

INOCULANTES DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES DE *Glomus mosseae* Y *Glomus* sp₁ EN MEDIO LÍQUIDO

F. Fernández✉, J. M. Dell'Amico, Kalyanne Fernández, I. de la Providencia y Asunción Morte

ABSTRACT. Two experiments were designed in order to evaluate the fungal vitality of *Glomus mosseae* (INCAM 2) and *Glomus* sp₁ (INCAM 4) in liquid suspension as well as its biological characterization in transformed (Ri TDNA) carrot rootlets (TCR). In the first one, a fungal viability of spores was studied in a liquid suspension for preservation and distilled water as a control for eight months was performed. Weekly and monthly evaluations of viability averages were done. In the second experiment, colonization capability of spores stored for eight months in TCR was studied. Spore population, germination average, and colonized root length were measured. The corresponding ANOVA design and Tukey test for comparing media was used. A higher viability and stability after eight months were observed with important spore viability losses in water media. Both strains showed its germinating power without significant differences, up to 30 days of incubation. Higher germination percentages in spores were recorded, which could be related to the strong osmotic stress occurred during the exposition time of spore wall in a liquid suspension during eight months. During colonization tests, it could be appreciated that spore population not only germinated, but it had a profuse colonization in both strains 14 days later, that means liquid suspension was effective to keep good functioning levels of the fungi studied, from the biological viewpoint.

Key words: arbuscular mycorrhizae, *Glomus*, liquid manures

RESUMEN. El trabajo tuvo como objetivo la evaluación de la viabilidad de los hongos micorrízicos (HMA) *Glomus mosseae* (INCAM 2) y *Glomus* sp₁ (INCAM 4) en soluciones líquidas. Se realizaron dos experimentos, uno donde se estudió la viabilidad fúngica de las esporas en un medio líquido de conservación y como control, agua destilada estéril durante ocho meses. En el segundo se estudió la capacidad de colonización de las esporas almacenadas durante ocho meses. En cada experimento se aplicó el ANOVA correspondiente y prueba de comparación de Tukey. En el medio líquido se logró un tiempo de viabilidad y estabilidad superior a los ocho meses, con importantes pérdidas de viabilidad de las esporas de ambas especies en el agua. Las cepas expresaron su capacidad germinativa hasta los 30 días de incubación, no detectándose diferencias significativas. En las esporas se encontraron elevados porcentajes de germinación, lo cual parece relacionarse con el fuerte estrés provocado a las paredes de estas, debido a la permanencia durante ocho meses en un medio líquido osmóticamente protector. Los ensayos de colonización permitieron aseverar que las esporas produjeron una fuerte colonización gradual a partir de los 14 días de iniciado el experimento, siendo muy similar en ambas especies. Finalmente, se puede aseverar que el inoculante líquido es efectivo desde el punto de vista biológico, logrando niveles de funcionamiento aceptados.

Palabras clave: micorrizas arbusculares, *Glomus*, abonos líquidos

INTRODUCCIÓN

El cultivo de los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) pasa por un denominador común, la necesidad de una planta hospedera o explantes de raicillas para completar su ciclo de vida, debido a su condición de simbioses obligados (1). Durante los últimos años, se han desarrollado diversas tecnologías de reproducción, siendo las más utilizadas aquellas que involucran a la

planta en un medio o sustrato sólido, empleando materiales que van desde suelo, turba, perlita, vermiculita, arena, arcilla, arcilla calcinada, varios materiales vegetales, fofo-restales, así como las mezclas de algunos de ellos (2, 3).

También se han desarrollado inoculantes micorrízicos en medios hidropónicos, poniendo en contacto a las raicillas de las plantas (previamente colonizadas con la especie fúngica deseada) con una solución nutritiva que fluye de manera continua y a velocidad constante; este método tiene como inconveniente que es preciso ser muy riguroso en el control del pH de la solución, ya que varía con la entrada al medio de los exudados de la planta (4).

Otra metodología de producción de inoculante micorrízico lo constituye el cultivo aeropónico, el cual se basa en el desarrollo de plantas (previamente micorrizadas) sin sustrato, en una cámara oscura, donde sus raicillas son irrigadas temporalmente a través de un dosificador de solución nutritiva, creciendo de forma ace-

Dr.C. F. Fernández, Investigador Auxiliar; Ms.C. Kalyanne Fernández y Ms.C. I. de la Providencia, Investigadores del Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas; Dr.C. J. M. Dell'Amico, Investigador Titular del Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba, CP 32 700, Dra.C. Asunción Morte, Profesora Asistente de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, Murcia, España.

✉ felixfm@inca.edu.cu, felinmar@yahoo.com

lerada de 12 a 15 semanas, en donde se logra un material muy homogéneo y libre de patógenos (5, 6).

Finalmente, se ha desarrollado un sistema de multiplicación de raicillas micorrizadas en fermentadores, que pudiera ser una interesante fuente de inoculante; sin embargo, no se han obtenido inoculantes micorrizógenos líquidos masivos, para enviar por los sistemas de riego localizado a cultivos hortícolas protegidos, así como para las plantas micropropagadas en condiciones *in vitro*.

Este trabajo tiene como objetivo mostrar la viabilidad de los hongos micorrízicos (HMA) *Glomus mosseae* (INCAM 2) y *Glomus* sp₁ (INCAM 4) en soluciones líquidas, así como sus características biológicas frente a la micorrización de raicillas transformadas de zanahoria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del material fúngico para el inoculante líquido. Se emplearon dos especies de HMA, *Glomus* sp₁ (INCAM 4) y *Glomus mosseae* (INCAM 2). Estos hongos se propagaron durante cuatro meses en asociación con la planta hospedera *Sorghum vulgare*, utilizando como sustrato arcilla caolinítica con un pH de 7.5, una temperatura de 25-28°C y fotoperíodo natural. Las plantas recibieron una solución de Long Ashton, modificada con media dosis de fósforo semanalmente y agua, según sus necesidades (7, 8).

Una vez culminado el ciclo de vida de la planta hospedera, se cortó la parte aérea y se obtuvo un sustrato sólido consistente en una mezcla de propágulos micorrízicos (raicillas colonizadas, micelio fúngico y esporas del propio hongo) y el propio soporte inicial, que tuvo las siguientes características micorrízicas:

- micelio externo (9) (> 100 mg.g⁻¹ suelo)
- colonización radical (10) (entre 80 y 87 %)
- Glomus* sp₁: 120 esporas.g⁻¹ de sustrato seco

Glomus mosseae: 300 esporas.g⁻¹ de sustrato seco.

Posteriormente, este inoculante fue secado a temperatura ambiente y almacenado durante un mes en recipientes plásticos a 4°C en la oscuridad. Cada una de las cepas fue montada en preparaciones con PVLG, reactivo de Meltzer y con azul algodón para comprobar sus características morfológicas en un microscopio compuesto Olympus BH2-RFCA con aumentos desde 40x hasta 100x.

Con posterioridad, se procedió a extraer los propágulos micorrízicos por el método de decantado húmedo y tamizado a través de dos tamices de 400 y 40 µm respectivamente; la fracción sólida que se recogió en el tamiz más fino, se centrifugó cinco minutos a 2000 g, con solución de sacarosa 2M-Tween 80 y luego se decantó la fracción líquida con los propágulos fúngicos (11).

Una vez separados todos los componentes, estos fueron desinfectados según el protocolo establecido (12) y modificados durante el proceso de la siguiente manera:

- ↳ la desinfección de las esporas se realizó en tubos Eppendorf durante dos minutos y se sustituyeron dos centrifugaciones

- ↳ la manipulación de las esporas y del material desinfectante (Cloramina T y Cefalexina -IMEFA-) se realizó a través de filtros (malla de acero, 40 µm) esterilizables, acoplados a las tapas horadadas de los tubos Eppendorf, en sustitución de filtros millipore y membranas de 0.22 µm, empleando jeringas esterilizables de 15 mL.

El proceso comenzó con el lavado de los propágulos en solución Ringer estéril durante cinco minutos, agitándose en vórtex para remover las impurezas. Posteriormente, se procedió a realizar la desinfección con la solución de Cloramina T (2 %) empleando un tiempo de exposición de dos minutos. Finalmente, las esporas se lavaron con agua destilada estéril dos veces consecutivas y se les añadió la solución de Cefalexina 100 mg.L⁻¹ durante 24 horas.

Una vez concluida esta fase, los propágulos fueron introducidos en diferentes soluciones estériles osmóticamente protectoras, conformando de esta forma los inoculantes líquidos.

Estabilidad del inoculante micorrízico líquido. Una vez establecidos los propágulos micorrízicos dentro de la solución protectora más promisoriosa y con el objetivo de demostrar la viabilidad del germoplasma fúngico dentro de este medio, se montó un experimento de almacenamiento y viabilidad de esporas, colocando un número constante de 100 esporas viables en tubos Eppendorf, realizándose para cada tratamiento 10 observaciones.

Determinaciones. Para cada una de las especies se realizaron tres ensayos, un conteo diario durante siete días, una dinámica mensual durante ocho meses, evaluándose en ambos casos, la viabilidad de las esporas a través de la determinación de las características morfológicas y de coloración de una espора viable y finalmente se realizó el control de calidad de este inoculante a partir de un bioensayo de efectividad en arroz (*Oryza sativa*, variedad LP-4). El ensayo fue conducido en contenedores individuales de 10 x 40 cm, con una profundidad de 15 cm. El sustrato empleado fue arcilla esterilizada, suplementada con solución de Long Ashton modificada y ajustada a pH 6.5 y un filtrado de sus microorganismos rizosféricos por una membrana de 2 µm.

En este caso se inocularon semillas de arroz con 20 esporas tomadas a los dos, cuatro, seis y ocho meses; las plantas se cosecharon a los 28 días, sus raíces se clarificaron y tiñeron, y se determinó el porcentaje de colonización micorrízica (10, 11).

Germinación y colonización del germoplasma fúngico. En la Universidad de Murcia, España, se realizó un experimento con inoculante líquido de las especies de *Glomus mosseae* y *Glomus* sp₁, con el objetivo de conocer la capacidad germinativa y de colonización de este material almacenado durante ocho meses en sustrato líquido.

Las esporas extraídas del medio líquido fueron colocadas en placas de petri conjuntamente con raíces transformadas (Ri T-DNA) de zanahoria (Foto 1) (*Daucus carota* L.) (13), en medio mínimo e incubadas en posición invertida a 27°C en la oscuridad (14). En total se evaluaron 10 ca-

jas de petri por especie de hongo micorrízico. Cada unidad experimental consistió en una placa de petri con 30 mL de medio M, 50 esporas y un fragmento de raíz transformada de zanahoria e incubada a una temperatura de 27°C, durante 40 días.

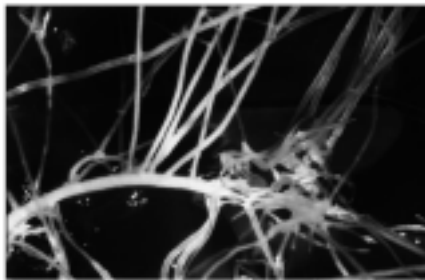


Foto 1. Raicillas de zanahoria transformadas (Ri T-DNA)

Determinaciones. Se realizaron observaciones diarias desde los siete hasta los 40 días. En este caso se determinaron el número de esporas germinadas y el porcentaje de germinación, así como la cuantificación de la colonización micorrízica a los siete, 15 y 30 días y el porcentaje de colonización micorrízica (10, 11).

Análisis estadístico. En todos los casos se realizaron análisis de varianza, utilizando el programa estadístico Statgraphs 4.1, así como transformaciones a los valores de porcentaje perteneciente a las variables fúngicas Colonización, según la expresión $\arcsenv100/x$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características del inoculante líquido de hongos micorrizógenos. *Descripción.* En las Fotos 2 y 3 pueden apreciarse las esporas de *Glomus* sp₁ y *Glomus mosseae* respectivamente, a los ocho meses de incubación en el medio líquido. En el primer caso, se observa la unión esporocárpica que puede reunir hasta nueve esporas en una misma estructura, las tres paredes celulares típicas de las esporas de la especie y la unión del esporóforo, sin estrechamiento de paredes en su base y el aspecto del inoculante a base de *Glomus* sp₁, con abundante presencia de mucílago, presumiblemente debido a la excreción de una glicoproteína soluble del citoplasma de estos hongos llamada Glomalina, así como las características morfológicas del segundo hongo, con las tres capas de pared celular y el típico poro ocluido que enlaza la base del esporóforo con la espora y la hifa de formación.

Estabilidad del inoculante micorrízico líquido. Tras realizar ensayos tendentes a seleccionar un soporte líquido, capaz de asegurar la viabilidad del inoculante durante un prolongado período de tiempo, se elaboraron inoculantes a base de las especies anteriormente mencionadas, las cuales presentaron una viabilidad y estabilidad adecuadas durante ocho meses, debido a las peculiaridades del componente líquido utilizado en su elaboración.

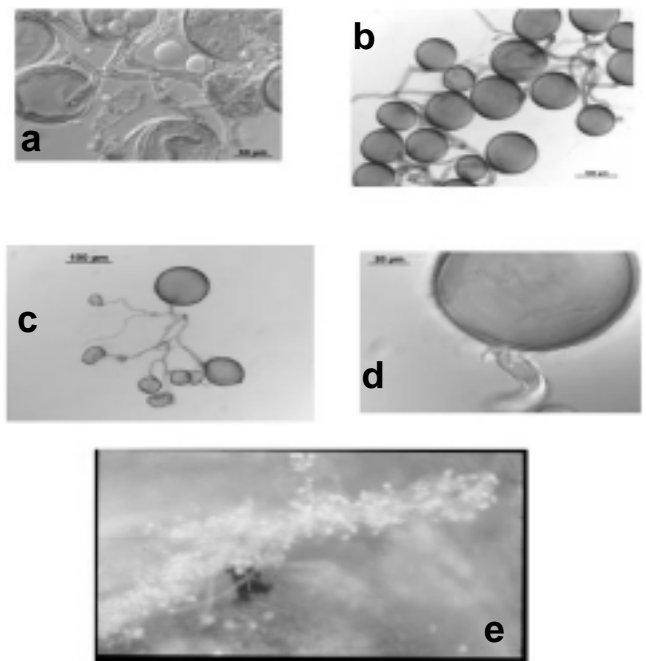


Foto 2. Diferentes esporas de *Glomus* sp₁. a: Esporas formando esporocarpos. b: Esporas en esporocarpio frente al reactivo de Meztler. c: Esporas en esporocarpos. d: Espora individual y unión con el esporóforo. e: Aspecto del inoculante en las líneas de riego. Nótese una gran cantidad de esporas y presencia de mucílago, presumiblemente Glomalina

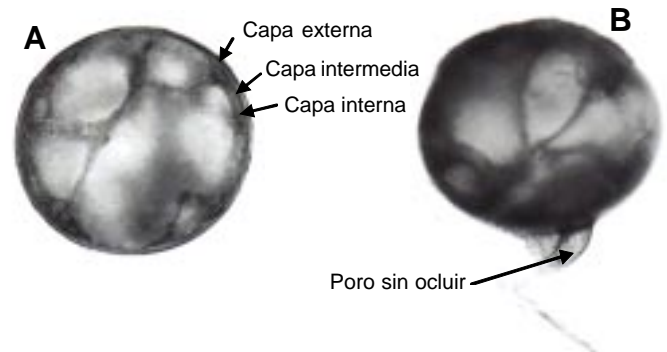


Foto 3. Esporas jóvenes de *Glomus mosseae*, contenidas en el medio líquido. A. Diferentes capas de paredes. B. Poro del esporóforo sin ocluir

En la Tabla I se presentan los números de esporas viables de ambas especies. Se pudo observar que en este medio líquido se mantienen estables sus características morfológicas, como la coloración de la pared externa y la brillantez, con ausencia de necrosis.

Sin embargo, este comportamiento fue contrario en el agua. Se pudo constatar una importante pérdida de viabilidad de las esporas de ambas especies en el agua, lo cual era esperado, provocado por la diferencia de presión osmótica entre el interior de la espora y el exterior rodeado de agua.

Tabla I. Número de esporas viables de *Glomus* sp₁ y *Glomus mosseae* en el medio líquido (ML) y en agua, durante ocho meses de incubación

Tratamientos	Meses de incubación							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Glomus</i> sp ₁ (ML)	103 a	101 a	97 a	100 a	100 a	96.5 a	97.5 a	98 a
<i>Glomus mosseae</i> (ML)	100 a	101 a	100 a	103 a	102 a	100 a	101 a	99 a
<i>Glomus</i> sp ₁ (Agua)	42 b	30 b	26.5 b	17.5 c	17.5 b	17.5 b	10 b	11 b
<i>Glomus mosseae</i> (Agua)	45 b	31 b	26.3 b	21 b	18.2 b	15.3 b	9.2 b	8.5 c
ES x	1.12***	1.15***	2.26***	2.31***	1.14***	2.09***	2.25***	3.31***

En otro experimento de una semana, se trató de conocer con qué velocidad se produce la pérdida de viabilidad de las esporas en este medio.

Los resultados mostraron que el comportamiento en el medio protector líquido era similar al encontrado a los ocho meses (Tabla II); sin embargo, para el caso de las esporas en agua, se observó una tendencia a la disminución. Si bien las pérdidas de la viabilidad se produjeron de forma progresiva, durante los dos a tres primeros días de acuerdo con la especie en cuestión, esta se mantiene alrededor del 40 %, lo cual pudiera indicar que las mayores pérdidas se presentan a partir del primer mes de incubación en agua, llegando a desaparecer casi totalmente estas especies a los ocho meses de almacenadas.

Los resultados mostraron que en todos los momentos la inoculación de las esporas en el medio protector provocó valores de colonización por HMA, demostrando que la incubación en este sustrato era efectiva, manteniendo la capacidad infectiva durante los ocho meses que duró el ensayo, por el contrario de las esporas en agua, donde solo se encontró colonización a los dos meses de incubadas, coincidiendo con el momento en que se había informado la mitad de la población de esporas (50 %, Tabla I). A medida que aumentó el tiempo en presencia de agua, no solo se presentan menores esporas viables, sino que no se pudo observar colonización radical y por ende una disminución sensible en su capacidad infectiva.

Tabla II. Número de esporas de *Glomus* sp₁ y *Glomus mosseae* viables en medio líquido (ML) durante 164 horas

Tratamientos	Horas de incubación						
	24	48	72	96	120	144	164
<i>Glomus</i> sp ₁ (ML)	103.5 a	104.5 a	100.5 a	94.0 b	108.0 a	107.0 a	101.5 a
<i>Glomus mosseae</i> (ML)	100.0 a	101.0 a	100.0 a	102.0 a	100.0 a	101.0 a	100.0 a
<i>Glomus</i> sp ₁ (agua)	82.0 b	57.5 c	48.5 c	49.5 c	42.0 b	44.0 b	45.0 b
<i>Glomus mosseae</i> (agua)	79.0 c	78.0 b	65.0 b	48.0 c	42.0 b	41.0 b	42.0 b
ES x	2.09***	3.11***	1.12***	1.08***	4.09***	3.11***	2.07***

Medias con letras iguales en la misma columna no difieren significativamente, según Prueba de Tukey para $p < 0.001$ ***: Diferencias significativas

Esta tendencia a la disminución no fue apreciada en los tratamientos homólogos en medio líquido, los cuales mantuvieron un valor estable durante todo el experimento (Tabla I). **Colonización de arroz con el inoculante líquido almacenado.** Con este estudio, se trató de comprobar la capacidad infectiva de las esporas tratadas en medio líquido a través de la colonización radical de plántulas de arroz, inoculadas con esporas de dos, cuatro, seis y ocho meses de incubación en el medio líquido y sus homólogos en agua (Tabla III).

Tabla III. Porcentajes de colonización encontrados a los 28 días en plántulas de *Oryza sativa*, inoculadas con esporas de *Glomus* sp₁ y *Glomus mosseae*, en medio líquido (ML) y en agua (A) almacenadas durante dos, cuatro, seis y ocho meses

Tratamientos	Meses de almacenamiento			
	2	4	6	8
<i>Glomus</i> sp ₁	25.3 ns	25.2 ns	26.4 ns	28.8 ns
<i>Glomus mosseae</i>	26.2 ns	25.5 ns	25.4 ns	26.9 ns
<i>Glomus</i> sp ₁ (A)	26.2 ns	0	0	0
<i>Glomus mosseae</i> (A)	23.5 ns	0	0	0
ES x	2.3	2.6	3.3	4.7

Los valores de colonización alcanzados estuvieron en un rango de 23 a 29 %, coincidiendo con valores informados anteriormente para el cultivo del arroz en otras condiciones de experimentación (13). **Pruebas de germinación *in vitro*.** Se procedió a conocer la capacidad germinativa y totipotente de las esporas de las dos especies fúngicas conservadas en medio líquido osmóticamente protector, posterior a los ocho meses de incubación en condiciones *in vitro*, comprobando a su vez si eran capaces de promover una colonización efectiva, aún en estas singulares condiciones.

En la Tabla IV se puede apreciar el comportamiento de la germinación de las especies de *Glomus* estudiadas en este trabajo. En ambos casos, se presentaron patrones de germinación muy similares; el proceso germinativo ocurrió entre los siete y 30 días después de la desinfección y los mayores valores se alcanzaron con la cepa *Glomus* sp₁; no obstante, los valores en general fueron altos, tomando en consideración que las esporas de las especies de *Glomus* poseen un bajo poder germinativo y pasan por largos períodos de dormancia. Sin embargo, el hecho de permanecer durante ocho meses en un medio líquido osmóticamente protector, indudablemente pudo haber generado un fuerte estrés en la zona de la pared externa, que debe haber influido sobre las capacidades germinativas, una vez extraídas de este medio y colocadas en condiciones favorables de humedad y temperatura.

Tabla IV. Número de esporas germinadas (NEG) y porcentajes de germinación (% G) de *Glomus* sp₁ y *Glomus mosseae* en medio líquido (ML), incubado a 28°C, durante 40 días

Tratamientos	Días de incubación							
	0-7		7-15		15-30		30-40	
	NEG	% G	NEG	% G	NEG	% G	NEG	% G
<i>Glomus</i> sp ₁ (ML)	0	0	6 a	12 a	36 a	84 a	0	84 a
<i>Glomus mosseae</i> (ML)	0	0	4 b	8 b	30 b	68 b	0	68 b
Es x	---	---	0.05***	0.03***	2.34***	2.45***	---	3.33***

Medias con letras iguales en la misma columna no difieren significativamente, según Prueba de Tukey para p≤0.001. *** Diferencias significativas

En las Fotos 4 y 5 se pueden apreciar tanto las esporas germinadas como las etapas del proceso de inicio de la colonización de las raicillas de zanahoria por las dos especies de HMA estudiadas. La germinación estuvo caracterizada por la formación de un tubo germinativo, que emergió en dirección rectilínea o serpenteando y formando en algunos casos ramificaciones, pero siempre originadas desde el interior del esporóforo que sostiene la espora.

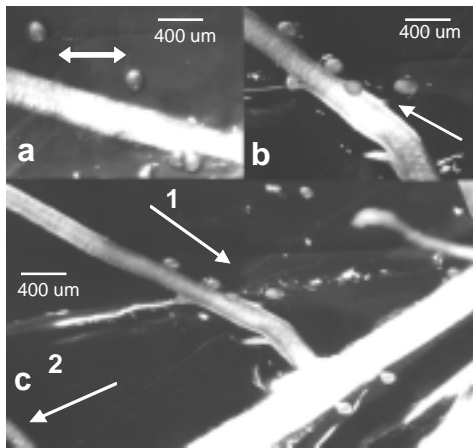


Foto 4. Germinación de esporas de *Glomus mosseae* a los siete días (a), hifa corredora en una espora de *Glomus mosseae* (b), formación de la colonia de *Glomus clarum* (c), hifas corredoras (1) e hifas saliendo del interior radical (2)

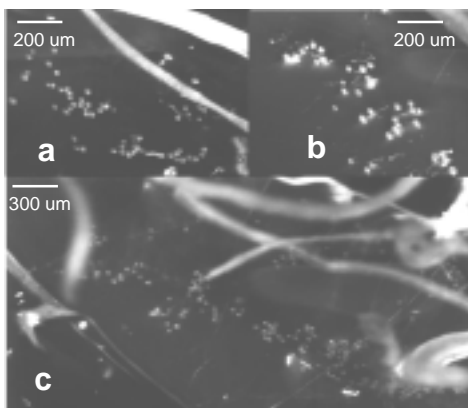


Foto 5. Esporas asépticas de *Glomus* sp₁ (a), Esporas comenzando a germinar (b), Colonia de *Glomus* sp₁ a los 60 días de cultivo (c), nótese hifas corredoras, esporas en ramilletes e hifas ramificadas de absorción

Estas se asociaron con las raíces y las primeras hifas corredoras empezaron a colonizar el medio una semana posterior a la germinación, se ramificaron, formando ocasionalmente anastomosis con otras. Estas colonias se esparcieron rápidamente, formando una profusa y densa red hifal en algunas zonas, asociada en algunas ocasiones a contaminación bacteriana.

Los resultados observados en las figuras anteriores, permitieron aseverar que las esporas no solo germinaron, sino que produjeron una colonización gradual a partir de los 14 días de iniciado el experimento, siendo el comportamiento diferente en ambas especies.

Para el caso de *Glomus mosseae*, el crecimiento *in vitro* resultó bastante recalcitrante; a los 60 días de cultivo, solo se habían formado hifas corredoras que rodeaban todas las raíces de zanahorias y se empezaban a observar algunos micelios que emergían del interior radical, lo cual indicaba que el estadio de colonización estaba comenzando; el hecho de que germinaran las esporas, no quería decir que se iba a lograr una colonización fructífera. Solo para esta especie se ha informado *in vitro* la formación de hifas y aún no se ha observado formación de esporas extraradicales. Estos resultados concuerdan con otros (14), considerándose este tipo de formación de micorrizas como una de las más difíciles de lograr.

Sin embargo, para el caso de *Glomus* sp₁, este crecimiento fue mucho más acelerado; al cabo de los 15 días, ya se podían apreciar incluso que comenzaban a formarse las esporas hijas y a los 60 días, se pudo lograr un cultivo *in vitro* exitoso.

En la Tabla V se presentan los valores de colonización de las raicillas transformadas con los HMA estudiados. Los resultados permitieron comprobar el comportamiento diferenciado de ambas especies; *Glomus* sp₁ no solo comenzó primero la asociación con las raicillas de zanahoria, sino que logró los mayores valores de colonización radical a partir de los 14 días de iniciado el experimento.

Tabla V. Porcentajes de colonización de raicillas transformadas de zanahoria con las cepas de *Glomus* sp₁ y *Glomus mosseae* durante 60 días de incubación en medio M a 28°C

Tratamientos	Días de incubación					
	7	15	30	40	50	60
<i>Glomus</i> sp ₁ (ML)	0 ns	12 a	24 a	35 a	46 a	56 a
<i>Glomus mosseae</i> (ML)	0 ns	0 b	11 b	10 b	22 b	25 b
Es x	1.2***	2.5***	3.4***	5.1***	3.2***	2.6***

Medias con letras iguales en la misma columna no difieren significativamente, según Prueba de Tukey para p≤0.001
*** Diferencias significativas

Para la otra cepa, el desarrollo de la colonización radical estuvo ralentizado, fue mucho más pobre y se pudo constatar a partir de los 30 días, alcanzando valores también muy bajos de colonización radical, fenómeno que puede apreciarse con mayor claridad en la Foto 6.

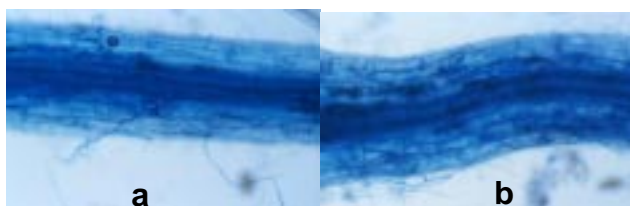


Foto 6. Raicillas de zanahoria transformadas y teñidas con azul de tripano a los 30 días después de enfrentada con esporas provenientes de medio líquido protector. Nótese la diferencia en los patrones de colonización, (a) *Glomus mosseae* y (b) *Glomus sp*₁

En esta foto se pudo constatar cómo la cepa *Glomus sp*₁ logró una extensa colonización radical a los 30 días, apreciándose una buena cantidad de arbuscúlos, en contraste con la otra especie, que apenas comienza el desarrollo de las hifas internas.

En cualquier trabajo con HMA, es crucial el proceso de desinfección de esporas para la formación y el posterior desarrollo 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 en condiciones controladas; además, las metodologías de desinfección deben ser establecidas para cada especie de hongo en particular, pues el efecto de los desinfectantes o las combinaciones de estos varían en función de la especie utilizada (15).

Los resultados aquí obtenidos en la conformación del inoculante líquido, reflejan el efecto exitoso de una combinación de antibiótico (Cefalexina), desinfectante (Cloramina T) sobre la variable germinación de las esporas.

En el proceso de desinfección se empleó una dosis de Cefalexina de 200 mg.mL⁻¹, la cual constituye una concentración suficiente para ejercer un adecuado control microbiano (16). Por otra parte, la Cefalexina está considerada un antibiótico de amplio espectro, informándose su mayor efecto sobre grupos bacterianos Gram- y algunas enterobacterias Gram+, además de actuar sobre algunos hongos de la clase Deuteromycete (17).

La efectiva acción de la Cloramina T como fuerte agente oxidante se puso de manifiesto en las cepas utilizadas y estuvo dada por la eficacia en el control de microorganismos contaminantes dentro del medio. En el caso particular de este desinfectante, se liberan lenta y gradualmente las moléculas contenidas del halógeno, evitando que actúen negativamente sobre el proceso germinativo (18).

Similares resultados fueron presentados en esporas de *Gigaspora margarita* (Becker & Hall) y *Scutellospora heterogama* (Nicolson & Gerdemann) Walker & Sander

inoculadas en medio Agar Agua (18), valores cercanos a 60 % de germinación en presencia de Cloramina T (2 %) y tiempos de exposición a la solución desinfectante + antibiótico entre tres y seis minutos.

En este estudio se demostró también la habilidad de las cepas *Glomus sp*₁ y *Glomus mosseae* para mantenerse viables luego de ocho meses de incubación, así como la capacidad de colonizar raíces transformadas de zanahorias después del proceso de desinfección y montaje en el medio protector y contar en el caso de la primera, con todos los atributos necesarios para los eventos tempranos de un cultivo monoaxénico.

Esta situación pudiera estar asociada con el hecho de conservarse las especies en un medio líquido osmoprotector, que mantiene las esporas en una latencia constante y estimula los mecanismos de germinación a partir de la creación de una situación estresante durante un prolongado período de almacenamiento, lo cual ayudaría a vencer los períodos de dormancias presentes en las especies del género *Glomus*.

También se pudiera considerar que este efecto es muy similar al que se busca con el tratamiento de bajas temperaturas a los inoculantes en sustrato sólido, para lograr a través de un fuerte estrés que se despierten los mecanismos de germinación y sobrepasen el período de dormancia en las esporas, bastante nocivo en la efectividad de un inoculante, debido a la baja capacidad de germinación que presentan las esporas de la familia Glomaceae (19, 20, 21).

Otro aspecto interesante observado en el medio líquido es una secreción de las esporas al medio, que pudiera estar relacionada con la producción de una glicoproteína soluble llamada Glomalina, específica de estos hongos. Esta sustancia pudiera conferirle características especiales al inoculante, debido a sus propiedades adherentes, ya que en contacto con el suelo, pudiera acelerar los procesos de formación de microagregados estables, mejorando su estructura física a partir de una mayor porosidad e incremento en los niveles de oxígeno (22), lo cual pudiera facilitar una mejor colonización de este microorganismo en condiciones de suelo altamente compactados, como es el caso de los suelos anegados.

Un aspecto relevante fue también la capacidad colonizadora de las esporas en este medio líquido protector y una vez fuera de él, en condiciones *in vitro*. Existieron diferencias relevantes entre los patrones de comportamiento *in vitro*, que pueden estar asociados a las necesidades nutricionales de cada una de las cepas estudiadas, así como a las propias características genéticas de crecimiento. Evidentemente, la especie *Glomus sp*₁ se asoció mucho más fácilmente con las raicillas de zanahoria que *Glomus mosseae*, cuyo crecimiento estuvo ralentizado y en ausencia de esporas, comportamiento anteriormente descrito (14).

Otro hecho a considerar pudiera ser la propia actividad enzimática de cada una de las especies estudiadas. Se conoce que los hospederos vegetales responden activamente a la colonización por HMA con un incremento en la actividad enzimática (23). Otros encontraron un elevado incremento

de la actividad quitinasa (24) a los cinco días en las raíces colonizadas por *Glomus fasciculatum*, en comparación con *Glomus clarum*, donde se detectó la actividad a los 25 días después de inoculado. Algunos han propuesto que las enzimas quitinasas podrían tener una función especializada en la extensión y ramificación de las hifas de los HMA, como las tienen para los hongos no micorrízicos. Esto pudiera ser una de las causas por las cuales las plantas responden de forma diferenciada a un tipo de hongo en la formación de la asociación micorrízica (25).

Otro elemento a tomar en consideración puede estar relacionado con las diferencias morfofuncionales de la especie *Glomus mosseae* de la familia Glomaceae, es decir, devolverla taxonómicamente a lo que originalmente fue, es decir, *Endogone mosseae*, pues sus características morfológicas y moleculares halladas recientemente, distan mucho filogénicamente de las especies representadas en esa familia (19).

Sin embargo, Herrera¹ indica que la especie *Glomus mosseae* debe ser reubicada taxonómicamente, no ya devolverla a su antigua taxón, *Endogone*, sino incluso crear una nueva familia para incluirla, debido a su ontogenia y formación de estructuras morfológicas muy diferentes de algunas especies típicas de la familia Glomaceae.

Estos elementos pueden constituir argumento que explique las diferencias en los patrones de funcionamiento micorrízico en condiciones *in vitro* e incluso marquen las diferencias entre las distintas habilidades competitivas de cada especie en cuestión.

Finalmente y a modo de conclusión, se puede aseverar que se está en presencia de un nuevo inoculante micorrízico, que nos permitirá ampliar las vías de aplicación de estos microorganismos, pudiéndose utilizar a través de los sistemas de riego localizado y cultivos protegidos, contribuyendo de esta forma con un manejo mucho más efectivo de la simbiosis micorrízica en un entorno menos agresivo y sostenible.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer al Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, La Habana, Cuba, y a la Fundación Séneca, Murcia, España, por el apoyo financiero para la consecución de este trabajo.

REFERENCIAS

- Giovannetti, M. Spore germination and pre-symbiotic micelial growth. En: Arbuscular mycorrhizas: Physiology and Function. 2000, p. 47-68.
- Morton, J. B. y Redecker, D. Two new families of Glomales, *Archaesporaceae* and *Paraglomaceae*, with two new genera *Archaespora* y *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia*, 2001, vol. 93, no. 1, p. 181-185.
- Fernández, F. Avances en la producción de inoculantes micorrízicos arbusculares. En: Manejo efectivo de la simbiosis micorrízica, una vía hacia la agricultura sostenible. Estudio de caso el Caribe. La Habana: MINREX. 2003. p. 166.
- Sylvia, D. The promise (and obstacles) of AMF inoculation. En: Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil-plant systems. Report of 1997 activities, cost Action 821, Iceland; p. 152. 1998.
- Hung, L. L y Sylvia, D. M. Production of vesicular arbuscular mycorrhiza fungus inoculum in aeroponic culture. *Appl. Environment Microbiology*, 1988, vol. 54, p. 353-357.
- Sylvia, D. M. y Jarstfer, A. G. Sheared-root inocula of vesicular arbuscular mycorrhiza fungi. *App. Environment Microbiology*, 1992, vol. 1, p. 229-232.
- Fernández, F.; Rodríguez, E. L. y Gómez, R. Caracterización de la efectividad de un nuevo inoculante micorrizógeno en Poaceas. *Cultivos Tropicales*, 1999, vol. 20, no. 2, p. 9-14.
- Fernández, F.; Rivera, R. A.; Providencia, I.; Fernández, K. y Rodríguez, Y. Effectiveness of mycorrhizal inoculation by seed dressing, fungal functioning and agrobiological effect. En: "Avances en el conocimiento de la biología de las micorrizas". Universidad de Guanajuato, 2004, p. 252-267.
- Herrera-Peraza, R.; Furrázola, E.; Ferrer, R. L.; Fernández, R. y Torres, Y. Functional strategies of root hairs and arbuscular mycorrhizae in an evergreen tropical forest, Sierra del Rosario, Cuba. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 2004, vol. 35, no. 2.
- Giovannetti, M. y Mosse, B. An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular infection in roots. *New Phytol.*, 1980, vol. 84, p. 489-500.
- Phillips, D. M y Hayman, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 1970, vol. 55, p. 158-161.
- Barredo, F. Estudio de la asociación micorrízica de dos cactáceas silvestres del estado de Yucatán. [Trabajo de Diploma]; Universidad Autónoma de Yucatán, México. 1995. 92 p.
- Fernández, F.; Ortiz, R.; Martínez, M. A.; Costales, A. y Llonin, D. The effect of commercial arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculants on rice (*Oryza sativa*) in different types of soils. *Cultivos Tropicales*, 1997, vol. 18, no. 1, p. 5-9.
- Declerck, D. y Dalpè, Y. Glomalean *in vitro* collection. Consultado [15-9-05]. Disponible en <http://www.ginco.be>, 2005.
- Walley, F. y Germida, J. Failure to decontaminate *Glomus clarum* NT4 spores is due to spore wall-associated bacteria. *Mycorrhiza*, 1996, vol. 6, p. 43-49.
- Providencia, I. de la y Fernández, F. Factibilidad de un ELISA indirecto en la detección de *Glomus clarum*. *Cultivos Tropicales*, 2004, vol. 25, no. 2, p. 19-22.
- Mirabal, L.; Ortega, E.; Rodés, R. y Fernández, F. Método efectivo para la desinfección de esporas de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA): aislamiento y caracterización de bacterias endospóricas en *Glomus clarum*. *Cultivos Tropicales*, 2002, vol. 23, no. 1, p. 21-24.
- Fernández, F. Factibilidad de la micorrización *in vitro* de *Solanum tuberosum*. Informe final de proyecto territorial. INCA. La Habana. 2003. 79 p.

¹Herrera, 2005 (comunicación personal)

19. Shueessler, A. Disponible en: <<http://www.tu-darmstadt.de/fb/bio/bot/schuessler/homepage/.html>>, 2004.
20. Tommerup, I. C. The vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Advances in Plant Pathology*, 1988, vol. 6, p. 81-91.
21. Juge, C.; Samsen, J.; Bastien, C.; Coughlan, A. P.; Vierheiling, H. y Piche, Y. Breaking spore dormancy on the AM fungus *Glomus intraradices*. *Mycorrhiza*, 2002, vol. 12, p. 37-42.
22. Fernández, F. Avances en la producción de inoculantes micorrízicos arbusculares. En: Manejo efectivo de la simbiosis micorrízica, una vía hacia la agricultura sostenible. Estudio de caso el Caribe. La Habana : MINREX. 2003. p.144-166.
23. Miller, R. M. y Jastrow, D. J. Mycorrhizal fungi influence soil structure. En: *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Kluwer Academic Publisher, 2000.
24. Rodríguez, Y.; Pérez, E.; Solórzano, E.; Meneses, A. y Fernández, F. Peroxidase and polyphenoloxidase activities in tomato roots inoculated with *Glomus clarum* and *Glomus fasciculatum*. *Cultivos Tropicales*, 2001, vol. 22, no. 1, p. 11-16.
25. Rodríguez, Y.; Noval, B. M. de la, Fernández, F. y Rodríguez, P. Estudio comparativo del comportamiento de seis cepas de hongos micorrízicos arbusculares en su interacción con el tomate. *Revista Ecología Aplicada*, 2004, no. 1-2.

Recibido: 8 de noviembre de 2004

Aceptado: 30 de septiembre de 2005

Cursos de Verano

Precio: 320 CUC

Biología de la productividad de las plantas
en condiciones de estrés abiótico

Coordinador: Dra.C. Inés Reynaldo Escobar

Fecha: julio

Duración: 40 horas

SOLICITAR INFORMACIÓN

Dr.C. Walfredo Torres de la Noval
Dirección de Educación, Servicios Informativos
y Relaciones Públicas
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)
Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,
La Habana, Cuba. CP 32700
Telef: (53) (64) 86-3773
Fax: (53) (64) 86-3867
E.mail: posgrado@inca.edu.cu