

Aclimatación de tres especies de leguminosas mediante bioendurecimiento con microorganismos benéficos

Melvin Maiquetía¹ , Edith Vargas¹ , Eva de García¹ , Marcia Toro^{2*} 

¹Universidad Central de Venezuela (UCV), Facultad de Ciencias, Instituto de Biología Experimental, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Caracas. Venezuela. ² Universidad Central de Venezuela (UCV), Facultad de Ciencias, Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Laboratorio de Ecología de Agrosistemas, Caracas. Venezuela. *Correo electrónico: marcia.toro@ciens.ucv.ve; mtoro30@gmail.com

RESUMEN

Las semillas de *Calopogonium sp.*, *Stylosanthes capitata* y *Cassia moschata* presentan un estado de latencia prolongada que limita su germinación. Una alternativa de propagación es por cultivo *in vitro*, y para mejorar la adaptación al ambiente terrestre se utiliza el procedimiento de bioendurecimiento. El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto de inoculación con microorganismos benéficos en la aclimatación de esas tres especies de leguminosas. Se seleccionaron 16 plantas para cada tratamiento, de las tres especies obtenidas de germinación *in vitro*. Para su aclimatación se sembraron en un sustrato, en envases de 250 mL. Los tratamientos fueron: inoculación de hongos Glomeromycota (HMA), inoculación con hongos Glomeromycota y *Rhizobium phaseoli* (HMA + R), control sin microorganismos (SM). Se determinó la sobrevivencia en un periodo de cinco meses. *Calopogonium sp.* mostró un 16 % de sobrevivencia a los cinco meses y 85 nódulos.planta⁻¹ para el tratamiento HMA+R y 40 % de colonización micorrízica en el tratamiento HMA, lo que favoreció su aclimatación. *S. capitata* tuvo un 25 % de sobrevivencia con HMA y mostró menor cantidad de nódulos (5 nódulos.planta⁻¹ con HMA + R, e insuficiente cantidad de raíces para cuantificar la micorrización. *C. moschata* inoculada con HMA alcanzó 13 % de sobrevivencia, sin formación de nódulos. La inoculación con microorganismos fue diferencialmente beneficiosa en la aclimatación de estas leguminosas y su efecto se potenció con la doble inoculación HMA+ R. La aclimatación de plantas obtenidas *in vitro* es vital para su establecimiento definitivo y es diferente para cada especie.

Palabras clave: *Calopogonium sp.*, *Cassia moschata*, endurecimiento, micorrizas arbusculares, *Stylosanthes capitata*

Acclimatization of three legume species by biohardening with beneficial microorganisms

ABSTRACT

Calopogonium sp., *Stylosanthes capitata* and *Cassia moschata* are legumes whose seeds have high protein content and long dormancy. In vitro culture is used as an alternative of propagation. The procedure known as biohardening is used to improve plant adaptation to the terrestrial environment. The objective of the research was to evaluate the effect of inoculation with beneficial microorganisms in the acclimatization of these species of legumes. Sixteen plants from each of the three legume species obtained from in vitro germination were selected for each treatment. For their acclimatization, plants were sown on a substrate, in 250 mL containers. The inoculation treatments were: Glomeromycota fungi (AMF), inoculation with Glomeromycota and *Rhizobium phaseoli* fungi (AMF + R) and control without microorganisms (WM). After five months plant survival was determined. 16 % of *Calopogonium sp.* plants survived after five months, showed 85 nodules.plant⁻¹, for AMF + R treatment and 40 % mycorrhizal colonization in the AMF treatment, which favored its acclimatization. *S. capitata* showed 25 % of survival with AMF, showed fewer nodules (5 nodules.plant⁻¹) with AMF + R and had insufficient roots to quantify mycorrhizal colonization. *C. moschata* inoculated with AMF reached 13 % survival and did not form nodules. The inoculation with microorganisms was differentially beneficial in the acclimatization of these legumes and its effect was enhanced with the double inoculation HMA + R. The acclimatization of plants obtained in vitro is vital for their definitive establishment and is different for each species.

Key words: *Calopogonium sp.*, *Cassia moschata*, hardening, arbuscular mycorrhiza, *Stylosanthes capitata*

Recibido: 01/09/2020 - Aprobado: 05/08/2021

INTRODUCCIÓN

Las leguminosas constituyen un grupo de plantas de interés alimenticio, con importancia en la agricultura y pascicultura en diferentes países, donde se incluye Venezuela (De Pablos *et al.* 2009). Proveen una fuente sustancial de proteínas para el ganado, al utilizarse en sistemas silvopastoriles. Entre estas, *Stylosanthes capitata* Vogel y *Calopogonium sp.* que son subfrutices nativos de las sabanas y consumidos por el ganado durante la época de sequía (Pérez *et al.* 2006). Otra de las leguminosas es *Cassia moschata* Benth. que se utiliza como barrera viva en las parcelas de manejo agroecológico y suministro de nitrógeno al suelo (Toral *et al.* 2006). Estas especies se encuentran en ecosistemas de suelos ácidos, por lo que pueden mostrar limitaciones en su crecimiento.

En Venezuela, alrededor del 70 % de los suelos son ácidos, de baja fertilidad natural y con limitaciones para uso agrícola (López-Falcón y Espinoza 2015). La baja capacidad productiva de los suelos por manejos inadecuados, se aborda con el uso de altos volúmenes de fertilizantes inorgánicos nitrogenados y fosforados. Estos fertilizantes pueden ser retenidos en el suelo, con consecuencias eventuales de contaminación de los suelos y aguas (Sánchez *et al.* 2011). Es necesario implementar prácticas que promuevan la sustentabilidad del suelo, como el uso de microorganismos benéficos, las micorrizas arbusculares (MA) y las bacterias promotoras de crecimiento (Marinho *et al.* 2010). Estos, como biofertilizantes, constituyen un medio económico por la reducción de la aplicación de fertilizantes y favorecen el rendimiento de los cultivos, de manera amigable al ambiente.

La mayoría de las semillas de las Leguminosae tienen como característica la impermeabilidad del tegumento, lo que les otorga la incapacidad de germinar de manera rápida (Anis *et al.* 2012). Esta característica, conocida como latencia, representa un mecanismo de supervivencia en climas desérticos o con alternancia de épocas secas y húmedas marcadas (Sanabria *et al.* 2004). Pueden tener, además, baja viabilidad y mediano porcentaje de germinación, lo que restringe su reproducción a gran escala (Rojas-Rodríguez y Torres-Córdoba 2015).

Debido a la latencia de las semillas de las Leguminosae surge la necesidad de incrementar su propagación y conservación como recurso fitogenético (Escandón

et al. 2003). Una alternativa de propagación es por medio de cultivo *in vitro*. Sin embargo, estas plantas presentan alteraciones morfológicas y fisiológicas que hacen de su aclimatación al exterior uno de los principales inconvenientes de la técnica. Con frecuencia, estas plantas poseen un escaso desarrollo de la cutícula foliar, hojas blandas y poco activas fotosintéticamente. La inactividad del aparato estomático, la pobre conexión vascular en el vástago y raíces poco funcionales, predisponen a estas plantas a una desecación inmediata al pasarlas a condiciones *ex vitro* (Pérez *et al.* 2006).

Para mejorar la adaptación al ambiente terrestre de las plantas producidas *in vitro*, varios autores han utilizado la inoculación con hongos Glomeromycota (Calderón *et al.* 2000) y bacterias promotoras de crecimiento (Singh *et al.* 2012, Muthuraj *et al.* 2018), procedimiento conocido como Bioendurecimiento o Biohardening (Singh *et al.* 2004). La inoculación de microorganismos benéficos genera efectos positivos, tanto en el incremento de la sobrevivencia de la planta, durante la fase de aclimatación, como en el desarrollo del sistema radical (Anis *et al.* 2012). Asimismo, las variables de crecimiento, densidad de raíces y colonización micorrízica mejoran en las plantas bioendurecidas (Fernández *et al.* 2002).

Las especies de la familia Fabaceae se destacan por su asociación simbiótica con las bacterias de la familia Rhizobiaceae o rizobios (Weir 2016). Estas bacterias tienen la capacidad de formar nódulos en las raíces, donde captan el nitrógeno de la atmósfera. Cerca de 3.400 especies de leguminosas se han analizado por su capacidad para nodular (Kumar *et al.* 2019).

Las especies de leguminosas se asocian a los hongos Glomeromycota u hongos formadores de la micorriza arbuscular (HMA) formando la simbiosis MA. Esto permite una mejor nutrición de la planta, principalmente, por favorecer la absorción del fósforo. Esas especies pueden tener doble simbiosis, rizobio-micorriza, lo que se conoce como simbiosis tripartita (Chalk *et al.* 2006); esto le confiere a la planta la capacidad de nutrirse de dos macronutrientes de importancia, como el nitrógeno (N) y el fósforo (P).

En los suelos agrícolas la asociación rizobio-leguminosa provee la fuente de N más importante para la planta (Liriano *et al.* 2012). Los simbiosiontes asociados son del orden Rhizobiales, que incluye

varios géneros entre ellos *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Ensifer* y *Sinorhizobium* (Datta *et al.* 2015). El nitrógeno atmosférico (N_2) es fijado dentro de los nódulos por dichas bacterias y lo transforman en amonio (NH_4), que emplea la planta como fuente asimilable para su crecimiento; ese proceso se denomina fijación biológica del nitrógeno (FBN) (Poole *et al.* 2018). El género *Rhizobium* es capaz de abastecer hasta un 90 % de las necesidades de nitrógeno en dichas plantas, a través de la FBN (López-Alcócer *et al.* 2017). Los rizobios son también considerados como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, colonizadoras del sistema radicular y su entorno más cercano, descritas originalmente por Zablutowicz *et al.* (1991).

La micorriza arbuscular es una simbiosis mutualista de amplia distribución en el reino vegetal (Barea 2015); favorece el crecimiento de la planta, ya que participa en la absorción de nutrientes inorgánicos de poca movilidad en el suelo, principalmente, el fósforo. Una abundante red de hifas del hongo que se extiende fuera de la raíz influye en la captación de los elementos de la solución del suelo. Esto permite que aumente la calidad y el rendimiento de los cultivos, se protegen las plantas de estreses bióticos y abióticos y mejora la estructura del suelo (Toro y Andrade 2020). Las micorrizas arbusculares son de interés biotecnológico, consideradas biofertilizantes. Su aplicación en sistemas agrícolas, prácticas de reforestación y recuperación de suelos contaminados o erosionados son promisorias (Toro *et al.* 2008).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la inoculación con microorganismos benéficos en la aclimatación de tres especies de leguminosas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

En una primera etapa se realizó la propagación de las especies *Calopogonium* sp., *S. capitata* y *C. moschata* a partir de la germinación *in vitro* de semillas, según Maiquetía *et al.* (2020). Las plantas *in vitro* se extrajeron del medio de cultivo y se enjuagaron con agua destilada, para retirar el agar de las raíces. Se seleccionaron un total de 48 plantas por especie de leguminosa, con una altura de 4 a 6 cm, para el proceso de endurecimiento con microorganismos ó bioendurecimiento.

Microorganismos

El inóculo de HMA que se utilizó se multiplicó en el Laboratorio de Ecología de Agroecosistemas del Instituto de Zoología y Ecología Tropical, UCV. Es un cultivo mixto de hongos Glomeromycota nativos de los suelos de las sabanas de Santa María de Ipire, con predominio de especímenes pertenecientes a las familias Acaulosporaceae, Glomeraceae y Gigasporaceae (Mora *et al.* 2013). Se obtuvo mediante el uso de *Zea mays* como planta hospedera. El uso de inóculos mixtos, multicepa o consorcios de hongos Glomeromycota es una práctica que permite asemejar a las condiciones del suelo rizosférico de la planta, en su ecosistema natural. El inóculo (20 g.planta^{-1}) consistió en una mezcla de esporas ($600 \text{ esporas.g}^{-1} \text{ suelo}$), raicillas colonizadas (67 % de longitud de raíz micorrizada, LRM) y micelio, y se cuantificó según Giovanetti y Mosse (1980) previa tinción con azul de tripan (Phillips y Hayman 1970).

También se empleó el inóculo de *Rhizobium phaseoli* (R) que pertenece a la colección de microorganismos del Laboratorio de Ecología de Agroecosistemas, según Mora *et al.* (2013). Este se multiplicó en el mismo Laboratorio. Es un simbionte de rápido crecimiento que posee un amplio rango de hospederos de leguminosas con diferentes grados de efectividad y afinidad (Lloret y Martínez-Romero 2005). Se añadieron $2,5 \text{ mL.planta}^{-1}$ directamente en la base de la planta, a una concentración de 10^8 UFC.mL^{-1} . El inóculo de HMA se aplicó para el tratamiento solo con micorrizas (Tratamiento HMA) y en combinación con *R. phaseoli* (Tratamiento HMA + R) al momento que se colocaron las plantas a aclimatar en el sustrato.

Diseño experimental

La investigación se realizó en el invernadero del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela (UCV). El diseño experimental empleado fue de bloques al azar, con tres tratamientos de inoculación correspondientes a: control sin microorganismos (SM), inoculación de hongos Glomeromycota (HMA) e inoculación con hongos Glomeromycota y *Rhizobium phaseoli* (HMA + R) con 16 plántulas o repeticiones para cada tratamiento. Las plantas seleccionadas de las tres especies se

trasplantaron a macetas, con capacidad de 250 mL; se colocaron en un sustrato constituido por una mezcla de suelo de sabana y tierra abonada (comercial) en proporción 2:1, cuya composición según Mora *et al.* (2017) fue: Textura: areno-francosa; pH= 5,01; N inorgánico= 20,36; P=11,32; K= 41,25; Ca= 57,63; Mg= 35,13; Na= 7,2 (mg.kg⁻¹); Materia Orgánica= 1,33 %, CIC= 3,06 (cmol⁺.Kg⁻¹). Las macetas con las plantas se ubicaron dentro de propagadores con alta humedad (80-93 % de humedad relativa) y baja luminosidad (10 μmol.m⁻².s⁻¹, densidad de flujo fotónico fotosintético, DFF), durante 21 días. Luego de este período, las macetas se retiraron del propagador y se colocaron en el invernadero, donde se evaluó su supervivencia, desarrollo y crecimiento, durante 5 meses. Las plantas se regaron cada 3 días con agua destilada. Una vez por semana se regaban con 20 mL de solución Hewitt (1966) de acuerdo a cada tratamiento.

Sistema de muestreo y variables analizadas

Se realizaron medidas mensuales de altura de la planta (cm) y diámetro (mm) basal del tallo, número de hojas y área foliar. Se evaluaron mensualmente los porcentajes de supervivencia de las plantas en el invernadero, considerándose como 100 % la supervivencia de las 16 plantas por cada tratamiento de inoculación. A los cinco meses de crecimiento se cosecharon cuatro plantas por tratamiento, para determinar el área foliar específica (AFE= área hoja/masa seca hoja), la longitud radical, la biomasa seca de hojas, vástago y raíces. Previo a las evaluaciones se realizó un lavado con agua destilada y posterior secado del material a 60 °C durante 96 h. Se pesaron en una balanza analítica digital marca Adventure (Ohaus, China). Este procedimiento, planteado para las tres especies, solo se aplicó a *Calopogonium* sp. y *S. capitata* (Tratamientos HMA y SM). En el caso de *C. moschata* el número de plantas al final del período de observación fue insuficiente para realizar estas determinaciones. De las mismas plantas, se colectaron muestras de raíces y se fijaron con isopropanol hasta la cuantificación de la colonización micorrizica, empleando la metodología de tinción con azul de tripán propuesta por Phillips y Hayman (1970). Cada raíz se observó en su longitud total y se evaluó la presencia de las estructuras típicas de las MA, mediante el método de intersección de cuadrantes de Giovanetti y Mosse (1980). En el tratamiento inoculado con *R. phaseoli* (HMA + R), para cada especie, se realizó un

conteo del número de nódulos formados en la raíz de cada una de las plantas. Con esto se expresó el número total de nódulos por planta y el número promedio total de nódulos por tratamiento. Estas mediciones se realizaron para cada especie de leguminosa.

Análisis estadístico

Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA), de dos vías para los datos que presentaban distribución normal y homogeneidad de varianzas. Se consideró los factores tiempo e inoculación para las variables supervivencia y de análisis de crecimiento a través del tiempo. El ANOVA de una vía se aplicó para los análisis de biomasa y análisis de crecimiento puntuales. En todos los casos en que las medias de los tratamientos diferían significativamente se aplicó la prueba de Duncan para $P < 0.05$. Para los análisis se utilizó el programa Statistic 5.5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sobrevivencia de las plantas de las tres especies de leguminosas en vivero

Las plantas de la especie *Calopogonium* sp. inoculadas con HMA +R mostraron la mayor supervivencia (16 %), respecto a los tratamientos HMA y SM (Figura 1A). En el caso de *S. capitata* se obtuvo un 25 % de supervivencia en las plantas micorrizadas (HMA), tratamiento con mayor supervivencia que SM y HMA + R (Figura 1B). En la especie *C. moschata* solo con el tratamiento HMA+R se mantuvo un 13 % de supervivencia de las plantas (Figura 1C).

La mayor tasa de supervivencia se encontró en las plantas inoculadas con HMA (*S. capitata*) o la doble inoculación HMA + R (en los casos de *Calopogonium* sp y *C. moschata*). Resultados similares han sido descritos por Krishna *et al.* (2006) y Muthuraj *et al.* (2018), quienes indican que la mayor supervivencia de las plantas estaría favorecida por la mayor capacidad exploratoria de la raíz; por la red de micelio que la MA establece en la rizósfera, lo cual incide en una mejora de la toma de nutrientes y agua para la planta. Al interactuar las MA con *R. meliloti*, no solo se mejora la nutrición de P, sino también del N, lo cual estaría incidiendo en el mejor desarrollo de la planta en los tratamientos HMA + R (Meng *et al.* 2015). La interacción entre bacterias promotoras

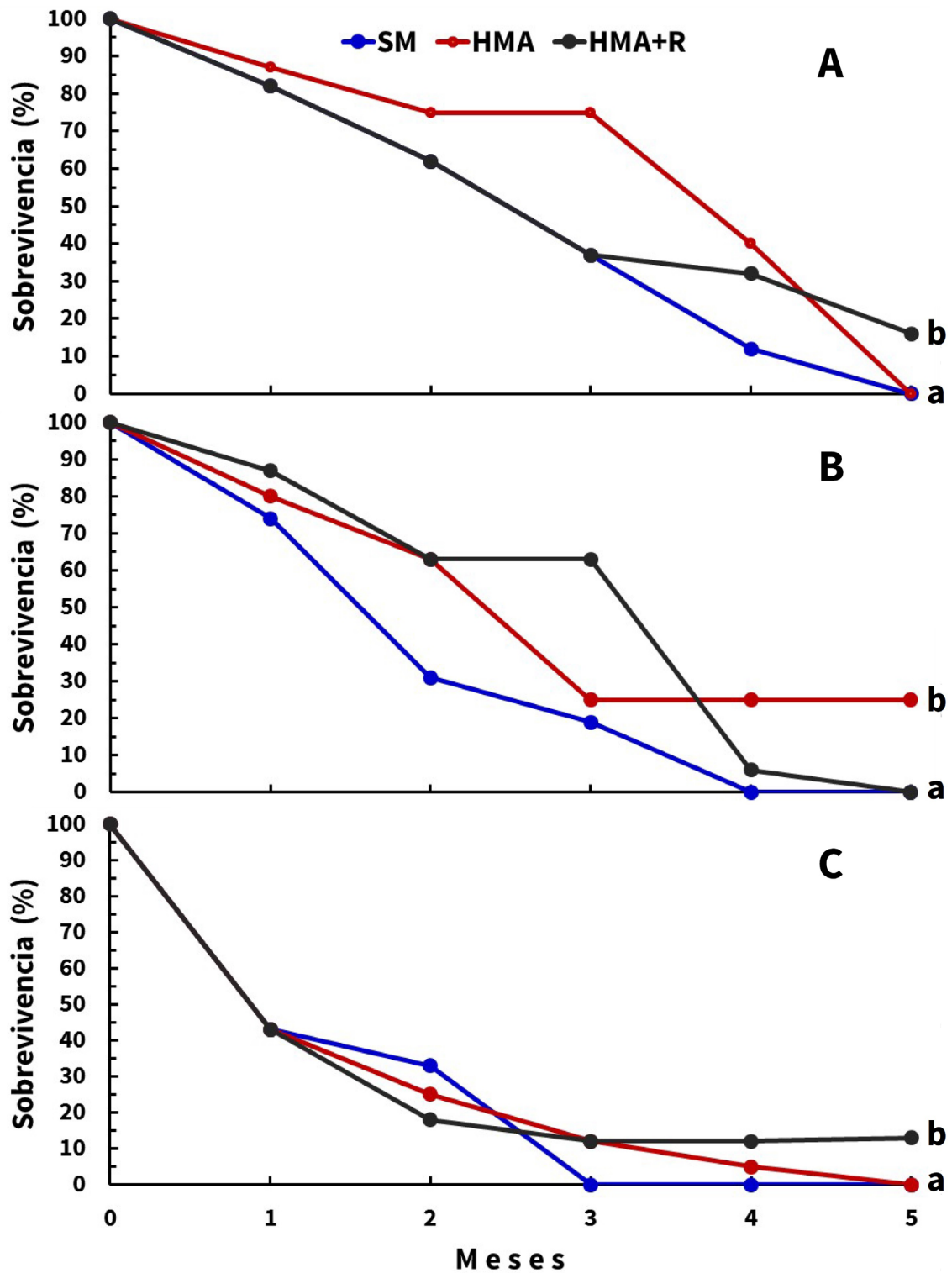


Figura 1. Variación del porcentaje de sobrevivencia de plantas provenientes de semillas germinadas *in vitro* en la inoculación con HMA, HMA+R y SM sobre la sobrevivencia: **A)** *Calopogonium sp.*, **B)** *S. capitata* y **C)** *C. moschata* (Letras distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos).

de crecimiento y las MA es sinérgica, estimulando la nutrición de las plantas; también se ha descrito que las bacterias promotoras favorecen la colonización micorrizica y por ende del desarrollo de la planta y adquisición de nutrientes (Mora *et al.* 2019).

Respuesta de crecimiento de las plantas de las tres especies de leguminosas provenientes de semillas germinadas *in vitro*

Calopogonium sp.

Se observó un incremento significativo en la altura de las plantas inoculadas con HMA+R y HMA respecto a las de control (SM), tendencia que se mantuvo hasta los cinco meses al finalizar la medición (Figura 2A). El diámetro basal del tallo fue mayor a partir del tercer mes en las plantas con doble inoculación (HMA+R), respecto a las plantas micorrizadas (HMA) y (SM), las cuales no tuvieron diferencias significativas entre sí a los cinco meses (Figura 2B). El número de hojas fue 46 y 28 % mayor en las plantas tratadas con HMA+R y HMA, respectivamente, en comparación a SM (Figura 2C). Es claro el efecto positivo de la inoculación con HMA + R en los parámetros de crecimiento de *Calopogonium sp.*

La masa de los compartimientos foliar, tallo y raíz de las plantas de *Calopogonium sp.* mostró diferencias significativas entre los tratamientos de inoculación (Figura 3), resultando mayor el efecto de la doble inoculación (HMA+R). La mayor cantidad de masa puede deberse a la mejor condición nutricional que proveen las MA y a un posible realce de la función fotosintética, tal como indican Rupnawar y Navale (2000) en plántulas de granada y Decklerk *et al.* (2002) en plantas de banano bioendurecidas. En el caso de la masa del tallo, de raíz y hojas se encontraron diferencias significativas entre las plantas con los tratamientos HMA+R y HMA y las plantas control (SM), evidenciando nuevamente el efecto positivo de la inoculación de los microorganismos en la masa de la planta. La relación vástago/raíz mostró diferencias significativas entre tratamientos para las vitro plantas de *Calopogonium sp.*, resultando con mayor valor en el tratamiento SM. Este comportamiento ha sido descrito como un efecto de estimulación en el desarrollo radical por los microorganismos beneficiosos descrito por Vidal *et al.* (1992) quienes observan un menor desarrollo de la raíz en las

plantas no inoculadas reflejado en una mayor relación V/R.

Tanto el área foliar total como el área foliar específica (mayor peso seco por unidad de área foliar) de *Calopogonium sp.* presentaron diferencias significativas entre tratamientos, resultando mayor el efecto positivo del tratamiento HMA+R, según se observa en la Figura 4. Tendencias similares fueron descritas por Vosátka *et al.* (1999) al conseguir buen desarrollo foliar y de la planta por efecto de la inoculación con varias especies de HMA, a consecuencia de la mejor condición nutricional (P y N) y a actividad fotosintética favorecida por las asociaciones simbióticas (Kumar *et al.* 2014, Mirjani *et al.* 2019).

S. capitata

El tratamiento más favorable para la aclimatación de esta especie fue HMA, en el que se observó un incremento significativo en la altura de las plantas respecto a las SM, a partir del tercer mes de tratamiento que se mantuvo hasta el quinto mes, final de la medición (Figura 5). El diámetro basal del tallo y el número de hojas fueron mayores a partir del cuarto mes en las plantas inoculadas con HMA. En esta especie, la cantidad de raíces de las muestras finales fue insuficiente para cuantificar la colonización micorrízica. Sin embargo, se observa que la inoculación con HMA favoreció los parámetros de crecimiento de *S. capitata*, coincidiendo con los resultados de bioendurecimiento con micorrizas de plantas micropropagadas obtenidos por Singh *et al.* (2012), Muthuraj *et al.* (2018) y Mirjani *et al.* (2019).

Aunque las plantas de *S. capitata*, inoculadas con HMA + R, alcanzaron los mayores valores de sobrevivencia en la aclimatación, 63 % a los tres meses, estas no sobrevivieron hasta los cinco meses. Esto pudo ser causado por el desarrollo incipiente de las raíces y, posiblemente, de su aparato fotosintético, incidiendo en una fisiología disfuncional de las plantas y baja sobrevivencia (Kumar *et al.* 2014). Por esta razón no se realizaron mediciones de los parámetros de crecimiento para este tratamiento. Los microorganismos que se combinan o se mezclan pueden manifestar incompatibilidad entre ellos, dado que las interacciones mutualistas alcanzan inestabilidad debido a diversos factores bióticos y abióticos (Cano 2011).

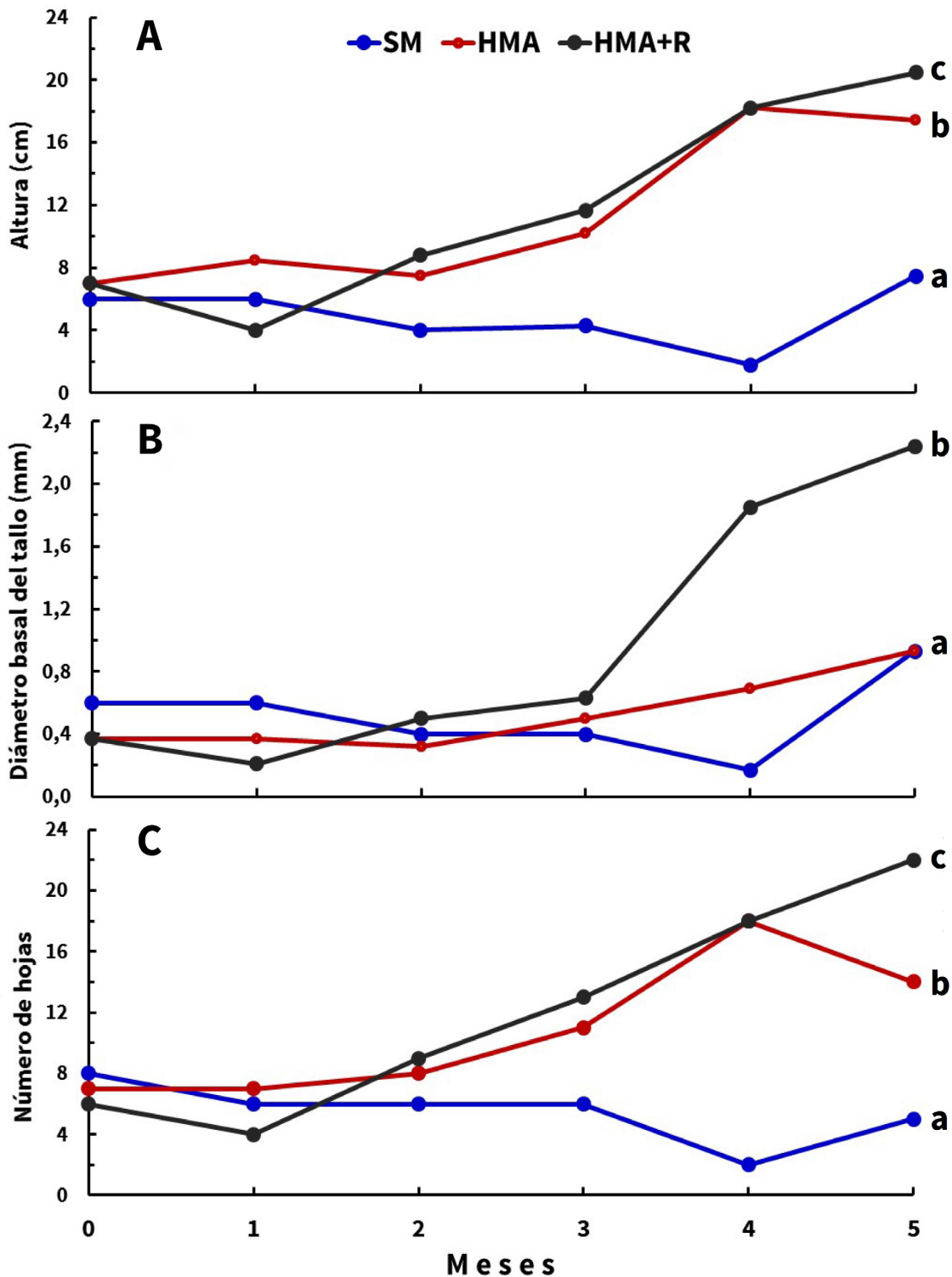


Figura 2. Evaluación de variables de crecimiento: **A)** altura (cm); **B)** diámetro (mm) basal del tallo y **C)** número de hojas durante cinco meses, en plantas de semillas germinadas *in vitro* de *Calopogonium* sp. inoculadas con HMA, HMA+R y SM. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos.

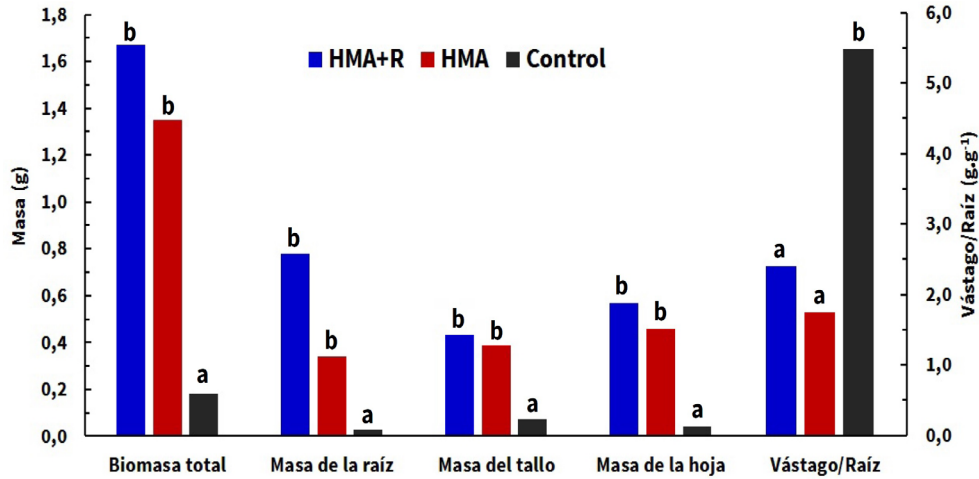


Figura 3. Efecto de la inoculación con HMA, HMA+R y Control (SM) en las plantas que provienen de semillas germinadas in vitro de *Calopogonium* sp. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos.

C. moschata

Durante la etapa de aclimatación el número final (dos) de plantas de *C. moschata* fue insuficiente para obtener datos con significancia estadística sobre las variables estudiadas. Las plantas que se conservaron en el proceso mostraron buen vigor, buena apariencia, sin formación de estructuras nodulares. Investigaciones previas reportaron efectos beneficiosos de la inoculación micorrízica en árboles micropropagados (Singh *et al.* 2004); cuando se aplica la inoculación con HMA poco después de retirar los explantes de los vasos de cultivo y al comienzo del inicio de la raíz. Estas

recomendaciones dependen de las especies, porque dicho beneficio no predominó en el presente estudio. Es conocido que la colonización micorrízica tiene lugar solo en raíces jóvenes y secundarias antes de la suberización (Azcón-Aguilar *et al.* 1992 y 1997).

C. moschata es una especie arbórea de lento crecimiento y las raíces finas y jóvenes son producidas tardíamente durante el desarrollo *ex vitro*. Según los resultados de la presente investigación, puede ser que, el establecimiento de la simbiosis micorrízica haya sido más lento en esta especie afectándose su desarrollo y supervivencia. Así mismo, para el

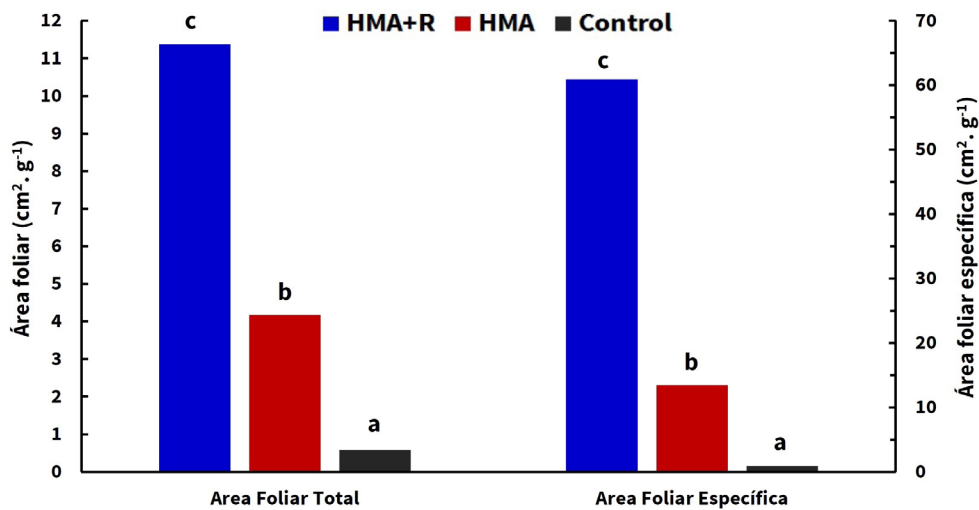


Figura 4. Efecto de la inoculación con HMA, HMA+R, con respecto al control (SM) de plantas provenientes de semillas germinadas in vitro de *Calopogonium* sp. sobre el área foliar total y el área foliar específica. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos.

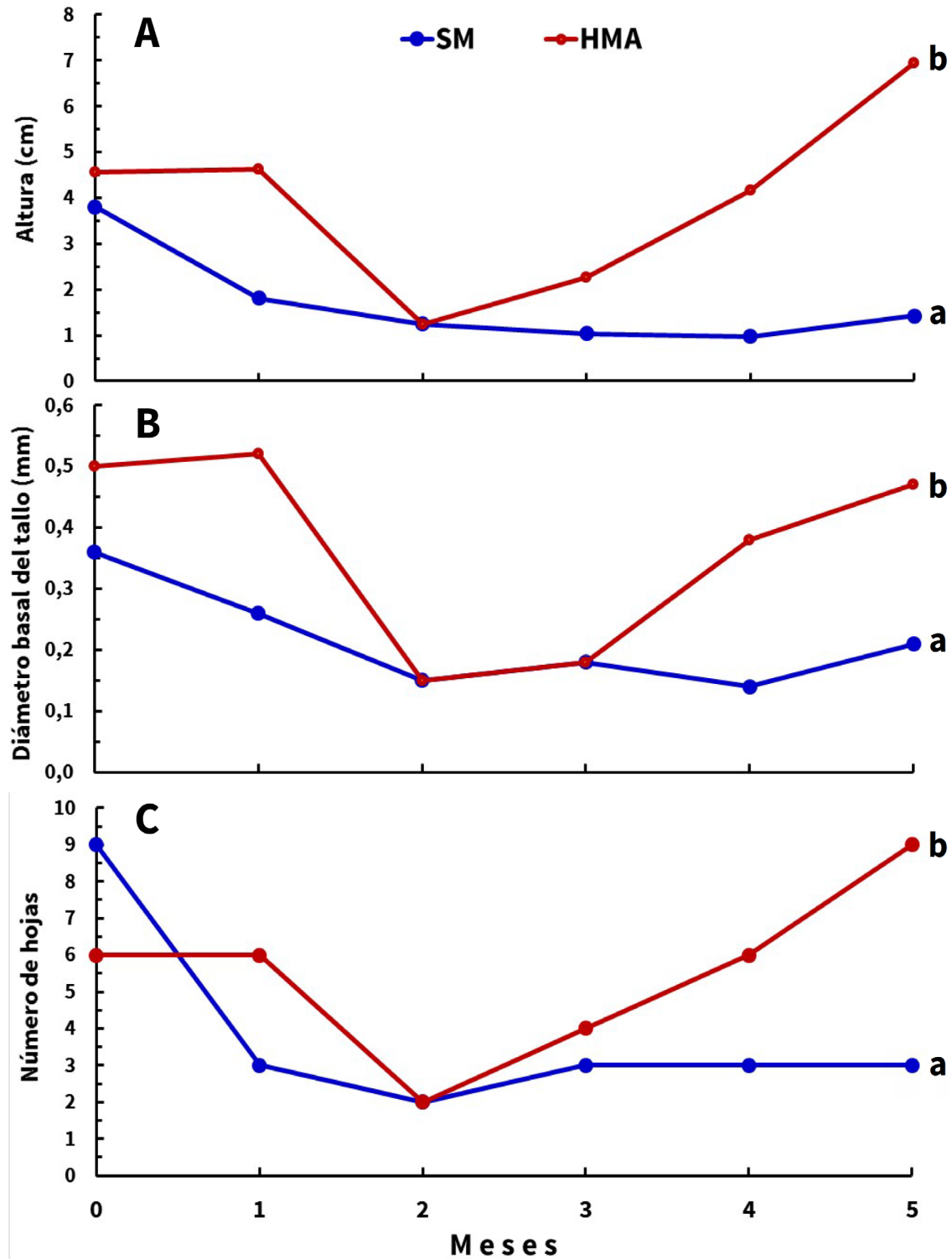


Figura 5. Evaluación del efecto de la inoculación de plantas de *S. capitata*, provenientes de semillas germinadas *in vitro*, durante 5 meses sobre: **A)** altura; **B)** diámetro basal del tallo y **C)** número de hojas. Triángulos, plantas inoculadas con HMA; cuadrados, plantas sin microorganismos inoculados (SM). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos.

establecimiento de *R. phaseolus* y la formación de los nódulos, pues hasta cinco meses de crecimiento, no se observaron. Las características de lento crecimiento de esta especie arbórea así lo sugieren y concuerdan con los resultados de la presente investigación. El efecto beneficioso de la inoculación micorrízica en *C. moschata* parece ser confirmado por nuestros resultados en las plantas restantes, solo a nivel de crecimiento. Así mismo, podría haber casos en los que no se encuentren efectos significativos de la inoculación con hongos micorrizicos según la planta hospedera; por lo tanto, la combinación de planta-HMA debe probarse para cada cultivo en particular antes de iniciar el proceso de bioendurecimiento (Vosátka *et al.* 1999).

Las diferentes respuestas de aclimatación entre las especies de leguminosas pueden ser porque la rizósfera es un entorno dinámico, donde ocurren interacciones importantes entre planta-planta, planta-microorganismos y microorganismos-microorganismos. La respuesta de estas interacciones puede representar un posible antagonismo o sinergismo, el cual depende de las cepas microbianas implicadas en la interacción, así como, de la especie vegetal utilizada (Perez *et al.* 2015). Nuestros estudios continuarán evaluando estos aspectos a fin de optimizar los protocolos de bioendurecimiento para cada especie vegetal.

Cuantificación de la longitud de raíz colonizada por MA y nodulación en las raíces de las tres especies de leguminosas estudiadas

En las plantas de *Calopogonium* sp. inoculadas con HMA se obtuvieron los mayores valores de colonización por micorrizas arbusculares (40 ± 12 %). En el caso del tratamiento con HMA + R un 25 ± 15 % (Cuadro 1), observándose vesículas y arbuscúlos en la tinción de las raíces (Figura 6).

Las plantas de *Calopogonium* sp. del tratamiento HMA + R exhibieron un promedio de 85 nódulos de *R. phaseoli* por planta, contrastando con las plantas, HMA y SM donde no se observaron dichas estructuras, a pesar de ser un suelo no esterilizado. La ausencia de HMA y/o rizobios en dicho sustrato, efectivos o afines a las especies de leguminosas empleadas en este trabajo es evidente (Cuadro 1).

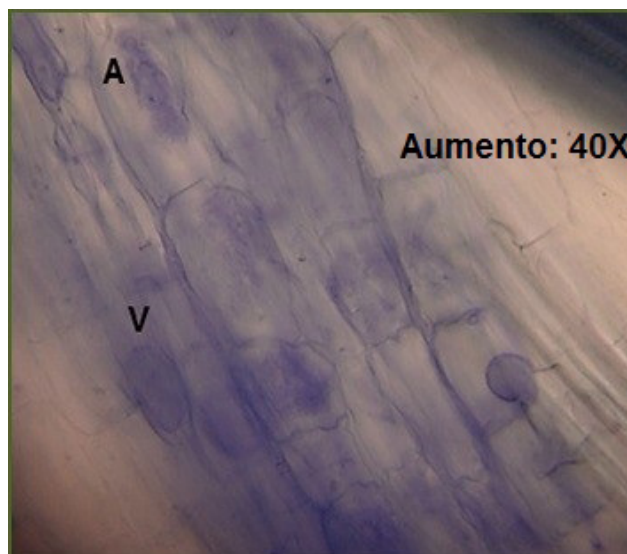


Figura 6. Raíz de *Calopogonium* sp. proveniente de plantas semillas germinadas *in vitro*, durante cinco meses de aclimatación colonizada con HMA. Nótese la presencia de arbuscúlos (A) y vesículas (V), estructuras típicas de la micorriza arbuscular.

Los resultados coinciden con los descritos por Meng *et al.* (2015), quienes señalan que la interacción de los rizobios con las MA es positiva para el crecimiento y desarrollo de las plantas; al igual que Chikkalaki *et al.* (2017), que obtuvieron eficiente bioendurecimiento de plantas de granada utilizando HMA y bacterias promotoras. Para *Calopogonium* sp., no hubo diferencias significativas respecto a la colonización micorrizica en la simbiosis tripartita, sin embargo se observó un número importante de nódulos por planta. Se ha descrito, Barea (2015), que la doble simbiosis es favorable en las leguminosas, reflejando una mejor condición nutricional y favorecimiento de los parámetros de crecimiento del tratamiento HMA + R. Un efecto similar de las inoculaciones se observa en la longitud de las raíces de esta especie (Figura 7).

S. capitata no produjo suficiente cantidad de raíces para la determinación de la colonización micorrizica, sin embargo si hubo nodulación en el tratamiento HMA + R (Cuadro 1). Es claro el contraste entre las capacidades de nodulación y colonización micorrizica entre las tres especies estudiadas. Esto puede estar relacionado con las diferencias fisiológicas entre las especies y su afinidad con los

Cuadro 1. Colonización micorrizica (%) y número de nódulos en las raíces de las tres especies de leguminosas, inoculadas con microorganismos benéficos.

| Variables | Tratamientos por especies de leguminosa | | | | | | | | |
|------------------------------|---|--------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|---|--------------------|--------------------|
| | Sin microorganismos | | | Hongos Glomeromycota | | | Hongos Glomeromycota + <i>R. phaseoli</i> | | |
| | <i>Calopogonium sp.</i> | <i>S. capitata</i> | <i>C. moschata</i> | <i>Calopogonium sp.</i> | <i>S. capitata</i> | <i>C. moschata</i> | <i>Calopogonium sp.</i> | <i>S. capitata</i> | <i>C. moschata</i> |
| Colonización micorrizica (%) | 0 | 0 | IR | 40 ± 12 | IR | IR | 25 ± 15 | IR | IR |
| Número de nódulos | 0 | 0 | 0 | ND | ND | ND | 85 ± 10,5 | 5 ± 3 | 0 |

IR = Insuficiente cantidad de raíces para determinar la colonización micorrizica o nódulos; ND = No detectado.

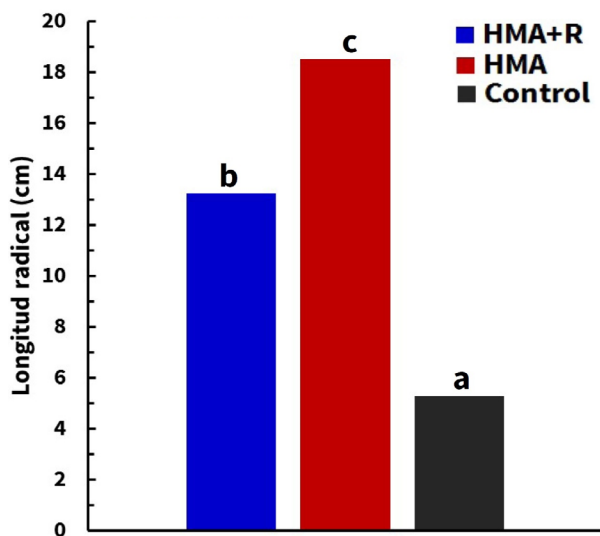


Figura 7. Efecto de la inoculación con HMA, HMA+RySM sobre la longitud de raíz de plantas de *Calopogonium sp.* provenientes de semillas germinadas *in vitro*. Letras distintas indican diferencias entre tratamientos.

microorganismos utilizados (Martínez-Viera *et al.* 2010). También se refleja en la ausencia de nodulación de *C. moschata* hasta los cinco meses de crecimiento, justificado anteriormente. En el mismo Cuadro 1, se observa la ausencia de nodulación y colonización micorrizica para *Calopogonium sp.* y *S. capitata* en el tratamiento SM, corroborando la ausencia de los microorganismos utilizados en el sustrato empleado.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos ilustran un efecto promotor de la inoculación micorrizica y de bacterias promotoras sobre la aclimatación de plantas provenientes de propagación *in vitro*.

El uso de hongos MA efectivos es notable en el desarrollo eficiente de las plantas propagadas *in vitro*, reduciendo así la mortalidad durante la aclimatación, particularmente para *Calopogonium sp.* y *S. capitata*.

La aplicación de las micorrizas arbusculares y de *R. phaseoli* a las plantas de *Calopogonium sp.* favoreció su establecimiento y podría asumirse como una práctica rutinaria en la aclimatación de plantas de esta especie. En el caso de *S. capitata* y *C. moschata*, es necesario continuar con los estudios de optimización de los protocolos *in vitro*, de aclimatación y bioendurecimiento con otras especies de bacterias promotoras y hongos micorrizicos; esto a fin de aumentar la supervivencia de las plantas de esas especies obtenidas *in vitro*, ya que la afinidad de los microorganismos puede variar con la planta hospedera.

LITERATURA CITADA

Anis, M; Siddique, I; Naz, R; Rafique Ahmed, M; Aref, IM. 2012. Advances in micropropagation of a highly Important *Cassia* species-A review (en línea). In Bandani, AR (ed.). New Perspectives in Plant Protection. p. 191-206. Consultado 13 jul. 2020. Disponible en <https://bit.ly/2WxFKNk>

- Azcón-Aguilar, C; Barceló, A; Vidal, MT; De la Viña, G. 1992. Further studies on the influence of mycorrhizae on growth and development of micropropagated avocado plants (en línea). *Agronomie* 12(10):837-840. Consultado 13 jul. 2020. Disponible en <https://bit.ly/3jiw16n>
- Azcón-Aguilar, C; Cantos, M; Troncoso, A; Barea, JM. 1997. Beneficial effect of arbuscular mycorrhizas on acclimatization of micropropagated cassava plantlets. *Scientia Horticulturae* 72:63-71.
- Barea, JM. 2015. Future challenges and perspectives for applying microbial biotechnology in sustainable agriculture based on a better understanding of plant-microbiome interactions. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 15(2):261-282.
- Calderón, L; Gómez, L; Blanco, F; Uribe, L. 2000. La inoculación con *Glomus manihotis* sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de yuca producidas *in vitro*, en la fase de aclimatización. *Agronomía Costarricense* 24(2):25-29.
- Cano, MA. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. *Revista U.D.C.A. Actualidad & Divulgación Científica* 14(2):15-31.
- Chalk, PM; Souza, RF; Urquiaga, S; Alves, BJR; Boddey, RM. 2006. The role of arbuscular mycorrhiza in legume symbiotic performance (en línea). *Soil Biology and Biochemistry* 38(9):2944-2951. Consultado 11 may. 2020. Disponible en <https://doi.org/bcjrwwq>
- Chikkalaki, S; Patil, SN; Venkateshalu. 2017. Bio hardening in micropropagation. *International Journal of Botany and Research* 7(2):21-24.
- Datta, A; Singh, RK; Kumar, S; Kumar, S. 2015. An Effective and Beneficial Plant Growth Promoting Soil Bacterium "*Rhizobium*": A Review. *Annals of Plant Sciences* 4(01):933-942.
- Decklerk, S; Risede, JM; Delvaux, B; 2002. Greenhouse response of micropropagated bananas inoculated with *in vitro* monoxenically produced arbuscular mycorrhizal fungi. *Scientia Horticulturae* 93(3-4):301-309.
- Depablos, L; Ordóñez, J; Godoy, S; Chicco, CF. 2009. Suplementación mineral proteica de novillas a pastoreo en los Llanos Centrales de Venezuela. *Zootecnia Tropical* 27(3):249-262.
- Escandón, AS; Ferreri, P; Facciuto, G; Soto, S; Hagiwara, JC; Acevedo, A. 2003. Combinación de técnicas *in vitro* y *ex vitro* para la micropropagación de Santa Rita (hibr.) Una arbustiva de relevancia ornamental. *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias* 32(1):111-112.
- Fernández, K; Fernández, F; González, ME; Pérez, E; Mirabal, L; Pazos, M. 2002. Micorrización *in vitro* de plantúlas de *Coffea canephora* Var. Robusta: ¿Una realidad? *Cultivos Tropicales* 23(3):47-52.
- Giovannetti, M; Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots (en línea). *New Phytologist* 84:489-500. Consultado 11 may. 2020. Disponible en <https://doi.org/chs76c>
- Hewitt EJ. 1966. *Sand and Water Culture Methods Used in Study of Plant Nutrition* (2 ed.). Technical communication of the Commonwealth Bureau of Horticulture and Plantation Crops. East Malling. Maidstone, Kent. Commonwealth Agricultural Bureaux 547 p.
- Krishna, H; Singh, SK; Patel, VB. 2006. Screening of arbuscular-mycorrhizal fungi for enhanced growth and survival of micropropagated grape (*Vitis vinifera*) plantlets. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 76(5):297-301.
- Kumar, RK; Singh, KP; Raju, DVS. 2014. Symbiotic Effect of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Growth and Flowering of Micropropagated Plants of *Chrysanthemum* (*Chrysanthemum dendranthemum*) (en línea). *International Journal of Bio-resource and Stress Management* 5(3):369-374. Consultado 13 jul. 2020. Disponible en <https://doi.org/gsnm>
- Kumar, A; Singh Meena, V; Roy, P; Vandana; Kumari, R. 2019. Role of Rhizobia for Sustainable Agriculture: Lab to Land (en línea). *In Kumar, A; Singh Meena, V. Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Agricultural Sustainability. From Theory to Practices.* pp. 129-149. Consultado 13 jul. 2020. Disponible en <https://doi.org/gsnk>

- Liriano G, R; Nuñez, BD; Barceló, R. 2012. Efecto de la aplicación de *Rhizobium* y Maycorrizas en el crecimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad CC-25-9 negro. *Centro Agrícola* 39(4):17-20.
- Lloret, L; Martínez-Romero, E. 2005. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. Review. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 47(1-2):43-60.
- López-Alcocer, JJ; Lépiz-Ildelfonso, R; González-Eguiarte, DR; Rodríguez-Macias, R; López-Alcocer, E; Olalde-Portugal, V. 2017. Caracterización morfológica y bioquímica de cepas de *Rhizobium* colectadas en frijol común silvestre y domesticado (en línea). *Revista Fitotecnia Mexicana* 40(1):73-81. Consultado 11 may. 2020. Disponible en <https://doi.org/gsm4>
- López-Falcón, R; Espinoza, F. 2015. Degradación del suelo en los llanos de Venezuela (en línea). In López Falcón, R; Hétier, JM; López Hernández, D; Schargel, R (†); Zinck, A. (eds.). *Tierras Llaneras de Venezuela... tierras de buena esperanza*. Consejo de Publicaciones, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. p. 269-301. Consultado 13 feb. 2020. Disponible en <https://bit.ly/38gEO2f>
- Maiquetía M, MY; Vargas C, TE; Toro G, M; García de G, EC. 2020. Estudios en la germinación y propagación *in vitro* de tres especies de Leguminosae: *Calopogonium* sp, *Stylosantes capitata* y *Cassia moschata* (en línea). *Revista Científica Ecociencia* 7(6):1-25. Consultado 16 feb. 2021. Disponible en <https://doi.org/gsrp>
- Marinho G, GJ; Ndiaye, A; Linhares de A, R; Azevedo E, JA. 2010. Cultivos de coberturas como indicadores de procesos ecológicos (en línea). *LEISA. Revista de Agroecología* 22(4):20-22. Consultado 13 jul. 2020. Disponible en <https://bit.ly/2Y1jhZH>
- Martínez-Viera, R; Dibut, B; Ríos, Y. 2010. Reseña "Efecto de la integración de aplicaciones agrícolas de biofertilizantes y fertilizantes minerales sobre las relaciones suelo-planta". *Cultivos Tropicales* 31(3):27-31.
- Meng, L; Zhang, A; Wang, F; Han, X; Wang, D; Li, S. 2015. Arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobium facilitate nitrogen uptake and transfer in soybean/maize intercropping system (en línea). *Frontiers in Plant Science* 6(339):1-10. Consultado 11 may. 2020. Disponible en <https://doi.org/f7gzzt>
- Mirjani, L; Salimi, A; Matinizadeh, M; Razavi, K; Shahbazi, M. 2019. Biotization with *Glomus fasciculatum* to enhance the acclimatization and absorption of nutrients by micropropagated savory (*Satureja khuzistanica* Jamzad) plantlets (en línea). *Journal of Elementology* 24(2):785-802. Consultado 13 jul. 2020. Disponible en <https://dx.doi.org/gsm3>
- Mora, E; Toro, M; López-Hernández, D. 2013. A survey of arbuscular mycorrhizae, *Rhizobium* and phosphate solubilizing bacteria in low fertility savanna soils in central Venezuela (Estación Experimental La Iguana). In Miransari, M. (ed). *Soil Microbiology*. Studium Press LLC, Houston, Texas, USA. p. 97-114.
- Mora, E; Toro, M; López-Hernández, D. 2017. The presence of beneficial organisms associated to N and P economy in the rhizosphere of native vegetation in an oligotrophic savanna of Guárico State, Venezuela (en línea). *The Open Plant Science Journal* 10:123-133. Consultado 13 jul. 2020. Disponible en <https://bit.ly/3noKLMc>
- Mora, E; López-Hernández, D; Toro, M. 2019. Arbuscular mycorrhizae and PGPR applications in tropical savannas. In Zúñiga-Dávila, D; González-Andrés, F; Ormeño-Orrillo, E. (eds). *Microbial probiotics for agricultural systems*. *Advances in Agronomic Use*. p. 169-177.
- Muthuraj, K; Kaffoor, HA; Nagarajan, N. 2018. Establishment of *in vitro* protocol and impact of mycorrhization with phosphobacteria on micropropagated *Pogostemon mollis* Benth. (Lamiaceae) (en línea). *Journal of Taibah University for Science* 12(1):1-10. Consultado 13 jul. 2020. Disponible en <https://doi.org/gsnq>
- Pérez, UA; Ramírez, MM; Zapata, YA; Córdoba, JM. 2015. Efecto de la inoculación simple y combinada con Hongos Formadores de Micorriza Arbuscular (HFMA) y Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (BPCV) en plántulas micropropagadas de mora (*Rubus glaucus* L.). *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria* 16(1):95-103.
- Pérez, A; Trujillo, I; Vidal, MC; De Lima, N. 2006. Propagación *in vitro* de *Stylosanthes capitata* Vogel: Una especie de gran potencial forrajero. *Acta Botanica Venezuelica* 29(2):335-346.

- Phillips, JM; Hayman, DS. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection (en línea). *Transactions of the British Mycological Society* 55(1):158-161. Consultado 13 jul. 2020. Disponible en <https://doi.org/dnhtg3>
- Poole, P; Ramachandran, V; Terpolilli, J. 2018. Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts (en línea). *Nature Reviews Microbiology* 16(5):291-303. Consultado 11 may. 2020. Disponible en <https://doi.org/gcwp7s>
- Rojas-Rodríguez, F; Torres-Córdoba, G. 2015. Árboles del Valle Central de Costa Rica: reproducción Corralillo (*Cassia moschata* Kunth) (en línea). *Revista Forestal Mesoamericana Kurú* 12(29):77-79. Consultado 11 may. 2020. Disponible en <https://doi.org/gsnf>
- Rupnawar, BS; Navale, AM; 2000. Effect of VA-mycorrhizal inoculation on growth of pomegranate layers. *Journal of Maharashtra Agricultural Universities* 25(1):44-46.
- Sánchez, S; Hernández, M; Ruz, F. 2011. Alternativas de manejo de la fertilidad del suelo en ecosistemas agropecuarios. *Pastos y Forrajes* 34(4):375-392.
- Sanabria, B; Silva-Acuña, R; Oliveros, M; Manrique, U. 2004. Germinación de semillas de las leguminosas arbustivas forrajeras *Cratylia argentea* y *Cassia moschata* sometidas a inmersión en ácido sulfúrico. *Bioagro* 16(3):225-230.
- Singh, SK; Minakshi, G; Khawale, RN; Patel, VB; Krishna, H. 2004. Mycorrhization as an aid for biohardening of In vitro raised grape (*Vitis vinifera* L.) plantlets (en línea). *Acta Horticulturae* 662(1):289-295. Consultado 11 may. 2020. Disponible en <https://doi.org/gsnd>
- Singh, N; Singhb, SK; Singhb, AK; Meshrama, DT; Suroshea, SS; Mishrac, DC; 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) induced hardening of micropropagated pomegranate (*Punica granatum* L.) plantlets (en línea). *Scientia Horticulturae* 136:122-127. Consultado 13 jul. 2020. Disponible en <https://doi.org/gsnb>
- Toro, M; Bazo, I; López, M. 2008. Micorrizas arbusculares y bacterias promotoras de crecimiento vegetal, biofertilizantes nativos de sistemas agrícolas bajo manejo conservacionista. *Agronomía Tropical* 58(3):215-221.
- Toro, M; Andrade, G. 2020. Arbuscular mycorrhizae, beneficial microorganisms for sustainable agricultura (en línea). *In* Filho W, L; Azul, A; Brandli, L; Lange, S; Wall, T. (eds). *Life on land, encyclopedia of the UN sustainable development goals*. p. 1-14. Consultado 13 feb. 2021. Disponible en <https://doi.org/gsnc>
- Toral, O; Machado, R; Navarro, M; Fung, C; Reino, J. 2006. Prospección y colecta de leguminosas multipropósito en la zona central de Cuba. *Pastos y Forrajes* 29(2):135-143.
- Vidal, MT; Azcón-Aguilar, C; Barea, JM; Pliego-Alfaro, F. 1992. Mycorrhizal Inoculation Enhances Growth and Development of Micropropagated Plants of Avocado (en línea). *Horticultural Science* 27(7):785-787. Consultado 11 may. 2020. Disponible en <https://doi.org/gsm9>
- Vosátka, M; Jansa, J; Regvar, M; Srámer, F; Malcová, R. 1999. Inoculation with mycorrhizal fungi a feasible biotechnology for horticulture. *Phyton* 3:219-224.
- Weir, BS. 2016. The current taxonomy of rhizobia. *NZ Rhizobia website* (en línea). Consultado 10 ago. 2020. Disponible en <https://bit.ly/3Be69i8>
- Zablowicz, RM; Tipping, EM; Lifshitz, R; Kloepper, JW. 1991. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers (en línea). *In* Keister, DL; Cregan, PB (eds.). *The rhizosphere and plant growth*. p. 315-326. Consultado 13 jul. 2020. Disponible en <https://doi.org/bd4m66>