

Metodologías microbiológicas de indicadores ambientales de suelo

Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo



Metodologías microbiológicas de indicadores ambientales de suelo

Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo

María Elena Castelán · Claudina María Hack
Miriam Porta · Cristina Esther Sotelo

COORDINADORAS

Silvia A. Arzuaga · Karina R. Ávalos Llano
Natalia Banegas · Sebastián Carnicer
Mónica M. Collavino · Stella M. Contreras Leiva
Amilcar Correa · Marcela R. Cossoli
Mario R. Delfino · Mariana Ferrerira
Daniela González · Daniel H. Grasso
María C. Iglesias · Natalia Mansilla
Cecilia Martin · Gernán L. Pérez
José M. Recalde · Amalia M. E. Romero
Julieta Rojas · Matías H. Serafini
Andrea A. Sirio · Cristina E. Sotelo
Marcela Toledo · Emilce Viruel

Metodologías microbiológicas de indicadores ambientales de suelo / Silvia A. Arzuaga ... [et al.]; coordinación general de María Elena Castelán ... [et al.]. - 1a edición para el alumno - Corrientes : Editorial de la Universidad Nacional del Nordeste EUDENE ; Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo, 2022. Libro digital, PDF - (Ciencia y técnica)

Archivo Digital: descarga

ISBN 978-950-656-211-3

1. Técnicas de Análisis. 2. Microbiología. 3. Suelos. I. Arzuaga, Silvia A. II. Castelán, María Elena, coord.

CDD 577.57

Edición: Irina Wandelow

Corrección: Facundo Alarcón / Irina Wandelow

Diseño y diagramación: Julia Caplan



© EUDENE. Coordinación de Comunicación Institucional, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina, 2023.

Queda hecho el depósito que marca la ley 11.723.
Reservados todos los derechos.

25 de Mayo 868 (cp 3400) Corrientes, Argentina.
Teléfono: (0379) 4425006
eudene@unne.edu.ar / www.eudene.unne.edu.ar

Capítulo 3. Determinación de infección micorrízica

Marcela R. Cossoli, Amalia M. E. Romero, Amilcar Correa,
Matías H. Serafini y María C. Iglesias

Un gran número de microorganismos residen en el suelo y llevan a cabo un amplio rango de funciones. Entre estos microorganismos se encuentran los hongos formadores de micorrizas arbusculares (Smith y Read, 2008).

Las micorrizas son asociaciones simbióticas que se producen entre ciertos hongos del suelo y las raíces de las plantas. El término micorriza proviene del griego (*mykos*: hongo y *rhiza*: raíz) y fue utilizado por primera vez por Frank (1885) para describir un fenómeno común que observó en las raíces de árboles de los bosques templados de Norteamérica.

Los hongos son seres vivos heterótrofos y, por lo tanto, se benefician con los hidratos de carbono sintetizados por la planta. A su vez, estos toman y transfieren nutrientes del suelo a la raíz (principalmente fósforo y nitrógeno) y le proveen protección contra patógenos y condiciones hídricas desfavorables (Smith y Read, 2008).

La formación de micorrizas resulta fundamental para la supervivencia de muchos taxones de plantas en diversos ecosistemas, incluyendo especies de cultivo de interés agronómico (Bethlenfalvay y Linderman, 1992).

Los hongos micorrízicos arbusculares se caracterizan por el desarrollo de hifas inter e intracelulares y estructuras de intercambio denominadas arbusculos dentro de las células corticales de la raíz, y por la producción de esporas intra y extraradicales. Además, algunas especies desarrollan vesículas dentro de las raíces (Saparrat, Ruscitti y Arango, 2020).

Bajo condiciones naturales, la mayoría de los cultivos agronómicos están colonizados con hongos micorrízico-arbusculares, y las prácticas agronómicas implican cambios complejos que podrían afectar a las poblaciones de estos hongos (Schalamuk, Druille y Cabello, 2013).

Para determinar la presencia de micorrizas y eventualmente cuantificarlas, es necesario realizar observaciones microscópicas de las raíces y es habitual utilizar diferentes protocolos de tinción de las raíces para el reconocimiento de estructuras fúngicas como proponen Phillips y Hayman (1970).

3.1. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El método descrito se basa en la tinción de las raíces de especies vegetales y en la observación detallada de las mismas, pudiendo visualizar todas las estructuras que forman parte de una infección micorrícica.

3.2. OBJETIVO DE LA DETERMINACIÓN

Cuantificar y describir el grado de infección micorrícica que pueda existir en diferentes especies vegetales bajo diferentes condiciones, pudiendo detallar el porcentaje de presencia de cada una de las estructuras fúngicas presentes en las raíces.

3.3. EQUIPAMIENTO

Se necesitan los siguientes elementos:

- Frascos y tubos de ensayo
- Probetas
- Porta y cubreobjetos
- Microscopio óptico
- Utillaje de uso normal en laboratorio.

3.4. REACTIVOS

Los reactivos que se utilizarán se detallan a continuación:

- Hidróxido de potasio 10%
- Agua oxigenada 10 vol
- Ácido clorhídrico 0,1 N
- Ácido láctico 5%
- Azul de tripán 0,05%.

3.5. ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL

Se trabaja con raíces de las especies vegetales que se encuentren bajo objetivo de estudio, una vez que estas son extraídas del suelo, deben estar correctamente limpias, sin ninguna partícula extraña, para proceder a la tinción.

3.6. PROCEDIMIENTO

Se llevará a cabo una tinción de las raíces y posteriormente su observación microscópica.

3.6.1. Tinción de las raíces

Se trabaja con la técnica reportada por Phillips y Hayman (1970) y Frioni (2011), con modificaciones incorporadas por el equipo de la Cátedra de Microbiología Agrícola (FCA-UNNE), quedando la misma con los siguientes pasos:

1. **Aclarado de las raíces con hidróxido de potasio.** Una vez que se obtienen las raíces perfectamente limpias, se las transfiere a tubos de ensayo o frascos de vidrio, luego se les incorpora hidróxido de potasio (KOH) al 10% hasta que queden sumergidas. Se las deja reposar durante 24 o al menos 12 horas en la mesada del laboratorio. Con el transcurrir del tiempo, el KOH se torna desde amarillento hasta tomar un color café, dependiendo de la especie vegetal.
2. **Incorporación de agua oxigenada.** Transcurrido el tiempo, se descarta el KOH y se enjuagan las raíces 3 veces con agua corriente, al igual que el frasco. Es conveniente trabajar en todos estos pasos con coladores y espátulas de plástico para manipular la masa de raíces (no material de metal porque puede ser corroído por el hidróxido). Una vez enjuagadas las raíces, se les coloca agua oxigenada (H_2O_2) 10 vol o al 3% hasta que queden sumergidas y se las deja reposar durante 15 minutos.
3. **Incorporación del ácido clorhídrico.** Pasado los 15 minutos, se descarta el H_2O_2 y se enjuagan una vez las raíces con agua corriente, se las coloca nuevamente en el frasco y se les incorpora ácido clorhídrico (HCl) 0,1 N hasta que queden sumergidas, dejándolas por 5 minutos.

4. **Incorporación de ácido láctico y azul de tripán.** Se descarta el HCl de cada frasco y sin enjuagar las raíces, se les coloca ácido láctico al 5% hasta que queden sumergidas. Luego, se les incorpora de a gotas el colorante azul de tripán, intentando lograr que el líquido quede de un color azul cristalino (Figura N° 1). Pasado un tiempo, el colorante empieza a ingresar a las raíces y comienza a teñirlas, en este momento es posible rectificar el colorante si se observa que las raíces quedan celestes. Es importante colocar de a poco el colorante debido a que, si las raíces quedan muy oscuras, se torna difícil visualizar las estructuras en el microscopio.



Figura N° 1. Detalle de las raíces sumergidas en ácido láctico y azul de tripán luego de su decoloración.

Una vez que se realiza este protocolo de tinción, las raíces se mantienen sin descomponerse a temperatura ambiente durante todo el tiempo que insuma la observación de la infección micorrízica. En el caso de disminuir el volumen de ácido por evaporación, este puede reponerse en el frasco quedando nuevamente las raíces sumergidas.

3.6.2. Observación microscópica

La observación se realiza siguiendo la técnica descrita por Giovannetti y Mosse (1980), con algunas modificaciones incorporadas por el equipo de la Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE.

En un portaobjeto se montan 10 segmentos de raíces teñidas que son tapadas con un cubreobjetos. Es importante en este punto que queden las raíces húmedas ya que, si se secan, no se puede realizar la observación bajo el microscopio.

En un costado del portaobjeto se realizan 5 marcas distanciadas a lo largo de 1 cm (Figura N° 2). Estas marcas van a señalar las 5 líneas que se van a seguir a lo largo de las 10 raíces, quedando de esta manera generados 50 puntos de observación. En cada uno se posiciona con el objetivo de 40x del microscopio y se describe en una grilla si existe la presencia de hifas, arbuscúlos y/o vesículas. De esta forma, teniendo en cuenta que cada punto se considera un 2%, podemos obtener el dato del porcentaje de cada estructura presente en una muestra en estudio. El porcentaje de micorrización total se obtiene a partir de calcular los campos donde está presente al menos una de las estructuras antes mencionadas.

Cabe aclarar que en cada uno de los 50 campos observados puede suceder que no haya ninguna estructura o que estén presentes las tres. Se considera como óptimo generar al menos 3 portaobjetos (repeticiones) por cada muestra que sea parte del ensayo en estudio, de esta forma se pueden promediar los datos y permiten un análisis estadístico.

3.7.1. Resultados obtenidos en la Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE

Tomaremos los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1. Ensayo en el cultivo de algodón, donde se consideró la utilización de abonos orgánicos. Estos se generaron de la mezcla con aserrín de estiércoles con diferentes orígenes: estiércol de ave, bovino, caprino y equino. Estos abonos orgánicos fueron aplicados al cultivo de algodón en 2 dosis diferentes, 20 tn.ha⁻¹ y 40 tn.ha⁻¹, con un total de 9 tratamientos incluyendo un testigo, con 5 repeticiones. El ensayo se realizó bajo condiciones controladas en invernáculo.

Luego de finalizado el ensayo, y habiendo realizado todas las determinaciones necesarias, se extrajeron las plantas de algodón y se tiñeron sus raíces. Después se determinó el porcentaje de presencia de las diferentes estructuras fúngicas en la simbiosis micorrícica.

Se detectaron diferencias en los porcentajes de las estructuras que respondían al tipo de abono y a la dosis utilizada, como también al contenido de P del suelo de cada uno de los tratamientos.

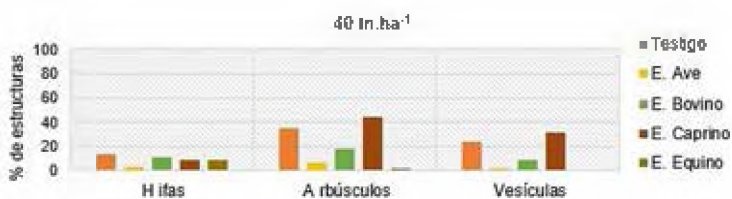


Figura N° 4. Estructuras para los tratamientos con abonos en una dosis de 40 tn.ha⁻¹.

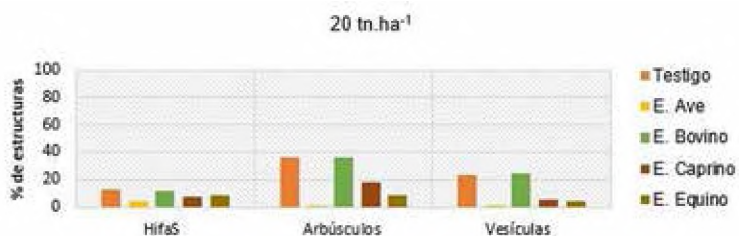


Figura N° 5. Estructuras para los tratamientos con abonos en una dosis de 20 tn.ha⁻¹.



Figura N° 6. Contenido de P del suelo de cada uno de los tratamientos del ensayo en algodón.

En la mayoría de los abonos (ave, caprino y equino) en la dosis más alta hubo mayor cantidad de P en el suelo que en la más baja, y los porcentajes de las estructuras respondieron de la misma forma. En cambio, en el abono a partir de estiércol bovino, se encontró menor contenido de P en ambas dosis y en el caso de la presencia de micorrizas, hubo mayor porcentaje de arbuscúlos y de vesículas en el tratamiento con menor dosis. Se podría decir que aquí la relación simbiótica respondió con relación al menor contenido de P.

Ejemplo 2. En este caso se trabajó en un cultivo de gramínea, específicamente con avena. Aquí el planteo del ensayo se realizó a campo y se trabajó con 8 tratamientos que provenían de la utilización de 3 biofertilizantes (*Bradyrhizobium japonicum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Azotobacter* sp.) y el tratamiento testigo sin inocular. En todos ellos también se incluyó la utilización de polvo de roca basáltica, con y sin basalto.

Esta avena se muestreó en dos oportunidades, la primera fue a los 56 días de la aplicación de los tratamientos y la segunda fue luego de un pastoreo, a los 22 días de este. En cada oportunidad se extrajeron plantas con raíces que fueron teñidas según el protocolo descrito anteriormente y se verificó la infección micorrícica en el microscopio.



Figura N° 7. Presencia de hifas para cada tratamiento en avena, en ambos muestreos.



Figura N° 8. Presencia de arbusculos para cada tratamiento en avena, en ambos muestreos.



Figura N° 9. Presencia de vesículas para cada tratamiento en avena, en ambos muestreos.

En todos los casos, en el segundo muestreo se verificó un mayor porcentaje de presencia de hifas en todos los tratamientos, siendo más marcada para *Pseudomonas* y *Azotobacter* en los tratamientos con basalto.

Con respecto a los arbusculos, en la mayoría de los casos fue ligeramente menor en el segundo muestreo, exceptuando para *Pseudomonas* con basalto y *Azotobacter* sin basalto, con porcentajes superiores en el segundo muestreo. Se destaca además al *Azotobacter*, dando resultados inversos según el uso o no de basalto.

Algo muy notorio, pero quizás esperable fue la presencia de vesículas, las que de por sí fueron las estructuras que menos se visualizaron. En el segundo muestreo prácticamente no hubo o fue nula su presencia en algunos casos, lo que podría ser lógico, dado que la planta está estresada, rebrotando luego del pastoreo, y las vesículas son estructuras que almacenan sustancias de reservas como lípidos, lo que insume un gran gasto de energía en la simbiosis.

En resumen. Utilizando el protocolo de tinción y de observación microscópica fue posible determinar la infección micorrícica y describirla en todos sus componentes o estructuras, logrando detectar diferencias en todos los parámetros evaluados que están asociados a prácticas agrícolas utilizadas en cultivos de interés productivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BETHLENFALVAY, G.J. y Linderman, J.A. (1992). *Mycorrhizae and crop productivity*. Horticultural Crops Research Laboratory. Oregon, EE.UU.: USDA-ARS.
- FRANK, B. (1885). «Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze». *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 3, 128-145. Disponible en <https://bit.ly/3lvKftO>
- FRIONI, L. (2011). *Microbiología: básica, ambiental y agrícola* (1ª ed.) Buenos Aires: Orientación Gráfica Editora.
- GIOVANNETTI, M. y Mosse, B. (1980). «An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots». *New Phytologist*, 84(3), 489-500.
- PHILLIPS, J.M. y Hayman, D.S. (1970). «Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection». *Transactions of the British Mycological Society*, 55(1), 158-161. Disponible en <https://bit.ly/3qqywGT>
- SAPARRAT, M.C.N., Ruscitti, M.F. y Arango, M.C. (2020). *Micorrizas arbusculares*. Libros de Cátedra. La Plata: Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata.
- SCHALAMUK, S., Druille, M. y Cabello, M.N. (2013). «Hongos formadores de micorrizas arbusculares. Influencia de las prácticas agronómicas sobre su diversidad y dinámica de colonización». *Rizósfera, Biodiversidad y Agricultura Sustentable*, 47-71.
- SMITH, S.E. y Read, D.J. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis* (3a ed.) Nueva York: Academic Press.