



ALTERNATIVA DE LA TÉCNICA DE TINCIÓN PARA DETERMINAR LA COLONIZACIÓN MICORRÍZICA

Alternative staining technique to determine mycorrhizal colonization

Yakelín Rodríguez Yon[✉], Lianne Arias Pérez, Aida Medina Carmona, Yonaisy Mujica Pérez, Laura R. Medina García, Kalyanne Fernández Suárez y Aracely Mena Echevarría

ABSTRACT. The root staining technique is necessary in the work with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), which constitute the base of several Biofertilizers, as the EcoMic[®] product, each time more used on agricultural practices at world level. That's why the sample number evaluated at Mycorrhiza laboratories from diverse Research, Academic and even some productive Centers, increases every year. Those works require the application of such technique; nevertheless, it has the inconvenient to use highly toxic and carcinogenic reagents. The objective of the present work was to substitute those reagents by others non harmful to human health and environment. This is the case of Trypan blue that was substituted by the washable pen ink Parker QuinK. Moreover, Lactic acid and Glycerin were eliminated from the protocol. Results showed the pertinence of such modifications and revealed the usefulness and high quality of mentioned ink, which successfully stains all fungal structures allowing a clear visualization during long time.

Key words: arbuscular mycorrhiza, roots, colorants, health protection

RESUMEN. La técnica de tinción de raíces es necesaria en el trabajo con los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA), que constituyen la base de algunos biofertilizantes, como EcoMic[®], cada vez más utilizados en las prácticas agrícolas a nivel mundial. Cada año se incrementa el número de muestras a evaluar en los laboratorios de micorrizas de los distintos centros de investigaciones científicas, de enseñanza e incluso de algunos vinculados a la producción, cuya labor requiere de la aplicación de dicha técnica. Sin embargo, ésta tiene el inconveniente de utilizar reactivos cancerígenos y altamente tóxicos, por lo que fue objetivo de este trabajo sustituir los mismos por otros no nocivos a la salud humana y al medio ambiente. Tal es el caso del azul de tripano, que fue sustituido por la tinta de bolígrafo Parker QuinK lavable en agua. Se eliminó además del protocolo el ácido láctico y la glicerina. Los resultados demostraron la pertinencia de las modificaciones realizadas y revelaron la utilidad y alta calidad de la tinta mencionada, la cual tiñe exitosamente todas las estructuras fúngicas, permitiendo visualizarlas claramente durante un periodo de tiempo prolongado.

Palabras clave: micorrizas arbusculares, raíces, colorantes, protección de la salud

INTRODUCCIÓN

Los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) forman una asociación simbiótica con más del 85 % de las plantas terrestres y como resultado ambas partes obtienen beneficios mutuos para su crecimiento y desarrollo (1). Cabe destacar los resultados satisfactorios en la mejora del estado nutritivo de las plantas y en el incremento del rendimiento agrícola, obtenidos con la inoculación de estos microorganismos

a diferentes cultivos de interés económico, en varios países latinoamericanos, incluido Cuba (2). Por ello, las investigaciones en el establecimiento y funcionamiento de esta asociación en los ecosistemas naturales y en los agroecosistemas, son fundamentales. Por tanto, es necesario disponer de técnicas apropiadas que permitan cuantificar la colonización intrarradical de estos hongos.

Con este propósito se desarrolló un método de tinción de las estructuras de los HMA en las raíces que utiliza el azul de tripano (3). Este reactivo es considerado carcinógeno, según la Agencia Internacional para Investigaciones sobre el Cáncer (4). También se emplean con frecuencia otras técnicas

Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), gaveta postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, CP 32700.

✉ yakelin@inca.edu.cu; ryakelin40@yahoo.es

basadas en el uso de presuntos carcinógenos como el clorazol negro E (5) y la fucsina ácida (6). La utilización de tales químicos debe ser reducida por razones de salud y seguridad del personal involucrado pues pueden causar irritación de la piel y sus vapores pueden irritar ojos, nariz, garganta y pulmones (7). Asimismo, por razones ambientales es preferible, siempre que sea posible, encontrar sustitutos para químicos nocivos.

En la tentativa de eliminar algunos de estos compuestos peligrosos, se desarrolló un método simple, confiable y económico para teñir las estructuras fúngicas de interés en el tejido radical y determinar la colonización micorrízica (8). Esta técnica sustituye químicos carcinogénicos potenciales, usados convencionalmente, por tinta de bolígrafo no lavable en agua que es inofensiva. No obstante, el tinte carcinogénico azul de tripano es comúnmente usado aún por la mayoría de los micorrizólogos del mundo, incluido el laboratorio de Micorrizas del INCA.

El objetivo del presente trabajo fue adecuar la técnica descrita para su uso masivo en las condiciones de diversos laboratorios (8), con énfasis en la sustitución de reactivos nocivos para la salud y el medio ambiente por otros no tóxicos pero igualmente efectivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron raíces frescas de características diferentes a partir de distintas familias de plantas (maíz [*Zea mays* L.], tomate [*Solanum lycopersicum* L.] y pepino [*Cucumis sativus* L.]). Las mismas se recibieron en el laboratorio de Micorrizas arbusculares del INCA para su procesamiento. Como inóculos de HMA se emplearon dos cepas de la colección del INCA: *Funneliformis mosseae* [(Nicol. & Gerd.) Walker & Schüßler] (9) y *Glomus cubense* (Y. Rodr. & Dalpé) (10), INCAM-2 e INCAM-4, respectivamente; así como un conglomerado de HMA nativos (11) pertenecientes a los géneros *Glomus* (10 morfotipos), *Funneliformis* (2), *Rhizoglomus* (4), *Sclerocystis* (1), *Septoglomus* (1), *Claroideoglomus* (3), *Acaulospora* (5), *Gigaspora* (1) y *Scutellospora* (1), según la clasificación de los Glomeromycota (12, 13). La inoculación en todos los casos se realizó en el momento de la siembra. Se procesaron raíces inoculadas y no inoculadas como control.

PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TINCIÓN

A BASE DE TINTA

Se partió de varias tintas de bolígrafo de colores azul y negro para preparar la solución de tinción: Pelikan azul 523, no lavable en agua, China; Kores azul, tinta para tampón; Staedtler azul 745, Alemania;

Fluido azul para corrección, China; Parker Quink azul lavable en agua, Inglaterra; Parker negra, Inglaterra; Musso negra, tinta para sellar sin aceite. Las mismas se prepararon a razón de 25 mL de tinta en 1000 mL de ácido clorhídrico (1N) al 2,5 % (v/v).

DETERMINACIÓN DE LA COLONIZACIÓN MICORRÍZICA INTRARRADICAL

Las raíces se lavaron cuidadosamente con agua común y se secaron en estufa a 70 °C hasta peso constante. Para cada especie vegetal se tiñeron, por separado, varios grupos de 200 mg de raíces secundarias, según los distintos protocolos, procesando 20 réplicas por tratamiento en cada uno de ellos. El primero radicó en la tinción mediante el procedimiento estándar que utiliza el azul de tripano (3) y el segundo fue el desarrollado en este trabajo que consistió en clarificar las raíces en solución de hidróxido de potasio al 10 % (m/v) incubando en estufa a 90 °C de 30 minutos a una hora y luego se eliminó la solución lavando varias veces con abundante agua corriente. Posteriormente se añadió la solución de tinción, se dejó en reposo por 15 minutos a temperatura ambiente y a continuación se colocó en la estufa de 10 a 15 minutos a 70 °C. Este último protocolo se realizó repetidamente en correspondencia con el número de las soluciones de tinción que se seleccionaron para desarrollar la técnica.

La lectura de las muestras se realizó en estereoscopio (Carl Zeiss, Stemi 2000-C/50x). A partir de las lecturas se determinaron los porcentajes de colonización micorrízica y la intensidad, según metodología descrita en el Manual de Procedimientos^A. Se montaron preparaciones de fragmentos de raicillas teñidas y se realizaron observaciones al microscopio óptico (Carl Zeiss, Axiostar Plus) para seleccionar la solución de tinción con mejores resultados en cuanto a la nitidez al visualizar las estructuras fúngicas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores de porcentajes de colonización micorrízica e intensidad, obtenidos mediante la evaluación por ambos protocolos (método estándar y la tinta con mejores resultados) se compararon mediante una Prueba T de Student para muestras relacionadas, utilizando el paquete SPSS Versión 21 para Windows.

^ATrouvelot, A.; Kough, J.; Gianinazzi-Pearson, V. Mesure du Taux de Mycorrhization VA d'un Systeme Radiculaire. Recherche de Methodes d'Estimation ayant une Signification Fonctionnelle. Proceedings of the 1st European Symposium on Mycorrhizae: Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae, Dijón, 1-5 July, 1985. Gianinazzi-Pearson, V.; Gianinazzi, S. (Eds.). Paris: INRA, 1986. pp. 217-222.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las soluciones de tinción que se prepararon a partir de las tintas: Pelikan azul 523 no lavable en agua y fluido azul para corrección, ambas de procedencia china, así como Kores azul y Staedtler azul 745 alemana, resultaron en la formación de precipitados y cambiaron de coloración cuando se les añadió el ácido clorhídrico, por lo que no se seleccionaron para ser utilizadas en los ensayos de la técnica, pues podían entorpecer la visualización de las estructuras fúngicas en la posterior observación al estereoscopio, considerándose no útiles para este fin.

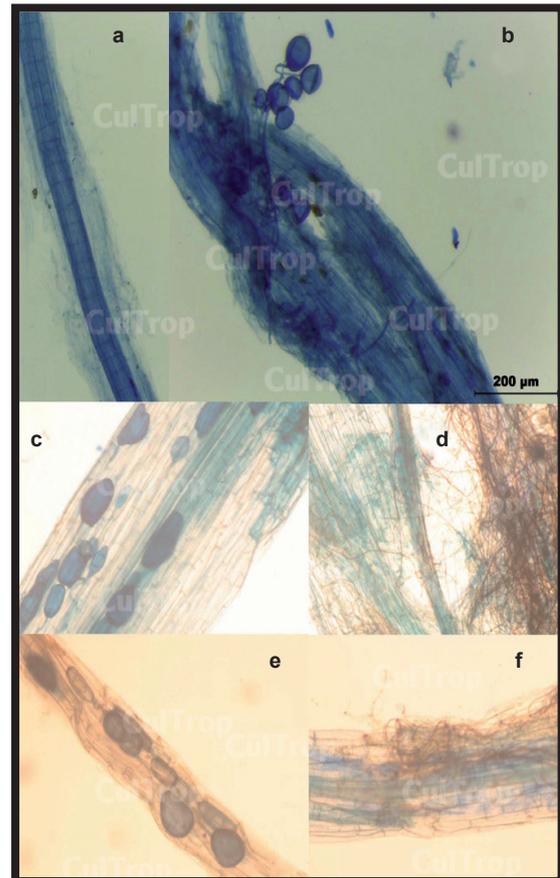
Las dos tintas negras ensayadas tiñeron las estructuras intrarradicales y extrarradicales de los HMA y posibilitaron su observación al estereoscopio, rindiendo mejores resultados, en cuanto a la nitidez en la visualización de las estructuras fúngicas, la Parker en comparación con la Musso. La utilidad de la tinta negra encontrada en este trabajo concuerda con resultados previos donde se informó como mejor alternativa para este propósito la tinta de bolígrafo Shaeffer negra no lavable en agua (8).

A diferencia del trabajo mencionado (8), en el presente estudio se logró obtener un mayor contraste cuando se utiliza la tinta azul Parker Quink. Además, con esta tinta, si la muestra queda sobreteñida se debe esperar unos días antes de la lectura y las raíces se pueden conservar en la solución de tinción a temperatura ambiente durante seis meses aproximadamente. En caso de que la lectura se realice meses después dentro de este periodo y presente dificultades para visualizar las estructuras fúngicas debe procederse a calentar las muestras en estufa por 10 minutos a 70 °C.

Se resalta la tinta Parker Quink azul lavable en agua, la cual tiñó las muestras y permitió visualizar con excelente claridad todas las estructuras fúngicas dentro y fuera de las raíces procedentes de las diferentes familias de plantas como se aprecia en la figura. Esta tinta resultó la más apropiada para utilizar como colorante, en sustitución del azul de tripano, en la técnica desarrollada comúnmente para la tinción de las estructuras de los HMA (3), por lo que se recomienda para una mayor calidad en la fotodocumentación y para facilitar la propia evaluación al microscopio. La misma permitió distinguir muy fácilmente las raíces colonizadas de las no colonizadas (fotos a, b). Las hifas individuales en secciones de raíces con colonización micorrízica parcial o abundante se observaron claramente (fotos d, f). Esta tinción permitió la visualización clara de las vesículas, esporas germinadas e hifas intra y extrarradicales con estructuras de penetración (fotos b- f).

En las figuras se puede apreciar que las soluciones de tinción ensayadas tiñeron por igual las estructuras fúngicas de los diferentes hongos

inoculados. Los mismos son representativos de dos órdenes (Glomerales y Diversisporales), cuatro familias (*Glomeraceae*, *Claroideoglomeraceae*, *Gigasporaceae* y *Acaulosporaceae*) y nueve géneros representados fundamentalmente, por especies de *Glomus*, *Acaulospora*, *Rhizoglomus*, *Funneliformis* y *Claroideoglomus*, entre otros. Lo antes mencionado demuestra la magnitud del alcance de la técnica alternativa propuesta con la utilización de la tinta azul Parker Quink lavable como colorante.



(a) raíz de pepino no colonizada. (b) raíz de tomate colonizada por *Glomus cubense*. Se observan esporas e hifas intrarradicales. (c, d) Raíces de tomate colonizadas por HMA nativos pertenientes al conglomerado. Se observan vesículas (c) e hifas intra y extrarradicales (d), colonización abundante. (e, f) raíces de maíz colonizadas por *Funneliformis mosseae*. Se observan vesículas (e) e hifas intra y extrarradicales (f), colonización parcial.

Fragmentos de raíces colonizadas por HMA teñidas con solución de tinta azul Parker Quink-HCl.

Es importante destacar que no hubo diferencias significativas en el grado de colonización micorrízica ni en la intensidad determinadas en las raíces de plantas con diferentes características, evaluadas mediante los dos métodos de tinción que emplean como colorante el azul de tripano (método estándar) o la tinta de bolígrafo azul lavable que propone este trabajo (Tabla).

Tabla. Resultados del análisis estadístico realizado al comparar los porcentajes de colonización micorrizica e intensidad determinados en las muestras de raíces teñidas con azul de tripano (método estándar) y con tinta Parker Quink azul lavable.

Planta	Porcentaje de raíces teñidas con:							
	Azul de tripano		Tinta azul lavable		valor t		Significación	
	CM	I	CM	I	CM	I	CM	I
Maíz	50±2,3	2,6±0,2	54±3,6	3,2±0,5	-0,75	-1,02	0,47	0,33
Tomate	72±0,03	4,3±0,9	71±3,07	3,9±0,6	0,53	0,92	0,64	0,40

Media (±error estándar) de muestras de raíces de veinte réplicas por especie vegetal. Prueba T para muestras relacionadas ($p < 0,05$). CM-colonización micorrizica, I- intensidad.

CONCLUSIONES

Este estudio propone modificaciones en la técnica de tinción de HMA estándar, consistentes en la sustitución del colorante azul de tripano por la tinta de bolígrafo azul Parker Quink lavable en agua, eliminación de la etapa de incubación de las muestras en solución de ácido clorhídrico y eliminación del uso de ácido láctico y glicerina. A la vez que adecua la tinta alternativa a utilizar en la técnica descrita previamente para este fin. Esto representa un ahorro considerable del recurso agua, de tiempo y financiero, por el empleo de un menor número de reactivos. No menos importante es que contribuye a la seguridad y protección del personal del laboratorio involucrado, pues se evita su exposición a reactivos cancerígenos y tóxicos, así como a la conservación del medio ambiente ya que evade la emisión de tales reactivos, ya sea en forma de gases o en el agua de lavado al mismo.

AGRADECIMIENTOS

A la M.Cs. Emilia Basulto por su asistencia en la búsqueda de los descriptores correctos.

BIBLIOGRAFÍA

- Smith, S.; Read, D. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3^{ed}. London: Academic Press, 2008. 606 pp. ISBN: 9780123705266.
- Rivera, R.; Fernández, F.; Fernández, K.; Ruiz, L.; Sánchez, C.; Riera, M. Advances in the Management of Effective Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis in Tropical Ecosystems. En: Hamel, Ch.; Plenchette, Ch. (Eds). *Mycorrhizae in crop production*. Haworth Press, Binghampton, New York. 2007. pp. 151-195.
- Phillips, J. M.; Hayman, D. E. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br Mycol. Soc.*, 1970, vol. 55, pp. 158-161. ISSN: 0007-1536.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). Monogr. *Eval. Carcinog. Risks to Human*. [en línea]. [Consultado: 30/Octubre/2013]. Disponible en: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>.
- Brundrett, M. C.; Piché, Y.; Peterson, R. L. A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Can. J. Bot.* 1984, vol. 62, pp. 2128-2134. ISSN: 0008-4026.
- Kormanik, P. P. y McGraw, A. C. Quantification of vesicular arbuscular mycorrhizae in plant roots. Methods and principles of mycorrhizal research. *The American Phytopathological Society, St Paul, Minn.* 1982. pp. 37-47. ISSN: 0331-949X.
- Pohanish, R. P. *Sittig's Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens*. 6th Ed. Estados Unidos de América, New York: William Andrew Inc. 2011, 3096 pp. ISBN: 978-1-4377-7869-4.
- Vierheilig, H.; Coughlan, A. P.; Wyss, U.; Piché, Y. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, vol. 64, pp. 5004-5007. ISSN: 1098-5336.
- Rodríguez, Y.; Dalpé, Y. y Séguin, S. Clasificación taxonómica de la cepa de hongo micorrizógeno arbuscular INCAM-2 como *Funneliformis mosseae*, syn. *Glomus mosseae*. *Cultivos Tropicales*, 2014, vol. 35, no. 2, pp. 27-33. ISSN: 0258-5936.
- Rodríguez, Y.; Dalpé, Y.; Séguin, S.; Fernández, K.; Fernández, F.; Rivera, R. A. *Glomus cubense* sp. nov., an arbuscular mycorrhizal fungus from Cuba. *Mycotaxon*, 2011, vol. 118, pp. 337-347. ISSN: 2154-8889.
- Medina, L. R.; Torres, Y.; Herrera, R.; Rodríguez, Y. Aislamiento e identificación de hongos micorrizicos arbusculares nativos de la zona de las Caobas, Holguín. *Cultivos Tropicales*, 2010, vol. 31, no. 4, pp. 33-42. ISSN: 1819-4087.
- Redecker, D.; Schüssler, A.; Stockinger, H.; Stürmer, S.; Morton, J.; Walker, C. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). *Mycorrhiza*, 2013, no. 7, pp. 515-31. doi: 10.1007/s00572-013-0486-y.
- Sieverding, E.; da Silva, G. A.; Berndt, R. y Oehl, F. *Rhizoglomus*, a new genus of the *Glomeraceae*. *Mycotaxon*, 2014, vol. 129, no. 2, pp. 373-386. ISSN: 0093-4666.

Recibido: 13 de mayo de 2014

Aceptado: 13 de diciembre de 2014