

# Observaciones del micelio extramátrico de las micorrizas vesículo-arbusculares al microscopio electrónico de barrido

MARÍA O. OROZCO, CLEMENTE FERNÁNDEZ, ZDENEK PRIKRYL, VLASTIMIL VANCURA, y RICARDO A. HERRERA

## RESUMEN

Muestras de micorrizas de *Hibiscus elatus* Sw. + *Gigaspora margarita* Becker et Hall, o *Glomus fasciculatum* (Thaxter sensu Gerd.) Gerd. et Trappe, fueron cuidadosamente lavadas para eliminar el suelo, y a continuación el micelio externo fue separado utilizando un microscopio estereoscópico bajo condiciones estériles. El micelio fue procesado para realizar observaciones en un microscopio electrónico de barrido, utilizando las técnicas descritas previamente por otros autores. Se muestra la presencia de bacterias sobre la superficie de las hifas VA.

## 1. INTRODUCCIÓN

Entre los factores ecológicos que rigen la actividad biológica subterránea ocupa la atención de numerosos investigadores el estudio de las relaciones existentes entre las micorrizas vesículo-arbusculares (VA) y otros microorganismos de la rizosfera. Sólo conociendo estas relaciones será posible la utilización generalizada de estos hongos VA como biofertilizantes en la agricultura moderna.

En este contexto, la existencia de una hifosfera micorrízica (HERRERA *et al.*, 1981) resulta de especial interés, por lo que hemos iniciado su estudio con el objetivo de conocer las características de esta asociación.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

El micelio extramátrico VA fue separado de raicillas micorrízicas de *Hibiscus elatus* Sw. (majagua) después de constatar el estado saludable de las plantas. Fueron colectadas dos muestras; la primera había sido cultivada en un subsuelo amarillo arcilloso (pH = 4,5) e inoculada con una cepa cubana de *Gigaspora margarita* Becker

M. O. Orozco y R. A. Herrera pertenecen al Instituto de Botánica de la Academia de Ciencias de Cuba. C. Fernández, pertenece a la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad de La Habana. Z. Prikryl y V. Vancura pertenecen al Instituto de Microbiología de la Academia de Ciencias de Checoslovaquia (Praga).

et Hall (A. Ferrer y otros, inédito).<sup>1</sup> La segunda, había sido cultivada en un suelo rojo ferralítico arcilloso (pH = 8,5) e inoculada con una cepa italiana (Turín) de *Glomus fasciculatum* (Thaxter sensu Gerd.) Gerd. et Trappe, facilitada por la Dra. Vivienne Gianinazzi-Pearson. Al momento de la colecta, las plantas inoculadas con *G. margarita* tenían 8 meses de edad; las otras, 4 meses.

Después de lavar tres veces muy cuidadosamente con agua destilada estéril para eliminar el exceso de suelo adherido, las raicillas fueron examinadas al microscopio estereoscópico con el fin de separar de las mismas el micelio extramático. A continuación, el micelio fue procesado para su observación al microscopio electrónico de barrido, utilizando para ello las técnicas de uso común en este sentido (BROWN y KING, 1982).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Lám. I muestra la presencia de bacterias en la superficie de las hifas VA pertenecientes a *G. margarita* (Lám. I-A) y a *G. fasciculatum* (Lám. I-B-C). El tratamiento de las muestras para ser observadas en el microscopio de barrido seguramente arrastró gran cantidad de microorganismos de la superficie de las hifas. Esto lo demuestra el hecho de que, tratadas por otras técnicas menos drásticas (coloración de Gram u otras) para observaciones al microscopio compuesto, las hifas muestran colonias superficiales de microorganismos y no individuos aislados (observaciones personales y fig. 1 en ROOS y DANIELS, 1982).

En la Lám. I-C se observan las hifas entrecruzadas y restos de materia orgánica amorfa constituida posiblemente por mucílago producido por la planta y los microorganismos. También se observan otros restos orgánicos semidescompuestos. Las bacterias embebidas en las sustancias mucilaginosas indican la preferencia de las mismas por estas zonas (ROVIRA y CAMPBELL, 1974) y constituyen un dato interesante en el estudio de las poblaciones microbianas del suelo.

La presencia de bacterias sobre la superficie de las hifas sugiere la existencia de posibles asociaciones de las micorrizas VA con otros microorganismos del suelo, a través de una hifosfera micorrízica. Estas asociaciones podrían explicar el sinergismo encontrado cuando se inoculan simultáneamente bacterias solubilizadoras de fósforo y hongos micorrizógenos VA (AZCÓN *et al.*, 1975), y, a su vez, podrían dar respuesta al gran incremento del contenido de fósforo encontrado en las plantas inoculadas. De igual forma se han reportado interacciones entre *Azotobacter* y hongos VA (BAGYARAJ y MENGE, 1978). Una revisión más completa acerca de las interacciones sinérgicas de las micorrizas VA y otros microorganismos fue realizada por BAREA y AZCÓN-AGUILAR (1982).

<sup>1</sup> "Crecimiento de *Hibiscus elatus* Sw. (majagua) y *Cedrella mexicana* M. J. Roem (cedro) inoculados con distintas cepas de hongos micorrizógenos vesículo-arbusculares", trabajo en preparación.

La presencia de colonias bacterianas sobre las hifas VA se ha reportado en pocos casos (HERRERA *et al.*, 1981; ROSS y DANIELS, 1982) y también ha sido interpretada en formas diferentes. ROSS y DANIELS (1982) se refirieron a estas colonias como posibles hiperparásitos, aunque no descartaron su probable condición de microorganismos beneficiosos o antagonistas. Nosotros hemos observado hifas similares a las de la Lám. I en ROSS y DANIELS (1982) y tal abundancia de colonias, de ser generalizada a todo el micelio extramático, seguramente produciría algún daño al crecimiento de la planta, si fueran parásitas.

Por todo esto creemos que la función y presencia de dichas colonias sería mejor explicadas considerando que ellas realizan alguna acción cuyo producto es removido constantemente por las hifas hacia las raicillas, y esta eliminación de tal producto en los alrededores de la colonia, a su vez, estimularía la continuación de la acción realizada por la última. Vista así la asociación, la colonia y la hifa establecerían seguramente un intercambio de metabolitos y, por tanto, estaríamos en presencia de una "hipersimbiosis." Tal mecanismo podría ser posible siempre que la hifosfera micorrízica estuviera constituida por hifas VA y colonias de microorganismos mineralizadores o solubilizadores de fósforo o azufre; o por fijadores de nitrógeno, de vida libre.

El extraordinario incremento que promueven las micorrizas VA, principalmente en la absorción de fósforo (HAYMAN y MOSSE, 1972; BLACK, 1978; OCAMPO, 1980), ha determinado la profundización de las investigaciones acerca de la fisiología de este fenómeno. Aunque existen diversas opiniones al respecto, la idea más aceptada sugiere que las micorrizas VA mejoran la absorción de fósforo para las plantas a través del micelio extramático (OCAMPO, 1980), aceptándose que la red de hifas externas permite a la raíz incrementar su superficie de absorción y explorar un volumen de suelo mucho mayor que el explorado por las raicillas no micorrízicas (BORIE y BAREA, 1981).

Un ejemplo evidente de la idea expresada en el párrafo anterior aparece en la Lám. II. En la Lám. II-A es claramente apreciable la ausencia de micelio extramático VA; sólo se destacan los pelos radicales que, al parecer, no sufrieron notables deformaciones durante el procesamiento de las raíces, y también se observan numerosas partículas de suelo adheridas a la superficie de las mismas.

La Lám. II-B muestra una raicilla infectada con *G. fasciculatum* y en ella puede observarse la abundante red de absorción que constituye el micelio extramático y el notable aporte a la nutrición de la planta cuando se compara con raicillas no infectadas (Lám. II-A). Consideramos que el extraordinario aumento en la absorción de elementos nutritivos en

plantas micorrízicas, tanto en condiciones de laboratorio como en experimentos de campo y comúnmente en los ecosistemas naturales terrestres, se explica por el aumento en superficie de absorción que constituye el micelio extramático, por la exploración que éste hace de lugares remotos hasta donde no pueden llegar las raicillas o pelos radicales por sí mismos, y, en última instancia, por la explotación de fuentes no accequibles para la planta (partículas insolubles de fosfatos u otros nutrientes, y materia orgánica en descomposición). HERRERA y JORDAN (1981) han demostrado la capacidad de las raíces micorrízicas para tomar el fósforo, el nitrógeno, y otros nutrientes directamente de la materia orgánica en descomposición, en los bosques venezolanos. Este fenómeno podría también ocurrir en los bosques de Cuba, donde se ha observado la presencia de abundante micelio extramático en restos de madera u otras formas de materia orgánica en descomposición (María Rodríguez, comunicación personal).

Con nuestras observaciones hemos podido comprobar la presencia de bacterias en la superficie de las hifas del micelio extramático de dos endófitos VA. Aunque debemos continuar con el análisis de un mayor número de muestras, los ensayos preliminares para cultivar los microorganismos de la hifosfera micorrízica han dado buenos resultados. La caracterización general de 17 cepas aisladas, aún no identificadas, de la hifosfera de *H. elatus* + *G. margarita*, y 30 de *H. elatus* + *G. fasciculatum*, se prepara actualmente para publicar. Todos los microorganismos aislados de la hifosfera hasta el momento han sido bacterias Gram negativas y probables actinomicetos. Los ensayos en el laboratorio y los experimentos con plantas permitirán conocer las características de las asociaciones de las micorrizas VA y otros microorganismos del suelo.

## RECONOCIMIENTO

Agradecemos la colaboración brindada por los departamentos de Microscopía Electrónica del CENIC, en Cuba, y del Instituto de Microbiología de la Academia de Ciencias de Checoslovaquia, sin la cual no hubiese sido posible la realización de este trabajo. También agradecemos a la Fundación Internacional para la Ciencia (IFS) la ayuda brindada a uno de los autores (R. A. Herrera), que ha facilitado la realización del presente trabajo. Por último, damos las gracias a la Srta. Estrella Macías por el cuidadoso trabajo mecanográfico realizado.

## REFERENCIAS

- AZCÓN, R., BAREA, J. M., y HAYMAN, D. S. (1975): Utilization of rock phosphate in alkaline soils by plants inoculated with mycorrhizal fungi and phosphate solubilizing bacteria. *Soil Biol. Biochem.*, 18:135-138.
- BAGYARAJ, D. J., y MENGE, J. A. (1978): Interaction between a VA mycorrhiza and *Azotobacter* and their effects on rhizosphere microflora and plant growth. *New Phytol.*, 80:567-573.
- BAREA, J. N., y AZCÓN-AGUILAR, C. (1982): Interactions between mycorrhizal fungi and soil microorganisms. En *Les mycorrhizes: biologie et utilisation, Les colloques de l'INRA, Dijon, 5-6 mai, 1982*, 13:181-193.

- BLACK, R. L. B. (1978): The role of mycorrhizal symbiosis in the nutrition of tropical plants. *IFD Provisional Report No. 1*, Kumasi, Ghana, 1978, pp. 73-86.
- BORIE, F., y BAREA, J. M. (1981): Ciclo del fósforo. II. Papel de los microorganismos y su repercusión en la nutrición vegetal. *An. Edafol. Agrobiol.*, 40: 2365-2381.
- BROWN, M. F., y KING, E. J. (1982): Electron microscopy of micorrhizae. En *Methods and principles of mycorrhizal research* (N. C. Schenck, ed.), The American Phytopathological Society, USA, pp. 201-217.
- HAYMAN, D. S., y MOSSE, B. (1972): The role of vesicular-arbuscular mycorrhiza in the removal of phosphorus from soil by plant roots. *Rev. Ecol. Biol.*, 9:463-470.
- HERRERA, R. y JORDAN, C. F. (1981): Nitrogen cycle in a tropical Amazonian rain forest: the caatinga of low mineral nutrient state. En *Terrestrial nitrogen cycles* (F. E. Clark y E. T. Rosswall, eds.), *Ecol. Bull.*, Stockholm, 33:493-505.
- HERRERA, R. A., RODRÍGUEZ, M., OROZCO, M. O., y FERRER, R. L. (1981): *About the presence of an hyphosphere on the extramatrical mycelia of vesicular-arbuscular mycorrhizae*. Fifth NACOM, Program and Abstracts, Université Laval, Québec, Canada, p. 17.
- OCAMPO, J. A. (1980): Micorrizas VA. III. Ecología. *An. Edafol. Agrobiol.*, 39: 1071-1088.
- ROSS, J. P., y DANIELS, B. A. (1982): Hyperparasitism of endomycorrhizal fungi. En *Methods and principles of mycorrhizal research* (N. C. Schenck, ed.), The American Phytopathological Society, USA, pp. 55-58.
- ROVIRA, A. D., y CAMPBELL, R. (1974): Scanning electron microscopy of microorganisms on the roots of wheat. *Microbial Ecol.*, 1:15-23.

#### ABSTRACT

Mycorrhizae of *Hibiscus elatus* Sw. + *Gigaspora margarita* Becker et Hall, or *Glomus fasciculatum* (Thaxter sensu Gerd.) Gerd. et Trappe, were carefully washed out of soil, and external mycelia picked up using a dissecting microscope under sterile conditions. The mycelia were processed for scanning electron microscope observations as previously described by other authors. The occurrence of bacteria on the surface of VA hyphae is shown.