

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Methodology for the disinfection and germination of spores and fragments of roots inoculated with *Glomus* sp. (GEV02) for use under *in vitro* conditions

Metodología para la desinfección y germinación de esporas y fragmentos de raíces micorrizadas con *Glomus* sp. (GEV02) para su uso bajo condiciones *in vitro*

Urley Adrian Pérez M.^{1,3}, María Margarita Ramírez G.¹,
Lina Margarita Moreno C.¹, Marcela Franco C.²

ABSTRACT

Surface disinfection and germination of propagules, used in inoculants based on arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), are a requirement of utmost importance for the successful establishment of symbiosis under *in vitro* conditions. This study assessed a protocol to establish a method of disinfection and germination of spores and root fragments with vesicles of the AMF *Glomus* sp. (GEV02) under *in vitro* conditions. The *Glomus* sp. (GEV02) spore disinfection was carried out using a combination of several disinfecting agents: chloramine T, hypochlorite, calcium, and antibiotics. For mycorrhized root fragments as a complement to the use of the aforementioned disinfectants, an ultrasound treatment was applied before the disinfection process. In addition, we employed a method of germinating the spores and root fragments mycorrhized with *Glomus* sp. (GEV02) that used different concentrations of flavonoid 3,5,7,3',4'-pentahydroxy flavone. The results reflected the positive impact of the disinfectants calcium hypochlorite (1%), chloramine T (2%) + two drops of tween 20, followed by an antibiotic solution containing 200 mg of sulfated streptomycin and 100 mg of sulfated gentamicin, as well as the use of the flavonoid 3,5,7,3',4'-pentahydroxy flavona (5 µM) during germination, on the percentages of contamination of the infective propagules. This study allowed us to establish a new methodology that ensures the rapid and successful germination of spores and root fragments with vesicles of the arbuscular mycorrhizal fungi, *Glomus* sp. (GEV02) while successfully avoiding contamination.

Keywords: arbuscular mycorrhizal fungi, 3,5,7,3',4'-pentahydroxy flavone, *Glomus* sp. (GEV02), disinfection, spore germination, flavonoid.

Fecha de recepción: 29/07/2011
Fecha de aceptación: 24/10/2011

¹ Laboratorio de Microbiología, Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB), Centro de Investigación Tibaitatá, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - Corpoica. Bogotá (Colombia).

² Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá (Colombia).

³ Autor para correspondencia: urleyadrian@gmail.com

RESUMEN

La desinfección superficial y la germinación de los propágulos, empleados en inoculantes basados en hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA), son un requisito de suma importancia para el exitoso establecimiento de la simbiosis bajo condiciones *in vitro*. El presente trabajo evaluó un protocolo para establecer un método de desinfección y germinación de esporas y fragmentos de raíces con vesículas del HFMA, *Glomus* sp. (GEV02) en condiciones *in vitro*. Se realizó la desinfección de esporas de *Glomus* sp. (GEV02) utilizando una combinación de varios agentes desinfectantes, a partir del uso de cloramina T, hipoclorito de calcio, y de antibióticos. Para los fragmentos de raíces micorrizadas como complemento a la utilización de los agentes desinfectantes mencionados anteriormente se aplicó un tratamiento de ultrasonido antes de realizar el proceso de desinfección. Adicionalmente, se empleó un método de germinación de esporas y fragmentos de raíces micorrizadas de *Glomus* sp. (GEV02), utilizando diferentes concentraciones de flavonoide 3,5,7,3',4'-pentahidroxi flavona. Los resultados reflejaron el efecto positivo de los desinfectantes hipoclorito de calcio (1%), cloramina T (2%) + 2 gotas de tween 20, seguido de una solución antibiótica que contenía 200 mg de estreptomicina sulfatada y 100 mg de gentamicina sulfatada sobre los porcentajes de contaminación de los propágulos infectivos, así como el empleo del flavonoide 3,5,7,3',4'-pentahidroxi flavona (5 µM) durante la germinación. Este estudio permitió contar con una nueva metodología que garantizó la germinación rápida y exitosa de las esporas y fragmentos de raíces con vesículas del HFMA, *Glomus* sp. (GEV02) en ausencia de contaminación.

Palabras clave: hongo formador de micorriza arbuscular, 3,5,7,3',4'-pentahidroxi flavona, *Glomus* sp. (GEV02), desinfección, germinación, flavonoide.

INTRODUCCIÓN

Los hongos formadores de micorriza arbuscular (HFMA) son microorganismos del suelo que completan su ciclo de vida sólo cuando colonizan una raíz susceptible a ser

micorrizada, por lo cual se consideran biótrosos obligados (Declerck *et al.*, 1998). Esta situación de biótrosos obligados reduce el potencial de inóculo de estos microorganismos para poder ser cultivados axénicamente. En las últimas décadas se han realizado muchos intentos por cultivar estos organismos bajo condiciones *in vitro*, encontrándose que la mayoría de los resultados que se han obtenido ha sido utilizando esporas como propágulo inicial (Mosse y Hepper, 1975; Mugnier y Mosse, 1987; Bécard y Fortin, 1988; Bécard y Piche, 1989; St-Arnaud *et al.*, 1996; Dalpé y Declerck, 2002; Fortin *et al.*, 2002; Yinli *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2005; Cranenbrouck *et al.*, 2005; Kandula *et al.*, 2006; Mirabal y Ortega, 2008; Solís-Domínguez *et al.*, 2009). Sin embargo, los fragmentos de raíces con vesículas, también juegan un papel clave en el ciclo de vida de HFMA (Declerck *et al.*, 1998; Strullu *et al.*, 1997; Diop *et al.*, 1994a; 1994b; Declerck *et al.*, 1996a; 1996b; Nogales, 2006; Eskandari y Danesh, 2010). Estos dos tipos de inóculos (esporas y fragmentos de raíces con vesículas) son los que se utilizan en la mayoría de los casos para iniciar un cultivo monoxénico (Fortin *et al.*, 2002).

Sin embargo, antes de ser utilizados estos dos tipos de inóculos en cultivos *in vitro*, deben ser desinfectados; este paso es crítico porque el éxito depende de la eliminación de todos los contaminantes (Fortin *et al.*, 2002). La descontaminación se requiere tanto para evitar la proliferación de contaminantes, como para asegurar que los microorganismos asociados a las esporas de estos hongos no influyan en los resultados experimentales (Fernández *et al.*, 2005). El uso de cloramina T (2%) con trazas de un surfactante tween 20 y antibióticos como la estreptomina y gentamicina, son los más utilizados para la desinfección superficial de propágulos infectivos de HFMA (Rai, 2001). Las variaciones en el tiempo de desinfección, la composición de la solución desinfectante, así como la inclusión de radiación ultravioleta y ultrasonido, también se han propuesto (Boudarga *et al.*, 1990; Fracchia *et al.*, 1998; Walley y Germida, 1996; Budi *et al.*, 1999).

Es conocido que las esporas pueden germinar en ausencia de un hospedero, e incluso la hifa puede elongarse, pero si no encuentra un hospedero se aborta el proceso, igualmente, se ha comprobado que los exudados radiculares podrían estimular la germinación de las vesículas y el crecimiento de las hifas en las esporas (Diop *et al.*, 1994a); de acuerdo a lo mencionado anteriormente una de las moléculas que se han identificado en la emisión de señales, en las respuestas, tanto de la germinación como del crecimiento de la hifa son los flavonoides. Los flavonoides son metabolitos secundarios presentes en la mayoría de las plantas y desempeñan un papel importante en muchas interacciones planta-

microorganismo (Phillips y Tsai, 1992; Akiyama *et al.*, 2002; Larose *et al.*, 2002; Vierheilig y Piché, 2002; Scervino *et al.*, 2009). Considerando la importancia del proceso de desinfección de los propágulos infectivos de los HFMA como la utilidad práctica, se realizó este trabajo con el objetivo de evaluar un protocolo para establecer un método de desinfección y germinación de esporas y fragmentos de raíces con vesículas, que permitiera obtener altos porcentajes de germinación de estos dos tipos de propágulos con bajos niveles de contaminación microbiana del hongo formador de micorriza arbuscular (HFMA), *Glomus* sp. (GEV02) en condiciones *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron esporas de *Glomus* sp. (GEV02), proveniente de un cultivo de mora de castilla (*Rubus glaucus*). La producción del HFMA se realizó bajo condiciones de invernadero en materas con capacidad de 300 g utilizando como hospedero cebolla de bulbo (*Allium cepa*). La producción de plántulas de cebolla se realizó a partir de semillas sexuales, del híbrido Yellow Granex F1PRR; las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2% y sembradas en turba Canadiense Growing Mix F15. Después de 16 semanas de crecimiento, se procedió a extraer el inóculo, consistente en una mezcla de sustrato, esporas y raíces micorrizadas. Las esporas utilizadas se aislaron del inóculo a través de la técnica de tamizado húmedo y decantación, propuestas por Gendermann y Nicholson (1963). Adicionalmente, se seleccionaron bajo un estereomicroscopio (Olympus SZ60) y se cortaron fragmentos de raíces, de 1 cm de longitud, que contenían gran cantidad de vesículas. Los dos tipos de propágulos infectivos (esporas y fragmentos de raíces con vesículas) fueron colocados en tubos eppendorf con agua destilada estéril y conservados a la temperatura de 4°C hasta su posterior desinfección.

Desinfección de esporas y de fragmentos de raíces con vesículas de *Glomus* sp. (GEV02)

Se aislaron 50 esporas y se introdujeron en un sistema de vacío, realizando 3 enjuagues con agua destilada estéril, y a continuación se procedió a realizar la desinfección, de acuerdo a los tratamientos con los diferentes agentes desinfectantes como cloramina T, con la inclusión de un surfactante tween 20, etanol, hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio, así como la adición de una solución de antibióticos (estreptomina y gentamicina sulfatada) esterilizada con un filtro Millipore de 0,25 µm, evaluando distintas combinaciones de tiempo y concentración de cada agente desinfectante, de acuerdo con lo reportado

por Cranenbrouck *et al.* (2005), con modificaciones. Adicionalmente, se cortaron 80 fragmentos de raíces de 1 cm de longitud aproximadamente, que contenían gran cantidad de vesículas. En primer lugar, los fragmentos de raíces se lavaron con agua destilada estéril durante 1 min en ultrasonido, y a continuación se desinfectaron empleando la metodología descrita por Declerck *et al.* (1998). El método de desinfección fue el siguiente: desinfección en etanol al 96% durante 10 s, hipoclorito de calcio al 6% durante 1 min, cloramina T más tween 20 al 2% durante 10 min, seguido de una solución antibiótica que contenía 200 mg de estreptomina sulfatada y 100 mg de gentamicina sulfatada durante 10 min. Después de la aplicación de cada solución (desinfectante y antibiótica) las esporas y fragmentos de raíces con vesículas se lavaron con agua destilada estéril tres veces consecutivas. Las esporas y los fragmentos de raíces con vesículas de *Glomus* sp. (GEV02) fueron colocados en cajas de Petri que contenían medio Modificado Strullu – Romand (MSR) (Declerck *et al.*, 1996a; modificado de Strullu y Romand, 1986) y se incubaron en oscuridad durante 2 semanas a 25°C en posición invertida. Se inocularon 10 cajas de Petri con 5 esporas y 5 fragmentos de raíces con vesículas por caja.

Germinación de esporas y fragmentos de raíces con vesículas del HFMA *Glomus* sp. (GEV02)

Se evaluó un protocolo para establecer un método de germinación de esporas y fragmentos de raíces micorrizadas de *Glomus* sp. (GEV02), utilizando diferentes concentraciones del flavonoide 3,5,7,3',4' - pentahidroxi flavona, según Scervino *et al.* (2005a), con modificaciones. El diseño experimental seleccionado fue completamente al azar con cuatro tratamientos y tres repeticiones. Los tratamientos evaluados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos evaluados para establecer un método de germinación de esporas y fragmentos de raíces micorrizadas de *Glomus* sp. (GEV02)

Tratamientos	Concentración del flavonoide (μ M)
1	Control
2	2
3	5
4	8

Los tratamientos fueron evaluados durante 2, 4, 8 y 12 d, tanto para las esporas como para los fragmentos de raíces con vesículas. Luego de realizar la desinfección de los propágulos infectivos, se inocularon 5 esporas y 5 fragmentos de raíces por cada repetición en medio modificado Strullu & Romand (MSR). Se incubaron en oscuridad a 25°C en posición invertida.

Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó el paquete estadístico SAS System. Se realizó un análisis de varianza (Anava) para los datos registrados con una distribución normal y homogeneidad de varianzas. Posteriormente los datos fueron sometidos a la prueba de Tukey para observar diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desinfección de esporas y de fragmentos de raíces micorrizadas con *Glomus* sp. (GEV02)

En la Tabla 2 se muestra el efecto de los diferentes tratamientos de desinfección, sobre la contaminación (%) de las esporas.

Tabla 2. Efecto de las diferentes evaluaciones de desinfección sobre los porcentajes de contaminación en las esporas del HFMA *Glomus* sp (GEV02) a las dos semanas de incubadas

Agente desinfectante	Concentración (%)	Tiempo de exposición (min)	Evaluación		
			I	II	III
Etanol	96	1	*		
	70	2		*	
Hipoclorito de sodio	3	3	*		
	2	2		*	
Hipoclorito de calcio	1	2			*
Cloramina T + Tween 20	2	10	*	*	*
Solución de antibióticos					
(estreptomina	0,02				
+ gentamicina)	+ 0,01	10	*	*	*
Resultados (% contaminación)			80	50	1

En la primera evaluación el porcentaje de contaminación de las esporas fue del 80%, observándose daño en las mismas; por lo que en la siguiente evaluación se decidió disminuir el tiempo de desinfección, así como la concentración del etanol y del hipoclorito de sodio. Para la segunda evaluación el porcentaje de contaminación de las esporas fue del 50%, y aunque disminuyó con respecto a la primera evaluación, se observaron daños a las esporas por el hipoclorito de sodio debido a que este es un producto inestable que se degrada cuando se mantiene unido a los propágulos del hongo. Además la solución de hipoclorito de sodio cuando no se lava bien, se concentra alrededor de las esporas desinfectadas, y esto puede tener un efecto tóxico (Cranenbrouck *et al.*, 2005). Por tal motivo se decidió en la siguiente evaluación reemplazar el hipoclorito de sodio por hipoclorito de calcio y eliminar del proceso de desinfección al etanol. Finalmente en la tercera

evaluación se consiguió reducir la contaminación al 1%, sin observar daño a las esporas.

Se estableció como método de desinfección el propuesto en la evaluación III. Este nuevo procedimiento garantizó la ausencia de contaminación en las esporas, lo cual pudo ser comprobado al inocularlas sobre medio MSR y no presentar crecimiento microbiano después de 2 semana en incubación. Estos resultados fueron similares a los descritos por Budi *et al.* (1999), en esporocarpos de *Glomus mosseae* donde utilizaron agentes desinfectantes como cloramina T y tween 20, hipoclorito de calcio, solución de estreptomina, gentamicina, observándose una reducción de la contaminación del 90%, con un alto nivel de germinación después de 3 semanas de incubación. En otro estudio de desinfección realizado (Fernández *et al.*, 2005) a esporas de *Glomus mosseae* utilizando cloramina T al 2% y solución de kanamicina con estreptomina sulfatada, estos autores obtuvieron un buen control de la contaminación en las esporas, aún a los 25 d de incubación. Eskandari y Danesh (2010), utilizaron cloramina T 2% y 2-3 mL de tween 20 durante 10 min, seguido de una solución de estreptomina (0,02%) y gentamicina sulfatada (0,01%) durante 10 min, para la desinfección superficial de *Glomus intraradices* proveniente de un cultivo de trigo, observando porcentajes de contaminación menores al 5% en las esporas tratadas. Muchos estudios se han realizado con esporas de diferentes géneros de HFMA bajo condiciones *in vitro* donde ha sido exitoso la implementación de agentes desinfectantes como la cloramina T, tween20 y la solución de antibióticos (estreptomina y gentamicina sulfatada) en diferentes concentraciones y tiempos de exposición (Dalpé y Declerck, 2002; Fortin *et al.*, 2002; Yinli *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2005; Kandula *et al.*, 2006; Mirabal y Ortega, 2008; Solís-Dominguez *et al.*, 2009; Eskandari y Danesh, 2010). Sin embargo, 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 (Walley y Germida, 1996).

Con la metodología empleada para la desinfección de fragmentos de raíces micorrizadas propuesta por Declerck *et al.* (1998), no se encontró ningún tipo de contaminación al cabo de 2 semanas de incubación, lo cual pudo ser comprobado al inocular los fragmentos sobre un medio rico (MSR) desde el punto de vista nutricional lo cual origina que se presenten contaminantes indeseables que no se expresan en un medio tan pobre como el Agar Agua (Fernández *et al.*, 2005). Estos resultados son similares a otros estudios realizados en la desinfección de fragmentos de raíces con vesículas (Cranenbrouck *et al.*, 2005; Eskandari y Danesh, 2010). Esta técnica ha permitido desarrollar los cultivos monoxénicos de *Glomus intraradices*, Schenck &

Smith y *Glomus vermiforme* Karsten & Berch (Strullu *et al.*, 1997) y dio lugar al estudio del ciclo de vida en *Glomus* spp. (Diop *et al.*, 1994a; 1994b); la producción en masa de miles de propágulos viables (Declerck *et al.*, 1996a) y su atrapamiento en perlas de alginato, que ofrece un nuevo tipo de inóculo de alta calidad, libre de patógenos (Declerck *et al.*, 1996b); así como el estudio del ciclo de vida de *Glomus intraradices* utilizando la técnica de cultivo *in vitro* (Eskandari y Danesh, 2010).

Germinación de esporas y fragmentos de raíces con vesículas del HFMA *Glomus* sp. (GEV02)

En la Tabla 3 se muestra el efecto de las diferentes concentraciones del flavonoide 3,5,7,3',4'-pentahidroxi flavona, sobre la germinación (%) de las esporas y fragmentos de raíces con vesículas. Según el análisis de varianza (GLM) se observan diferencias estadísticas altamente significativas ($P \leq 0,01$) por el efecto que tiene el flavonoide 3,5,7,3',4'-pentahidroxi flavona en la germinación de propágulos infectivos (esporas y fragmentos de raíces con vesículas). Según los resultados de la prueba de rangos múltiples de Tukey, se observa que el tratamiento inoculado con una concentración de 5 μ M, mostró la mayor germinación de esporas (80%) y fragmentos de raíces (33,3%) a los 4 d (Figura 1) y 2 d (Figura 2) respectivamente, después de la incubación (Figura 3). Sin embargo, para todas

Tabla 3. Efecto de las diferentes concentraciones de quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxi flavona) en la germinación de esporas y fragmentos de raíces con vesículas de *Glomus* sp (GEV02).

Fuente de variación	% de Germinación			
	2 días	4 días	8 días	12 días
Esporas				
Tratamientos				
Control	0,0a	0,0b	0,0c	33,3c
Q2 μ M	0,0a	13,3b	46,6b	73,3b
Q5 μ M	0,0a	80,0a	100a	100a
Q8 μ M	0,0a	0,0b	40,0b	93,3b
Coefficiente de variación	-	49,9	24,74	13,33
GLM	ns	**	**	**
Fragmentos de raíces con vesículas				
Tratamientos				
Control	0,0b	0,0b	0,0b	20,0b
Q2 μ M	0,0b	13,3b	13,3b	33,3b
Q5 μ M	33,3a	46,6a	73,3a	80,0a
Q8 μ M	6,6b	13,3b	20,0b	46,6ab
Coefficiente de variación	81,6	54,5	48,4	28,69
GLM	**	**		**

** : Diferencias altamente significativas ($P \leq 0,01$), ns: Diferencias no significativas, de acuerdo con el ANAVA. Letras diferentes indican: Diferencias significativas ($P \leq 0,05$), de acuerdo con la prueba de Tukey.

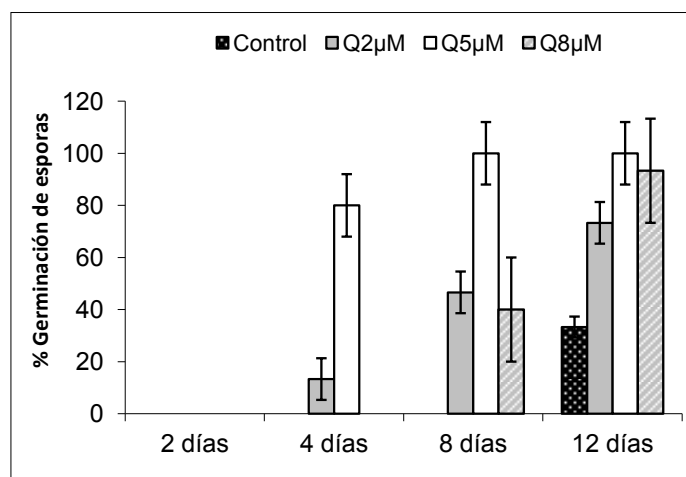


Figura 1. Efecto de las diferentes concentraciones de 3,5,7,3',4'-pentahidroxi flavona comparadas con el control en la germinación de esporas de *Glomus* sp. (GEV02). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$), de acuerdo con la prueba de Tukey.

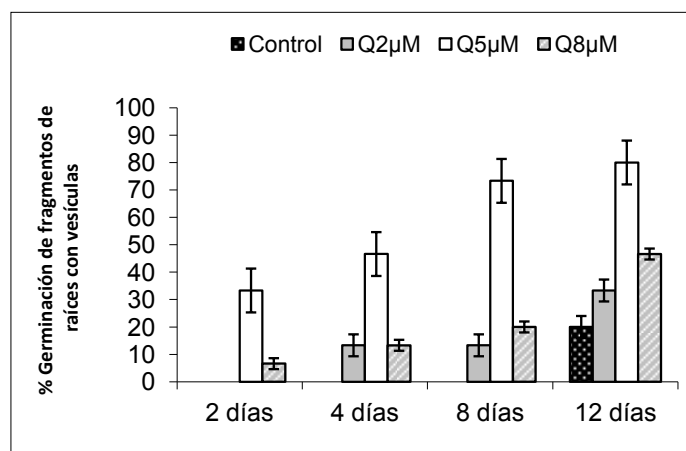


Figura 2. Efecto de las diferentes concentraciones de 3,5,7,3',4'-pentahidroxi flavona comparadas con el control en la germinación de fragmentos de raíces con vesículas de *Glomus* sp. (GEV02). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$), de acuerdo con la prueba de Tukey.

las concentraciones de 3,5,7,3',4'-pentahidroxi flavona evaluadas (2, 5 y 8 μM) se presentó germinación de esporas y fragmentos de raíces. La germinación en el control fue más tardía con respecto a los demás tratamientos, observándose germinación de esporas y fragmentos de raíces con vesículas a los 12 d. Estos resultados demuestran el efecto estimulador del flavonoide 3,5,7,3',4'-pentahidroxi flavona en la germinación de las esporas y crecimiento del tubo germinativo en las vesículas de *Glomus* sp. (GEV02).

Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Tsai y Phillips (1991), en donde obtuvieron las máximas germinaciones en esporas de *G. etunicatum* actualmente *Glomus deserticola* y *G. macrocarpum* con concentraciones de quercetina de 1,0 a 2,5 μM , con una longitud de hifas mayor con respecto al tratamiento control, a partir del tercer día de inoculadas; estos autores observaron que la longitud de la hifa aumentaba su crecimiento en los tratamientos con quercetina bajo condiciones *in vitro*. De este mismo modo Bécard *et al.* (1992), demostraron el efecto estimulante que tiene la quercetina hasta concentraciones de 10 μM en combinación con CO_2 en la germinación de esporas de *Glomus* sp. y *Gigaspora margarita*; observando que todas las esporas germinadas en presencia de quercetina continuaban su crecimiento hasta 42 d. Scervino *et al.* (2005a), determinaron el efecto que tiene la quercetina en el número de puntos de entrada y el porcentaje de la colonización (etapa simbiótica) de raíces de tomate (*Solanum lycopersicum*), por *G. rosea*, *G. margarita*, *G. mosseae* y *G. intraradices*. Estos autores encontraron que el número de puntos de entrada y la colonización de raíces de tomate por *G. rosea* aumentaba cuando se aplicaba una concentración de quercetina de 2 a 8 μM . En contraste estos autores también observaron que la quercetina no tiene ningún efecto sobre el número de puntos de entrada y en el porcentaje de colonización micorrícica en especies de *Glomus*.

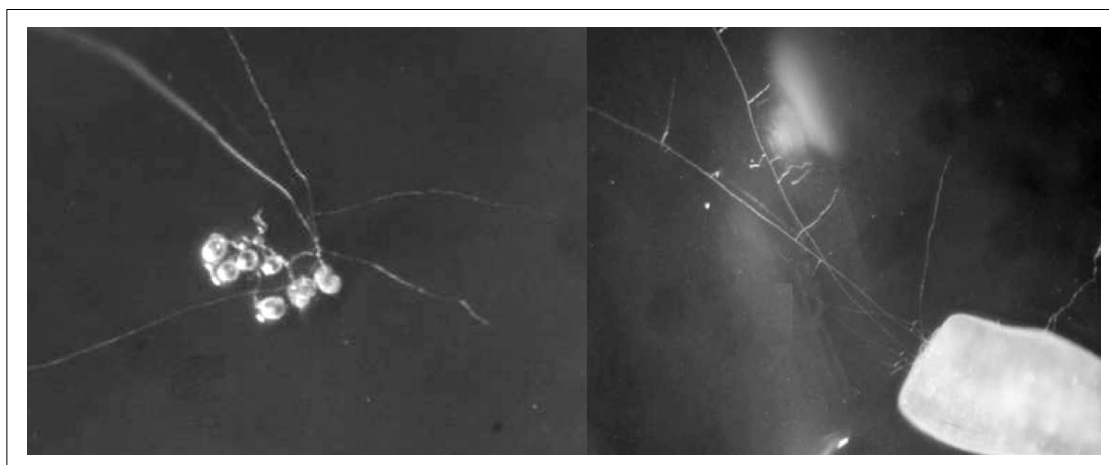


Figura 3. Germinación de propágulos infectivos de *Glomus* sp. (GEV02) después de incubados durante 4 d en medio MSR con 3,5,7,3',4'-pentahidroxi flavona (5 μM). a. Esporas germinadas; b. Fragmentos de raíces con vesículas germinadas.

Muchos estudios se han realizado sobre el efecto de los flavonoides en la etapa pre-simbiótica y simbiótica de los HFMA; la mayoría se han realizado con hongos del género *Gigaspora*, en menor grado con especies de *Glomus* y prácticamente nada con otros géneros (Morandi, 1996; Vierheilig *et al.*, 1998; Scervino *et al.*, 2005a; 2005b; 2006; 2007; 2009). La quercetina es el flavonoide más ampliamente distribuido en las plantas micorrizadas y tienen un efecto positivo en la germinación de las esporas y la longitud de las hifas (Tsai y Phillips, 1991; Bécard *et al.*, 1992; Chabot *et al.*, 1992; Kape *et al.*, 1992; Bel-Rhliid *et al.*, 1993; Poulin *et al.*, 1997).

Vierheilig *et al.* (1998), postulan una cierta especificidad del efecto de la quercetina sobre los HFMA. En un experimento realizado *in vitro* se demostró que el compuesto estimula el crecimiento de las hifas de una especie de *Gigaspora*, pero no de una especie de *Glomus*. Sin embargo, el género o la especies de los HFMA parece ser un importante factor para el efecto del flavonoide en la desarrollo de la simbiosis micorrícica (Vierheilig y Piché; 2002) ya que algunos flavonoides pueden estar involucrados en un solo paso del desarrollo de los HFMA, pero no en el otro, por ejemplo la acetina y rhamnina inhiben el número de puntos de entrada y la colonización de las raíces en tomate por *G. rosea* y *G. margarita* cuando son aplicados en una concentración de 2 a 8 μM (Scervino *et al.*, 2005a). Por otra parte, el flavonoide 3-methoxy-5,6,7,8-hidroxi-4'-hidroxi flavona (NMHTV) no afecta el porcentaje de germinación de las esporas (etapa pre-simbiótica) de *G. rosea*, *G. margarita*, *G. mosseae* y *G. intraradices*; pero si afecta significativamente otros pasos en la etapa pre-simbiótica en esporas de *G. margarita* cuando es aplicado en una concentración de 2 μM , sin embargo, cuando se aplica en

concentraciones de 8 μM inhibe la longitud de las hifas en *G. rosea* (Scervino *et al.*, 2009). Estos resultados indican que los efectos de los flavonoides dependen no sólo del tipo de flavonoide, sino también de su concentración, y que estos podrían estar implicados en el proceso de regulación de los HFMA (Scervino *et al.*, 2005a; 2005b; 2006; 2007; 2009).

CONCLUSIONES

Se estableció un método de desinfección y germinación de propágulos infectivos (esporas y fragmentos de raíces con vesículas), para el HFMA, *Glomus* sp. (GEV02), aislado de cultivos de mora de castilla (*R. glaucus*), que permitió su uso bajo condiciones *in vitro*. Este procedimiento no solo garantizó la ausencia de contaminación y la homogeneidad del proceso germinativo, sino que también posibilitó la obtención de esporas y fragmentos de raíces con vesículas, viables para iniciar colonización de hospedero (germinadas) a solo 4 d de su incubación; permitiendo disponer del 100% de los propágulos del HFMA *Glomus* sp. (GEV02) para ser empleados en estudios posteriores de inoculación de plántulas de mora de castilla (*R. glaucus*) en condiciones *in vitro*.

El procedimiento de desinfección superficial utilizando una combinación de hipoclorito de calcio (1%), cloramina T (2%) + 2 gotas de tween 20, seguido de una solución antibiótica que contenía 200 mg de estreptomina sulfatada y 100 mg de gentamicina sulfatada, fue satisfactorio para la descontaminación de esporas de *Glomus* sp. (GEV02) con un alto nivel de germinación en presencia de 3,5,7,3',4'-pentahidroxi flavona (5 μM), en donde no se encontró ningún tipo de contaminación al cabo de 2 semanas de incubación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akiyama K, Matsuoka H, Hayashi H. 2002. Isolation and identification of a phosphate deficiency-induced C-glycosylflavonoid that stimulates arbuscular mycorrhiza formation in melon roots. *Mol Plant Microbe Interact* 15:334-340.
- Bécard G, Fortin JA. 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol* 108:211-218.
- Bécard G, Piché Y. 1989. Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Appl Environ Microbiol* 55:2320-2325.
- Bécard G, Douds DD, Pfeffer PE. 1992. Extensive *in vitro* hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO₂ and flavonols. *Appl Environ Microbiol* 58(3):821-825.
- Bel-Rhliid R, Chabot S, Piché Y, Chenevert R. 1993. Isolation and identification of flavonoids from Ri T-DNA-transformed roots (*Daucus carota*) and their significance in vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Phytochemistry* 33:1369-1371.
- Boudarga K, Lapeyrie F, Dexheimer J. 1990. A technique for dual vesicular-arbuscular endomycorrhizal/ectomycorrhizal infection of *Eucalyptus in vitro*. *New Phytol* 114:73-76.
- Budi SW, Blal B, Gianinazzi S. 1999. Surface-sterilization of *Glomus mosseae* sporocarps for studying endomycorrhization *in vitro*. *Mycorrhiza* 9:65-68.
- Cranenbrouck S, Voets L, Bivort C, Renard L, Strullu DG, Declerck S. 2005. Methodologies for *in vitro* cultivation of arbuscular mycorrhizal fungi with root organs. En: Declerck S, Strullu DG, Fortin JA, editores. *In vitro* culture of mycorrhizas. Heidelberg, Alemania: Springer-Verlag. pp. 341-375.
- Chabot S, Bel-Rhliid T, Chenevert R, Piché Y. 1992. Hyphae growth promotion *in vitro* of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO₂-enriched conditions. *New Phytol* 122:461-467.
- Dalpé Y, Declerck S. 2002. Development of *Acaulospora rehmi* spore and hyphal swellings under root-organ culture. *Mycologia* 94(5):850-855.
- Declerck S, Strullu D, Plenchette C. 1998. Monoxenic culture of the intraradical forms of *Glomus* sp. Isolated from a tropical ecosystem: a proposed methodology for germoplasm collection. *Mycologia* 90:579-585.
- Declerck S, Strullu DG, Plenchette C. 1996a. *In vitro* mass-production of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus versiforme*, associated with Ri T-DNA transformed carrot roots. *Mycol Res* 100:1237-1242.
- Declerck S, Strullu DG, Plenchette C, Guillemette T. 1996b. Entrapment of *in vitro* produced spores of *Glomus versiforme* in alginate beads: *in vitro* and *in vivo* inoculum potentials. *J Biotechnol* 48:51-57.
- Diop TA, Plenchette C, Strullu DG. 1994a. Dual axenic culture of sheared-root inocula of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with tomato roots. *Mycorrhiza* 5:17-22.
- Diop TA, Plenchette C, Strullu DG. 1994b. *In vitro* culture of sheared mycorrhizal roots. *Symbiosis* 17:217-227.
- Eskandari A, Danesh YR. 2010. Study on life cycle of arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* using *in vitro* culturing technique. *J Phytol* 2(6):69-75.
- Fernández K, Fernández F, Rivera R, Olalde V. 2005. Metodología para la germinación de esporas de *Glomus mosseae*. *Cultivos Tropicales* 28(2):11-16.
- Fortin JA, Bécard G, Declerck S, Dalpé Y, St-Arnaud M, Andrew P, Coughlan AP, Piché Y. 2002. Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. *Can J Bot* 80:1-20.
- Fracchia S, Mujica MT, Garcia-Romera I, Garcia-Garrido JM, Martin J, Ocampo JÁ, Godeas A. 1998. Interactions between *Glomus mosseae* and arbuscular mycorrhizal sporocarp-associated saprophytic fungi. *Plant Soil* 200:131-137.
- Gendermann JW, Nicholson TH. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans Br Mycol Soc* 46:235-244.
- Kape R, Parniske M, Brandt S, Werner D. 1992. Isoliquiritigenin, a strong nod gene- and glyceollin resistance-inducing flavonoid from soybean root exudate. *Appl Environ Microbiol* 58:1705-1710.
- Kandula J, Stewart A, Ridgway HJ. 2006. Monoxenic culture of the arbuscular mycorrhizal fungus *Scutellospora calospora* and Ri-TDNA transformed carrot roots. *New Zealand Plant Protection* 59:97-102.
- Larose G, Chenevert R, Moutoglis P, Gagne S, Piche Y, Vierheilig H. 2002. Flavonoid levels in roots of *Medicago sativa* are modulated by the developmental stage of the symbiosis and the root colonizing arbuscular mycorrhizal fungus. *J Plant Physiol* 159:1329-1339.
- Mirabal Lorelí de los A, Ortega E. 2008. Comunidad microbiana asociada a los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA). *Cultivos Tropicales* 29(4):13-20.
- Morandi D. 1996. Occurrence of phytoalexins and phenolic compounds in endomycorrhizal interactions, and their potential role in biological control. *Plant Soil* 185:241-25.
- Mosse B, Hepper CM. 1975. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organ cultures. *Physiol Plant Pathol* 5:215-223.
- Mugnier J, Mosse B. 1987. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in transformed Ri T-DNA roots grown axenically. *Phytopathol* 77:1045-1050.
- Nogales AM. 2006. Estudio de la interacción entre el hongo formador de micorrizas arbusculares *Glomus intraradices* Schenck & Smith y el hongo patógeno *Armillaria mellea* (Vahl:fr) P. Kuhn en Vid [tesis de doctorado]. Barcelona, España: Facultad de Biología, Universidad de Barcelona.
- Phillips DA, Tsai SM. 1992. Flavonoids as plant signals to the rhizosphere microbes. *Mycorrhiza* 1:55-58.
- Poulin MJ, Simard J, Catford JG, Labrie F, Piché Y. 1997. Response of symbiotic endomycorrhizal fungi to estrogens and antiestrogens. *Mol Plant Microbe Interact* 10:481-487.
- Rai MK. 2001. Current advances in mycorrhization in micropropagation. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37:158-167.
- Scervino JM, Ponce MA, Erra-Bassells R, Vierheilig H, Ocampo JA, Godeas A. 2005a. Flavonoids exhibit fungal species and genus specific effects on the presymbiotic growth of *Gigaspora* and *Glomus*. *Mycol Res* 109(7):789-794.
- Scervino JM, Ponce MA, Erra-bassells R, Vierheilig H, Ocampo JM, Godeas A. 2005b. Arbuscular mycorrhizal colonization of tomato by *Gigaspora* and *Glomus* species in the presence of root flavonoids. *J Plant Physiol* 162:625-633.
- Scervino JM, Ponce MA, Erra-Bassells R, Vierheilig H, Ocampo JÁ, Godeas A. 2006. Glycosidation of apigenin results in a loss of activity on different growth parameters of arbuscular mycorrhizal fungi from the genus *Glomus* and *Gigaspora*. *Soil Biol Biochem* 38:2919-2922.
- Scervino JM, Ponce MA, Erra-bassells R, Bompadre J, Vierheilig H, Ocampo JM, Godeas A. 2007. The effect of flavones and flavonols on colonization of tomato plants by arbuscular mycorrhizal fungi of the genera *Gigaspora* and *Glomu*. *Can J Microbiol* 53:702-709.

- Scervino MJ, Ponce MA, Monica DI, Vierheilig H, Ocampo JA, Godeas, A. 2009. Development of arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of different patterns of *trifolium repens* shoot flavonoids. *Rev Cienc Suelo Nutr / J Soil Sci Plant Nutr* 9(2):102-115.
- Solís-Domínguez FA, Alarcón A, Ferrera-Cerrato R, Salvador-Figueroa M, Espinosa-Victoria D, Cárdenas-Soriano E. 2009. Hacia el cultivo monoxénico de *Glomus claroideum* en raíces transformadas de zanahoria. *Terra Latinoam* 27(1):35-41.
- St-Arnaud M, Hamel C, Vimard B, Caron M, Fortin JA. 1996. Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in absence of host roots. *Mycol Res* 100:328-332.
- Strullu DG, Diop TA, Plenchette C. 1997. Réalisation de collections *in vitro* de *Glomus intraradices* (Schenck et Smith) et de *Glomus versiforme* (Karsten et Berch) et proposition d'un cycle de développement. *C R Acad Sci Paris* 320:41-47.
- Strullu DG, Romand C. 1986. Méthode d'obtention d'endomycorrhizes à vésicules et arbuscules en conditions axéniques. *C R Acad Sci Paris* 303:41-47.
- Tsai SM, Phillips DA. 1991. Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores *in vitro*. *Appl Environ Microbiol* 57:1485-1488.
- Vierheilig H, Bago B, Albrecht C, Poulin MJ, Piche Y. 1998. Flavonoids and arbuscular-mycorrhizal fungi. *Adv Exp Med Biol* 439:9-33.
- Vierheilig H, Piche Y. 2002. Signalling in arbuscular mycorrhiza: facts and hypotheses. *Adv Exp Med Biol* 505:23-39.
- Walley FL, Germida JJ. 1996. Failure to decontaminate *Glomus clarum* NT4 spores is due to spore wall-associated bacteria. *Mycorrhiza* 6:43-49.
- Yinli Bi, Xiaolin Li, Honggang Wang, Peter Christie. 2004. Establishment of monoxenic culture between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus sinuosum* and Ri T-DNA-transformed carrot roots. *Plant Soil* 261:239-244.