

Métodos de tinción para identificación de estructuras producidas por HMA en raicillas de *Coriandrum sativum* y *Allium fistulosum*

Staining methods for identification of structures produced by HMA in rootlets of *Coriandrum sativum* and *Allium fistulosum*

Chica-Toro Fáber¹
Gómez-García Mayra²

Resumen

Existen varios métodos de tinción de tejidos en raicillas para la identificación de estructuras simbiotas con hongos (micorrizas). Algunos de estos son costosos, toman mucho tiempo y resultan nocivos para la salud de quienes desarrollan sus protocolos. Este trabajo presenta una alternativa de tinción para teñir e identificar las estructuras micorrizogénicas menos costosa, rápida e inocua, a base de una solución con tinta Parker®-vinagre.

Palabras clave: Tinción, fuscina ácida, tinta, vinagre, HMA.

1 I. A. M. Sc. Docente de tiempo completo Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Oriente. fchica@uco.edu.co

2 Agrónoma. Universidad Católica de Oriente. mfgomezgarcia@gmail.com

Abstract

Several methods for tissue staining in rootlets structures for identifying symbionts with fungi (mycorrhiza). Some of these are costly, take a long time and are harmful to the health of those who develop their protocols. This paper presents an alternative to dye staining and identify micorrizogénicas less costly structures, fast and safe, a solution-based ink-Parker®-vinegar.

Key words: Staining, acid fuchsin, ink, vinegar, HMA.

Introducción

A partir de la revolución verde el hombre ha creado sistemas altamente eficientes en términos de producción de biomasa vegetal por unidad de área. Ello ha desencadenado la adopción de técnicas para crear medios casi artificiales, en los cuales se diseñan condiciones de alto subsidio energético para las plantas cultivadas con fines comerciales. Sin embargo, muchas de estas metodologías han generado desequilibrio en el comportamiento, principalmente de la microbiota edáfica. Después de casi seis décadas las investigaciones han retornado al concepto de utilizar el equilibrio natural para obtener óptimos resultados. Es así como el uso de «micorrizas» en el sector agrícola ha sido promocionado como un producto a base de hongos micorrizoarbusculares (HMA), capaces de establecer asociaciones simbióticas mutualistas entre un hongo y células vivas de la raíz, sobre todo en células corticales y epidérmicas, encaminadas a una agricultura más amigable con el medio ambiente. Los hongos reciben nutrientes orgánicos de la planta a la vez que mejoran la absorción de agua y minerales; en general, el mayor beneficio consiste en que las micorrizas aumentan la zona de exploración de la raíz mediante la producción de hifas de los hongos que infectan la planta, reciclando muchos de los nutrientes en el suelo, que en condiciones normales se pierden por lixiviación. Adicionalmente, Coyne (2000) argumenta que está plenamente comprobado que se requiere de las micorrizas como parte fundamental en

el incremento del proceso de absorción de nutrientes, como por ejemplo el P, entre otros. Una de la simbiosis más estudiada es la efectuada por plantas y hongos micorrizoarbusculares (HMA). Varios autores (Bolan, 1991; Salisbury y Ross, 1992; Coyne, 2000) argumentan que esta relación la presentan de forma natural cerca del 95 % y hasta un 97 % de las especies vegetales. Este descubrimiento ha llevado a que actualmente muchas investigaciones se encaminen a dilucidar su funcionamiento y encontrar la mejor manera de aprovechar esta circunstancia para incrementar, entre otros aspectos, el rendimiento de los cultivos (Azcón-Aguilar y Barea 1997; Moreno, 1988; Harrier y Watson, 2003; Agudelo *et al.*, 2004; Tahuico-Reyes, 2005; González-Vizcaíno *et al.*, 2009). Una de las técnicas más empleadas para la identificación de estructuras simbiotes, es el método propuesto por Kormanik y McGraw (1982). El proceso inicialmente decolora los tejidos con KOH (Phillips y Hayman, 1970), seguidamente se tiñen o colorean las raicillas para su posterior identificación. Para este segundo paso usualmente se usa la fuscina ácida como colorante. Sin embargo, Combes y Haveland-Smith (1982) indican la peligrosidad de utilizar esta sustancia reportada como agente carcinógeno. Adicionalmente la metodología de tinción que usa la fuscina ácida requiere de aproximadamente 72-92 horas. En los últimos años se han empleado técnicas más limpias y económicas, por ejemplo Vierheilig, Coughlan,

Wyss y Piche (1998) realizaron tinción de raicillas en *Phaseolus vulgaris* L., *Glycine max* L., *Cucumis sativus* L., *Zea mays* L., *Tritium aestivum* L., *Hordeum vulgare* L. y *Lolium perenne* L. El estudio reporta la identificación exitosa de estructuras micorrizogénicas (hifas, vesículas y arbuscúlos) a partir del uso, como agente colorante, de una solución con tinta Sheaffer® negra y vinagre.

El objetivo de esta investigación fue el de comparar dos métodos de tinción con dos agentes colorantes, tinta Parker®-vinagre y fuscina ácida; en dos especies vegetales, cilantro (*Coriandrum sativum*), y cebolla junca (*Allium fistulosum* L.).

Materiales y métodos

1. Obtención de raicillas. Para obtener raicillas con estructuras de HMA se sembraron en canecas, con 20 kg de sustrato previamente desinfectado, plántulas de cilantro (*Coriandrum sativum*), especie reportada como micorrizo-dependiente por Chica *et al.* (2009) y cebolla junca (*Allium fistulosum* L.). Al momento del trasplante se inoculó cada plántula con 10 g de un producto comercial a base de *Glomus* spp., *Entrophospora* spp. y *Scutellospora* spp., que según los mismos autores es dosis suficiente para generar estructuras en raicillas de cilantro. Se realizó una fertilización 25 días después del trasplante con 5 g 15-15-15 planta-1 y se proporcionó riego cada 3 días. La cosecha de ambas especies se realizó a los 50 días después del trasplante. Este protocolo se llevó a cabo bajo condiciones de invernadero.

2. Tinción. Las muestras para teñir se obtuvieron cortando las raicillas de cada especie en fragmentos de un centímetro. Luego se procedió a realizar la tinción por los dos métodos.

2.1 Tinta Parker®. Para realizar este proceso se utilizó la metodología de clarificación y tinción descrito por Vierhejlig *et al.* (1998), modificado con tinta Parker® como solución para la tinción.

2.2 Fuscina ácida. La metodología utilizada fue la propuesta por Kormanik y McGraw, (1982), la cual se basa en un aclaramiento o blanqueo, acidificación, tinción y eliminación de excesos de colorante.

Resultados

En las figuras 1, 3 y 5 se observa la presencia de estructuras micorrizogénicas producto de la tinción con solución tinta Parker®-vinagre. En las figuras 2, 4 y 6 se observa la presencia de estructuras micorrizogénicas producto de la tinción con fuscina ácida. Los resultados obtenidos bajo la metodología de tinción con solución tinta Parker®-vinagre presentan mayor claridad en las estructuras presentes (hifas, vesículas y esporas), en comparación con iguales estructuras observadas bajo tinción con fuscina ácida. Con la utilización de la solución tinta Parker®-vinagre el tiempo requerido es de aproximadamente 1 hora. Otro aspecto a tener en cuenta a favor de la utilización de la solución mencionada es el costo. 1 cm³ de fuscina ácida puede estar alrededor de los US 4,4, y 1 cm³ de tinta Parker®-vinagre está alrededor de US 0,2 (tasa representativa del mercado a julio 4 de 2012 de \$1.770=, Portafolio, 2012).

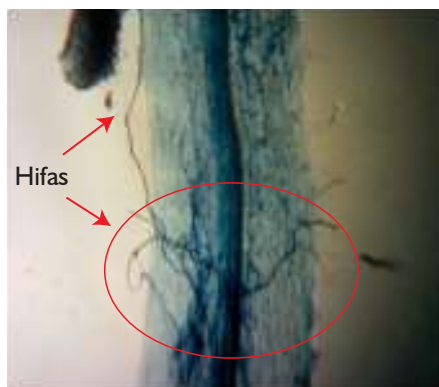


Figura 1. Hifas en cilantro (*Coriandrum sativum*) 10X Por: Cristian Jiménez. 13 de junio de 2012. UCO.

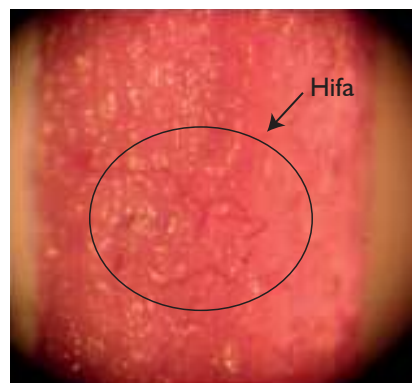


Figura 2. Hifas en cilantro (*Coriandrum sativum*) 10X Por: Gómez-García Mayra. 21 de junio de 2012. UCO.

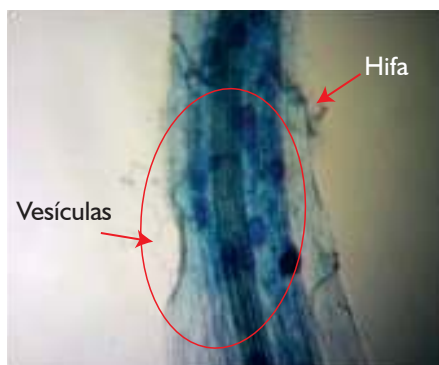


Figura 3. Hifas y vesículas en cilantro (*Coriandrum sativum*) 10X Por: Cristian Jiménez. 13 de junio de 2012. UCO.

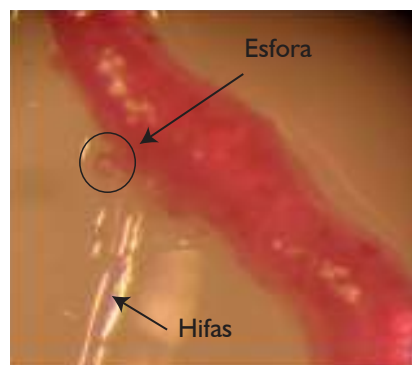


Figura 4. Esporas e hifas en cilantro (*Coriandrum sativum*) 10X Por: Gómez-García Mayra. 21 de junio de 2012. UCO.



Figura 5. Miscelio y vesículas en cebolla (*Allium fistulosum*) 40X Por: Gómez-García Mayra. 13 de junio 2012. UCO

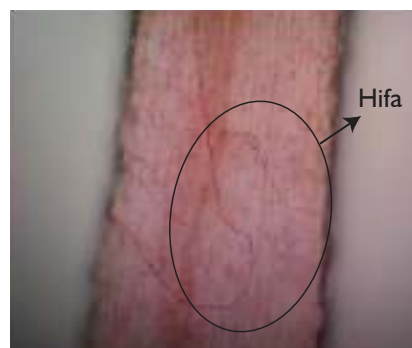


Figura 6. Hifa en cebolla (*Allium fistulosum*) 40X Por: Gómez-García Mayra. 13 de junio 2012. UCO

Conclusión

La tinción con solución de tinta Parker®-vinagre es una alternativa económica, limpia, eficaz y ágil para la identificación de estructuras micorrizogénicas en cilantro (*Coriandrum sativum*) y cebolla junca (*Allium fistulosum* L.).

Referencias bibliográficas

- Agudelo B., Mará y Casierra-Posada, Fanor. (2004). Efecto de la micorriza y gallinaza sobre la producción y la calidad de cebolla cabezona (*Allium cepa* L. "Yellow granex"). *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 57 (1). Medellín-Colombia.
- Azcón-Aguilar, C. y Barea, J. M. (1997). Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: Significance and potentials. *Scientia Horticulturae* (68), 1-24.
- Bolan, N. S. (1991). A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant and Soil*. 134, 189-293.
- Chica-Toro, F., Bula, M. R., Morales H., L. y Vargas, M. O. (2009). Colonización de hongos micorrizógenos en cilantro (*Coriandrum sativum*). *Revista Universidad Católica de Oriente*, (28), 25-32.
- Combes, R. D. y Haveland-Smith, R. B. (1982). A review of the genotoxicity of food, drugs and cosmetic colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes. *Mutat. Res.* (98), 101-248.
- Coyne, Mark. (2000). *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio*. Madrid: Paraninfo.
- Harrier, L. A. y Watson, C. A. (2003). The role of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable cropping systems. *Advances in Agronomy*. (20), 185-225.
- González-Vizcaíno, A. et al. (2012). Potencial biofertilizante de micorriza arbusculares en cultivo ecológico en invernaderos. Recuperado de http://www.agroecologia.net/SEAErecursos-publicacionescdscongresosactasbullasseae_bu-llasverdposters9%20P.%20FERfer17.pdf
- Indicadores de moneda. (4, junio, 2013). *Portafolio*. Recuperado de: <http://www.portafolio.co/indicadores/monedas/>.
- Kormanik, P. P., McGraw, A. C. y Schultz, R. C. (1980). Procedure and equipment for staining a large number of plant samples for endomycorrhizal assay. *Can. J. Microbiol.* (26), 536-538.
- Moreno D., Patricia. (1988). Inoculación de micorrizas MVA en papa (*Solanum tuberosum*) respuesta en el crecimiento y nutrición de plantas inoculadas en invernadero y en campo. *Revista Latinoamericana de la Papa*. (1), 84-103. Lima-Perú.
- Phillips, J. M. y Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* (55), 158-161.
- Salisbury, F. B. y Ross, C. W. (1992). *Fisiología vegetal*. México: Iberoamérica.
- Tahuico Reyes, José S. (2005). *Respuesta de la caña de azúcar a la inoculación con micorrizas vesículo arbusculares en el ingenio Tres Valles, Honduras*. [Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar al título de ingeniero agrónomo en el grado académico de licenciatura]. Zamorano-Honduras. En: [http://zamo-oti-02.zamorano.edu/asp/getFicha.asp?glx=79744.glx&recnum=12&skin=&maxrecnum=12&searchString=\(@buscable%20S\)%20and%20\(@encabezamiento%20MICORRIZAS%20and%20ARBUSCULARES%20and%20VESICULARES\)&orderBy=](http://zamo-oti-02.zamorano.edu/asp/getFicha.asp?glx=79744.glx&recnum=12&skin=&maxrecnum=12&searchString=(@buscable%20S)%20and%20(@encabezamiento%20MICORRIZAS%20and%20ARBUSCULARES%20and%20VESICULARES)&orderBy=).
- Vierheilig, H.; Coughlan, A. P.; Wyss, U. y Piché, Y. (1998). Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (12), 5004-5007.