

POBLACIONES ENDOSIMBIONTES ASOCIADAS A ESPORAS NATIVAS DE GLOMEROMYCETES, EN DOS ESTRATOS DEL SUELO DE UN BOSQUE TROPICAL

Rigel Fernández Valle¹, Marcia E. Medina Viera² y Eduardo F. Furrázola Gómez²

RESUMEN

Hasta la fecha, se desconoce la función fisiológica de los endosimbiontes de esporas de hongos micorrizas arbusculares (HMA). Aun no se define el modo de transmisión de los mismos. Dado que los turrículos de lombriz de tierra (TUR) son considerados “puntos calientes de biodiversidad”. Nos propusimos comparar las poblaciones de grupos funcionales de bacterias endosimbiontes (GFBE) de esporas de HMA. Fundamentalmente pretendemos relacionar un supuesto modo de transmisión horizontal entre el TUR y el suelo subyacente (SS) a estas excretas de lombriz de tierra. Se colectaron cinco muestras durante la estación seca, en un bosque secundario de La Reserva de la Biosfera Sierra del Rosario, Cuba. Se determinó el biovolumen de esporas y la masa de micelio externo de HMA. Se cuantificaron las poblaciones de heterótrofos y diazótrofos totales, así como las de solubilizadores de fósforo. Se observó que los GFBE presentan mayores poblaciones en el SS. Las poblaciones de heterótrofos totales, resultaron predominar por encima de las de diazótrofos y solubilizadores de fósforo, en ese orden para ambos estratos. Nuestros resultados no confirman, ni rechazan el fenómeno micostático. Sin embargo, confirman la presencia de comunidades de bacterias endosimbiontes que se encuentran en estrecha interdependencia con la planta y el hongo. La hipótesis de que una transmisión horizontal de endosimbiontes, indicaría mayores poblaciones dentro de las esporas en TUR, es descartada según nuestro diseño. La dinámica observada en las poblaciones de GFBE de ambos estratos, convoca a nuevos desafíos en el estudio de la fisiología de los microorganismos endosimbiontes.

Palabras claves: Micorriza, endosimbiosis, lombriz de tierra

Endosymbiotic population asociated to native spore of Glomeromycetes in two layers of soil in one tropical forest

ABSTRACT

Up to now, still remain unknown the physiological function of spore's endosymbiotic bacteria from arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). Neither is defined their way of transmission. Since earthworm's casting (EWC) are regarded as truly “hot spots of biodiversity”. We purposed to balance the populations of three functional groups of endosymbiotic bacteria (FGEB) to spores of AMF, amongst the EWC and the nearby soil (NS), in order to relate

M.Sc Rigel Fernández Valle, Investigador Agregado del Instituto de Sanidad Vegetal (INISAV-MINAG).
Calle 110 e/e 5ta E y 5ta F ,CP 11300, Playa, Ciudad de La Habana Cuba.

²Instituto de Ecología y Sistemática (IES-CITMA). Carretera. de Varona km 3,5. Capdevila, Boyeros, A. P. 8029,
La Habana 10800, Cuba.

✉ rfernandez@inisav.cu

them with a supposed way of horizontal transmission. We collect five samples during the dry season in a secondary forest from the Biosphere's Reserve, Sierra del Rosario, Cuba's western. We assess the spore's biovolume and the mycomass of AMF external mycelium. Also, we quantified the endosymbiotic populations of total's heterotrophic, diazotrophic and phosphate solubilizer's bacteria as well. We found that FGEB had highest populations in the NS. Phosphate solubilizer's bacteria were smaller than total's heterotrophic and diazotrophic populations within both soil's layers, in that order. Despite our results do not confirm, and neither reject the mycostatic phenomenon, we're convinced to the presence of such endosymbiotic community. Furthermore, we are almost sure of a tight interdependence within bacteria, plants and AMF. According with our design we refuse the horizontal's transmission hypothesis, which would indicate a supposed higher population of endosymbiotic bacteria inside the spores of EWC. Results achieved about functional groups of endosymbiotic bacteria on both soil's layer; encourage us towards new challenges to follow studying the physiology of such endosymbiotic microorganisms.

Key words: Mycorrhiza, endosymbiosis, earthworm

INTRODUCCIÓN

Las lombrices de tierra y los hongos micorrizas arbusculares (HMA), son indicadores de calidad en suelos de diferentes ecosistemas. Sus poblaciones generalmente disminuyen en el orden, ecosistemas naturales, agroecosistemas de bajos insumos, y de altos insumos (Sieverding, 1991; Fragoso *et al.*, 1999). Paralelamente, ambas promueven la formación de agregados de suelo y contribuyen con sus exudados o excretas al incremento del número de bacterias en la rizosfera (Rillig *et al.*, 1999). De igual modo, favorecen el crecimiento y desarrollo vegetal (Truffen *et al.*, 2002; Wurst *et al.*, 2004). Sin embargo, es escaso el conocimiento sobre la relación que existe entre la drilosfera (Bouché, 1975, Lavelle, 1984) y la micorrizosfera (Rambelli, 1973), particularmente en los bosques tropicales.

Algunos autores como Tiwari y Mishra (1993), Gange (1993), han tratado esta relación. No obstante, sus estudios se limitan a la comparación entre el número de propágulos de HMA en los turrículos de lombriz de tierra (TUR) y el suelo subyacente (SS) a estos, en ecosistemas agrícolas y de reemplazo.

En la micorrizosfera existen además, diferentes bacterias promotoras del crecimiento vegetal que contribuyen al incremento del micelio externo de los HMA (Azcón, 1987; Linderman, 1997). Se ha demostrado la acción sinérgica de bacterias solubilizadoras de fósforo con los HMA en el crecimiento vegetal (Barea *et al.*,

1997; Kim *et al.*, 1998). En este sentido, algunas especies bacterianas han mostrado poseer un alto grado de especificidad en su asociación con los HMA (Andrade *et al.*, 1998; Artursson *et al.*, 2006). Así se conoce que los HMA pueden interactuar con bacterias fijadoras de N₂, tanto de vida libre, como en simbiosis (Barea, 1997).

Desde que Meyer y Linderman (1986) analizaron el efecto sobre el crecimiento vegetal de *Pseudomonas putida* y una mezcla de cepas salvajes de HMA, son escasas las referencias de esta interacción, particularmente en bosques tropicales. En estos ecosistemas, se conoce además, que las endomicorrizas son diez veces más frecuentes que las ectomicorrizas (Ries y Rambelli, 1980).

Varios microorganismos se han observado al microscopio en el interior de esporas de los géneros *Gigaspora*, *Glomus*, y *Acaulospora* (Bonfante *et al.*, 1994). Incluso Hijri *et al.* (2002), han logrado aislar un hongo de la clase Ascomycete dentro de esporas de *Scutellospora castanea*.

Bianciotto y Bonfante (2002), han propuesto que la interacción de estos endosimbiontes con los HMA, está mediada por contacto físico y/o elementos solubles. Sin embargo, hasta la fecha, se desconoce la función fisiológica de estos endosimbiontes (Jargeat *et al.* 2004).

Aun no se ha definido el modo de transmisión de estos endosimbiontes, partiendo de una generación de propágulos de HMA a la siguiente (Artursson *et al.*, 2006).

El TUR posee propágulos micorrizógenos aislados y fragmentados. En cambio, en el suelo subyacente, los HMA se hayan en plena actividad simbiótica y con la red de micelio en pleno desarrollo.

Si consideramos que existe preferencia diferencial entre las lombrices de tierra por alimentarse de ciertos hongos del suelo (Bonkowski *et al.*, 2000), como son los HMA (Lee *et al.*, 1996). Y además, reconocemos a los TUR como verdaderos “puntos calientes de biodiversidad” (Brown, 1995). Nos resulta de interés fundamental, conocer cuanto varían las poblaciones de endosimbiontes, entre dos estratos del suelo de un bosque secundario, cuando un aumento de las poblaciones de endosimbiontes en las esporas del TUR nos sugeriría la transmisión horizontal de estos endosimbiontes. Para lograrlo, nos proponemos cuantificar el micelio externo y el biovolumen de esporas de HMA que se encuentra en ambos estratos, así como las poblaciones de grupos funcionales de microorganismos endosimbiontes a dichas esporas.

MATERIALES Y METODOS

Las muestras se colectaron en un bosque secundario del sendero ecológico La Serafina, de La Reserva de la Biosfera, Sierra del Rosario, situada en los 22° 49' N y 83° 05' W, Pinar del Río, Cuba. En el mismo domina la especie vegetal *Syzygium jambos* (L.) Alston, la cual crece sobre un Oxisol (Ferralsol) de pH 6,5. El acumulado anual de precipitaciones para dicha zona fue de 1659 mm y una temperatura media anual de 24,4°C, hasta la fecha de colecta que se realizó a fines de la estación seca de 2004. Se colectaron cinco muestras, cada una conformada por una sub-muestra de TUR y otra de SS (primeros 10 cm. de profundidad). El muestreo se realizó en cuadrantes de 25 x 25 cm, distantes a 5m sobre un transecto orientado según la metodología del programa “Tropical Soil Biology and Fertility” (TSBF) (Anderson y Flanagan, 1989). Las muestras fueron secadas a temperatura ambiente durante 48 h. y luego desagregadas. Finalmente se determinó la densidad aparente del suelo por el método de probeta. Esta magnitud fue expresada como g/dm³ y todos los resultados de las variables analizadas convertidos a dm³.

Análisis de HMA

Para la extracción del micelio externo de HMA se tomó un volumen de 25 g para cada submuestra y se procesó mediante el método conocido como tamizado húmedo y decantado (Gerdemann y Nicolson, 1963), modificado por Herrera *et al.* (2004). De este modo, el tamizado queda bien limpio y compuesto solo de partículas de humus mayores de 40 µm, arena, grava, raicillas, componentes micorrizógenos y otros organismos vivos. Las hifas externas de los HMA quedan atrapadas como masas de hifas agregadas, en el tamiz de 40 µm. Luego de secarse a temperatura ambiente, los tamizados son separados del papel de filtro. Entonces, se hacen pasar los de 140 µm y 40 µm a través del tamiz de 500 µm. De esta forma quedan identificadas tres fracciones: A – mayor de 500 µm y menor que dos mm; B - 140 a 500 µm y C - 40 a 140 µm.

Estimación de la micomasa de micelio externo de HMA

Este paso está basado en el porcentaje de colonización micorrízica, método descrito por Giovannetti y Mosse (1980) el cual ha sido adaptado por Herrera *et al.* (2004). Las raicillas fueron retiradas del SS ya que en el TUR se encuentran fragmentadas, haciendo imposible su procesamiento. Aproximadamente 40 mg de cada fracción B y C son dispersadas con una gota de glicerina sobre un porta objeto bajo el cual se coloca un papel donde está dibujado un cuadrado de 22 x 22 mm. Sobre el perímetro dibujado se coloca un porta objeto y en el se dispersa la alícuota de muestra con la gota de glicerina. Luego se le coloca un cubre objeto (igual a dimensiones anteriores) cuidadosamente sobre el área que contiene la muestra dispersa en glicerina, evitando la formación de burbujas de aire (dos alícuotas son preparadas para cada fracción B y C). Se cuentan como intersecciones las hifas que interseccionen el centro del campo del microscopio a través de dos líneas imaginarias verticales y dos horizontales. Este procedimiento se debe realizar explorando a profundidad el campo visual de 100 a 200 x en un microscopio compuesto y luego se determina el valor promedio entre las cuatro.

La media de las intersecciones presentes en las cuatro líneas multiplicadas por el factor 0,000745 permite estimar el peso del micelio externo (ME) presente en cada alícuota. Finalmente se extrapola el peso promedio de ME proveniente de las dos alícuotas de las fracciones B y C, al peso total de cada fracción, permitiendo obtener, las micomasas de ME-B y ME-C. La suma de estas dos fracciones proporciona un estimado de la masa total de micelio que existe en la muestra original.

Bio-volumen de esporas y determinación de Grupos Funcionales de Bacterias Endosimbiontes:

Las esporas fueron extraídas a partir de cinco g de suelo para garantizar una cantidad pequeña y homogénea, mediante la técnica de Gerdemann y Nicolson (1963). Posteriormente las muestras se centrifugaron en un gradiente de sacarosa 2M. Sólo se tomaron en cuenta las esporas que lucían viables, de acuerdo con su forma, color y contenido lipídico bajo el microscopio estereoscópico. Las mismas se colocaron en un vidrio reloj con agua destilada para tomarles fotos al microscopio estereoscópico Carl Zeiss, con aumento de 2.5 x. Se tomaron imágenes digitales con cámara Axiocam y el software Axio Vision 3.1 a 1300 x 1030 dpi., que permite la medición exacta de distintas estructuras en las esporas.

La estimación del biovolumen que ocupan las esporas se realizó asumiendo que las esporas fueran esféricas. De esta manera podemos usar la ecuación del volumen de estos cuerpos ($V = \frac{4}{3} \pi r^3$). Bajo una campana de flujo laminar se realizó la filtración al vacío utilizando un filtro Gelman de 45 μm . Bajo estas condiciones, las esporas fueron esterilizadas superficialmente a la temperatura del laboratorio (23°C) por 5 min. en Cloramina-T al 2% con tres gotas de Tween 20. Luego fueron inmersas durante 10 min. en una solución de antibióticos (200 mg L⁻¹ de estreptomina y 100 mg L⁻¹ de gentamicina). Entre estos dos pasos de desinfección las esporas fueron lavadas tres veces con agua desionizada estéril, siguiendo la metodología de Declerck *et al.* (1998).

Para la ruptura, las esporas se colocaron en viales estériles durante dos minutos en baño ultrasónico (*P-Selectra*). De esta solución “viva” se tomó un ml homogenizado, y a partir de la misma se resuspendió

cada dilución seriada hasta 10⁻¹⁰. Se sembraron en medio semisólido Watanabe y Barroquio (1979), 0,2 ml y un ml a profundidad para los medios sólidos. La cuantificación de las poblaciones en los medios sólidos (Heterótrofos totales y Solubilizadores de Fósforo), se llevo a cabo por el Método de Conteo de Viables siguiendo las condiciones de Ramos y Callao (1967). En ambos casos se comenzó a contar colonias partir de las 24h. Para el medio semi-sólido (Diazótrofos totales) Watanabe y Barroquio (1979), la cuantificación se realizó por el Método del Número Más Probable (Frobisher, 1969). La lectura en este caso, se realizó mediante la Tabla de Mc Grady (1918), entre los siete y diez días con posterioridad a la siembra.

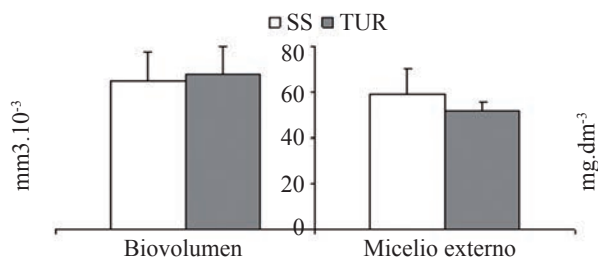
Procesamiento Estadístico:

Los datos fueron procesados mediante el programa estadístico SPSS, versión 11. Los valores de las poblaciones de endosimbiontes fueron transformados mediante Log(x) y se comparó los valores medios con la prueba T-Student. Se utilizó el Coeficiente de correlación de Pearson (r_p), para conocer como se comportan en interacción las variables de HMA determinadas. Se usó la prueba de Levene para cumplir con las premisas del ANOVA. Se realizó un análisis de varianza simple mediante la prueba Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

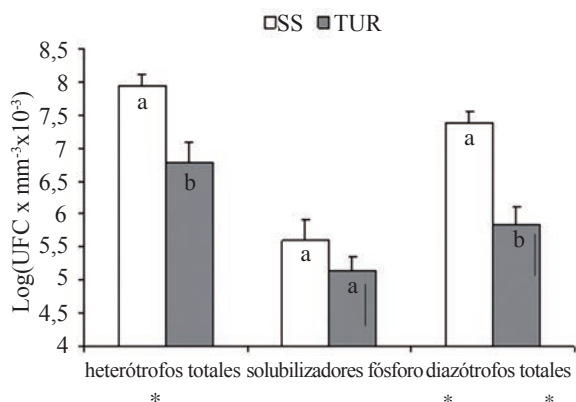
El biovolumen de esporas y el micelio externo estimados (Figura 1), no defieren significativamente en ambos estratos. Ambas variables se correlacionaron de forma negativa en el estrato TUR ($r_p = -0.91$; $n = 5$; $p = 0.032$). Este mismo análisis para SS no fue significativo. Se observó además, un ligero incremento del ME en el este último sustrato.

De forma general los grupos funcionales de microorganismos endosimbiontes presentan mayores poblaciones en el SS (Figura 2). Las poblaciones de solubilizadores de fósforo son menos predominantes que las de diazótrofos y heterótrofos totales, en ese orden para ambos estratos (Figura 3). La comunidad de Glomerales del área muestreada estaba representada en su mayoría, por los género *Glomus spp.* y *Acaulospora spp.* con predominio de esporas de coloración que van desde tonos claro de amarillo, al pardo oscuro.



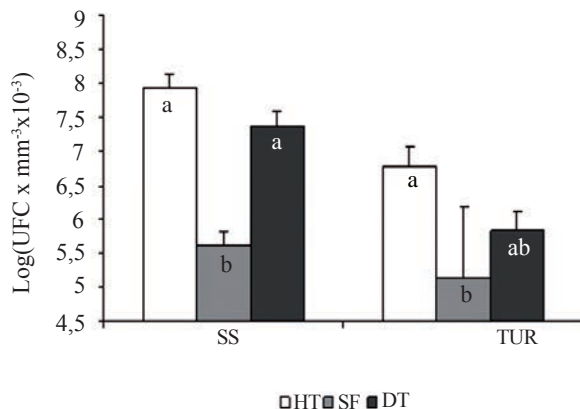
No se observó diferencia significativa para los valores medios usando la prueba T-Student, a $p \leq 0,05$, $n=5$

Figura 1. Biovolumen de esporas en 5g de suelo y micomasa de micelio externo. Error estándar de la media superpuesto en cada barra



Distintas letras en una misma población indican diferencias significativas (*) y altamente significativas (**) a $p \leq 0,05$ y $p \leq 0,01$, respectivamente. Error estándar de la media superpuesto a las barras en cada caso

Figura 2. Prueba T-Student para comparar valores medios de las poblaciones de microorganismos endosimbiontes de esporas de MA, entre ambos estratos



Datos expresados por unidad de volumen de esporas. HT (Heterótrofos totales), SF (Solubilizadores de Fósforo) y DT (Diazótrofos totales). Distintas letras en un mismo estrato indican diferencia significativa, mediante un ANOVA simple; $p \leq 0,05$, $n=5$ Error estándar de la media superpuesto a las barras en cada caso

Figura 3. Prueba Tukey para comparar valores medios de las poblaciones de grupos funcionales de microorganismos endosimbiontes en cada estrato

Los evidentes valores contrapuestos entre los biovolúmenes de esporas y la producción de ME en un mismo estrato (Figura 1), nos propone considerar, que en un determinado estadio temprano de la simbiosis es mayor la energía metabólica que se destina a la producción de micelio (estructura absorbente), mientras que en etapas maduras o condiciones adversas puntuales, se canaliza la energía del hongo hacia la formación de esporas (estructuras de resistencia o latencia). Es importante aclarar que la similitud de los biovolúmenes determinados en ambos estratos, son resultado de seleccionar un pequeño tamaño de muestra, coherente con los objetivos propuestos.

Brown (1995) y Bonkowski *et al.* (2000), plantean que las lombrices de tierra al consumir el suelo concentran fragmentos de micelio en los turriculos, debido a que probablemente los hongos del suelo o sus exudados, son la principal fuente de alimentos para algunas especies. La mayor abundancia de micelio encontrada en el suelo

subyacente, difiere con los reportes de Redell y Spain (1991), aunque Gange (1993) en ocasiones, obtuvo valores superiores en el suelo subyacente al TUR.

Según Hepper (1989), los HMA son incapaces de completar su ciclo de vida en ausencia de raíces anfitrionas. Sin embargo, ya se conoce que en la fase asimbiótica también producen micelio para contactar a la raíz a partir de sus propias reservas (Bago *et al.*, 2004). Estos resultados sugieren que la abundancia de micelio externo en SS está asociada a la presencia de raíces en ese estrato, manteniendo su total vitalidad, está en constante crecimiento y recibe directamente estímulos a partir de exudados de la raíz. El micelio fragmentado del TUR es incapaz de asociarse, debido a que en ese estrato no hay raíces vivas y hay ausencia de vegetación herbácea debido al grosor de la capa de hojarasca.

La relativa abundancia del micelio externo asociado en SS, también pudo ser influenciada por el período de muestreo (época seca). En este sentido, se considera que le cuesta menos a las plantas, mantener al huésped simbiote, que producir raicillas para la absorción de agua y nutrientes (Fitter, 1987). Además, durante la época de sequía las poblaciones de lombrices disminuyen en cantidad y calidad (Lavelle, 1983), esto modularía negativamente la cuantía de micelio externo fragmentado en el TUR.

El predominio de las distintas comunidades o grupos funcionales de endosimbiontes de HMA, encontrados en el suelo, y no en el turrículo, sugieren que estos grupos de microorganismos poseen una dependencia de algún compuesto carbonado localizado en las esporas que se encuentran en fase simbiótica.

Bianciotto *et al.*, (1996), han encontrado microorganismos endosimbiontes en todas las estructuras del HMA, excepto en los arbúsculos. Aun se desconoce si existen abundancias similares de estos MO en las vesículas del endófito, ya que los estudios previos se efectuaron en representantes del suborden Gigasporineae, los cuales carecen de vesículas (Morton y Benny, 1990). Precisamente en este suborden se han llegado a cuantificar un promedio de hasta 20 000 bacterias por espora (Bianciotto *et al.*, 2004).

De acuerdo a la teoría del bipolo metabólico, inherente a los HMA (Bago *et al.*, 2000), el micelio interno posee fundamentalmente metabolismo glucolítico, mientras en el externo, es gluconeogénico (Pfeffer *et al.*, 1999). Bajo esa premisa, el sustrato utilizable por los microorganismos (MO) endosimbiontes debe estar más disponible en las hifas externas a la raíz anfitriona. Esto nos permite considerar que la abundancia de microorganismos en las esporas, más que a un fenómeno físico, responde a causas fisiológicas, debido a la abundancia de fuentes de carbono disponibles de inmediato para las bacterias y no urgentes para el hongo ya que ellas son estructuras de resistencia que reservan hasta el 95 % de los lípidos neutros (Bécard *et al.*, 1991).

En el interior de las esporas pudiera ocurrir que la versatilidad metabólica de los heterótrofos totales, permita que sus poblaciones predominen, cuando compiten entre sí, grupos más selectivos, como son los diazotrofos y solubilizadores de fósforo. Las atenuadas poblaciones de solubilizadores de fósforo en ambos estratos (Figura 2), sugieren que estas poblaciones se encuentran en desventaja competitiva respecto a las poblaciones de diazotrofos. Según Pan y Vessey (2001) la actividad nitrogenasa de los diazotrofos es óptima en condiciones de microaerofilia y quizás esto se relacione con un mayor acceso a determinados sustratos específicos dentro de la espora. No obstante, aún se desconocen los mecanismos fisiológicos en que se involucran los endosimbiontes en las esporas de HMA (Jargeat *et al.*, 2004).

Existe el conocido fenómeno de la micostasis (Lockwood, 1977), el cuál se atribuye al agotamiento de nutrientes de reserva en las esporas, esto provoca la inviabilidad de las mismas, debido al agotamiento de reservas por la actividad de la microbiota interna. Según De Boer *et al.* (2003), la germinación pudiera ser también inhibida mediante liberación de sustancias antibióticas. En contraste a este criterio, Harinikumar *et al.* (1991), han sugerido que los propágulos micorrízicos dentro del turrículo son capaces de colonizar las raíces de las plantas manteniéndose viables. Recientemente hemos demostrado ese efecto en posturas forestales de *Talliparitis elatum* Frixell (datos no publicados).

Aunque nuestros resultados no confirman, ni rechazan el fenómeno micostático, nos indica la presencia de comunidades específicas de bacterias endosimbioses, que intercambian tanto con la planta como con el hongo simbiote, reforzando la hipótesis de una simbiosis tripartita (Minerdi, 2001).

Al no predominar los endosimbioses en las esporas del TUR (Figura 3), nos sugiere que la transmisión horizontal no ocurre en este ambiente donde existe abundante micelio fragmentado y esporas con discontinuidad en su esporóforo. Este tipo de movimiento permite la entrada de MO desde el exterior hacia el interior de la estructura fúngica. (Bianciotto *et al.*, 2004). Es decir, no hay evidencias de transmisión horizontal de microorganismos en un ambiente pleotóxico de ellos. En los TUR, considerados como verdaderos “puntos calientes de biodiversidad” (Brown, 1995), las esporas de HMA serían un locus donde el medio es muy favorable para su crecimiento. Sin embargo, no podemos descartar esta transmisión cuando el hongo se encuentra asociado a la planta, ya que en el SS la red de micelio sufre fracturas por efectos físicos y biológicos. Aunque aún se desconocen realmente las vías de entrada de los endosimbioses (Artursson *et al.*, 2006), nuestros resultados apoyan la hipótesis de una transmisión vertical cíclica (Bianciotto *et al.*, 2004). De este modo, nos permite coincidir con Bianciotto *et al.*, (1996 b), quienes sugieren la posible entrada de estos MO, a través de mecanismos de quimiotaxis por las puntas de hifas externas en crecimiento y de las fracturas que sufren las mismas.

A pesar de que nuestros resultados no confirman, ni rechazan el fenómeno micostático, nos convence de la presencia de comunidades de bacterias endosimbioses, que se encuentran en estrecha interdependencia tanto con la planta, como con el hongo. El predominio de un grupo funcional de endosimbioses sobre otro, nos convoca a continuar los estudios de la fisiología de los mismos. Nuevos y rigurosos diseños experimentales que incluyan varios períodos de muestreo en diversos ecosistemas, deben realizarse. También proponemos el uso de medios de cultivos diferenciales, así como, el empleo de marcadores moleculares. Bajo la nueva teoría del “bipolo funcional” que ocurre entre el micelio externo y el interno a las raíces, se desconoce aún,

como se comportan las poblaciones de endosimbioses a vesículas y esporas internas a las raíces. En este contexto, el estudio de perfiles lipídicos conocidos como FAME (por sus siglas en inglés), sería una herramienta apropiada para cuantificar la comunidad de HMA, así como para las poblaciones de bacterias que estos acogen en su interior. El escaso conocimiento sobre los endosimbioses en comunidades nativas de HMA, y la especificidad, o sinergia entre ellos, incrementa la avidez de estudios que aporten información sustancial sobre el manejo de potenciales cepas de HMA utilizadas en la biofertilización a nivel de agroecosistemas.

CONCLUSIONES

La correlación negativa de esporas y micelio externo en el TUR indica cierta selectividad por parte de las lombrices de tierra al no existir diferencias significativas al cuantificar estas estructuras en ambos sustratos analizados.

Es indiscutible la presencia de bacterias endosimbioses en las esporas de HMA, a pesar de que no se confirma la transmisión horizontal.

Nuestros resultados confirman el carácter tripartito de la simbiosis planta-HMA-bacteria.

Las poblaciones de solubilizadores de fósforo son las menos abundantes en ambos estratos.

Los heterótrofos totales son el grupo funcional predominante en ambos estratos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo constituye un homenaje póstumo a varios colegas y amigos, como fueron: El Dr. Ricardo A. Herrera Peraza, guía y formador de varias generaciones de micorrizólogos y quien me introdujo en el mundo de las micorrizas. La Dra. Ana C. Velasco Elizalde, colega especialista en fijadores de Nitrógeno y formadora de varios microbiólogos en nuestro país. A nuestra Técnico auxiliar Maritza Portier Villamil, por haberme enseñado a extraer del suelo mis primeras esporas de MA. A todos ellos, nuestra eterna gratitud.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, J. M. y P. W. Flanagan (1989): Biological processes regulating organic matter dynamics in tropical soils. *En: Dynamic of Soil Organic Matter in Tropical Ecosystems* (D. C. Coleman, J. M. Oades & G. Uehara, eds.). University of Hawaii Press, Honolulu, Hawaii.
- Andrade, G., Mihara, K. L., Linderman R. G. y G. J. Bethlenfalvay (1998): Soil aggregation status and rhizobacteria in the mycorrhizosphere. *Plant and Soil* 202:89-96.
- Artursson, V., Finlay, R.D., y J. K. Jansson (2006): Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environ. Microbiol.* 8(1): 1-10.
- Azcón, R. (1987): Germination and hyphal growth of *Glomus mosseae* *in vitro*: effects of rhizosphere bacteria and cell-free culture media. *Soil Biol Biochem* 19: 417-419.
- Bago, B., Pfeffer, P.E. y Y. Shachar-Hill (2000): Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiol.* 124: 949-957.
- Bago, B., Pfeffer, P.E. y Y. Shachar-Hill (2004): Metabolismo del Carbono y su Regulación en Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares. *En: Avance en el Conocimiento de la Biología de las Micorrizas.* (eds. J.T. F. Hernández, V.O. Portugal, R. F. Cerrato), Universidad de Guanajuato, Guanajuato: 29-43.
- Barea, J.M. (1997): Mycorrhiza-bacteria interactions on plant growth promotion. *En: Plant Growth Promoting Rhizobacteria.* Ogoshi, A., Kobayashi, K., Homma, Y., Kodama, F., Kondo, N., and Akino, S. (eds). Paris, France: OECD Press, pp. 150-158.
- Barea, J.M., Azcón-Aguilar, C., y R. Azcón (1997): Interactions between mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms within the context of sustainable soil-plant systems. *En: Multitrophic Interactions in Terrestrial Systems.* Gange, A.C., and Brown, V.K. (eds). Oxford, UK: Blackwell Science, pp. 65-77.
- Bécard, G., Doner, L.W., Rolin, D.B., Douds, D.D. y P.E. Pfeffer (1991): Identification and quantification of trehalose in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi by *in-vivo* ¹³C NMR and HPLC analyses. *New Phytol.* 118: 547-552.
- Bianciotto, V., Bandi, C., Minerdi, D., Sironi, M., Tichy, H.V., y P. Bonfante (1996 a): An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3005-3010.
- Bianciotto, V., Minerdi, D., Perotto, S., y P. Bonfante (1996 b): Cellular interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizosphere bacteria. *Protoplasma* 193: 123-131.
- Bianciotto, V., y P. Bonfante (2002): Arbuscular mycorrhizal fungi: a specialised niche for rhizospheric and endocellular bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 365-371.
- Bianciotto, V., Genre, A., Jargeat, P., Lumini, E., Bécard, G. y P. Bonfante (2004): Vertical transmission of endobacteria in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* through generation of vegetative spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3600-3608.
- Bonfante, P., Balestrini, R., y K. Mendgen (1994): Storage and secretion processes in the spore of *Gigaspora margarita* Baecker & Hall as revealed by high-pressure freezing and freeze substitution. *New Phytol* 128: 93-101.
- Bonkowski M., Griffiths B. S. y K. Ritz (2000): Food preferences of earthworms for soil fungi. *Pedobiologia* 44, 666-676.
- Bouché M. B. (1975): Action de la faune sur les états de la matière organique dans les écosystèmes. *En: Kilbertus G, Reisinger O, Mourey A & da Fonseca J A C (ed.) Humification et biodegradation.* Pierron, Sarreguemines. pp. 157-168.
- Brown, G.G. (1995): How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity? *Plant and Soil.* 170: 209-231.
- De Boer, W., Verheggen, P., Klein Gunnewiek, P.J.A., Kowalchuk, G.A., y J.A. van Veen (2003): Microbial community composition affects soil fungistasis. *Appl. and Environ. Microbiol.* 69: 835-844.
- Declerck, S., Strullu, D.G. y C. Plenchette. (1998): Monoxenic culture of the intraradical forms of *Glomus* sp. Isolated from a tropical ecosystem: A proposed methodology for germplasm collection. *Mycologia*-90: 579-585.
- Fitter, A.H. (1987): An architectural approach to the comparative ecology of plant root systems. *New Phytol.* 106: 61-67.
- Fragoso, C., P. Lavelle, E. Blanchart, B. K. Senapati, J. J. Jimenez, M. A. Martinez, T. Decaëns y J. Tondoh (1999): Earthworm Communities of Tropical Agroecosystems: Origin, Structure and Influence of Management Practices. *En: Earthworm Management in Tropical Agroecosystems* (P. Lavelle, L. Brussard & P. Hendrix, eds.), CAB International Publishing, 300 pp.

- Frobisher, M. (1969): Microbiología. Editorial Academia León. España.
- Gange, A. (1993): Translocation of mycorrhizal fungi by earthworms during early succession. *Soil Biology and Biochemistry*, 25: 1021-1026.
- Gerdemann, J. W. y T. H. Nicolson (1963): Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet-sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46: 235-244.
- Giovannetti, M. y B. Mosse (1980): An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84: 489-500.
- Harinikumar, K. M., Bagyaraj, D. J., y R. D. Kale (1991): Vesicular arbuscular mycorrhizal propagules in earthworm cast. *En: Advances in Management and Conservation of Soil Fauna.* (G.K. Veeresh, D. Rajagopal and C. A. Viraktamath eds.), Oxford and IBH, New Delhi: 605-610.
- Hepper, C.M. (1989): Isolation and culture of VA mycorrhizal (VAM) fungi. *En: VA Mycorrhiza*, eds. C.L. Powell, D.J. Bagyaraj. CRC Press, Boca Raton, 95-112.
- Herrera R.A., E. Furrázola, R.L. Ferrer, R. Fernández y Y. Torres (2004): Functional strategies of root hairs and arbuscular mycorrhizae in an evergreen tropical forest, Sierra del Rosario, Cuba. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 35(3): 113-123.
- Hijri, M., Redecker, D., MacDonald-Comber Petetot, J.A., Voigt, K., Wöstemeyer, J., y I.R. Sanders (2002): Identification and Isolation of two Ascomycete fungi from spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Scutellospora castanea*. *Applied and Environmental Microbiol.* 68(9): 4567-4573.
- Kim, K.Y., Jordan, D., y G.A. McDonald (1998): Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biol Fert Soils* 26: 79-87.
- Jargeat, P., Cosseau, C., Ola'h, B., Jauneau, A., Bonfante, P., Batut, J., y G. Bécard (2004): Isolation, free-living capacities and genome structure of "Candidatus Glomeribacter gigasporarum", the endocellular bacterium of the mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *J. bacterial.* 186: 8676-6884.
- Lavelle, P. (1983): The structure of earthworm communities. *En: Earthworm Ecology: From Darwin to Vermiculture.* (J. E. Satchell ed.). Chapman & Hall, London: 449-465.
- Lavelle P. (1984): The Soil System in the Humid Tropics. *Biol. International* 9, 2-17.
- Lee, K. K., M. V. Reddy, S. P. Wani & N. Trimurtulu (1996): Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in earthworm casts and surrounding soil in relation to soil management of a semi-arid tropical Alfisol. *Applied Soil Ecology*, 3: 177-181.
- Linderman, R.G. (1997): Vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi. *En: The Mycota.* Carroll, G.C., and Tudzynski, P. (eds). Berlin, Germany: Springer-Verlag, pp. 117-128.
- Lockwood, J. L. (1977): Fungistasis in soils. *Biol. Rev.*, 52: 1-43.
- McGrady, M. H. (1918): Tables for rapid interpretation of fermentation tube's results. *Can. Pub. Health. J.*, (9): 275-286.
- Meyer, J.R. y R.G. Linderman (1986): Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular fungi and a plant growth-promoting bacterium, *Pseudomonas putida*. *Soil Biol Biochem.* 18: 185-190.
- Minerdi, D., Fani, R., Gallo, R., Boarino, A., y P. Bonfante (2001): Nitrogen fixation genes in an endosymbiotic *Burkholderia* strain. *Appl. Environ Microbiol.*, 67: 725-732.
- Morton, J.B. y G.L. Benny (1990): Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon*, 37:471-491.
- Pan, B. y J. K. Vessey (2001): Response of the endophytic diazotroph *Gluconacetobacter diazotrophicus* on solid media to changes in atmospheric partial O₂ pressure. *Appl. and Environ. Microbiol.* 67 (10): 4694-4700.
- Pfeffer, P.E., Douds, D.D, Bécard, G., y Y. Shachar-Hill (1999): Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in arbuscular mycorrhiza. *Plant Phys.* 120: 587-598.
- Rambelli A. (1973): The Rhizosphere of mycorrhizae. *En: Ectomycorrhizae.* Marks, G.L. and Koslowski, T.T. (Eds.), Academic Press, New York, pp. 299-343.
- Ramos, A. y V. Callao (1967): El empleo de la solubilización de fosfatos en placas como teoría diferencial bacteriana. *Microbiol. Española*, 20(1), 10-15.
- Reddell, P. y A. V. Spain (1991): Earthworms as vectors of viable propagules of mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 23(4): 767-774.

- Reiss, S. y A. Rambelli (1980): Preliminary notes o mycorrhizae in a natural tropical rain forest. *En: Tropical Mycorrhiza Research*. Mikola, P. (ed.), Claredon Press Oxford, New York, 143-145.
- Rillig, C. M., S. F. Wright, M. F. Allen y C. B. Field (1999): Rise in carbon dioxide change soil structure. *Nature*, 400- 628.
- Sieverding, E. (1991): *Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza Management in Tropical Agrosystems*. Schriftenreihe der GTZ, No. 224, Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit, GTZ, 371 p.
- Tiwari, S. C. y R.R. Mishra (1993): Fungal abundance and diversity in earthworm casts and uningested soil. *Biology and Fertility of Soil*, 16: 131-134.
- Truffen F., Eason W. R. y J. Scullion (2002): The effect of earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi on growth of and ³²P transfer between *Allium porrum* plants. *Soil Biol. & Biochem.*, 34, 1027-1036.
- Watanabe, I., y W. L. Barraquio (1979): Low levels of fixed nitrogen required for isolation of free living organism from rice roots. *Nature* (227), 565-566.
- Wurst S., Dugassa-Gobena D., Langel R., Bonkowski, M., y S. Scheu (2004): Combined effects of earthworms and vesicular-arbuscular micorrizas on plant and aphid performance. *New Phytol.*, 163, 169-176.

Recibido: 18 de julio de 2012

Aceptado: 9 de enero de 2013