some microorganisms of the genus *Pseudomonas* and *Corynebacterium*, can increase the germination of spores of *Rhizoglyphus versiforme* and directly affect the mechanisms of destruction of the external wall, exchange molecular material and combine some final products of the synthesis of each of the microorganisms involved⁽¹⁵⁾.

In this regard, in another investigation, a marked stimulation of the germination of *funneliformis mosseae* spores was reported when they were inoculated in the presence of microbial species previously isolated from their interior⁽¹⁴⁾.

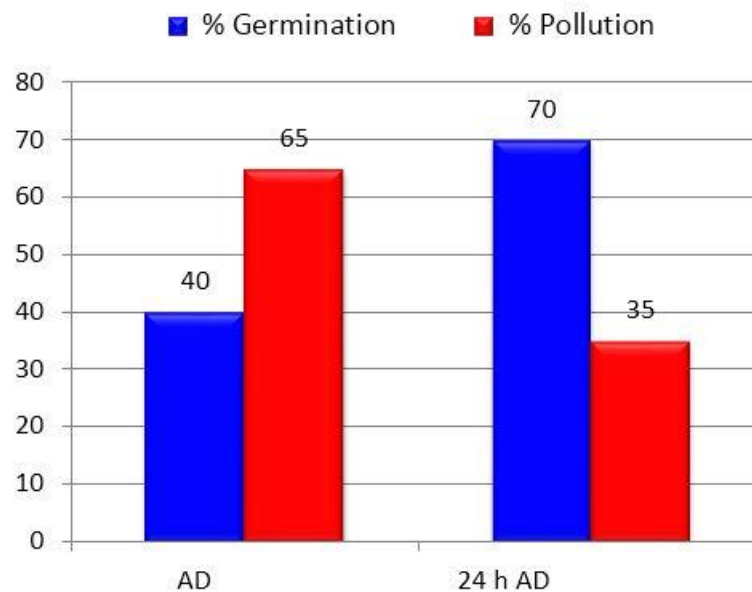
Bioassay 2. With the objective of reducing the contamination of the propagules and increasing the germination percentages, this test was carried out, extending the exposure time

to the antibiotic solution to 24 hours, after the end of the disinfection treatment.

Figure 3 represents the effect of this variation on the behavior of both variables.

Regarding germination, it was observed that the propagules that were exposed to the antibiotic solution for 24 hours prior to inoculation began to germinate two to four days before the previous bioassay, that is, at four days, and the percentages Germination gradually increased in relation to the propagules that did not receive this treatment, reaching a 75 % increase. Likewise, prolonged exposure to the antibiotic solution contributed to reducing contamination levels by 46 %.

Many studies have been carried out with spores of different AMF genera *under in vitro* conditions where the implementation of disinfectant agents such as Chloramine T, Tween 20 and antibiotic solutions (eg Streptomycin, Gentamicin Sulfate, Cephalexin, etc.) has been successful. different concentrations and exposure times ^(2,5,8); however, keeping the propagules for 24 hours exposed to the antibiotic solution had not been reported so far.



Bars of the same color with different letters differ from each other. The bars are the averages of 20 plates containing five propagules each. Significant differences for $p < 0.05$ according to Tukey's test. - AD after disinfection; 24 h DD – 24 hours after disinfection

Figure 3. Effect of the residence time in the antibiotic solution before inoculation on the percentages of germination and contamination of propagules of INCAM-11 in the bioassay 2

The aforementioned confirms that in order to obtain satisfactory results in the disinfection of spores, the concentrations of disinfectants and antibiotics, as well as the duration of the treatments should be adapted depending on the levels of contamination and the sensitivity of the spores.

Although contamination was significantly reduced in this bioassay in relation to bioassay 1, the levels obtained are considered high when compared to those reported by Danesh *et al* ⁽⁵⁾, using similar methodology. These authors obtained contamination percentages of less than 5 % in treated spores of *Rhizoglyphus intraradices*.

The concentrations of microorganisms in the AMF propagules must be related to the fungal species and the substrate on which they develop before sterilization. During the colonization process, AMF interacts with numerous bacteria and spores and hyphae provide sites where certain microbial populations commonly inhabit ⁽¹²⁾, so that both criteria are conditions for their propagules to live with more or less number of microorganisms

The results of this first experiment demonstrate that by modifying existing methodologies the expected effects can be obtained. So that if INCAM-11 spores are kept in antibiotic solution for 24 hours, using the methodology of Cranenbrouck *et al* ⁽⁶⁾, before their inoculation in SRM culture medium, their germination percentages are increased by 75 %, pollution levels are reduced by 46 % and the occurrence of the germination process is advanced from two to four days.

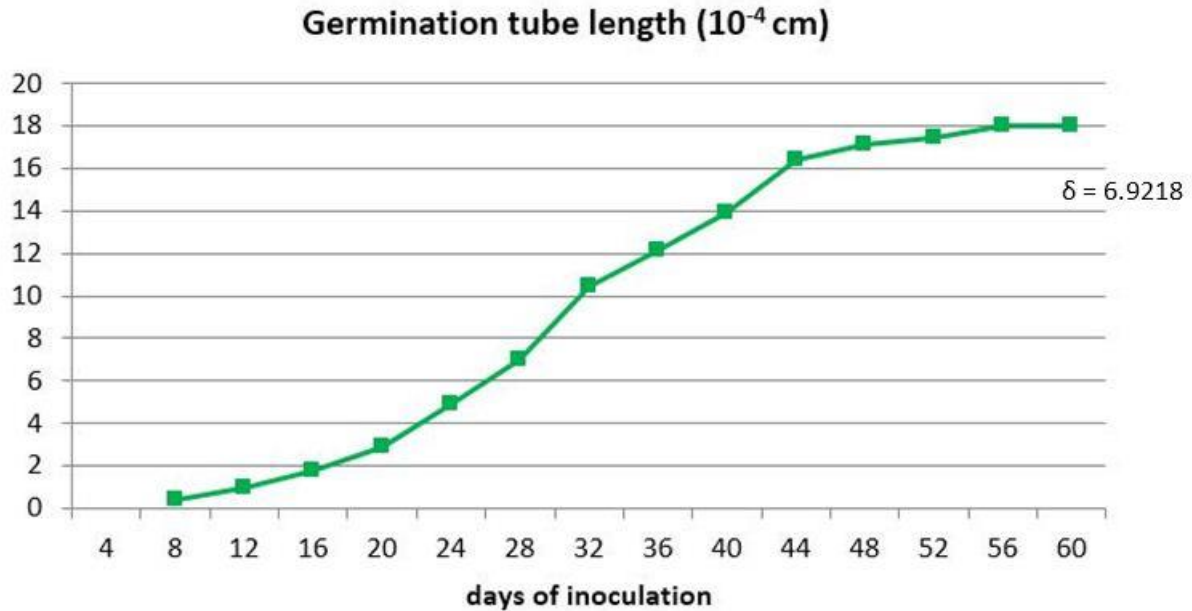
The presymbiotic growth of AMF is a decisive phase for the survival of these fungi since it depends on them that they can find a compatible host to complete their life cycle and the use of *in vitro* culture techniques has allowed us to study how different factors can , synergistically or individually, affect the growth of the fungus during this early and sensitive stage of its development.

Experiment 2. Evaluation of germ tube growth

In this experiment, an evaluation of the dynamics of growth of the germ tubes of INCAM-11, previously disinfected, was carried out using both disinfection treatments (Bioassay 2) to determine the moment at which they stop their growth in axenic conditions.

As can be seen in Figures 4 and 5, the propagules begin to germinate as well as in the previous tests, between days four and eight after disinfection, depending on the treatment. From this

moment on, the germination tubes continue to grow exponentially until they reach constant values around day 56 (Figure 4).



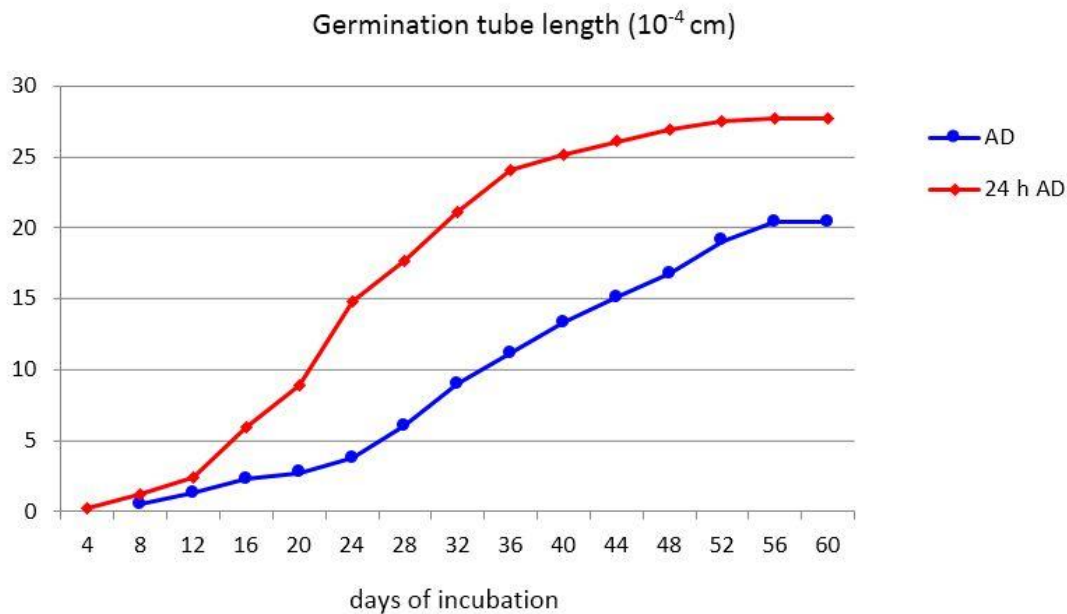
The points correspond to the average of 100 propagules

Figure 4. Dynamics of the germ tube growth of INCAM-11 propagules inoculated to germinate in SRM medium for 60 days

When the propagules remain in the antibiotic solution for 24 hours, they begin to germinate earlier and higher values of germ tube length (LTG) are reached, showing, from day 16, significant differences between treatments (Figure 5) and percentages of 35 % increase on average.

The germination of the propagules is not homogeneous, but varies on the day of onset, the length reached and the moment they stop their growth.

In this experiment, the germinating hyphae that grew for more days stopped their growth on day 56 (Figures 4 and 5), regardless of when they had begun to germinate, estimating an average of 30 days during which the hyphae continued to grow in search of signals from a potential host before stopping their progression, probably due to depletion of the propagule reserves.



The points correspond to the average of 100 propagules. Significant differences for $p < 0.05$ according to Tukey's test. AD - after disinfection; 24 h AD - 24 hours after disinfection

Figure 5. Effect of the time of exposure to the antibiotic solution on the growth of the propagules germinative tube of INCAM-11

Several authors assure that the growth of the germ tube is dependent on the availability and quantity of spore reserves ⁽¹⁶⁾ and that the protoplasm contains all the organelles necessary to ensure its subsequent development. This consists in the straight growth of the running hypha in search of a potential host and the successive thinner branches that occur to explore the surrounding environment. In the event that there is no contact with any root or that any signal from a host is not detected, the germination tube stops its growth, the protoplasm retracts from the apex of the hypha and is sequestered, emptying the hypha, through the production of successive septa.

Other authors have found similar results in relation to the time it takes for germ tubes of AMF spores to stop their growth ⁽¹⁷⁾. According to these authors, in a germination experiment of previously disinfected *R. intraradices* spores, they observed the formation of septa at the apical end of the hypha, the retraction of the cytoplasm and the cessation of hyphal growth, between two and five weeks after their inoculation in culture medium and in the absence of transformed roots.

Apparently there is no high relationship between the moment at which the propagules germinate and the time that elapses until the germinating hyphae stop growing, which could be confirmed with the correlations made ($r = 0.424$ at $p \leq 0.05$).

The length of the germination tubes and the germination of the spores are parameters that are not related, therefore a higher germination rate does not imply that the germination tubes are greater⁽¹⁸⁾. The length that these structures can reach is more related to the size of the spores and the reserves they can store⁽¹⁸⁾ and is manifested both in spores of different genera⁽¹²⁾, and in individuals of the same species⁽¹⁸⁾.

CONCLUSIONS

- The residence time of the spores in antibiotic solution for 24 hours before inoculation in SRM culture medium, increases the germination percentages, decreases the pollution percentages and germination is advanced from two to four days. So far, no previous study had taken into account this modification, so the use of it in disinfection methodologies will favor the success of *in vitro* cultures.
- The germination hyphae of *Rhizoglosum* sp. (INCAM – 11) they spread in the culture medium for approximately 30 days independently, before stopping their growth, which contributes to the subsequent establishment of the association with transformed roots.

RECOMMENDATIONS

Use the spore disinfection methodology of Cranenbrouck *et al*, extending the exposure time to antibiotics to 24 hours, to increase the germination percentages of spores of *Rhizoglosum* sp. (INCAM - 11) from soil and decrease pollution levels.