

Viabilidad de esporas de hongos micorrízicos arbusculares y semillas de girasol para el establecimiento de la simbiosis micorrízica

Viability of spores of arbuscular mycorrhizal fungi and sunflower seeds for the establishment of mycorrhizal symbiosis

Isabel Vital-Vilchis¹, Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar¹, Luis Guillermo Hernández-Montiel² y Gabriel Rincón-Enríquez^{1,*}

¹Laboratorio de Fitopatología de Biotecnología Vegetal, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Camino Arenero 1227, El Bajío del Arenal, Zapopan, Jalisco, México, C.P. 45019. Tel. (33) 33455200. ²Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Av. Instituto Politécnico Nacional 195, Col. Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz, BCS, México, C.P. 23096.

Resumen

Dentro de las semillas de plantas y las esporas de hongos micorrízicos arbusculares (HMA), la viabilidad celular se va perdiendo con respecto al tiempo y a las condiciones ambientales como temperatura y humedad relativa. La viabilidad celular influye sobre la germinación tanto de las semillas como de esporas de HMA y sobre la capacidad de colonización de estas últimas. El objetivo de este trabajo fue determinar la viabilidad de semillas de girasol y de esporas de HMA almacenadas a temperatura ambiente, para posteriormente establecer la simbiosis entre ellos. Semillas de tres variedades de girasol ornamental (1 año de almacenamiento) y dos inóculos de HMA (dos años de almacenamiento) a temperatura ambiente, se les determinó su viabilidad empleando la técnica de tetrazolio. Posteriormente se realizó, un experimento complemente al azar bifactorial con tres niveles de HMA y dos variedades de girasol, generando así seis tratamientos, los cuales se repitieron 6 veces. A los 20 días después de inoculadas las plantas, se evaluó la altura de planta, diámetro de tallo, peso fresco de la planta y colonización micorrízica. Las variedades de girasol mostraron que después de un año de almacenamiento, pierden la viabilidad en un 90% (Gigante Simple Amarilla) y un 40% (Belleza de Otoño y Doble Gigante); mientras que las esporas de los inóculos de HMA mostraron la misma viabilidad (Tukey, $p \leq 0.05$) comparada con un inóculo recién cosechado. Los HMA a los 20 días después de iniciado el experimento no lograron establecer la colonización micorrízica y no mostraban efecto en el crecimiento de las plantas (Tukey, $p \leq 0.05$). Estos resultados sugieren que, en girasol, los tiempos de

Abstract

Cell viability of plant seeds and of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) spores is lost through time and due to environmental conditions such as temperature and relative humidity. Cell viability has a roll over germination of both, seeds and AMF spores, and over the colonization capacity of these last ones. The objective of this work was to determine the viability of sunflower seeds and of AMF spores, after being stored at room temperature, for further establishment of symbiosis with one another. Cell viability of three ornamental sunflower seed varieties (one-year long storage) and of two AMF inoculums (2 years long storage) at room temperature was determined with the tetrazolium test. Later, a bifactorial randomly complemented experiment was carried out with three levels of AMF and two sunflower varieties. The experiment consisted of six treatments with six replicates each. Twenty days after inoculation with AMF, plant's height, stem diameter, fresh weight and mycorrhizal colonization were evaluated. Sunflower showed a loss in cell viability, after 1 year of storage, of 90% (Gigante Simple Amarillo) and of 40% (Belleza de Otoño y Doble Gigante); meanwhile, AMF spores showed to keep their viability (Tukey, $p \leq 0.05$) after storage compared with a freshly harvested inoculum. The AMF, after 20 days after inoculation, did not show effects over sunflower growth and did not establish mycorrhizal colonization (Tukey, $p \leq 0.05$). These results suggest that, in sunflower, timing for mycorrhizal colonization in flower pot in field conditions with inocula conserved for long periods takes longer than 3 weeks to establish symbiosis, while the viability of the AMF spores is maintained over time, sunflower seeds viability can

colonización micorrízica en condiciones de campo en maceta con inóculos conservados durante periodos largos son mayores a 3 semanas de simbiosis, mientras que la viabilidad de las esporas de HMA se mantiene a través del tiempo y en semillas de girasol se puede perder rápidamente dependiendo de la variedad.

Palabras clave

prueba de tetrazolio, almacenamiento, latencia, esporas de HMA, semillas, viabilidad celular.

Autor de correspondencia: Gabriel Rincón. e-mail: grincon@ciatej.mx

Introducción

El envejecimiento de las semillas consiste en el deterioro de las estructuras y funciones de la semilla con respecto al tiempo, de manera que, se va perdiendo la viabilidad (las semillas van muriendo). El envejecimiento puede ser causado por factores exógenos; por ejemplo, en semillas ortodoxas como el girasol, la temperatura y la humedad reducen la longevidad (Mohamed-Yasseen *et al.*, 1994) o por factores endógenos, por ejemplo, la metilación del ADN es crítica para la regulación de la embriogénesis vegetal y para la viabilidad de semillas (Xiao *et al.*, 2006). Al igual que las semillas, los propágulos de hongos micorrízicos arbusculares también son susceptibles a los cambios de temperatura y humedad relativa (Lekberg y Koide, 2008).

La prueba de tetrazolio es un método establecido y rápido para determinar la viabilidad de células, esporas, semillas y tejidos en general. Todos los tejidos que respiran son capaces de convertir el reactivo incoloro 2,3,5 trifenil cloruro de tetrazolio, en un compuesto no soluble de color rojo carmín llamado formazan. Lo anterior sucede a través de una reacción de transferencia de hidrógeno por deshidrogenasas celulares. Así, las células vivas cambiarán de color mientras el tejido muerto (dañado o envejecido) permanecerá sin teñir (Verma y Majee, 2013; Verma *et al.*, 2013). También se pueden usar otras sales de tetrazolio como el MTT [bromuro de 3-(4,5- dimetilthiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol] que viran a un color azul (An y Hendrix, 1998).

La viabilidad y el porcentaje de germinación tanto de semillas como de esporas de hongos son

be lost quickly depending on the variety.

Keywords

tetrazolium test, storage, latency, AMF spores, seeds, cell viability.

Introduction

Seeds aging consists in the deterioration of their structures and functions through time, so that, the viability is being lost (seeds dye). Seeds aging can be caused by exogenous factors, for example, in orthodox seeds like sunflower, temperature and humidity reduce longevity (Mohamed-Yasseen *et al.*, 1994) or by endogenous factors, for example, DNA metilation is critical for plant embriogenesis regulation and for seed viability (Xiao *et al.*, 2006). Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) propagules are also susceptible to temperature and relative humidity changes (Lekberg and Koide, 2008).

Tetrazolium test is an established and quick method for determining cell, spores, seeds and tissue viability in general. Every breathing tissue is capable of converting the colorless 2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride in a non soluble red compound named formazan, this happens through a hydrogen transfer reaction by cellular dehydrogenases. Thereby, living cells will change their color while dead tissue (damaged or aged) will remain unstained (Verma and Majee, 2013; Verma *et al.*, 2013). It can also be used other tetrazolium salts such as MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazole bromide) that turn tissue to a blue color (An and Hendrix, 1998).

Viability and germination percentage of both seeds and fungi spores are different concepts as viable seeds and spores (alive tissue) can germinate or not depending on external conditions such as temperature, humidity and ground oxygen in between other factors (Daniels and Trappe, 1980). It can also be the case in which the seed is not germinating because of dormancy or physiological latency (Tommerup, 1983; Navarro and González, 1999). In the specific case of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), colonization not only depends on weather conditions or on inoculum viability, it also has to be consider soil nutrients content, fungus species, plant species and their interaction. To illustrate the anterior, a research on wheat, beans and meadow vegetation (*Lolium multiflorum* cv. Tetrone and *Trifolium pratense* cv. Quiñequeli), showed

conceptos diferentes ya que, semillas o esporas viables (vivas) pueden germinar o no dependiendo de las condiciones externas como temperatura, humedad y oxigenación del suelo, entre otros factores (Daniels y Trappe, 1980). Puede ser también que, la semilla o espора no esté germinando por presentar un estado de dormancia o latencia fisiológica (Tommerup, 1983; Navarro y González, 1999). Para el caso de los hongos micorrízicos arbusculares, la colonización depende no sólo de las condiciones climáticas o de la viabilidad del inóculo. También, se deben considerar los nutrientes del suelo, la especie de hongo, la especie de planta y su interacción. Para ilustrar lo anterior se puede comparar un estudio en trigo, frijol y vegetación de pradera (*Lolium multiflorum* cv. Tetrone y *Trifolium pratense* cv. Quiñequeli), en el cual la adición de composta (rica en fósforo) aumentó la colonización micorrízica (Millaleo *et al.*, 2006). Mientras que Mäder *et al.* (2000) encontraron una relación inversa entre la disponibilidad de P con el porcentaje de colonización de las raíces de trigo. Alarcón y Ferrera-Cerrato (2003), no encontraron diferencias significativas en la colonización entre tratamientos con y sin fósforo en *Citrus volkameriana*; sin embargo, el mejor tratamiento con respecto al crecimiento fue, el que incluía la fertilización fosfatada con los inóculos micorrízicos.

Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue, determinar la viabilidad de semillas de tres variedades de girasol (*Helianthus annuus*) de un año de almacenamiento, y de esporas de dos inóculos de HMA de dos años de almacenamiento a temperatura ambiente para posteriormente establecer la simbiosis entre ellos en condiciones de campo en maceta.

Materiales y métodos

Determinación de la viabilidad de semillas de girasol y esporas de HMA

Se tomaron muestras de semillas de girasol de las variedades ornamentales Gigante Simple Amarillo (GSA), Doble Gigante (DG) y Belleza de Otoño (BO) de la compañía Vita[®], que contaban con envejecimiento natural de un año a temperatura ambiente (14.8 y 28.5 °C como temperaturas mínima y máxima, respectivamente). A las semillas se les retiró la testa manualmente y se colocaron en una solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (0.25 mg mL⁻¹) y se incubaron 24 horas según el procedimiento de An y Hendrix (1998). Se realizó un experimento de viabilidad de las semillas de girasol completamente al azar con tres tratamientos (GSA, DG, BO) y la unidad experi-

that mycorrhizal colonization increase when compost (rich in phosphorous) was added (Millaleo *et al.*, 2006). In contrast, Mäder *et al.* (2000) found an inverse relationship between P availability and the colonization percentage in wheat. Alarcón and Ferrera-Cerrato (2003), did not find significant differences in mycorrhizal colonization between treatments with and without phosphorous in *Citrus volkameriana*; nevertheless, best treatment with respect to growth was the one that included both, phosphorus fertilization and arbuscular mycorrhizal fungi.

For all of the above, the objective of this work was to determine seed viability of three sunflower varieties (*Helianthus annuus*) with one year long storage and the viability of two arbuscular mycorrhizal fungi spores species with two year long storage at room temperature for establishment of symbiosis between them in an experiment on flower pot on field conditions.

Materials and methods

Determination of sunflower seeds and AMF spores viability

Samples of sunflower seeds from the varieties Gigante Simple Amarillo (GSA), Doble Gigante (DG) and Belleza de Otoño (BO) from the company Vita[®] with 1 year long storage at room temperature (14.8 and 28.5 °C as minimum and maximum temperature) were taken. Seed coat was removed manually to then cover the seeds in a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazole bromide (0.25 mg mL⁻¹) solution and incubated 24 hours according to An and Hendrix (1998) procedure. The sunflower seed viability experiment consisted on three treatments (GSA, DG, BO) that were completely randomized with 3 replicates each consisting of 13 seeds per experimental unit. Seeds of every experimental unit were placed in a Petri dish 90x15 with sterile filter paper at the bottom and incubated at 28 °C for 24 hours. The number of seeds that turned blue were counted (viable seeds). AMF inoculums *Funneliformis mosseae* (Fm) and consortium Cerro del Metate (CM) (Trinidad *et al.*, 2017) with two years storage (room temperature, relative humidity 20-30% in darkness) and recently harvested inoculums were used. This inoculums were previously propagated for 8 months in pots in greenhouse conditions using sorghum (*Sorghum bicolor* × *Sorghum sudanese* Sweet Chow; Western Seed Co.) as a host plant. The AMF spores were extracted by mechanical agitation and sifted according to the procedure proposed by Hernández

mental se conformó de 13 semillas, las cuales se colocaron en una caja Petri de 90X15 con un fondo de papel filtro estéril, se realizaron 3 repeticiones. Las cajas Petri se incubaron a 28°C por 24 h. Se cuantificó el número de semillas que cambiaron a color azul (viable).

Se emplearon inóculos de HMA de *Funneliformis mosseae* (Fm) y del consorcio Cerro del Metate (CM) (Trinidad *et al.*, 2017), de dos años de almacenamiento (temperatura ambiente, humedad relativa 20-30% y en oscuridad) y recién cosechadas de una propagación durante 8 meses bajo invernadero en macetas trampas empleando sorgo (*Sorghum bicolor* × *Sorghum sudanese* Sweet Chow; Western Seed Co.) como planta hospedera. Las esporas de HMA se extrajeron por agitación mecánica y tamizado de acuerdo con el protocolo propuesto por Hernández *et al.* (2012). Se realizó un experimento de la viabilidad de las esporas de HMA en un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos (Fm-2 años; CM-2 años; Fm-nueva y CM-nueva) y la unidad experimental se conformó de 50 esporas y se realizaron 3 repeticiones. Las esporas se colocaron con una solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (0.25 mg mL⁻¹) y se incubaron durante 36 horas en tubos tipo Eppendorf de 1.5 mL a 28°C en oscuridad. Se cuantificó las esporas que cambiaron a color azul (viable) después de las 36 horas de incubación.

Simbiosis micorrízica de plantas de girasol con inóculos de HMA

El experimento se realizó a la intemperie, en las instalaciones del Centro de Investigación y de Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) Unidad Zapopan ubicado en las coordenadas geográficas N 20° 42' 5.97'', W 03° 28' 25.83''; durante la primavera de 2018 (marzo a abril). La temperatura promedio fue 23.1 °C con una máxima promedio de 32.2 °C y mínima de 13.9 °C (IAM-CUCEI, 2019).

El experimento consistió de dos factores: el primero las variedades de girasol ornamental Belleza de Otoño (BO) y Gigante Simple Amarilla (GSA) de la compañía Vita® y como factor dos, tres niveles de inóculos de HMA: *Funneliformis mosseae* (Fm-2 años); consorcio Cerro del Metate (CM-2 años) y sin HMA. Estos seis tratamientos con 6 repeticiones se establecieron en un diseño completamente al azar bajo condiciones de campo en macetas. Las semillas de las variedades de girasol se germinaron con la de “tacos de germinación”

(2012). AMF spores viability experiment was a completely randomized experiment with four treatment (Fm-2 years; CM-2 years; Fm-fresh and CM-fresh) consisting of 50 spores per experimental unit and three replicates. Spores were placed in a 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazole bromide (0.25 mg mL⁻¹) solution and were incubated for 36 hours in 1.5 mL Eppendorf tubes at 28 °C in darkness. Blue stained spores (viable) were counted.

Mycorrhizal symbiosis of sunflower plants with AMF inoculums

Experiment was conducted outdoors in “Centro de Investigación y de Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) Unidad Zapopan” located in the geographic coordinates N 20° 42' 5.97'', W 03° 28' 25.83''; during spring 2018 (march to april). Average temperature was 23.1 °C with a maximum average of 32.2 °C and minimum 13.9 °C (IAM-CUCEI, 2019).

Experiment consisted of two factors: varieties of ornamental sunflower Belleza de Otoño (BO) and Gigante Simple Amarilla (GSA) of the company Vita® and the factor AMF inoculum: *Funneliformis mosseae* (Fm-2 years); consortium Cerro del Metate (CM-2 years) and without HMA. These 6 treatments with 6 replicates each were established in a complete randomized design in flower pots in open sky conditions. Sunflower seeds from the different varieties were germinated with the technique “germination tacos” according to Moreno (1996) for 5 days in darkness at 25 °C in an incubation room. Germinated plantlets of 6 cm long and only both cotyledons were transplanted in black polyethylene bags (caliber 400, 15x15 cm) with 350 g of sterile substrate (120°C, 1.05 kg cm⁻², 6 h) consisting of peat-moss, earthworm humus and agricultural soil [70:10:20 (v/v/v)]. 80 viable spores were inoculated from each AMF inoculum the moment of transplant. The experiment lasted 20 days in field conditions during the spring. At the end of the experiment plant height, leaves number, fresh plant weight and mycorrhizal colonization was evaluated according with the protocol of Hernández *et al.* (2012). The response variables were analyzed by means of a one-way or multivariate analysis of variance ($p \leq 0.05$) and when significant differences between treatments were found, a multiple comparison test of Tukey means ($p \leq 0.05$) was applied; both analyzes were performed using the Statgraphics Centurion program (Statgraphics, 2005).

según lo recomendado por Moreno (1996) durante 5 días en condiciones de oscuridad a 25 °C en una cuarto de incubación. Las plántulas germinadas de aproximadamente 6 cm de longitud y con sólo sus cotiledones, se trasplantaron en bolsas negras de polietileno calibre 400 (15x15 cm) con 350 g de sustrato estéril (120°C, 1.05 kg cm⁻², 6 h), el cual fue una mezcla de peat-moss, humus de lombriz y suelo agrícola [70:10:20 (v/v/v)]. Se inocularon 80 esporas viables de cada inóculo de HMA al momento de trasplante. El experimento permaneció 20 días en condiciones de campo durante la etapa de primavera y al final, se registró la altura de planta, número de hojas, peso fresco de la planta y colonización micorrízica de acuerdo con el protocolo Hernández *et al.* (2012). Las variables de respuesta fueron analizadas mediante un análisis de varianza de una vía o multifactorial ($p \leq 0.05$) y cuando se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, se aplicó una prueba de comparación múltiple de medias Tukey ($p \leq 0.05$); ambos análisis fueron realizados empleando el programa Statgraphics Centurion (Statgraphics, 2005).

Resultados y discusión

La viabilidad para los inóculos micorrízicos arbusculares mostró diferencias significativas según la prueba estadística Tukey ($p \leq 0.05$). El consorcio Cerro del Metate, tanto recién cosechado como con 2 años de almacenamiento tuvo menor viabilidad que *Funneliformis mosseae*. Los inóculos conservan su viabilidad después de 2 años de almacenamiento a temperatura ambiente (Tukey, $p \leq 0.05$) (Tabla 1, Tabla 2, Figura 1).

Results and discussion

Arbuscular mycorrhizal inocula viability showed significant differences according to Tukey statistical test ($p \leq 0.05$). Cerro del Metate consortium, both recently harvested and with 2 years of storage had lower viability than *Funneliformis mosseae*. Inoculums preserved their viability after 2 years of storage at room temperature (Tukey, $p \leq 0.05$) (Table 1, Table 2, Figure 1). An interaction was found between the type of inoculum (mono or multi species) and the storage time of the AMF spores (Table 2).

Speaking about *Helianthus annuus* seeds, the varieties Belleza de Otoño and Doble Gigante presented the mayor viability in comparison with Gigante Simple Amarillo. In other words, Gigante Simple Amarillo loses rapidly its germination capability (Tukey, $p \leq 0.05$) (Table 3, Figure 1).

There was no effect observed of AMF inoculation over plant growth 20 days after inoculation compared with the non inoculated treatment belonging to the same plant variety (Table 4). There was no AMF colonization found after 10 nor 20 days after inoculation, Despite of this, some germinating spores were observed (Figure 2).

The fact that spores remain viable after two years is consistent with the commercial product Safer Micorrizas M.A.® whose shelf life is two years when stored in a fresh, dried environment, protected from sunlight. However, mycorrhizal colonization is absent 20 days after inoculation; this is consistent with Fernández *et al.* (2005) study that determined that *Glomus mosseae* and other specie of *Glomus* sp. need in between 7 and 30 days to germinate *in vitro*.

Tabla 1. Viabilidad de esporas de diferentes inóculos micorrízicos recién cosechados y con 2 años de almacenamiento a temperatura ambiente.

Table 1. Spores viability of different inoculums recently harvested and with 2 years long storage at room temperature.

AMF inoculum	Storage condition	Spore viability (%)
<i>Funneliformis mosseae</i>	2 years storage	87.0 a
<i>Funneliformis mosseae</i>	Recently harvested	76.8 ab
Cerro del Metate	2 years storage	53.2 b
Cerro del Metate	Recently harvested	74.3 ab

Different letters in the same column indicate significant differences according to Tukey's test ($p \leq 0.05$).

Tabla 2. Efecto del almacenamiento a temperatura ambiente sobre la viabilidad de las esporas de hongos micorrízicos arbusculares.

Table 2. Storage effect at room temperature on arbuscular mycorrhizal fungi spores viability.

Inoculo de HMA	Viabilidad de esporas (%)
Cerro del Metate	63.7 a
<i>Funneliformis mosseae</i>	82.0 b
Almacenamiento	
Dos años	70.1 a
Recién cosechados	75.6 a
Interacción entre los factores de estudio	
Estadístico F	0.0613
Vapor de probabilidad (P value)	0.0384

Letras distintas en el mismo factor de estudio indica diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Different letters in the same factor indicate significant differences according to Tukey's test ($p \leq 0.05$).

Se encontró una interacción entre el tipo de inoculo (mono o multi especie) y el tiempo de almacenamiento de las esporas de los HMA (Tabla 2).

En el caso de las semillas de *Helianthus annuus*, las variedades Belleza de Otoño y Doble Gigante presentaron la mayor viabilidad con respecto a la variedad Gigante Simple Amarillo, es decir, esta última variedad pierde rápidamente la capacidad de germinación (Tukey, $p \leq 0.05$) (Tabla 3, Figura 1).

In the other hand, it has been demonstrated that spore germination can be stimulated and therefore accelerate colonization adding strigolactones to the substrate (Besserer *et al.*, 2006). Further studies on sunflower are needed. Talking about viability in seeds De Castro-Lima *et al.* (2014) assure that room conditions are not appropriated to store sunflower seeds as they easily lose viability. Seeds continue to be viable for 12 months when stored in dried conditions with refrigeration, regardless of the type of packing used.

Tabla 3. Porcentaje de viabilidad de las semillas de variedades ornamentales de girasol después de un año de almacenamiento.

Table 3. Viability percentage of different ornamental sunflower varieties after one year of storage.

Variedad de girasol ornamental	Viabilidad de las semillas (%)
Gigante Simple Amarillo	10.3 a
Doble Gigante	57.1 b
Belleza de Otoño	66.6 b

Different letters in the same column indicate significant differences according to Tukey's test ($p \leq 0.05$).

No se observó efecto de los HMA sobre el crecimiento vegetal, a los 20 días después de la inoculación entre tratamientos con respecto al testigo sin

In this study Gigante Simple Amarilla was the less viable variety probably because it has the biggest seed, which can contribute to dehydration and therefore

HMA dentro de la misma variedad de girasol (Tabla 4). La determinación de la colonización micorrízica a los 10 y 20 días después de la inoculación, no mostró colonización; a pesar de esto, se observó algunas esporas de los HMA en proceso de germinación (Figura 2).

the embryo may dye. It is worth mentioning that Nagel and Borner (2009) found a negative relationship between big quantities of oil seed content and its longevity, while carbohydrates and protein content did not affect longevity and sunflower is an oleaginous plant; Nevertheless, in

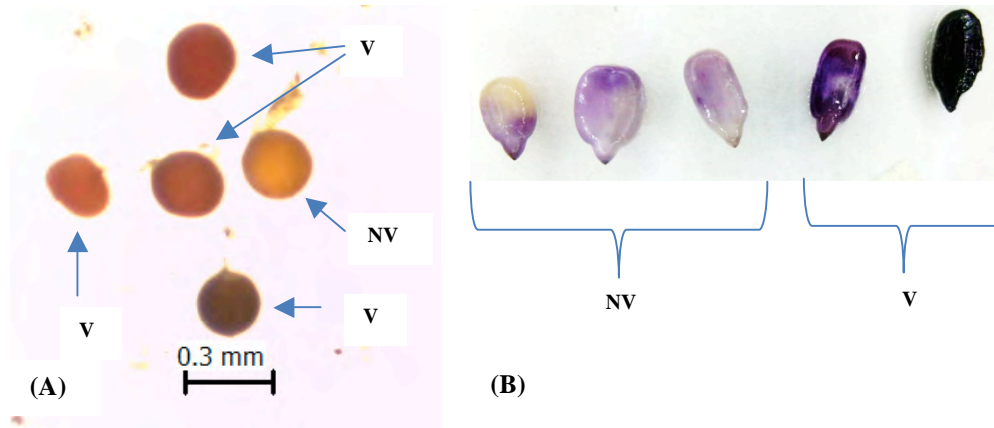


Figura 1. Esporas de hongos micorrízicos arbusculares (A) y semillas de girasol ornamental (B) después de 24 horas de la prueba de viabilidad con el reactivo 3-(4,5- dimetilthiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol. Las estructuras vivas, en el caso de las esporas hay un cambio de coloración de amarillo a tonos rojizos; mientras que en las semillas de girasol el cambio es de blanco a azules. V= estructuras viables, NV = Estructuras no viable.

Figure 1. Arbuscular mycorrhizal fungi spores (A) and ornamental sunflower seeds (B) after 36 and 24 hours of incubation with the reactant 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazole bromide respectively. Living tissue in AMF spores turn from yellow to red tones; while sunflower seeds turn from white to blue. V= viable structure, NV= non viable structure.

La determinación de la colonización micorrízica a los 10 y 20 días después de la inoculación, no mostró colonización; a pesar de esto, se observó algunas esporas de los HMA en proceso de germinación (Figura 2).

El hecho de que las esporas se mantengan viables después de dos años, es consistente con el producto comercial Safer Micorrizas M.A.[®] cuya vida de anaquel es de dos años, almacenando el producto en un ambiente fresco, seco y protegido de los rayos directos del sol. Sin embargo, la colonización micorrízica es nula a los 20 días después de la inoculación; esto es consistente con el estudio de Fernández *et al.* (2005) que determinó que, las especies *Glomus mosseae* y otra especie de *Glomus* sp. necesitan entre 7 y 30 días para germinar *in vitro*. Por otro lado, se ha demostrado que se puede estimular la germinación de las esporas y así acelerar la colonización agregando estrigolactonas al sustrato (Besserer *et al.*, 2006) aunque faltan más estudios en girasol.

GSA variety case, the apparently big oil content (related to the big seed size) was not relevant for the drastic seed viability reduction, which suggests that genetic factors may be involved in expanding the viability of these ornamental species varieties.

In this matter, Ellis y Roberts (1980) indicates that, as a fact, viability does depend on genetic variations in a same species and on conditions prior to storage. This is in full agreement with the results found in this study, given that while the GSA variety almost lost its viability (90%), the other two varieties suffered only 50% damage. To end up with, regarding the mycorrhizal colonization absence in sunflower, it can be due to availability of nutrients (mostly due to phosphate content) present in earthworm humus applied in the substrate used for the experiment or due to the fact that the substrate used was of organic nature.

Tabla 4: Efecto de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares sobre, el crecimiento de variedades de girasol ornamental a los 20 días después de inoculado, en condiciones de cielo abierto durante la estación de la primavera.

Table 4. AMF inoculation effect over ornamental sunflower varieties growth 20 days after inoculation, under open sky conditions during spring season.

Tratamiento			Altura de planta (cm)	Número de hojas	Diámetro de tallo (mm)	Peso fresco de planta (g)	Porcentaje de colonización
Variedad de girasol	Inoculo de HMA	de					
Belleza de Otoño	Fm		25.1 a	9.6 a	2.6 a	10.8 a	0 a
	CM		23.0 a	10.0 a	2.9 ab	8.7 a	0 a
	Sin HMA		25.5 a	11.0 a	3.2 ab	17.0 a	0 a
Gigante Simple Amarilla	Fm		37.3 b	13.0 a	4.2 b	454.6 b	0 a
	CM		38.2 b	11.3 a	4.1 b	258.0 b	0 a
	Sin HMA		42.5 b	13.0 a	3.8 ab	331.0 b	0 a

Fm= *Funneliformis mosseae*; CM= consorcio Cerro del Metate. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Fm= *Funneliformis mosseae*; CM= Cerro del Metate consortium. Different letters in the same column indicate significant differences according with Tukey's test ($p \leq 0.05$).

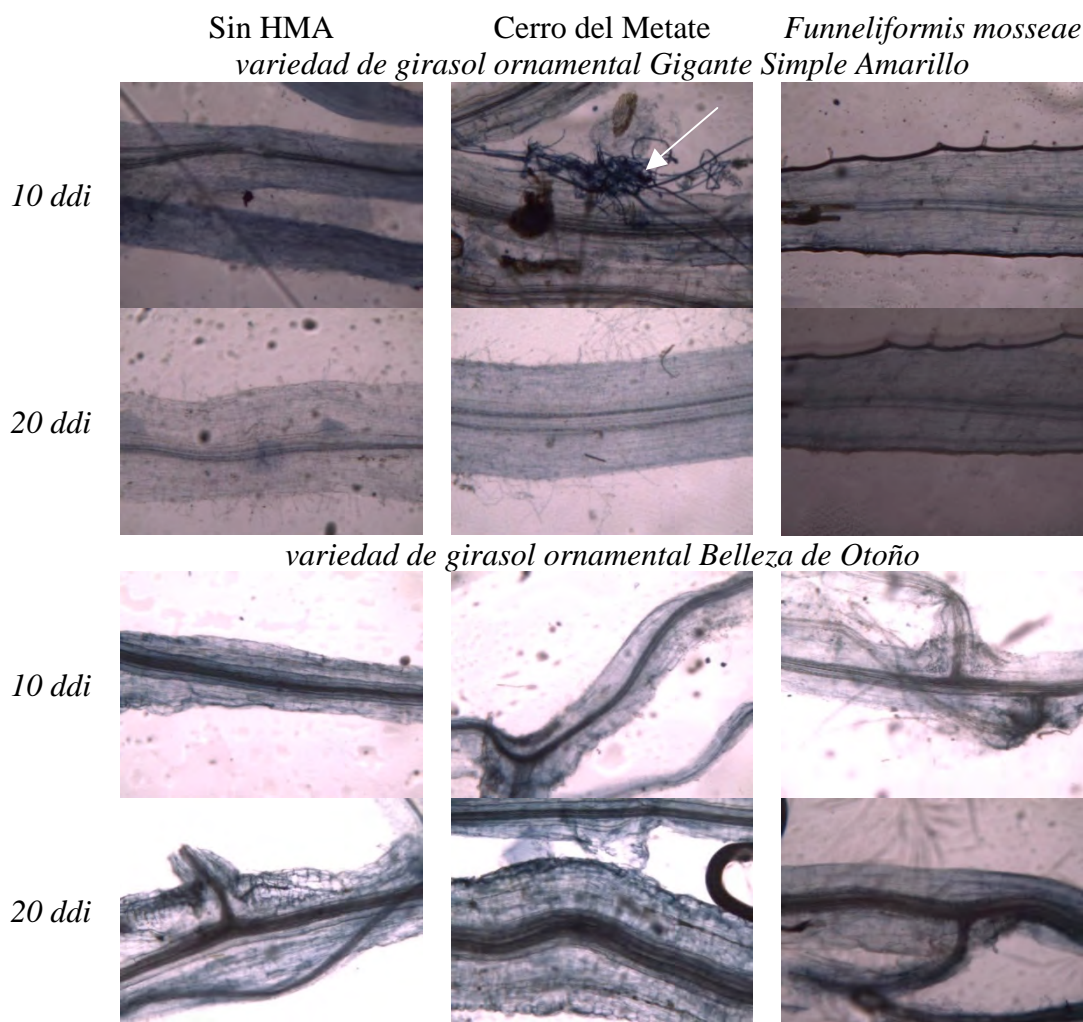


Figura 2. Raíces de dos variedades de girasol ornamental inoculadas con hongos micorrízicos arbusculares a los 10 y 20 días después de la inoculación (ddi), en condiciones de campo durante la estación de primavera. La flecha indica posibles esporas de HMA en proceso de germinación (Cerro del Metate en Gigante Simple Amarilla a los 10 ddi).

Figure 2. Roots from two ornamental sunflower varieties inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) 10 and 20 days after inoculation (*dai*), in open sky conditions during spring. Arrow indicates possible AMF spores germinating (Cerro del Metate in Gigante Simple Amarilla 10 days after inoculation).

Respecto a la viabilidad de las semillas, De Castro-Lima *et al.* (2014) afirman que, las condiciones ambientales no son apropiadas para almacenar las semillas de girasol porque pierden fácilmente la viabilidad. Las semillas continúan viables por 12 meses en un cuarto seco y con enfriamiento (refrigeración), independientemente del tipo de empaque que se use. En este caso la variedad Gigante Simple Amarilla fue la menos viable probablemente por ser la variedad con la semilla más grande lo cual puede contribuir a deshidratarse y por tanto morir el embrión. Cabe mencionar que Nagel y Borner (2009), encontraron una relación negativa entre el contenido de grandes cantidades de aceite en semilla y la longevidad de ésta, mientras que el contenido de carbohidratos y de proteínas no afectó la longevidad y el girasol es una semilla oleaginosa; sin embargo, en el caso de la variedad GSA no importó la aparente alta cantidad de aceite (según el tamaño grande de semilla) en la disminución tan drástica de la viabilidad lo cual sugiere que otros factores genéticos también pudieran estar implicados en alargar la viabilidad de las variedades de esta especie ornamental. En este sentido, Ellis y Roberts (1980) indican que, efectivamente la viabilidad también es dependiente de las variaciones genéticas dentro de una misma especie y de las condiciones previas al almacenamiento. Lo cual concuerda plenamente con los resultados encontrados en el presente estudio, dado que mientras la variedad GSA casi perdió toda su viabilidad (90%), las otras dos variedades solo sufrieron un daño del 50%. Finalmente, respecto a la colonización micorrízica no observada en las plantas de girasol pudo deberse a la disponibilidad de nutrientes, sobre todo fósforo, contenido en el humus de lombriz aplicado en el sustrato de establecimiento del experimento o también a que el sustrato empleado fue muy orgánico.

Conclusiones

Las esporas de hongos micorrízicos arbusculares almacenados hasta por 2 años, pueden ser usados como inóculos para plantas porque conservan su viabilidad. Sin embargo, es necesario realizar más estudios en condiciones controladas para determinar el tiempo que tarda una espora viable de los inóculos estudiados en colonizar a variedades ornamentales de *Helianthus annuus* así como, las

Conclusions

Spores of arbuscular mycorrhizal fungi stored for up to 2 years can be used as inocula for plants because they keep their viability. However, it is necessary to carry out further studies in controlled conditions to determine the time it takes for a viable spore of the inoculants studied to colonize ornamental varieties of *Helianthus annuus* as well as the ideal conditions that favor this process. Sunflower seeds quickly lose their viability and the speed with which this happens is a function of the variety of the species that is being investigated.

Acknowledgements

IVV thanks CONACYT, the scholarship for Master's degree awarded. This research was supported by projects of the Plant Pathology Laboratory of CIATEJ and through project 293362 of CONACYT through the PLANTECC National Laboratory. Dr. E. E. Quiñones-Aguilar participated as co-director of this thesis work.

condiciones ideales para favorecer este proceso. Las semillas de girasol pierden rápidamente su viabilidad y la rapidez con la que sucede esto está en función de la variedad de la especie con la que se investigue.

Agradecimientos

IVV agradece a CONACYT, por la beca para estudios de maestría otorgada. Esta investigación fue apoyada por proyectos del Laboratorio de Fitopatología del CIATEJ y mediante el proyecto 293362 del CONACYT a través del Laboratorio Nacional PLANTECC. La Dra. E. E. Quiñones-Aguilar participó como codirectora de este trabajo de tesis de maestría.

Referencias

- Alarcón A y Ferrera-Cerrato R. (2003) Aplicación de fósforo e inoculación de hongos micorrízicos arbusculares en el crecimiento y estado nutricional de *Citrus volkameriana*. Terra Latinoamericana. 21: 91-99.
- An Z. Q. and Hendrix J. W. (1988) Determining viability of endogonaceous spores with a vital stain. Mycologia. 80: 259-261.
- Besserer A., Puech-Pagès V., Kiefer P., Gomez-Roldan V., Jauneau A., Roy S., Portais J. C., Roux C., Bécard G. and Séjalon-Delmas N. (2006) Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. PLOS Biology. 4: e222-e226.
- Daniels B. A. and Trappe J. M. (1980) Factors affecting spore germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus epigaeus*. Mycologia. 72: 457-471.
- De Castro-Lima D., Dutra A. S., Moura-Pontes F. and Thiago-Coelho-Bezerra F. (2014) Storage of sunflower seeds. Revista Ciencia Agronómica. 45: 361-369.
- Ellis R. H. and Roberts, E. H. (1980) Improved equations for the prediction of seed longevity. Annals of Botany. 45: 13-30.
- Fernández F., Dell' Amico J. M., Fernández K., de la Providencia I. and Morte A. (2005) Inoculantes de hongos micorrízicos arbusculares de *Glomus mosseae* y *Glomus* sp.1 en medio líquido. Cultivos Tropicales. 26: 29-36.
- Hernández-Cuevas L. V., Guadarrama-Chávez P., Sánchez-Gallen I. y Ramos-Zapata J. (2012) Micorriza arbuscular, colonización intrarradical y extracción de esporas de suelo. In. Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración. Álvarez S. J. y Monroy A. A. (Comps.). Fac. de Ciencias UNAM. DF, México. 1-16 pp.
- IAM-CUCEI (Instituto de Astronomía y Meteorología del Departamento de Física CUCEI Universidad de Guadalajara). 2019. Annual climatological summary. <http://astro.iam.udg.mx/estacion/NOAAYR.TXT> (enero 2019).
- Lekberg Y. and Koide R. T. (2008) Effect of soil moisture and temperature during fallow on survival of contrasting isolates of arbuscular mycorrhizal fungi. Canadian Journal of Botany. 86: 1117-1124.
- Mäder P., Edenhofer S., Boller, T., Wiemken, A. and Niggli U. (2000) Arbuscular mycorrhizae in long-term field trial comparing low-input (organic, biological) and high-input (conventional) farming systems in a crop rotation. Biology and Fertility of Soils. 31: 150-156.
- Millaleo R., Montecinos C., Rubio R., Contreras A. and Borie F. (2006) Efecto de la adición de compost sobre propágulos micorrízicos arbusculares en un suelo volcánico del centro sur de Chile. Journal of Soil Science and Plant Nutrition. 6: 26-39.
- Mohamed-Yasseen Y., Barringer S. A., Splittstoesser W. E. and Costanza S. (1994) The role of seed coats in seed viability. The Botanical Review. 4: 427-435.
- Moreno M. E. (1996) Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. 3^{ra} ed., UNAM, México DF. 393 p.
- Nagel M. and Borner A. (2009) The longevity of crop seeds stored under ambient conditions. Seed Science Research. 20: 1-12.
- Navarro M. y González Y. (1999) Identificación del periodo de latencia en tres especies de árboles leguminosos. Pastos y Forrajes. 22: 239-243.
- Statgraphics. (2005) StatGraphics centurion: ver. XV (User manual). StatPoint Technologies Inc. Warrenton, VA, EEUU.
- Tommerup C. (1983) Spore dormancy in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Transactions of the British Mycological Society. 81: 37-45.
- Trinidad-Cruz J. R., Quiñones-Aguilar E. E., Hernández-Cuevas L. V., López-Pérez L. y Rincón-Enríquez G. (2017) Hongos micorrízicos arbusculares asociados a la rizósfera de *Agave cupreata* Trel. & Berger en regiones mezcaleras del estado de Michoacán, México. Scientia Fungorum. 45: 13-25.

- Verma P. and Majee M. (2013) Seed germination and viability test in tetrazolium (TZ) assay. *Bio-Protocol*. 3: e884.
- Verma P., Kaur H., Petla, B. P., Rao V., Saxena S. C. and Majee M. (2013) Protein L-isoaspartyl methyltransferase is differentially expressed in chickpea and enhances seed vigor and longevity by reducing abnormal isoaspartyl accumulation predominantly in seed nuclear proteins. *Plant Physiology*. 161: 1141-1157.
- Xiao W., Custard K. D., Brown R. C., Lemmon B. E., Harada J. J., Goldberg R. B. and Fischer R. L. (2006) DNA methylation is critical for arabidopsis embryogenesis and seed viability. *The Plant Cell*. 18: 805-814.