

ASLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NATIVOS DE LA ZONA DE LAS CAOBAS, HOLGUÍN

Laura R. Medina[✉], Y. Torres, R. Herrera y Yakelín Rodríguez

ABSTRACT. Indigenous fungi and their clusters, coming from saline soils, were isolated, identified and multiplied, with the aim of characterizing the mycorrhizal potential of *Las Caobas* area in *Holguín* province. Regarding their morphological traits, 28 morphotypes of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) were identified and grouped according to their homogeneity on shape, colour, outer wall appearance, spore size and the hyphal connection presence, shape and coloration. From the morphological analysis of isolated spores, four of the known genera (*Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora* and *Scutellospora*) were found, *Glomus* being the most common; besides, 35 % of the species were considered as new ones, since they had not been described in literature.

Key words: fungi, vesicular arbuscular mycorrhizal, salinity, fungal morphology

RESUMEN. Con el objetivo de caracterizar el potencial micorrízico de la zona Las Caobas en la provincia de Holguín, se aislaron, identificaron y multiplicaron hongos nativos y conglomerados de estos, provenientes de suelos afectados por la salinidad. Por sus características morfológicas, se identificaron 28 morfotipos de hongos micorrízicos arbusculares (HMA), agrupados según su homogeneidad respecto a la forma, el color, la apariencia de la pared externa, el tamaño de las esporas y la presencia, forma y coloración de la conexión hifal. A partir del análisis morfológico de las esporas aisladas, se encontraron cuatro de los géneros conocidos (*Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora*), siendo *Glomus* el más común; además, se consideró el 35 % de las especies como nuevas, al no estar descritas en la literatura.

Palabras clave: hongos, micorrizas arbusculares vesiculares, salinidad, morfología fúngica

INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas agrícolas más extendidos en el mundo es la acumulación de sales en la superficie del suelo. La salinidad afecta completamente un tercio de las tierras bajo riego en áreas con escasez de agua, altas temperaturas, alta evapotranspiración o cuando se practica un manejo de riego deficiente por parte de los agricultores (1). Además, con la disminución de las fuentes de agua disponibles, usar aguas salinas para el riego es casi inevitable (2).

En general, la salinidad inhibe el crecimiento de las plantas y su productividad. La alta salinidad induce desequilibrios en las relaciones osmóticas entre el suelo y la planta y en su metabolismo. Existe un grupo de factores que aumentan la tolerancia de las plantas a la salinidad, la incorporación o aplicación de estos puede facilitar a las plantas una mejor resistencia al estrés salino y también ayudar a mejorar la productividad de los cultivos en estas condiciones (2, 3).

La tolerancia al estrés en las plantas es un fenómeno complejo, que involucra muchos cambios a nivel bioquímico y fisiológico.

M.Sc. Laura R. Medina, Aspirante a Investigador y M.Sc. Yakelín Rodríguez, Investigadora Auxiliar del departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), gaveta postal 1, San José de las Lajas, La Habana; Y. Torres, Investigador y Dr.C. R. Herrera, Investigador Titular del Instituto de Ecología y Sistemática (IES), Ciudad de La Habana, Cuba.

✉ laura@inca.edu.cu

Sin embargo, los mecanismos detrás de la tolerancia al estrés parecen estar bajo la influencia de la colonización por los hongos micorrízicos arbusculares (HMA).

La simbiosis micorrízica arbuscular es el resultado visible de la interacción entre las raíces de las plantas y un hongo, y un excelente ejemplo de las extensas alteraciones morfológicas que dichas raíces experimentan, con el fin de acomodarse a la presencia de un simbiote (4). Los HMA reciben fotosintatos de la planta, mientras que esta mejora su habilidad para la toma de nutrientes y agua, así como la tolerancia tanto al estrés abiótico como biótico (5, 6).

Por las posibilidades que brindan los HMA en la agricultura desarrollada en áreas afectadas por la salinidad, resulta importante conocer y aislar las especies nativas de estos suelos. Tradicionalmente, los estudios taxonómicos de estos hongos se han basado en la morfología y apariencia de las esporas (6, 7, 8) y, a pesar de que hoy en día se aplican técnicas moleculares con estos fines (9, 10, 11), no se puede obviar el incuestionable valor de los métodos morfológicos en la identificación y caracterización de nuevos géneros y especies (12, 13, 14).

Teniendo en cuenta estos aspectos y la necesidad de contar con un cepario de especies de HMA adaptadas a condiciones salinas, que pudieran ser utilizadas con fines prácticos, el objetivo del presente trabajo fue aislar, identificar y multiplicar los HMA nativos y sus conglomerados, provenientes de suelo salino de la zona Las Caobas en la provincia de Holguín.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización de la zona seleccionada para el aislamiento de HMA. El área escogida fue la zona Las Caobas, municipio de Gibara, provincia de Holguín, que cuenta con una superficie agrícola de 409.2 ha; de ellas, 118.8 son cultivables y 68.64 se encuentran bajo riego.

El agua de riego se obtiene de 20 pozos, es salobre y, en ocasiones, tiene altos niveles de salinidad; el clima se caracteriza por temperaturas promedio de 30.3°C y las precipitaciones de 1 008 mm como valores medio anuales.

Al momento del muestreo, la zona se encontraba cultivada de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y no se le había aplicado con anterioridad ningún producto a partir de HMA.

Análisis del suelo. El suelo de la zona se encuentra dentro del agrupamiento Húmico sialítico, tipo Rendzina y subtipo rojo (15, 16), que se correlaciona con un Nitisol ferrálico (éutrico, ródico) del *World Reference Base* (17). La Tabla I muestra los análisis realizados al suelo.

Tabla I. Algunas características químicas del suelo seleccionado para el aislamiento de los HMA nativos en Holguín

Na	K	Ca	Mg	P	MO	pH	CE	SST
	(cmol.kg ⁻¹)			(ppm)	(%)		(dS.cm ⁻¹)	(ppm)
5.8	1	32.8	5.2	35	4	8.6	5.55	3552

Las determinaciones se realizaron en el laboratorio de Análisis Químico del INCA, mediante los siguientes métodos: para los cationes calcio (Ca²⁺), potasio (K⁺), sodio (Na⁺) y magnesio (Mg²⁺) –Maslova; fósforo (P)-Oniani; materia orgánica (MO) -Walkley y Black; pH (H₂O) - por la conductividad mediante el electrodo de vidrio con dilución 1:2.5.

Extracción y cuantificación de esporas de HMA nativos. Se tomaron 13 muestras compuestas por tres submuestras de suelo de 200 g de la zona de la rizosfera de las plantas presentes, de 0 a 40 cm de profundidad, que se guardaron en bolsas plásticas a 4°C hasta el momento de su uso.

Las muestras de los sitios seleccionados se llevaron al laboratorio de Micología del IES. Las esporas de HMA provenientes de las muestras se extrajeron del suelo, empleando el método de decantado húmedo y tamizado modificado por Herrera (18), del protocolo descrito por Gerdemann y Nicholson (19), a través de dos tamices de 400 y 40 µm respectivamente y centrifugado con solución de sacarosa 2 M–Tween 80, decantándose luego la fracción líquida con los componentes fúngicos. Se realizó un conteo de las esporas en estereomicroscopio (Stemi-200C), utilizando placas de conteo de nematodos, para conocer la cantidad de material micorrízico con que se contaba.

Propagación de esporas de las muestras representativas de suelos salinos. Para la propagación de esporas, se utilizaron 50 g de cada una de las muestras de suelos que contenían las esporas. Estas se propagaron en macetas de 5 L de capacidad, conteniendo suelo Ferralítico Rojo lixiviado (15) como sustrato, el cual se esterilizó para la destrucción de los microorganismos en activo crecimiento y sus estructuras de resistencia, tales como las esporas, con una solución de formaldehído al 5 % por cinco días, al cabo de los cuales el sustrato fue removido y lavado con agua hasta la eliminación del producto.

Se utilizó sorgo como cultivo trampa, debido a que los HMA son simbioses obligados y necesitan una planta para poder completar su ciclo de vida, siendo el sorgo (*Sorghum bicolor*) muy utilizado por los altos niveles de colonización micorrízica que desarrolla. A las semillas se les dio un tratamiento de esterilización, empleando una solución de hipoclorito de sodio al 10 % por 10 minutos. Una vez que se decantó la solución, estas se lavaron varias veces con abundante agua destilada.

Cuando germinaron las semillas, se aplicó el riego a base de solución nutritiva modificada a partir de Hewitt (20) cada 10 días. El cultivo trampa se mantuvo por un período de tres meses. Después de este tiempo, se extrajeron las esporas por el método anteriormente mencionado y se trabajó con esporas sanas, para la identificación morfológica.

Identificación de los HMA nativos aislados de los suelos salinos. Para ello, las esporas se separaron en grupos, de acuerdo con su color y tamaño, preparándose portaobjetos con las esporas extraídas, utilizando alcohol polivinílico y ácido láctico glicerol (PVLG) y PVLG con reactivo Melzer (1:1 v/v), como líquidos de montaje, aplicándose una ligera presión sobre cada uno de los cubreobjetos, para romper levemente las esporas y secando cada preparación a la temperatura ambiente durante 72 horas. Después de este tiempo, se procedió a analizar las preparaciones con ayuda del sistema AxioVision de Carl Zeiss y se clasificaron de acuerdo con sus características morfológicas: forma, color, contenido, unión hifal y tipos de paredes o grupos de paredes, considerando además el tipo y la distribución de las ornamentaciones, según los morfotipos descritos en la literatura (21, 22). El color de las esporas se obtuvo con ayuda de la carta de color del INVAM (23). Para la identificación de las especies, se empleó el manual de Schenck y Pérez (24), la colección fotográfica del departamento de Biofertilizantes del IES de esporas de hongos Glomales, así como la página Web del INVAM (23) y las descripciones originales de las especies publicadas en la literatura especializada, mediante el método propuesto por Herrera (25, 26). Se tomaron imágenes de los distintos tipos de esporas aisladas con el sistema AxioVision de Carl Zeiss.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del potencial micorrízico de la zona Las Caobas. Los conteos totales de esporas correspondientes a 1 g de suelo, para cada una de las muestras tomadas, indican que el número se encuentra entre 8 y 17 esporas.g⁻¹ de suelo. El número de esporas encontradas no es bajo para las condiciones nativas, según los datos informados (27) que encontraron entre 0 y 49 esporas en 25 g de suelo en un experimento, en el que se evaluaron poblaciones de HMA asociadas con cultivos de maíz y soya de cinco años. Además, Howeler (28) registró conteos de esporas nativas asociadas a *Brachiaria decumbens*, que no superan las 10 esporas.g⁻¹ de suelo seco. Igualmente, Douds (29) encontró entre 1 y 43 esporas en 50 cm³ (aproximadamente 50 g) de suelo en cultivos de maíz, soya y trigo, en sistemas con labranza convencional y mínima, y Serralde y Ramírez (30) informaron de 4 a 16 esporas.g⁻¹ de suelo seco en poblaciones de HMA nativas asociadas al cultivo del maíz.

Identificación de morfotipos de HMA aislados. A partir del análisis morfológico de las esporas aisladas, se encontraron cuatro de los 19 géneros conocidos (*Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora*), el más común fue *Glomus*, al cual pertenecen 21 morfotipos, seguido por *Acaulospora*, al que pertenecen cinco de los morfotipos encontrados. Por el contrario, los géneros menos frecuentes fueron *Gigaspora* y *Scutellospora*, en los que solo se identificó un morfotipo en cada uno. Estos resultados se corresponden con los encontrados por Blaszkowski (31), Oehl (32) y Castillo (33), lo que ubica a *Glomus* como género dominante en la mayoría de las poblaciones nativas y es posible que se encuentre en simbiosis activa en mayor proporción que los demás, lo que refleja su capacidad de adaptación a las condiciones edáficas y ofrece un alto potencial para su uso como biofertilizante.

Es conocido que especies como *Gigaspora* o *Scutellospora* necesitan una prolongada fase de colonización radical, para llegar a la fase de esporulación; en contraste con esto, no se requiere la esporulación para la colonización de nuevas raíces en la mayoría de las especies de *Glomus*, siendo la colonización por estas especies mucho más abundante e iniciada por hifas, micelios o fragmentos de raíces en el suelo, lo que pudiera explicar su éxito ecológico (14).

Por sus características morfológicas, se identificaron 28 morfotipos de HMA agrupados según su homogeneidad respecto a la forma, el color, la apariencia de la pared externa, el tamaño de la espora y la presencia, forma y coloración de la conexión hifal, así como la reacción con el reactivo de Melzer, que se describe a continuación, mostrando las imágenes de las distintas esporas de los HMA nativos aislados, así como el género y la especie a la que pertenece cada una de ellas.

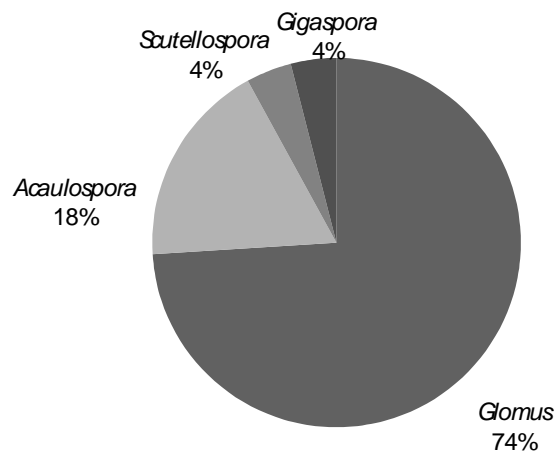
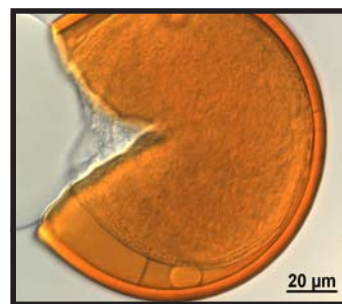


Figura 1. Distribución porcentual de los géneros de los HMA nativos encontrados en suelos salinos de Las Caobas, Holguín



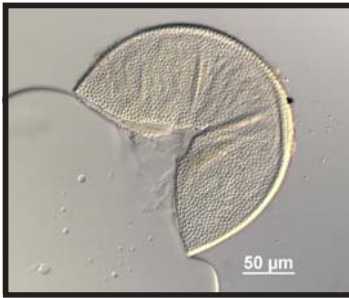
Género: *Acaulospora*
Especie: *Acaulospora koskei-like*
Color: Pardo rojizo
Tamaño: (μm) 120-240
Forma: Globosa, subglobosa
Paredes: Compuesto por tres capas

L1: Hialina, lisa, 1.3-2.2 micras de espesor; aparece como una capa granular en la superficie
 L2: Una capa compuesta de subcapas muy finas y adherentes (o láminas), amarillo-marrón (0-10-100-0 a 0-20-100-0). La superficie de esta capa es suave
 L3: Otra capa laminada de 1.2-1.6 micras de espesor, en las esporas maduras se encuentra cerrada entre la pared y el cuello del sáculo funcionando como una endospora

Género: *Acaulospora*
Especie: *Acaulospora mellea-like*
Color: Amarillo naranja
Tamaño: (μm) 90-140
Forma: Globosa, subglobosa
Paredes: Tres capas (L1, L2 y L3)



L1: Hialino, delgado (<0,5 micras), muy flexible produciendo a menudo extensas arrugas
 L2: Una capa compuesta de subcapas muy finas y adherentes (láminas), de color anaranjado-amarillo, 3.6-5.1 micras de espesor
 L3: Amarillo pálido-marrón, semirígida, laminada



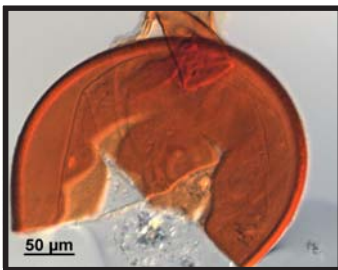
Género: *Acaulospora*
Especie: *Acaulospora scrobiculata*-like
Color: Amarillo pálido
Tamaño: (µm) 80-160
Forma: Globosa, subglobosa
Paredes: Tres capas (L1, L2 y L3), continuas con el exterior de la pared

L1: Hialina; 0.8-1.2 micras de espesor, a menudo ausente en las esporas maduras
 L2: Una capa espesa de color amarillo pálido, con subcapas (o láminas), con depresiones ovoides cóncavas en la superficie. Algunas se unen para formar los canales de 5-12 micras de largo
 L3: A veces se separa ligeramente de la pared de las esporas y ha definido los límites



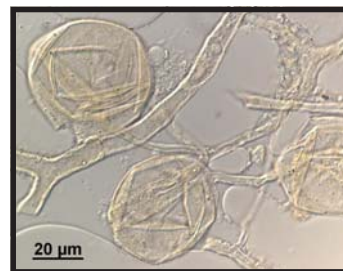
Género: *Gigaspora*
Especie: *Gigaspora* sp.
Color: Hialino
Tamaño: (µm) 160-200
Forma: Globosa, subglobosa
Paredes: Consta de tres capas (L1, L2 y L3), las dos primeras adherentes

y de igual grosor, con L2 como engrosamiento de la pared de esporas
 L1: Una capa externa rígida con una superficie lisa, color hialino a amarillo pálido, 2.0-3.2 m de espesor
 L2: Una semi-capa con subcapas (o láminas) que aumentan en número con la diferenciación, lo que varía considerablemente el grosor de las esporas maduras, 14-26 micras de espesor
 L3: Una capa hialina y adherente



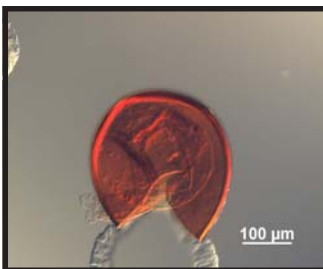
Género: *Acaulospora*
Especie: *Acaulospora spinosa*
Color: Pardo rojizo
Tamaño: (µm) 120-140
Forma: Globosa, subglobosa
Paredes: Dos capas (L1 y L2), el exterior continúa con la

pared del cuello de la matriz del sáculo
 L1: Hialina, 1.2-1.6 micras de espesor. Se degrada muy temprano en la diferenciación de la pared de las esporas
 L2: Una capa espesa de color amarillo pálido formada por subcapas (o láminas) y espinas
 L3: Una sola capa hialina, 0.6-1.2 micras de espesor que se adhiere a la L2 (y por tanto difícil de ver)



Género: *Glomus*
Especie: *Glomus albidum*-like
Color: Hialino
Tamaño: (µm) 40-100
Forma: Elipsoidal
Paredes: Se compone de dos capas diferentes separables (L1 y L2)

L1: Hialina, 0.5-2 micras de espesor, se degrada y desprende con la edad
 L2: Una capa de color amarillo pálido y de grosor similar al de L1 (0.5-2 micras)



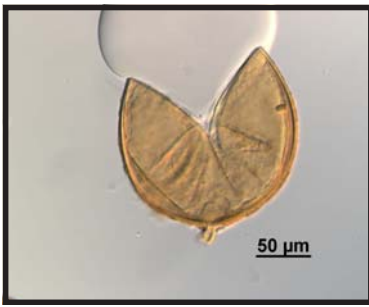
Género: *Acaulospora*
Especie: *Acaulospora spinosa*-like
Color: Pardo rojizo
Tamaño: (µm) 120-140
Forma: Globosa, subglobosa
Paredes: Dos capas (L1 y L2), el exterior continúa con la

pared del cuello de la matriz del sáculo
 L1: Hialina, 1.2-1.6 micras de espesor. Se degrada muy temprano en la diferenciación de la pared de las esporas
 L2: Una capa espesa de color pardo rojizo formada por subcapas (o láminas) y espinas
 L3: Una sola capa hialina, 0.6-1.2 micras de espesor, hay un mayor grado de separación de la pared de las esporas



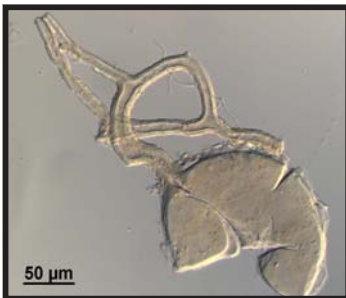
Género: *Glomus*
Especie: *Glomus ambisporum*
Color: Pardo rojizo
Tamaño: (µm) 60-100
Forma: Globosa
Paredes: Consta de tres capas (L1, L2 y L3)

L1: Subhialina, 2-4 micras de espesor, que se extiende a todo lo largo de la unión de hifas en el centro del esporocarpio. Tiene una superficie reticulada que contiene placas hexagonales en una disposición ordenada
 L2: Se compone de subcapas finamente adheridas (o laminadas), 3-14 micras de espesor, de color pardo oscuro
 L3: Es delgada y flexible (<1 micra de grosor), se origina de la sub-capa más interna de la pared de la hifa



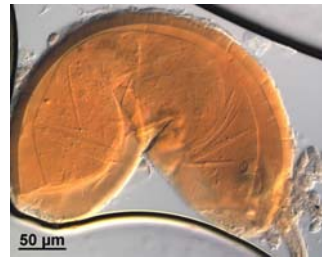
Género: *Glomus*
Especie: *Glomus claroideum*
Color: Pardo
Tamaño: (µm) 80-160
Forma: Globosa, subglobosa
Paredes: Cuatro capas (L1, L2, L3 y L4), solo las dos primeras

presentes en la mayoría de las esporas jóvenes
 L1: Capa hialina mucilaginosa, 0.6-1.8 micras de espesor en las esporas jóvenes, produciendo un color rosa. No hay reacción con el reactivo de Melzer
 L2: Hialina, formada en las esporas más jóvenes con L1, 0.6-2.0 micras de espesor. Puede degradarse lo cual, al parecer, provoca atracción de los desechos orgánicos que pueden acumularse en la superficie de las esporas
 L3: Una capa delgada y muy adherente de color amarillo pálido, subcapas (o láminas), 2.8-6.2 micras de espesor en las esporas maduras
 L4: Una capa incolora, a menudo puede parecer bastante delgada (<0,5 micras) o engrosar con subcapas hasta alrededor de 3 micras



Género: *Glomus*
Especie: *Glomus clarum*
Color: Crema-amarillo
Tamaño: (µm) 100-260
Forma: Elíptica, oblonga
Paredes: Tres capas (L1, L2 y L3), todas pueden estar adheridas a L3, pero frecuentemente se separan en las esporas maduras

L1: Una capa hialina mucilaginosa, generalmente degradada y desprendida de manera que a menudo está ausente en las esporas maduras, 1.0-4.7 micras de espesor
 L2: Una capa hialina permanente, 9-14.5 micras de espesor, consiste en sub-capas de una consistencia granulosa que provoca el agrietamiento y la fragmentación de la pared de las esporas
 L3: Otra capa permanente, que generalmente consiste en 2-4 subcapas (o láminas), de color amarillo oscuro, 1.2-3.5 micras de espesor. Las subcapas generalmente son adherentes



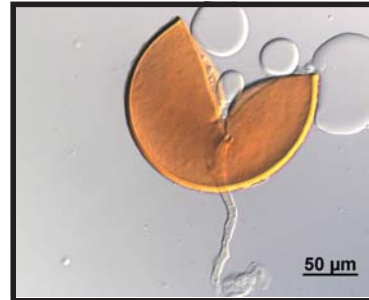
Género: *Glomus*
Especie: *Glomus clarum*-like
Color: Pardo
Tamaño: (µm) 100-260
Forma: Globosa, elíptica, oblonga
Paredes: Consta de tres capas (L1, L2 y L3)

L1: Una capa hialina mucilaginosa, generalmente degradada, 1.0-4.7 micras de espesor
 L2: Una capa hialina permanente, 9-14.5 micras de espesor, consiste en sub-capas de una consistencia granulosa que provoca el agrietamiento y la fragmentación de la pared de las esporas
 L3: Otra capa permanente, que generalmente consiste en 2-4 subcapas (o láminas), de color amarillo oscuro, 1.2-3.5 micras de espesor



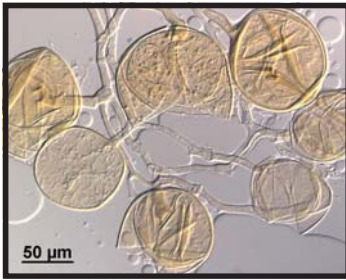
Género: *Glomus*
Especie: *Glomus etunicatum*-like
Color: Pardo claro
Tamaño: (µm) 60-160
Forma: Globosa, subglobosa
Paredes: Consta de dos capas (L1 y L2)

L1: Mucilaginosa, con cierta plasticidad y con la superficie exterior desigual, 0.6-2.8 micras de espesor en las esporas jóvenes, se tiñe con manchas rosadas a rojo púrpura en el reactivo de Melzer
 L2: Una capa formada por subcapas (o láminas) delgadas adherentes, color de pardo claro a rojo-pardo, 4.4-6.4 micras de espesor



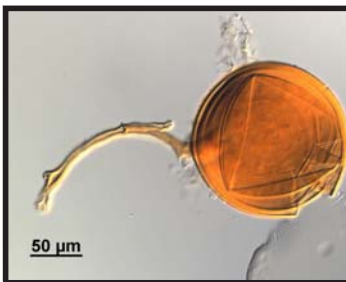
Género: *Glomus*
Especie: *Glomus geosporum*
Color: Pardo oscuro
Tamaño: (µm) 120-240
Forma: Globosa, subglobosa, algunas irregulares
Paredes: Tres capas (L1, L2 y L3), el espesor

combinado 8-16 micras
 L1: Una capa hialina, menos de 1 micra de espesor, no reacciona en el reactivo de Melzer, puede degradarse y a continuación se forma una capa granular de desprendimiento
 L2: Una capa rígida compuesta por subcapas adherentes (o láminas), de color amarillo-marrón y naranja, 6-14 micras de espesor
 L3: Capa rígida 1-2.5 micras de espesor, con frecuencia adherida a L2, pero generalmente se diferencian por el color ligeramente más oscuro (amarillo a naranja-marrón), el crecimiento continuo en el lumen de la hifa forma un tabique recurvado ininterrumpido



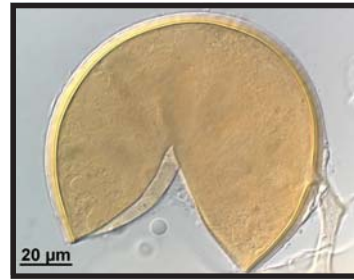
Género: *Glomus*
Especie: *Glomus intraradices-like*
Color: Pardo rojizo
Tamaño: (µm) 40-140
Forma: Globosa, subglobosa
Paredes: Consta de tres capas (L1, L2 y L3)

L1: capa más externa hialina, mucilaginosa, 0.6-3.2 micras de espesor, intacta en las esporas jóvenes, en las maduras aparece granulada y se pueden acumular algunos desechos
 L2: adherida a la capa externa mucilaginosa, hialina, 1.5-4.9 micras de espesor (media de 2.6 micras). Con la edad, se degrada y adquiere un aspecto granular
 L3: una capa compuesta por subcapas (o láminas) de color amarillo pálido-marrón, que se quedan adheridas. El grado de separación entre las subcapas varía considerablemente entre las esporas y, a menudo se ve afectada por la edad, la cantidad de parasitismo, o la cantidad de presión aplicada después del montaje



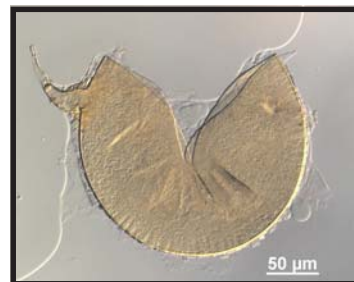
Género: *Glomus*
Especie: *Glomus intraradices-like 2*
Color: Pardo rojizo
Tamaño: (µm) 40-140
Forma: Globosa, subglobosa, irregular
Paredes: Consta de tres capas (L1, L2 y L3)

L1: De coloración rojo rosado a púrpura pálido en el reactivo de Melzer, Con la edad esta capa casi siempre se degrada y se descompone de manera natural y por la acción de los microorganismos
 L2: Capa hialina y mucilaginosa. Las esporas maduras a menudo carecen de L1 y L2
 L3: Capa laminada, en las esporas más jóvenes la subcapa inicial presenta 0.5-1 micras de espesor y luego engrosa con la formación de sub-capas adicionales. El espesor varía 3,2-12 micras (media= 7,2 micras) en las esporas maduras. Así se forma la capa simultáneamente en la pared de la hifa



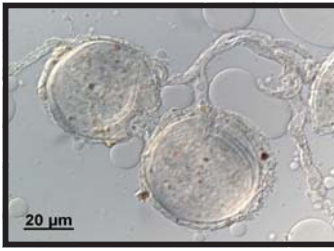
Género: *Glomus*
Especie: *Glomus luteum-like*
Color: Pardo claro
Tamaño: (µm) 60-180
Forma: Globosa, subglobosa
Paredes: Consta de cuatro capas (L1, L2, L3 y L4),

todas se adhieren con L4
 L1: capa hialina mucilaginosa con considerables variaciones en el espesor, 1.3-5.0 micras, no reacciona al reactivo de Melzer. En las esporas maduras esta capa puede estar totalmente ausente
 L2: hialina, semi-rígida, 1.3-6.5 micras de espesor. Se degrada en las esporas maduras
 L3: Capa permanente rígida, consiste en varias subcapas adherentes (o láminas), de color amarillo pálido a amarillo parduzco, 2.5-10 micras de espesor
 L4: Capa delgada y flexible. Su apariencia se asemeja mucho a la de una pared germinal. Se considera una capa separada en lugar de una subcapa de L3, ya que siempre separa a los distintos grados de la pared de esporas. En algunas esporas se aparta completamente de la pared de la espora y tiene una pequeña protuberancia en la que se adjunta a la pared de hifa



Género: *Glomus*
Especie: *Glomus mosseae-like*
Color: Pardo claro
Tamaño: (µm) 100-260
Forma: Globosa, subglobosa
Paredes: Consta de tres capas (L1, L2 y L3)

L1: Hialina, mucilaginosa, 1.4-2.5 micras de espesor, se tiñe con manchas rojo-rosado en el reactivo de Melzer, descamación en las esporas maduras, apareciendo granular en estado avanzado de degradación; 2.5-3.5 m de espesor
 L2: Hialina, 0.8-1.6 micras de espesor, por lo general rígida
 L3: Una capa de color amarillo pardo, compuesta por subcapas (o láminas), 3.2-6.4 micras de espesor

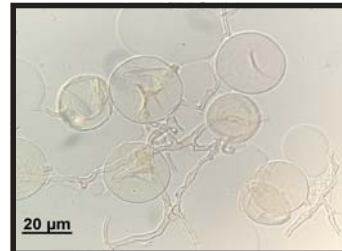


Género: *Glomus*
Especie: *Glomus viscosum*-like
Color: Hialino
Tamaño: (μm) 50-120
Forma: Globosa, subglobosa
Paredes: Consta de tres

capas (L1, L2 y L3)

L1: Una semi-capa hialina flexible; 1-2 micras de espesor. Esta capa no reacciona en el reactivo de Melzer. En las esporas maduras esta capa tiende a permanecer, pero se separa en diferentes grados tanto de la pared de la hifa como de las restantes capas

L2: Una semi-capa fina, flexible, hialina (0,5 micras o menos). Tiende a separarse de L3 en menos del 10 % de las esporas aplastadas, pero se observa sistemáticamente
 L3: Una capa hialina que espesa a través de subcapas (o láminas). Esta capa es más rígida que la L1 o L2, de modo que produce pliegues en la superficie interior, después de ser aplastada



Género: *Glomus*
Especie: *Glomus* sp3
Color: Hialino
Tamaño: (μm) 15-30
Forma: Globosa, subglobosa
Paredes: Consta de tres capas (L1, L2 y L3)

L1: Una semi-capa hialina, flexible, 1-2 micras de espesor. Esta capa no reacciona en el reactivo de Melzer

L2: Una semi-capa fina, flexible, hialina (0,5 micras o menos de espesor)

L3: Una capa hialina más rígida que la L1 o L2, de modo que produce pliegues en la superficie interior, después de ser aplastada



Género: *Glomus*
Especie: *Glomus* sp1
Color: Hialino
Tamaño: (μm) 100-120
Forma: Globosa, subglobosa
Paredes: Consta de tres

capas (L1, L2 y L3)

L1: capa más externa hialina, 0.6-3.2 micras de espesor
 L2: adherente a la capa externa mucilaginosa, hialina, 1.5-4.9 micras de espesor (media de 2.6 micras). Con la maduración adquiere un aspecto granular

L3: una capa compuesta por subcapas (o láminas) de color amarillo pálido



Género: *Glomus*
Especie: *Glomus* sp4
Color: Hialino
Tamaño: (μm) 100-140
Forma: Globosa, subglobosa
Paredes: Consta de tres capas (L1, L2 y L3)

L1: Una capa hialina mucilaginosa, generalmente degradada y desprendida de manera que a menudo está ausente en las esporas maduras, 1.0-4.7 micras de espesor

L2: Una capa hialina permanente, 9-14.5 micras de espesor, consiste en sub-capas de una consistencia granulosa

L3: Una sola capa hialina, 0.6-1.2 micras de espesor que se adhiere a la L2 (y por tanto difícil de ver)



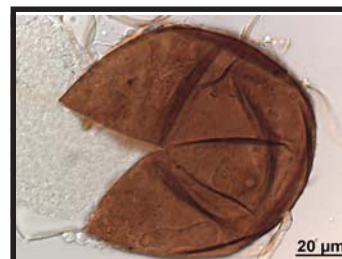
Género: *Glomus*
Especie: *Glomus* sp2
Color: Hialino
Tamaño: (μm) 30-50
Forma: Globosa, subglobosa
Paredes: Consta de tres

capas (L1, L2 y L3)

L1: Hialina, 2-4 micras de espesor, que se extiende a todo lo largo de la unión de la hifa

L2: Se compone de subcapas finamente adheridas (o laminadas), 3-14 micras de espesor

L3: Es delgada y flexible (<1 micra de grosor), se origina de la sub-capa más interna de la pared de la hifa

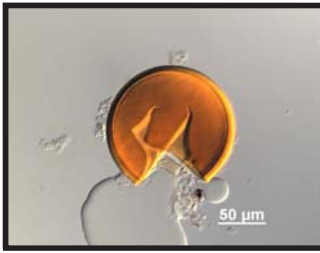


Género: *Glomus*
Especie: *Glomus* sp5
Color: Pardo oscuro
Tamaño: (μm) 60-120
Forma: Globosa, subglobosa
Paredes: Consta de tres capas (L1, L2 y L3)

L1: Una capa hialina, menos de 1 micra de espesor, no reacciona en el reactivo de Melzer

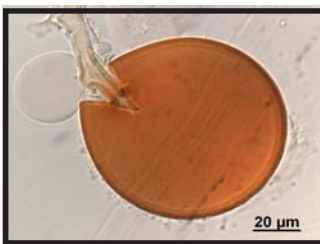
L2: Una capa rígida compuesta por subcapas adherentes (o láminas), de color pardo, 6-14 micras de espesor

L3: Capa rígida 1-2.5 micras de espesor, con frecuencia adherida a L2, pero generalmente se diferencia por el color ligeramente más oscuro



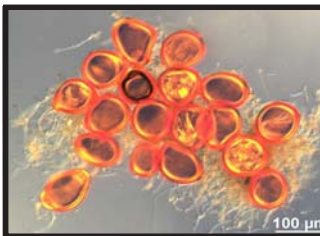
Género: *Glomus*
Especie: *Glomus* sp6
Color: Pardo rojizo
Tamaño: (µm) 100-150
Forma: Globosa, subglobosa
Paredes: Consta de tres capas (L1, L2 y L3)

L1: De coloración púrpura en el reactivo de Melzer. Con la edad, esta capa, casi siempre se degrada y se descompone de manera natural y por la acción de los microorganismos
 L2: Capa hialina y mucilagínosa
 L3: Capa laminada. En las esporas más jóvenes, la subcapa inicial presenta 0.5-1 micras de espesor y espesa con la formación de sub-capas adicionales. Así se forma la capa simultáneamente en la pared de la hifa



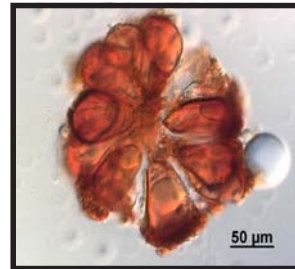
Género: *Glomus*
Especie: *Glomus* sp7
Color: Pardo rojizo
Tamaño: (µm) 60-100
Forma: Globosa, subglobosa
Paredes: Consta de tres capas (L1, L2 y L3)

L1: Hialina, lisa, 1.3-2.2 micras de espesor
 L2: Una capa compuesta de sub-capas muy finas y adherentes, de color amarillo-pardo. La superficie de esta capa es suave
 L3: Otra capa laminada de 1.2-1.6 micras de espesor



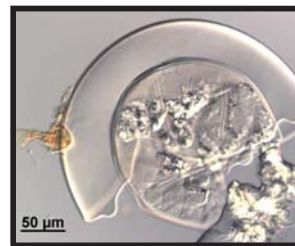
Género: *Glomus*
Especie: *Glomus* sp8
Color: Rojo
Tamaño: (µm) 60-100
Forma: Globosa, subglobosa, elíptica
Paredes: Consta de tres capas (L1, L2 y L3)

L1: Hialina, 2-4 micras de espesor, que se extiende a todo lo largo de la unión de las hifas en el centro del esporocarpio
 L2: Se compone de subcapas finamente adheridas (o laminadas), 3-14 micras de espesor, de color rojo intenso
 L3: Delgada, se origina de la sub-capas más interna de la pared de la hifa



Género: *Glomus*
Especie: *Glomus sinuosum*
Color: Rojo
Tamaño: (µm) 200-360
Forma: Elíptica, organizadas en una capa a partir de un plexo central
Paredes: Una capa (L1), rodeada por el peridio de la hifa

L1: De color marrón-naranja pálido, subcapas (o láminas) que siempre son adherentes. El espesor varía considerablemente de una sola espora, 1.5-6 micras, siendo más gruesa en la base



Género: *Scutellospora*
Especie: *Scutellospora* sp.
Color: Hialino
Tamaño: (µm) 120-200
Forma: Oblonga, en algún caso irregular
Paredes: Consta de dos capas (L1 y L2)

L1: Una capa hialina única, inferior a 1 micra de grosor
 L2: Una capa hialina delgada, inferior a 1 micra de grosor, que se separa fácilmente del resto de la pared de las esporas, salvo en su fijación a la pared de la hifa.

Diversos autores han encontrado entre tres y 15 especies nativas de HMA para condiciones de cultivos en campo (30). Sin embargo, es interesante observar que el total de morfotipos detectados aquí indica un buen establecimiento de las poblaciones de HMA en condiciones nativas para estos suelos (27).

El 35 % de los morfotipos encontrados aparentemente presentaron características que no se ajustan a las descripciones publicadas en la literatura, por lo que se consideraron como posibles especies nuevas y se requiere de mayor investigación para su identificación.

Es válido aclarar que la identificación, basada únicamente en la morfología de las esporas, requiere de personal altamente calificado así como largos años de experiencia visual, por lo que en la actualidad se complementa este criterio, realizando técnicas moleculares (12, 13), las cuales constituyen una herramienta valiosa y viable para estos fines.

Oehl (34) detectó un total de 45 especies de HMA en ocho agroecosistemas de Europa Central, donde un 20 % correspondía a especies no descritas en la literatura. De forma similar, Castillo (33) informó que de 39 especies encontradas en una prospección al sur de Chile, el 23 % se consideraron especies nuevas.

Al comparar estos resultados con los obtenidos en este estudio, se observa un elevado porcentaje de especies nuevas aisladas de los suelos salinos (34), lo cual pudiera atribuirse, en parte, al hecho de que no se pudo corroborar por métodos moleculares la identificación morfológica de las especies nativas encontradas.

La aplicación de estas técnicas novedosas ha contribuido de manera importante al esclarecimiento de la identidad de las especies de HMA (35, 36, 37).

REFERENCIAS

1. Cano, E. A.; Perez-Alfocea, F.; Moreno, V.; Caro, M. y Bolarín, M. C. Evaluation of salt tolerance in cultivated and wild tomato species through *in vitro* shoot apex culture. *Plant Cell Tissue Org Cult.*, 1998, vol. 53, p. 19-26.
2. Chinnusamy, V.; Jagendorf, A. y Zhu, J. K. Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Sci.*, 2005, vol. 45, p. 437-448.
3. Alrahman, A.; Shibli, N. M.; Ereifej, R. A. y Hindiye, K. I. Influence of salinity on growth and physiology of *in vitro* grown cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Jordan Agric. Sci.*, 2005, vol. 1, p. 93-106.
4. Mohammadi, E.; Rezaee, D.; Prasad, R. y Varma, A. Mycorrhizal fungi: What we know and what should we know?, En: Mycorrhiza: state of the art, genetics and molecular biology. A. Varma. Editor, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2008.
5. Ashraf, M. y Foolad, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exptl. Bot.*, 2006, vol. 59, p. 206-216.
6. Choa, K.; Tolera, H.; Leeb, J.; Ownley, B.; Stutz, J. C.; Moore, J. L. y Auge, R. M. Mycorrhizal symbiosis and response of sorghum plants to combined drought and salinity stresses. *Journal of Plant Physiology*, 2006, vol. 163, p. 517-528.
7. Al-Karaki, G. N. Response of wheat and barley during germination to seed osmopriming at different water potential (p. 229-235). Published Online: Apr 22, 2008, 12:00 am. DOI: 10.1111/j.1439-037X.1998.tb00422.x.
8. Aroca, R.; Porcel, R. y Ruiz-Lozano, J. How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses?. *New Phytologist*, 2007, vol. 173, p. 808-816.
9. Ruiz-Lozano, J. M.; Azcón, R. y Gómez, M. Alleviation of salt stress by arbuscular-mycorrhizal *Glomus* species in *Lactuca sativa* plants. *Physiologia plantarum*, 1996, vol. 98, p. 767-772.
10. Rabie, G. H. y Almadini, A. M. Role of bioinoculants in development of salt-tolerance of *Vicia faba* plants under salinity stress. *Afr J Biotech.*, 2005, vol. 4, p. 210-22.
11. Walker, C. Taxonomic concepts in the Endogonaceae: spore wall characteristics in species descriptions. *Mycotaxon*, 1983, vol. 18, p. 443-455.
12. DeBellis, T. y Widden, P. Diversity of the small subunit ribosomal RNA gene of the arbuscular mycorrhizal fungi colonizing *Clintonia borealis* from a mixed-wood boreal forest. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2006, vol. 58, p. 225-235.
13. Lee, J.; Lee, S. y Young, P. W. J. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2008, vol. 65, p. 339-349.
14. Öpik, M.; Moora, M.; Zobel, M.; Saks, Ü.; Wheatley, R.; Wright, F. y Daniel, T. High diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreal herb-rich coniferous forest. *New Phytologist*, 2008, vol. 179, p. 867-876.
15. Hernández, A.; Pérez, J. M.; Bosch, D. y Rivero, L. Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba. La Habana: AGRINFOR, 2006, 64 p.
16. Hernández, A.; Ascanio, M.; Morales, M. y Bojorquez, I. El suelo: Fundamentos sobre su formación, los cambios globales y su manejo. Editado en Universidad de Nayarit, México. 2006, 255 p.
17. IUSS Working Group WRB. World Reference Base for Soil resources 2006. Rome: FAO, 2006, 128 p.
18. Herrera, R. A. Estrategia de funcionamiento de las micorrizas VA en un bosque tropical. Biodiversidad en Iberoamérica: Ecosistemas, evolución y procesos sociales (Eds. Maximina Monasterio). Programa iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo. Subprograma XII, diversidad biológica, Mérida, 1995.
19. Gerdemann, J. W. y Nicholson, T. H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans Br Mycol Soc.*, 1963, vol. 46, p. 235-244.
20. Hewitt, E. J. Sand and water culture methods used in the studies of plant nutrition. En: Tech Comm 22. London: comm. Agri Bur. 1966, p. 430-434.
21. Sieverding, E. y Ole, F. Revision of *Entrophospora* and description of *Kuklospora* and *Intraspora*, two new genera in the arbuscular mycorrhizal Glomeromycetes. *J. Appl. Bot. and Food Qual.*, 2006, vol. 80, p. 69-81.
22. Spain, J. L.; Sieverding, E. y Oehl, F. *Appendicispora*: a new genus in the arbuscular mycorrhiza-forming Glomeromycetes, with a discussion of the genus *Archaeospora*. *Mycotaxon*, 2006, vol. 97, p. 163-182.
23. INVAM. International culture collection of arbuscular and vesicular mycorrhizal fungi. Species descriptions from reference culture, names and authorities of fungi in Glomales. 2009, p. 1-5.
24. Schenck, N. C. y Pérez, Y. Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. 3ª ed. Synergistie, Gainesville, Fla. USA. 1990, 241 p.
25. Glomeromycota TAXONOMY. Consultado [13 de diciembre del 2009]. Disponible en: <http://www.lrz-muenchen.de/~schuessler/amphylo/>
26. Herrera, R. A.; Ferrer, R. L.; Ruiz, L.; Fernández, F.; Medina, N.; Furrázola, E.; Orozco, M. O.; Cueto, J. R.; García, M. J.; Expósito, L.; Pouyu, E.; Ojeda, L.; Valdez, A. R.; Rivera, R. y Sánchez, C. Perspectivas para la generalización del uso de las MA en la agricultura cubana.-Florianópolis, SC, Brazil: Univ. Federal Sta. Catarina. Resúmenes V REBRAM, 1994. p. 37.
27. Collins, N.; Pflieger, F.; Crookston, R.; Simmons, S. y Coipeland, P. Vesicular-arbuscular mycorrhizas respond to corn and soybean cropping history. *New Phytol.*, 1991, vol. 117, p. 657-663.
28. Howeler, R. H.; Sieverding, E. y Saif, S. Practical aspects of mycorrhizal technology in some tropical crops and pastures. *Plant and Soil*, 1987, vol. 100, p. 249-283.
29. Douds, D. D.; Galvez, L.; Janke, R. R. y Wagoner, P. Effect of tillage and farming system upon populations and distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 1995, vol. 52, p. 111-118.
30. Serralde, A. M. y Ramírez, M. M. Análisis de poblaciones de micorrizas en maíz (*Zea mays*) cultivado en suelos ácidos bajo diferentes tratamientos agronómicos. *Revista Corpoica*, 2004, vol. 5, p. 31-40.

31. Blaszkowski, J. Comparative studies on the occurrence of arbuscular fungirhizae (Glomales) in cultivated and uncultivated soils of Poland. *Acta Mycol.*, 1993, vol. 28, p. 93-140.
32. Oehl, F.; Sieverding, E.; Ineichen, K.; Ris, E. A.; Boller, T. y Wiemken, A. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi at different soil depths in extensively and intensively managed agroecosystems. *New Phytol.*, 2005, vol. 165, p. 273-283.
33. Castillo, C. Biodiversidad y efectividad de hongos micorrízicos arbusculares en ecosistemas agroforestales del centro sur de Chile, Tesis Doctorado, 2005, Universidad de la Frontera, Temuco, Chile.
34. Oehl, F.; Sieverding, E.; Ineichen, K.; Mader, P.; Boller, T. y Wiemken, A. Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, vol. 69, p. 2816-2824.
35. Blaszkowski, J.; Renker, C. y Buscot, F. *Glomus drummondii* and *G. walkeri*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycological Research*, 2006, vol. 110, p. 555-566.
36. Blaszkowski, J.; Czerniawska, B.; Wubet, T.; Schäfer, T.; Buscot F. y Schüßler, I. A. Molecular phylogeny and new taxa in the *Archaeosporales* (Glomeromycota): *Ambispora fennica* gen. sp. nov., *Ambisporaceae* fam. nov. and emendation of *Archaeospora* and *Archaeosporaceae*. *Mycological Research*, 2007, vol. 111, p. 137-139.
37. Walker, C. *Ambispora* and *Ambisporaceae* resurrected. *Mycological Research*, 2008, vol. 112, p. 297-298.

Recibido: 19 de noviembre de 2009

Aceptado: 2 de junio de 2010

AZOFERT:

Bioproducto que garantiza el nitrógeno en plantas leguminosas

Azofert es el nombre comercial de un biopreparado a base de bacterias que habitan en el suelo, capaces de asociarse con las plantas leguminosas y formar nódulos en sus raíces, dentro de los cuales fijan el nitrógeno del aire y lo brindan directamente a



la planta, evitando de esta forma el uso de fertilizante químico. A diferencia de otros inoculantes, Azofert contiene altas concentraciones de factores de nodulación, moléculas determinantes en el éxito de esta simbiosis.

Azofert es un producto que se viene estudiando y optimizando durante más de 15 años en el INCA. La optimización de su tecnología ha permitido obtener un producto rentable, con el uso de materias primas nacionales, lo que sustituye importaciones y con mayor calidad, dado no

sólo por la concentración de bacterias en él, sino también por altas concentraciones de factores de nodulación, moléculas que se consideran esenciales en el éxito de la interacción entre estas bacterias y las plantas que ellas benefician.