

Comunicación corta

## **Efecto del pH del medio de cultivo en el crecimiento presimbiótico de *Rhizoglyphus irregularis***

Martha de la Caridad Arocha-Rodríguez<sup>1\*</sup>

Eduardo Pérez-Ortega<sup>1</sup>

Kalyanne Fernández-Suárez<sup>1</sup>

Geert Haesaert<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Facultad de Ingeniería en Biociencias, Universidad de Gent, Bélgica

\*Autor para correspondencia. [marocha@inca.edu.cu](mailto:marocha@inca.edu.cu)

### **RESUMEN**

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) están representados en casi todos los ecosistemas terrestres y colonizan a más del 90 % de las plantas. Su asociación depende de muchos factores edafoclimáticos entre ellos el pH, uno de los parámetros químicos más importantes del suelo, que regula directamente la disponibilidad de los nutrientes y puede afectar la germinación, diversidad, densidad de esporas y colonización de raíces por HMA. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto del pH del medio de cultivo Strullu y Romand Modificado (SRM) en el crecimiento presimbiótico de *Rhizoglyphus irregularis* (INCAM 11) en condiciones “*in vitro*”. Para el desarrollo del experimento las esporas de HMA se expusieron a diferentes pH (4,5; 5,5; 6,5 y 7,5) y se evaluó el crecimiento del tubo germinativo durante 4 semanas presentando los mayores valores de crecimiento en el pH 7,5. Este resultado está dentro del rango de pH óptimo recomendado para esta cepa en experimentos de campo, en los cuales muestra su mayor eficiencia.

**Palabras clave:** micorrizas, germinación de esporas, cultivo *in vitro*

Recibido: 26/12/2018

Aceptado: 14/05/2019

## INTRODUCCIÓN

Los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA, *Phyllum Glomeromycota*) son parte integral de numerosos ecosistemas y se consideran particularmente ventajosos debido a que se asocian a la mayoría de las plantas vasculares <sup>(1)</sup>. Esta simbiosis mutualista facilita la captación de nutrientes minerales y agua a la vez que protege a las plantas contra distintas enfermedades <sup>(2,3)</sup>. La mayoría de los HMA contribuyen a la estabilidad de los agregados del suelo <sup>(4)</sup> y se adaptan a un amplio espectro de condiciones edáficas que están relacionadas con su desarrollo y eficacia <sup>(5,6)</sup>. El pH es considerado uno de los parámetros químicos más importantes del suelo <sup>(7)</sup>, debido al efecto que ejerce tanto sobre las características físicas, químicas y biológicas de éste, como también sobre el rendimiento de los cultivos. A través del intercambio iónico el pH regula directamente la disponibilidad de los nutrientes, lo que determina la riqueza de especies y la composición de la comunidad de microorganismos entre los que se encuentran los HMA <sup>(7)</sup>.

El pH determina en muchos casos la eficiencia del endófito, el porcentaje de germinación y el desarrollo de las esporas de los HMA <sup>(6,7)</sup>. Por tanto, es muy importante en los estudios de selección de especies de HMA, con alta eficiencia simbiótica, tener en cuenta el efecto del pH, ya sea, sobre la productividad de la asociación o sobre los mecanismos de reproducción fúngicos, con el fin de poder seleccionar las especies o ecotipos de mayor eficiencia en un rango amplio de pH o en los rangos que resulten de interés <sup>(8,9)</sup>. A pesar de la importancia de los hongos HMA en la fisiología y nutrición de las plantas, así como en la formación de comunidades de plantas, los factores que afectan la germinación, diversidad, densidad de esporas y colonización de raíces por HMA son poco conocidos <sup>(8)</sup>.

Atendiendo a los aspectos anteriormente descritos el trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del pH del medio de cultivo Strullu y Romand Modificado (SRM) en el crecimiento presimbiótico de *Rhizoglofus irregulare* (INCAM 11) en condiciones “*in vitro*”.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para el presente estudio se evaluó el crecimiento del tubo germinativo de *Rhizoglofus irregulare* (INCAM 11), en diferentes condiciones de pH (4,5; 5,5; 6,5 y 7,5) del medio de cultivo Strullu y Romand Modificado (SRM).

## Material biológico

Para la ejecución del experimento se extrajeron esporas de INCAM11 procedente de la colección de HMA del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) de Cuba mediante la técnica de Tamizado húmedo y decantado y posterior extracción por centrifugación en gradiente de sacarosa + Tween 80 a 2000 rpm en centrifuga de mesa (KUBOTA) durante cinco minutos <sup>(10,11)</sup>. Una vez obtenida la interfase agua – sacarosa + Tween 80, las esporas se extrajeron empleando una jeringa de 30 mL.

### Desinfección de esporas de *Rhizoglyphus irregularis*. (INCAM–11)

De los propágulos extraídos se seleccionaron ramilletes de esporas según la técnica de desinfección previamente propuesta por Cranenbrouck *et al.* <sup>(12)</sup>, modificado por Perera <sup>(13)</sup>, 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 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) durante 24 horas. Posteriormente, los propágulos se inocularon en placas Petri de 90 mm diámetro, divididas en 4 compartimentos que contenían cada uno, medio de cultivo SRM con los diferentes pH en estudio 4,5; 5,5; 6,5 y 7,5 ajustados con HCL o NaOH según correspondiera.

### Evaluación del crecimiento del tubo germinativo de propágulos de *Rhizoglyphus irregularis* (INCAM - 11) en condiciones *in vitro*

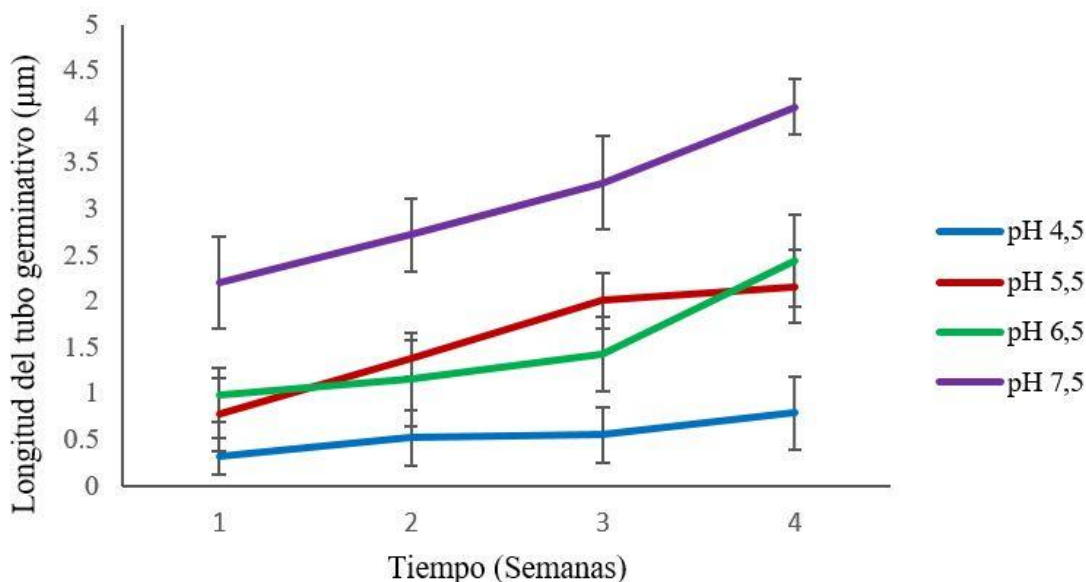
Este experimento se diseñó con el propósito de realizar una dinámica de crecimiento del tubo germinativo de propágulos de INCAM–11. Esta variable se evaluó a partir del momento en que se observó crecimiento del tubo germinativo a partir del esporóforo o de la hifa de sustentación. Las mediciones del mismo se realizaron una vez por semana durante un mes, 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.

## Análisis estadístico

Una vez comprobada la normalidad, se calculó el intervalo de confianza de las medias al 95 % de probabilidad, atendiendo al número de repeticiones (10 réplicas por tratamiento) y la reproducibilidad de los datos. Los análisis de comparación de medias y la determinación de los intervalos de confianza fueron realizados por el programa STATISTIC versión 6.1.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestra el efecto de los diferentes pH en el crecimiento del tubo germinativo de la cepa *Rhizoglosum irregulare* (INCAM 11). Se observó que los mayores valores de longitud del tubo germinativo los mostró la cepa en el pH 7,5, presentando diferencias estadísticamente significativas desde el inicio del experimento con el resto de los tratamientos.



Las barras representan los intervalos de confianza de la media de tratamientos para  $p \leq 0,05$  ( $n=4$ tratamientos)

**Figura 1.** Dinámica del crecimiento del tubo germinativo de propágulos de INCAM 11 inoculados en medio SRM durante cuatro semanas

Investigaciones dirigidas al estudio del efecto del pH en la colonización micorrízica, plantean que hay determinadas cepas de HMA insensibles al aumento del pH (valores de pH 7), aunque éstas, de manera general, tienen un mejor rendimiento en suelos alcalinos, o en condiciones de pH neutro <sup>(7)</sup>. No obteniéndose los mismos resultados para suelos ácidos donde el número de hifas y arbuscúlos presentes en las raíces examinadas eran escasas.

En el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) se trabaja desde 1992 en la utilización y extensión de estos hongos en la nutrición vegetal en general y en la fosforada en particular, contando con un sistema de recomendación de cepas por tipo de suelo, en función de su pH, contenido de materia orgánica y nivel de fertilidad <sup>(14)</sup>. De esta forma, estudios realizados en suelos Pardo Mullido Carbonatado con un pH-H<sub>2</sub>O ligeramente alcalino <sup>(2,7)</sup> se observó que la cepa INCAM 11 presentó siempre un efecto superior y significativo ( $p \leq 0,05$ ), diferenciándose de los obtenidos por las cepas restantes *Glomus cubense* y *Funneliformis mosseae* <sup>(15)</sup>. En la presente investigación, este resultado permitió corroborar que la mencionada cepa presentó los mejores valores de germinación en un pH cercano al que se empleó para el estudio de extensión antes mencionado <sup>(15)</sup>. Con lo cual se corrobora que el efecto del pH es determinante para la eficiencia de la cepa empleada por tipo de suelo, lo que evidencia que su potencialidad está relacionada con el pH del medio en que se desarrolla. Esto le permite acceder al sitio de infección con más facilidad lo que le posibilita establecerse en estas condiciones y ejercer su efecto.

Recientemente, algunos autores han planteado que la relación que se establece entre los rangos de pH del suelo y el efecto de la colonización micorrízica es verdaderamente complejo, dependiendo no sólo de la especie micótica, sino también del tipo de suelo, la forma en que se encuentran los nutrientes (fundamentalmente P y N y otros elementos como Cu, Zn, Mo, B, etc.) y en menor medida de la especie de planta sobre la que se desarrolla <sup>(8)</sup>, en este sentido, es de destacar que estos efectos son importantes desde el inicio del ciclo de vida del simbiote, como se observó en este experimento, lo cual confirma la teoría de que el funcionamiento óptimo está determinado por el pH del sustrato en el cual se desarrolla el simbiote.

## CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este experimento están dentro del rango de pH óptimo recomendado para esta cepa en experimentos de campo, en los cuales muestra su mayor eficiencia.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ortiz N, Armada E, Duque E, Roldán A, Azcón R. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi and/or bacteria to enhancing plant drought tolerance under natural soil conditions: effectiveness of autochthonous or allochthonous strains. *Journal of plant physiology*. 2015;174:87–96.
2. 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.
3. Sánchez-Romera B, Calvo-Polanco M, Ruiz-Lozano JM, Zamarreño ÁM, Arbona V, García-Mina 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*. 2017;59(2):248–261.
4. Wu Q-S, Cao M-Q, Zou Y-N, He X. Direct and indirect effects of glomalin, mycorrhizal hyphae, and roots on aggregate stability in rhizosphere of trifoliolate orange. *Scientific Reports*. 2014;4:5823. doi:10.1038/srep05823
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;5(11):1578–86.
6. Kanwal S, Bano A, Malik RN. 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):872–883.
7. Ouzounidou G, Skiada V, Papadopoulou KK, Stamatis N, Kavvadias V, Eleftheriadis E, et al. Effects of soil pH and arbuscular mycorrhiza (AM) inoculation on growth and chemical composition of chia (*Salvia hispanica* L.) leaves. *Brazilian Journal of Botany*. 2015;38(3):487–95. doi:10.1007/s40415-015-0166-6
8. Kawahara A, An G-H, Miyakawa S, Sonoda J, Ezawa T. Nestedness in Arbuscular Mycorrhizal Fungal Communities along Soil pH Gradients in Early Primary Succession: Acid-Tolerant Fungi Are pH Generalists. *PLOS ONE*. 2016;11(10):e0165035. doi:10.1371/journal.pone.0165035
9. Vyas D, Gupta RK. Effect of edaphic factors on the diversity of VAM fungi. *Trop Plant Res*. 2014;1:14–25.

10. 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
11. Herrera RA, Ferrer RL, Furrázola E, Orozco MO. Estrategia de funcionamiento de las micorrizas VA en un bosque tropical. *Biodiversidad en Iberoamérica. Ecosistemas, evolución y procesos sociales. Programa Iberoamericano deficiencia y tecnología para el desarrollo. Subprograma XII. Diversidad Biológica: Mérida. 1995.*
12. 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; 2005 [cited 05/05/2019]. p. 341–75. doi:10.1007/3-540-27331-X\_18
13. Perera García SS. Cultivo in vitro de *Glomussp.* (INCAM 11) asociado a raíces transformadas de *Cichoriumintybus*. [Trabajo de Diploma]. Universidad de La Habana, Facultad de Biología. 2017. 32p
14. Rivera R, Fernández F, Fernández K, Ruiz L, Sánchez C, Riera M, et al. Advances in the management of effective arbuscular mycorrhizal symbiosis in tropical ecosystems. In: Ed. Hamel E, Plenchette C, editors. *Mycorrhizae in CroupProductions*. 2007. p. 151–95.
15. João JP, Espinosa Cuellar A, Ruiz Martínez L, Simó González J, Rivera Espinosa R. Efectividad de cepas de HMA en el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) en dos tipos de suelos. *Cultivos Tropicales*. 2016;37(1):48–56.

Short Communications

**Effect of culture medium pH on the presymbiotic growth of *Rhizoglyphus irregularis***

Martha de la Caridad Arocha-Rodríguez<sup>1\*</sup>

Eduardo Pérez-Ortega<sup>1</sup>

Kalyanne Fernández-Suárez<sup>1</sup>

Geert Haesaert<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Facultad de Ingeniería en Biociencias, Universidad de Gent, Bélgica

\*Author for correspondence. [marocha@inca.edu.cu](mailto:marocha@inca.edu.cu)

**ABSTRACT**

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are represented in almost all terrestrial ecosystems and colonize more than 90 % of plants. Its association depends on many edaphoclimatic factors including pH one of the most important chemical parameters of the soil which directly regulates the availability of nutrients and can affect germination, diversity, spore density and colonization of roots by AMF. The objective of this study was to evaluate the effect of the pH of the Strullu and Romand Modified culture medium (SRM) on the presymbiotic growth of *Rhizoglyphus irregularis* (INCAM 11) on in vitro conditions. For the development of the experiment, surface sterilized AMF spores were exposed to different pH conditions (4.5, 5.5, 6.5 and 7.5). The growth of the germinative tube was evaluated during 4 weeks, presenting the higher values on pH 7.5. This result is within the range of optimum pH recommended for this strain in field experiments, in which it shows its highest efficiency.

**Key words:** *mycorrhizae, germination of the spores, in vitro culture*

**INTRODUCTION**

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF, *Phyllum Glomeromycota*) are an integral part of numerous ecosystems and are considered particularly advantageous because they are



associated with most vascular plants <sup>(1)</sup>. This mutualistic symbiosis facilitates the uptake of mineral nutrients and water while protecting plants against different diseases <sup>(2,3)</sup>. Most AMF contribute to the stability of soil aggregates <sup>(4)</sup> and adapt to a wide spectrum of edaphic conditions that are related to their development and effectiveness <sup>(5,6)</sup>. The pH is considered one of the most important chemical parameters of the soil <sup>(7)</sup>, due to the effect it exerts both on the physical, chemical and biological characteristics of the soil, as well as on the crop yield. Through ion exchange the pH directly regulates the availability of nutrients, which determines the richness of species and the composition of the microorganism community among which are the AMF <sup>(7)</sup>.

The pH determines in many cases the efficiency of the endophyte, the germination percentage and the development of the AMF spores <sup>(6,7)</sup>. Therefore, it is very important in studies of the selection of AMF species, with high symbiotic efficiency, to take into account the effect of pH, either on the productivity of the association or on the fungal reproduction mechanisms, in order to be able to select the most efficient species or ecotypes in a wide range of pH or in the ranges that are of interest <sup>(8,9)</sup>. Despite the importance of AMF fungi in the physiology and nutrition of plants, as well as in the formation of plant communities, the factors that affect germination, diversity, spore density and root colonization by AMF are poorly understood <sup>(8)</sup>.

Based on the aspects described above, the objective of the study was to evaluate the effect of pH of the Strullu and Romand Modified (SRM) culture medium on the presymbiotic growth of *Rhizoglyphus irregularis* (INCAM 11) under “*in vitro*” conditions.

## **MATERIALS AND METHODS**

For the present study, the growth of the germ tube of *Rhizoglyphus irregularis* (INCAM 11) was evaluated, under different pH conditions (4.5; 5.5; 6.5 and 7.5) of the Strullu and Romand Modified culture medium (SRM).

### **Biological material**

For the execution of the experiment, INCAM11 spores were extracted from the HMA collection of the National Institute of Agricultural Sciences (INCA) of Cuba using the technique of wet and decanted sieving and subsequent extraction by centrifugation in sucrose gradient + Tween 80 at 2000 rpm in a centrifuge table (KUBOTA) for five minutes <sup>(10,11)</sup>.

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

### **Disinfection of *Rhizoglyphus irregularis* spores. (INCAM – 11)**

From the extracted propagules, spore clusters were selected according to the disinfection technique previously proposed by Cranenbrouck *et al.* <sup>(12)</sup>, modified by Perera <sup>(13)</sup>, 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 filter aid millipore (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 24 hours.

Subsequently, the propagules were inoculated in 90 mm diameter Petri dishes, divided into 4 compartments each containing SRM culture medium with the different pHs under study 4,5; 5.5; 6.5 and 7.5 adjusted with HCL or NaOH as appropriate.

### **Assessment of the growth of the germinative tube of prothallia of *Rhizoglyphus irregularis* (INCAM-11) in *in vitro* conditions**

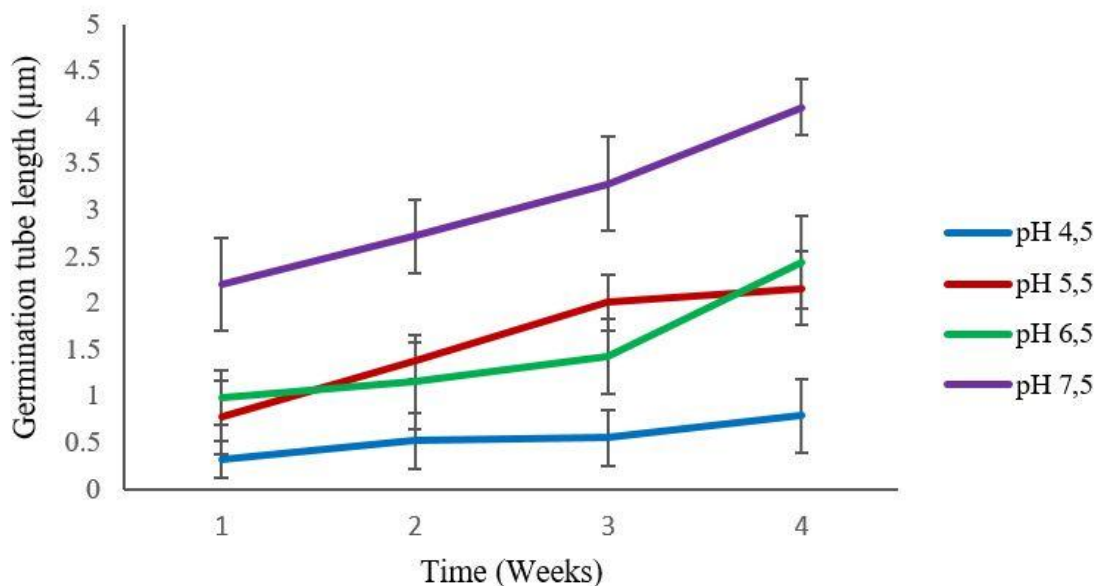
This experiment was designed with the purpose of performing a dynamics of propagation germ tube of propagules of INCAM-11. This variable was evaluated from the moment in which germination tube growth was observed from the sporophore or the support hyphae. The measurements were made once a week for a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

### **Statistic analysis**

Once normality was verified, the confidence interval of the means was calculated at 95 % probability, according to the number of repetitions (10 replicates per treatment) and the reproducibility of the data. The means comparison analyzes and the determination of the confidence intervals were performed by the STATISTIC version 6.1 program.

## RESULTS AND DISCUSSION

The effect of the different pHs on the growth of the germ tube of the *Rhizoglyphus irregularis* strain (INCAM 11) is shown in Figure 1. It was observed that the highest germ tube length values were shown by the strain at pH 7.5, presenting statistically significant differences from the beginning of the experiment with the rest of the treatments.



The bars represent the confidence intervals of the average of treatments for  $p \leq 0.05$  ( $n = 4$  treatments)

**Figure 1.** Dynamics of the germ tube growth of INCAM 11 propagules inoculated in SRM medium for four weeks

Research aimed at the study of the effect of pH on mycorrhizal colonization, suggests that there are certain strains of AMF that are insensitive to the increase in pH (pH 7 values), although these, in general, have better performance in alkaline soils, or in conditions pH neutral <sup>(7)</sup>. Not obtaining the same results for acid soils where the number of hyphae and arbuscules present in the roots examined were scarce.

The National Institute of Agricultural Sciences (INCA) has been working since 1992 on the use and extension of these fungi in plant nutrition in general and in phosphorus in particular, with a system of recommendation of strains by type of soil, depending on of its pH, organic matter content and fertility level <sup>(14)</sup>. In this way, studies carried out on Carbonated Fluffy Brown soils with a slightly alkaline pH-H<sub>2</sub>O <sup>(2,7)</sup> it was observed that the INCAM 11 strain always had a superior and significant effect ( $p \leq 0.05$ ), differing from those obtained by the

remaining strains *Glomus cubense* and *Funneliformis mosseae* <sup>(15)</sup>. In the present investigation, this result allowed us to confirm that the strain had the best germination values at a pH close to that used for the aforementioned extension study <sup>(15)</sup>. This confirms that the effect of pH is decisive for the efficiency of the strain used by type of soil, which shows that its potentiality is related to the pH of the medium in which it develops. This allows you to access the infection site more easily which allows you to establish itself in these conditions and exert their effect.

Recently, some authors have stated that the relationship established between the pH ranges of the soil and the effect of mycorrhizal colonization is truly complex, depending not only on the fungal species, but also on the type of soil, the way in which find nutrients (mainly P and N and other elements such as Cu, Zn, Mo, B, etc.) and to a lesser extent the species of plant on which it develops <sup>(8)</sup>, in this sense, it is noteworthy that these effects are important from the beginning of the symbiont life cycle, as observed in this experiment, which confirms the theory that optimal functioning is determined by the pH of the substrate on which the symbiont develops.

## CONCLUSION

The results obtained in this experiment are within the recommended optimum pH range for this strain in field experiments, in which it shows its highest efficiency.