

## EL ESTUDIO DE LAS MICORRIZAS ARBUSCULARES: LIMITANTES Y PERSPECTIVAS

Montañez, A.<sup>1</sup>

### RESUMEN

El objetivo de este artículo es difundir y actualizar el conocimiento -en algunas áreas específicas- sobre la biología de los hongos micorrízicos arbusculares, qué son y qué funciones desempeñan, así como sus posibilidades de aplicación. También se esbozan y discuten brevemente las perspectivas y líneas de investigación para el futuro.

**PALABRAS CLAVE:** micorrizas arbusculares, investigación y desarrollo.

### SUMMARY

## THE STUDY OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI: LIMITANTS AND PERSPECTIVES

The aim of this document is to disseminate and update knowledge in specific areas regarding the biology of the arbuscular mycorrhizal fungi, their ecosystem function and future applications in agriculture. Possible lines of research and development in those areas are discussed.

**KEY WORDS:** arbuscular mycorrhizas, research and development.

### ¿QUÉ SON LAS MICORRIZAS ARBUSCULARES?

Se conoce con el nombre de micorriza arbuscular (MA) a la asociación mutualista establecida entre las raíces de la mayoría de las plantas y ciertos hongos del suelo. Se trata de una simbiosis prácticamente universal, no sólo porque casi todas las especies vegetales son susceptibles de ser micorrizadas sino también porque puede estar presente en la mayoría de los hábitats naturales. Las micorrizas son tan antiguas como las propias plantas<sup>2</sup> y se conoce su existencia desde hace más de cien años, estimándose que aproximadamente el 95% de las especies vegetales conocidas establecen de forma natural y constante este tipo de simbiosis con hongos del suelo.

El establecimiento de estas asociaciones implica la creación de fuertes interdependencias, tanto es así que el hongo pasa a ser una parte más del sistema radical, tan perfectamente integrado en el mismo que ve muy dificultado o incluso imposibilitado su desarrollo sin la presencia de su

planta hospedadora, y ésta puede, a su vez, tener un rango de dependencia del hongo, que va desde absoluto hasta relativo en mayor o menor grado.

Los hongos formadores de MA pertenecen a la clase Zigomicetes y se caracterizan porque son organismos cuya morfología, anatomía e histoquímica son muy particulares. Las MA producen, a lo largo de su ciclo de vida, esporas, estructuras de gran resistencia a condiciones ambientales adversas, con paredes rígidas y resistentes, que les permiten permanecer en el suelo con vida latente por largos períodos. Dentro de la raíz producen estructuras llamadas arbusculos (en todos los casos) y vesículas (en la mayoría de ellos). Las vesículas son estructuras globosas e irregulares que actúan como órganos de reserva de lípidos. Los arbusculos son las estructuras responsables de la transferencia bidireccional de nutrientes entre los simbioses, realizada en la interfase planta-hongo producida a este nivel (Balestrini & Bonfante, 2005). Estudios con microscopía electrónica permitieron dilucidar con mayor exactitud la función de los arbusculos, como estructu-

<sup>1</sup>Microbiología de Suelos. Centro de Investigaciones Nucleares. Facultad de Ciencias. Universidad de la República Iguá 4225. Montevideo, Uruguay. montanmez\_massa@yahoo.co.uk

<sup>2</sup>De acuerdo a los registros fósiles las MA existen desde hace 460 millones de años y han coevolucionado junto con las plantas hasta hoy.

ras activas en el intercambio de la simbiosis. La infección de la raíz por el hongo se produce a partir de propágulos presentes en el suelo; éstos pueden ser esporas, trozos de hifas del hongo y también raíces ya micorrizadas.

El mutualismo supone una relación beneficiosa para los dos organismos implicados, y tanto el hongo como la planta se ven favorecidos por la asociación. Clásicamente se ha entendido este mutualismo de la siguiente manera: el hongo coloniza la raíz de la planta y le proporciona nutrientes minerales y agua, que extrae del suelo por medio de su red externa de hifas, mientras que la planta suministra al hongo sustratos energéticos y carbohidratos que elabora a través de la fotosíntesis. Actualmente sabemos que las MA no sólo aportan a la nutrición mineral de las plantas, sino que en esta relación mutualística las MA también contribuyen a la protección contra patógenos y aportan a la planta mayor tolerancia al estrés ambiental (estrés hídrico, salinidad, contaminación por metales pesados, etc.). Por otra parte, el micelio extra-radical del hongo MA beneficia las propiedades físicas del suelo, favoreciendo la agregación de las partículas del suelo, a través del micelio y los exudados de las hifas (principalmente glicoproteínas) que actúan como cementantes.

Por muchos años se ha puesto énfasis en el aporte de las MA en la absorción de fósforo. Nuevos hallazgos demuestran hoy que las MA tiene un gran papel en la absorción y utilización de nitrógeno por la mayoría de las plantas. Los hongos formadores de micorrizas arbusculares transfieren cantidades considerables de nitrógeno a sus plantas hospederas; Govindarajulu *et al.* (2005) identificaron enzimas y genes involucrados en la absorción y degradación de nitrógeno por los hongos MA y descubrieron un camino metabólico novedoso en el cual el nitrógeno inorgánico es absorbido por el hongo y es incorporado en un ácido amino llamado arginina. Este ácido amino se queda en el hongo hasta que se degrada y se transfiere a la planta. Los hallazgos muestran que las relaciones simbióticas entre los hongos MA y las plantas podrían tener un papel mucho más importante en el ciclo del nitrógeno respecto a lo que anteriormente se ha pensado.

Estudios recientes también sugieren que las distintas familias de hongos MA podrían variar en su habilidad para influenciar la producción vegetal basado en sus diferentes capacidades para absorber y transferir nutrientes al hospedador (Treseder, 2005; Hart and Reader, 2002; Jakobsen *et al.*, 1992).

## MORFOLOGÍA, GENÉTICA Y DIVERSIDAD

El proceso de formación de la simbiosis comienza con la germinación de las esporas de resistencia en el suelo, cuando las condiciones ambientales de temperatura y humedad son favorables (Bolan & Abbott, 1983). Tras la emisión del tubo o tubos germinativos, el micelio del hongo crece hasta encontrar una raíz hospedadora, donde se desarrolla la colonización micorrítica. La colonización del hongo se extiende por la epidermis y el parénquima cortical, nunca penetra en la endodermis ni en los tejidos vasculares y meristemáticos (Harley & Smith, 1983), estableciendo una marcada diferencia con las infecciones radicales de hongos patógenos que sí penetran en los haces conductores y meristemas. En una primera instancia se produce una identificación mutua planta-hongo en la rizósfera, en regiones próximas a las raíces nutricias; este reconocimiento parece mediado por sustancias exudadas por la raíz que provocan el crecimiento del micelio y un biotropismo positivo del mismo hacia la raíz. Luego se produce el contacto intercelular al formarse una estructura llamada "apresorio" y luego la hifa penetra la epidermis desarrollando hifas que crecen intra e intercelularmente. En la capa interna del parénquima se forman los arbusculos, producidos por una ramificación masiva de la hifa después de penetrar la pared celular. La hifa ramificada se encuentra rodeada por la membrana plasmática de las células del parénquima cortical, siendo el espacio apoplástico producido entre la membrana plasmática y el hongo la zona de intercambio de nutrientes. La vida de los arbusculos es muy corta, inferior a 15 días (David, 1994). Las vesículas se forman generalmente en los extremos de las hifas del hongo y pueden producirse a lo largo de todo el parénquima cortical colonizado; suelen aparecer más tarde que los arbusculos y son consideradas órganos de reserva, principalmente de lípidos (Beilby & Kidby, 1980; Cooper & Lösel, 1978).

La colonización del hongo puede extenderse también mediante hifas exteriores ("runners") por la superficie de la raíz y penetrar en ésta a intervalos irregulares (Sieverding, 1991). Cuando la infección interna está bien establecida, las hifas del hongo pueden crecer externamente desde la raíz de la planta hacia el suelo (micelio externo) y explorar un volumen de suelo inaccesible a las raíces; con ello la planta aumenta considerablemente su superficie de absorción, de 100 a 1000 veces (Gil, 1995), y por tanto su capacidad de captación de nutrientes y de agua.

Estos cambios morfológicos y estructurales tanto en los tejidos colonizados por el hongo, como en la organización de la pared celular del simbiote fúngico generan una integración fisiológica de ambos simbiotes, que produce una alteración de las actividades enzimáticas, que se coordinan entre los simbiotes para integrar sus procesos metabólicos (Bago, 2000).

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares producen, normalmente, esporas a partir del micelio externo, y también en algunos casos, las forman en el interior de la raíz a partir de micelio interno. Las esporas de resistencia pueden permanecer inalteradas en el suelo por mucho tiempo, mientras que las hifas del hongo se colapsan tras una permanencia en suelo de 2 a 4 semanas si no encuentran una raíz hospedadora (Bolan & Abbott, 1983). Se ha estipulado que las esporas contienen de 1700 a 20000 núcleos, dependiendo de la especie de hongo y del método empleado para su análisis (Cooke *et al.*, 1987; Bécard & Pfeffer, 1993; Bago *et al.*, 1998). Recientemente, se han podido realizar estudios del comportamiento nuclear de hongos MA como *Gigaspora rosea* en condiciones de laboratorio *in vitro* (axénicas), gracias al desarrollo del microscopio multifotónico, el cual abrió nuevas perspectivas en estudios de ciclos celulares en especímenes vivos, ya que es mínimo el daño inducido por esta técnica sobre el tejido (Bago *et al.*, 1998). De esta forma se ha logrado conocer que los núcleos de los hongos MA, se distribuyen a intervalos regulares en la hifa, delimitando "compartimentos celulares". Se sugiere que cada núcleo tiene una función específica y que su distribución en la hifa es programada previamente.

Sumado a esta enorme complejidad estructural y funcional, investigaciones recientes han demostrado, la presencia de estructuras citoplasmáticas, llamadas inicialmente organismos similares a bacterias (OSBs), observadas gracias a la microscopía electrónica en diferentes especies de hongos MA (Mosse, 1970; MacDonald & Chandler, 1981; Bonfante *et al.*, 1994; Bianciotto *et al.*, 1996, 2000). La combinación de estudios morfológicos y moleculares han mostrado que los OSBs en las esporas de *Gigaspora margarita* son bacterias con genes *nif* relacionadas al género *Burkholderia* (Bianciotto *et al.*, 2000). Lo sorprendente es que Bianciotto *et al.* (1996) encontraron en esporas de *G. margarita* más de 250.000 bacterias, lo cual hace pensar en cómo esta bacteria o bacterias penetraron en la MA, cómo se trasmite, y cuál es su función en relación a la MA, es un simbiote o un endo-parásito?

Es posible que un mismo hongo forme la micorriza con más de una planta a la vez, estableciéndose de este modo una conexión entre plantas distintas. También es posible que distintas hifas de MA se anastomosen e intercambien

material citoplasmático (núcleos, genes, nutrientes, bacterias, etc.) que a su vez puedan ser compartidos por distintas plantas a kilómetros de distancia. Es decir que los mecanismos de transferencia horizontal a través de los hongos MA en el suelo jugarían un papel muy importante en la dinámica funcional de la biodiversidad de microorganismos del suelo así como de las comunidades vegetales que sustentan y acompañan dicha biodiversidad.

La extracción de esporas del suelo es necesaria para la clasificación de los hongos MA. Las esporas se forman durante la fase asexual de su ciclo de vida denominada imperfecta, en la cual liberan conidios o esporas asexuales desde zonas especializadas del micelio. Todas las especies de hongos MA han sido descriptos en base a la morfología de las esporas, la única estructura aparentemente distinta y con valor taxonómico; el resto es común a todos los hongos MA, hifas aseptadas y multinucleadas, que esporulan en el suelo y producen arbusculos dentro de las células corticales y no son cultivables. La espora constituye la unidad taxonómica por excelencia y se correlaciona con la diversidad genética en la mayoría de los casos. Una de las limitantes en estudios de plantas multi-infectadas por MA, como lo son la gran mayoría en condiciones naturales, es la identificación de la MA una vez que se desarrolló la simbiosis en la planta hospedadora (Montañez, 1999).

## POSIBLES APLICACIONES Y PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN

En el marco de una agricultura sostenible, la utilización de hongos formadores de MA debe ser considerada en el diseño de cualquier sistema de producción agrícola, pues además de que estos micro-simbiotes son componentes inseparables de los agro-ecosistemas, realizan diversas funciones en su asociación con las plantas, y pueden constituir sustitutos biológicos de los fertilizantes minerales. Aunque los hongos que forman este tipo de micorrizas no pueden crecer en ausencia de una planta hospedadora, lo cual ha sido y es una gran limitante, actualmente es factible la producción de inóculos de hongos MA para plantas que tienen una fase de vivero, almacigo o semillero.

Aparte de su interés científico en estudios de tipo fisiológico en plantas, en microbiología, aplicaciones a la biotecnología en la producción comercial hortifrutícola y ornamental, es de destacar su aplicación a procesos de reforestación, re-vegetación y de recuperación de zonas áridas y de suelos degradados. Otra importante aplicación a señalar es en el control biológico contra agentes patógenos de la rizósfera y la planta.

Aspectos básicos de la investigación de la ecología, fisiología, bioquímica, biología molecular y biotecnología de la simbiosis micorrítica, en relación con la nutrición y protección de las plantas frente a estreses bióticos y abióticos y en su interacción con microorganismos rizosféricos, aportaría a largo plazo al manejo y utilización de estos microorganismos para una productividad agrícola sostenida, con el mínimo deterioro del medio ambiente.

La temática a estudiar a la luz de lo anteriormente expuesto, es quizá demasiado ambiciosa para cubrirla en un corto plazo, pero sí crucial para la ciencia y la sociedad que necesita alternativas para la producción de alimentos sin el costo de la pérdida de los suelos, la falta de agua y la contaminación ambiental. En este marco se proponen los distintos puntos a considerar para el desarrollo de líneas y estrategias de investigación en MA.

#### 1- Biodiversidad de hongos micorríticos:

- Unificación de metodologías para el análisis de la biodiversidad funcional y morfológica de las MA. Identificación y caracterización de hongos MA, en agrosistemas y ecosistemas naturales, utilizando aproximaciones moleculares entre otras. Esto sentaría las bases para elaborar un banco de hongos MA para su posterior utilización en proyectos de restauración, inoculación, etc.
- Biodiversidad genética y funcional como por ejemplo el estudio de los genes implicados en la resistencia a metales pesados, salinidad, etc., de los hongos formadores de MA.
- La diversidad de MA como indicador de perturbaciones (cambio climático, prácticas agronómicas, tratamientos de inoculación, etc.).

#### 2- Bases moleculares de las actividades fisiológicas y bioquímicas de las micorrizas:

- Desarrollo de protocolos.
- Clonación y estudio de la expresión de genes que codifican para actividades de interés en el funcionamiento de la simbiosis.
- Desarrollo de marcadores moleculares como indicadores de la eficiencia de la simbiosis.

#### 3- Micorrizas y resistencia a estreses ambientales (abióticos y bióticos):

- Resistencia a estreses nutricionales, salinidad, sequía, contaminación.

- Control biológico de hongos patógenos de las plantas.
- Análisis de los mecanismos implicados en a y b.

#### 4- Interacciones con otros microorganismos de la rizósfera

- Establecer un grupo interdisciplinario con el fin de estudiar las interacciones bióticas que ocurren en la rizósfera y analizar el efecto de los mismos sobre la estructura y composición de las comunidades vegetales.
- Interacción con fijadores biológicos de nitrógeno.
- Con microorganismos solubilizadores de fosfatos (biotecnología aplicada a procesos de compostaje/fermentación, utilizando residuos agrícolas, fosfato de roca, etc.)
- Con rizobacterias antagonistas de patógenos.

#### 5- Desarrollo de tecnologías para la recuperación de áreas degradadas.

- Producción de inóculo que contenga también rizobacterias seleccionadas.

## BIBLIOGRAFÍA

- BAGO, B. 2000. Putative sites for nutrient uptake in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 226:263-274.
- BAGO, B.; AZCON-AGUILAR, C.; GOULET, A. & PICHE, Y. 1998. Branched absorbing structures (BAS). A feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 139:375-388.
- BALESTRINI, R; BONFANTE, P. 2005. The interface compartment in arbuscular mycorrhizae: A special type of plant cell wall? *Plant Biosystems* 139(1):8-15.
- BECARD, G. & PFEFFER, P. E. 1993. Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during *in vitro* development. *Protoplasma, Springer* 174:62-68.
- BEILBY, J. P. & KIDBY, D. K. 1980. Biochemistry of ungerminated and germinated spores of the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus caledonium*: changes in neutral and polar lipids. *Journal of Lipid Research* 21:739-741.
- BIANCIOOTTO, V.; BANDI, C.; MINERDI, D.; SIRONI, M.; TICHY, H.V. & BONFANTE, P. 1996. An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 62:3005-3010.

- BIANCIOTTO, V.; LUMINI, E.; LANFRANCO, L.; MINERDI, D.; BONFANTE, P. & PEROTTO, S. 2000. Detection and identification of bacterial endosymbionts in arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the family Gigasporaceae. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:4503-4509.
- BOLAN, N. S. & ABBOTT, L. K. 1983. Seasonal variation in infectivity of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi relation to plant response to applied phosphorus. *Aust. J. Soil Res.* 21:297.
- BONFANTE, P.; BALESTRINI, R. & MENDEGEN, K. 1994. Storage and secretion processes in the spore of *Gigaspora margarita* Becker & Hall as revealed by high pressure freezing and freeze substitution. *New Phytol.* 128:93-101.
- COOKE, J.C.; GEMMA, J.N. & KOSKE, R.E. 1987. Observations of nuclei in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia* 79:331-333.
- COOPER, K. M. & LÖSEL, D. M. 1978. Lipid physiology of vesicular arbuscular mycorrhiza. I. Composition of lipids in roots of onion, clover and ryegrass infected with *Glomus mosseae*. *New Phytol.* 80:143-151.
- DAVID, S. 1994. Vesicular arbuscular mycorrhizal fungi pp. 351-378. *En: R. W. Weaver et al.* (Eds.). *Methods of soil analysis, Part 2. Microbiological and biochemical properties.* Soil Science Society of America, Madison, WI.
- GIL, F. 1995. Las micorrizas y la nutrición mineral. pp. 281-283. *En: Elementos de fisiología vegetal. Relaciones hídricas. Nutrición mineral. Transporte. Metabolismo.* Ediciones Mundi-Prensa.
- GOVINDARAJULU, M.; PFEFFER, P.E.; JIN, H.R.; ABUBAKER, J.; DOUDS, D.D.; ALLEN, J.W.; BUCKING, H.; LAMMERS, P.J. & SHACHAR-HILL, Y. 2005. Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* 435(7043):819-823.
- HARLEY, J.L. & SMITH, S.E. 1983. *Mycorrhizae symbiosis.* Academic Press, London.
- HART, M.M. & READER, R.J. 2002. Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 153:335-44.
- JAKOBSEN, I.; ABBOTT, L.K.; & ROBSON, A.D. 1992. External hyphae of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum*. L. 2. Hyphal transport of P-32 over defined distances. *New Phytologist* 120(4):509-516.
- MACDONALD, R. M. & CHANDLER, M. R. 1981. Bacterium like organelles in the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus caledonius*. *New Phytol.* 89:241-246.
- MOSSE, B. 1970. Honey-coloured sessile *Endogone* spores. II. Changes in fine structure during spore development. *Arch. Mikrobiol* 74:146-159.
- MONTAÑEZ, A. 1999. Tesis de doctorado, Universidad de Reading, UK.
- SIEVERDING, E. 1991. Vesicular arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Technical cooperation. GTZ, Eschborn, Germany. p. 371.
- TRESEDER, K.K. 2005. Nutrient acquisition strategies of fungi and their relation to elevated atmospheric CO<sub>2</sub>. *En: The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem*, 3rd edition. J. Dighton, P. Oudemans, and J. White (Eds.). Marcel Dekker. pp. 713-731.