



Universidad Nacional del Nordeste



Facultad de Ciencias Agrarias

Trabajo Final de Graduación Modalidad Pasantía

“Determinación de la colonización micorrícica en especies forrajeras”

Pasante/Alumna: TURRELLA, Vanina Antonella.

Asesora: Ing. Agr. (Mgter) HACK, Claudina María.

Año: 2023

INTRODUCCIÓN

Los pastizales constituyen el principal alimento del ganado en la región NEA. Las especies predominantes en estos ecosistemas son gramíneas megatérmicas (C4), lo que condiciona la producción animal por su marcada estacionalidad y su baja calidad nutricional. Una alternativa para mejorar la calidad forrajera sería incorporar especies forrajeras cultivadas al tapiz. Esta práctica muchas veces se ve condicionada por la baja fertilidad de los suelos de la región, particularmente por la baja disponibilidad de fósforo (P). Existen numerosos antecedentes que indican que la simbiosis con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) puede incrementar la capacidad de las plantas de absorber fósforo (Koide, 1991; Smith y Read, 1997), lo cual podría ayudar a la implantación de especies forrajeras, especialmente leguminosas templadas, e incrementar la producción de biomasa o la concentración de P en los tejidos, mejorando la oferta y la calidad del forraje.

El término micorriza se debe al botánico alemán A. B. Frank que, en 1885, lo utilizó para describir la existencia de raíces de plantas vasculares que estaban infectadas con hongos. Las micorrizas actualmente se definen como asociaciones simbióticas mutualistas entre HMA y raíces de plantas superiores (Alvear Lizama, 2001). Los HMA son seres vivos heterótrofos y por lo tanto, se benefician con los hidratos de carbonos sintetizados por la planta y a su vez estos toman y transfieren nutrientes del suelo a la raíz, principalmente fósforo y nitrógeno. Además, le proveen protección contra patógenos y condiciones hídricas desfavorables (Smith y Read, 2008). Los HMA se caracterizan por el desarrollo de hifas inter e intracelulares, arbuscúlos, que son considerados el sitio funcional de intercambio de nutriente, y algunas especies también desarrollan vesículas dentro de las raíces. En el suelo pueden encontrarse distintos tipos de propágulos: esporas, hifas o fragmentos de raíces colonizadas. El tamaño y la distribución de la población fúngica del suelo está relacionada con la cantidad y calidad de la materia orgánica aportada y los métodos de manejo del suelo empleados. Los HMA se ven afectados por determinados factores edáficos físico-químicos como: O_2 , CO_2 , temperatura, humedad, pH, fuentes de nutrientes y su disponibilidad, y efectos fungistáticos del suelo, entre otros. El micelio externo de los hongos arbusculares que emerge del sistema radical puede adquirir nutrientes de zonas del suelo que son inaccesibles para las raíces (Smith et al., 2000). Además, las hifas fúngicas son mucho más delgadas que las raíces y, por lo tanto, pueden penetrar en poros más pequeños (Allen, 2011). Dentro de los beneficios de las micorrizas están: producir antibióticos, mejorar la disponibilidad de fósforo y absorber exudados de la raíz, mejorando el

desarrollo de la planta a bajo costo. También hay antecedentes que indican que se puede incrementar la nutrición nitrogenada al establecerse una relación sinérgica con las bacterias fijadoras de N en el caso de las leguminosas, aunque para ello sería necesario asegurar una cierta disponibilidad de P en el suelo (Hack et al., 2019).

Si bien en el suelo se encuentran HMA, la inoculación con biofertilizantes comerciales que contienen estos hongos podría ser una alternativa rentable para mejorar la producción y calidad de especies cultivadas en la región. En cualquier caso, para poder evaluar el efecto de los HMA en las plantas, es necesario determinar la presencia de estructuras micorrícicas en las raíces y cuantificar el grado de colonización. En este trabajo se realizaron observaciones microscópicas de las raíces de dos especies forrajeras que se utilizan en el NEA, *Melilotus alba* Med. (trébol de olor blanco) y *Brachiaria brizantha*. *M. alba* se cultiva en Argentina como melífera y forrajera, ofreciendo forraje de calidad proteica y volumen durante el invierno y la entrada de la primavera. Si bien presenta baja palatabilidad por la presencia de cumarina, luego de un período de acostumbamiento, es pastoreada sin inconveniente por el ganado. Se utiliza principalmente en pastoreo directo, pudiendo sembrarse pura, asociada a gramíneas cultivadas o intersebrada en campo natural. Se desarrolla tanto en suelos francos como en aquellos arenosos o pesados (Ferrari y Maddaloni, 2001). *B. brizantha* es una gramínea, de ciclo estival. Se destaca por las buenas cualidades de adaptación y persistencia en suelos con limitantes, como suelos ácidos, de mediana y baja fertilidad; por su eficiente crecimiento y perdurabilidad; por sus altas producciones de biomasa de buena calidad y alto grado de aceptación por los animales (Olivera et al., 2006).

Objetivo general:

- ✓ Adquirir experiencia en la tinción de raíces y observación microscópica de hongos micorrícicos arbusculares en especies forrajeras.

Objetivos específicos:

- ✓ Determinar la infección de hongos micorrícicos en raíces de *Melilotus alba* y *Brachiaria brizantha* inoculadas con micorrizas arbusculares.
- ✓ Identificar el grado de colonización micorrícica y el tipo de estructuras fúngicas presentes en las raíces.

Descripción de las tareas desarrolladas

El procedimiento se realizó en el Instituto Agrotécnico “Pedro M. Fuentes Godo”, Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE (Resistencia, Chaco). Las raíces con la que se trabajó se obtuvieron de un ensayo de *M. alba* y *B. brizantha* que fueron inoculadas con biofertilizantes que contenían micorrizas arbusculares. El suelo donde se realizó el ensayo era proveniente de la localidad de Santa Ana, Corrientes. El mismo es arenoso, con bajo contenido de P y no fue esterilizado para la realización del ensayo.

El procedimiento de tinción de raíces y observación de estructuras fúngicas se realizó sobre 24 muestras de raíces de *M. alba* y 23 muestras de *B. brizantha*. A su vez se realizaron dos repeticiones de cada una.

Preparación de las raíces

Una vez separada la parte aérea, las raíces se lavaron con agua corriente, eliminando todos los restos de suelo (Fig. 1),



Fig. 1: Procedimiento de lavado de raíces de *M. alba*

Tinción de las raíces

Una vez que las raíces de cada muestra estuvieron preparadas, se llevó a cabo la tinción de las mismas con la técnica reportada por Phillips y Hayman (1970) modificada (Cossoli et al., 2023), para el reconocimiento de estructuras fúngicas.

Se realizaron los siguientes pasos:

- a) Aclarado de las raíces: las raíces limpias se colocaron en frascos de plástico, adecuadamente rotulados y se sumergieron en hidróxido de potasio (KOH) al 10%. Se las dejó reposar durante 24 horas. Con el transcurrir del tiempo, el KOH se tornó amarillento hasta tomar un color café (Figura 2, A).
Luego se enjuagaron las raíces con agua corriente (tres veces) para eliminar el KOH. Se incorporó agua oxigenada hasta cubrir las raíces, se dejó reposar durante 15 minutos y luego se lavaron nuevamente.
- c) Incorporación de ácido clorhídrico (HCl 0,1N): las raíces se dejaron durante 10 minutos cubiertas con HCl 0,1 N y luego se descartó el HCl sin necesidad de enjuagar.
- d) Tinción de las raíces: Por último, se incorporó ácido láctico al 5% hasta que quedaron sumergidas. Para la tinción se incorporó de a gotas el colorante azul de tripán (al 0,05% en ac. Láctico), hasta que el líquido quedó con color azul cristalino (Figura 2 B). Cabe aclarar que el colorante se agrega de a poco debido a que, si las raíces quedan muy oscuras, se torna difícil visualizar las estructuras en el microscopio. Pasado un tiempo, el colorante ingresó a las raíces, que quedaron teñidas con una coloración azul. Una vez completado el procedimiento, las raíces se conservaron en la misma solución hasta su observación.

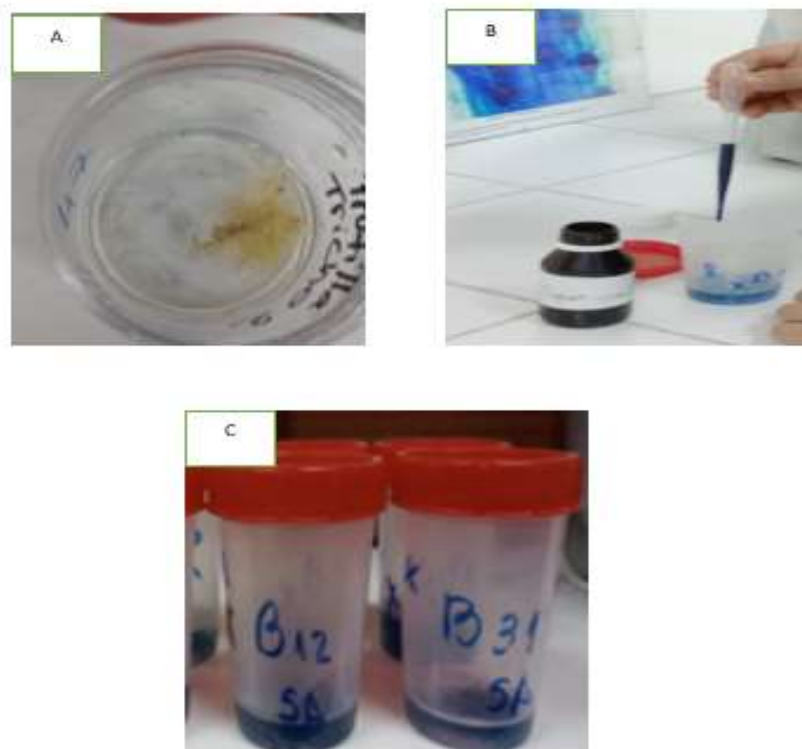


Fig. 2. Proceso de tinción de las raíces para la observación microscópica de estructuras fúngicas. A) KOH tornándose de color amarillento; B) Incorporación de gotas de azul de tripán; C) Raíces sumergidas en ácido láctico luego de su decoloración y tinción con azul de tripán.

Cuantificación de la colonización micorrícica de las raíces

Una vez finalizados los pasos anteriores se realizó la observación microscópica 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.

Para cada muestra se montaron en un portaobjetos 10 segmentos de raíces teñidas que se taparon con un cubreobjetos, el mismo fue presionado firmemente para facilitar su observación (Fig. 3). Las observaciones de los preparados se realizaron con el objetivo de 40x del microscopio óptico (Fig. 4). Se realizó un recorrido de las raicillas en busca de estructuras fúngicas (hifas, vesículas y arbuscúlos) que indican que hay colonización micorrícica (Fig. 5). Se registraron cinco campos visuales de forma vertical por cada fragmento de raíz, dando un total de 50 puntos de observación en cada repetición. Este

procedimiento se realizó dos veces por cada muestra. Es decir que en total se realizaron 100 observaciones en cada una, con un total de 2400 observaciones para *M. alba* y 2300 para *B. brizantha*.

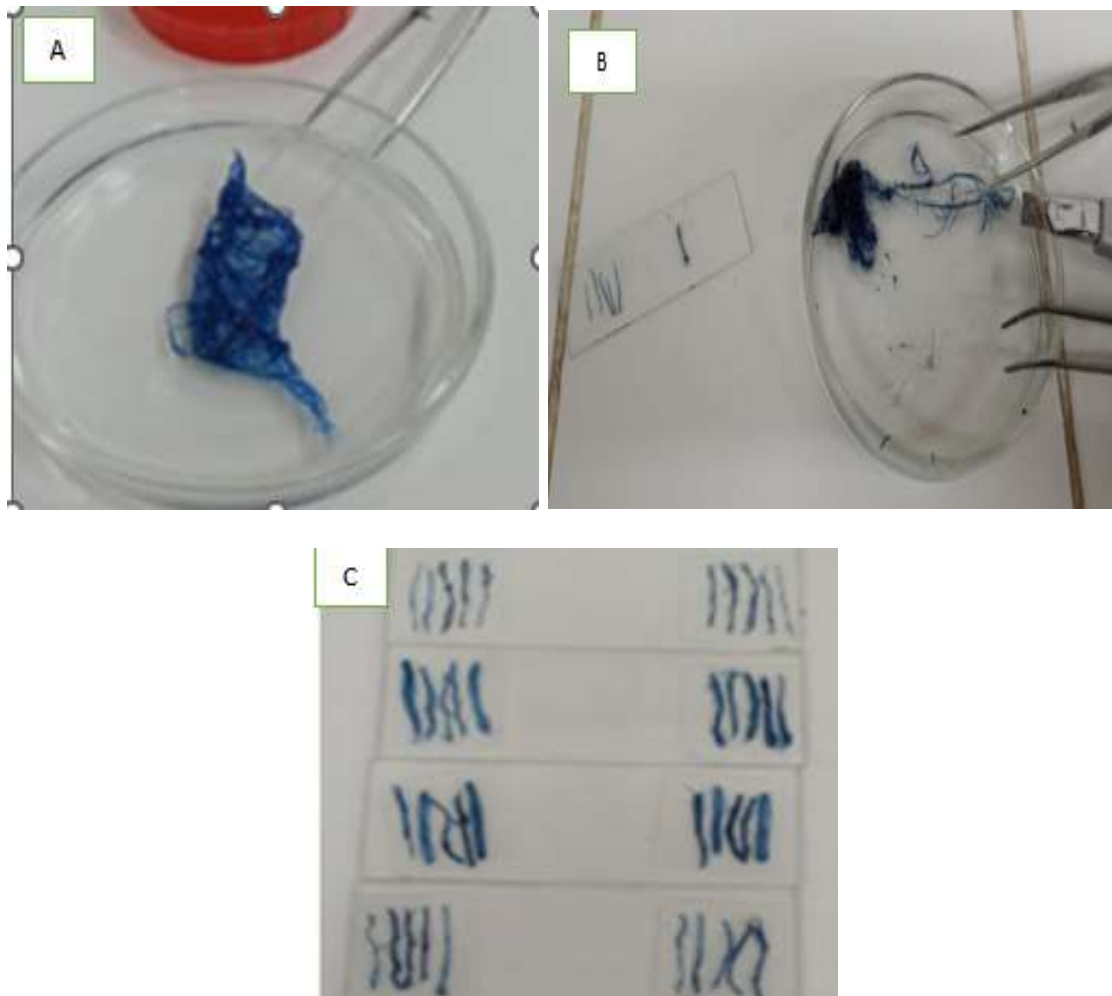


Fig. 3: A) Raíces teñidas, listas para su observación. B) Extracción de raicillas con pinza histológica; C) Montaje de las raíces para la observación microscópica.



Fig. 4: observación de raíces realizada con microscopio óptico.

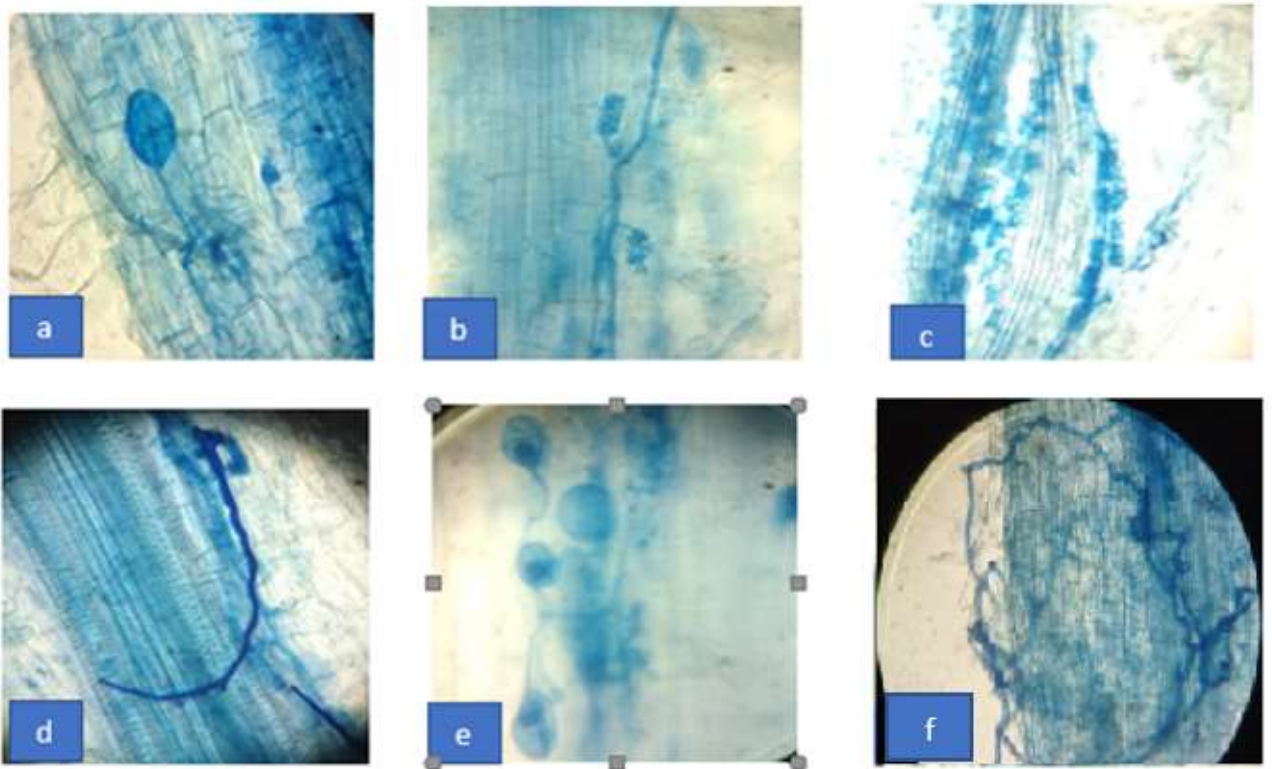


Fig. 5: estructuras fúngicas observadas con microscopio electrónico, con el objetivo 40x.
a y e: vesículas, b y c: arbúsculos, d y f: hifas.

Los resultados de las observaciones se registraron en una planilla, luego se analizaron para determinar el porcentaje de micorrización promedio para cada especie. Para ello se tuvo en cuenta el número de observaciones con estructuras fúngicas, en relación al

total de observaciones realizadas. Se tomó en cuenta también el tipo de estructuras observadas en cada caso (hifas, vesículas o arbuscúlos).

Resultados obtenidos

En la figura 6 se observa el porcentaje de colonización en *Brachiaria brizantha*. Del porcentaje total se considera cuánto corresponde a hifas, vesículas y arbuscúlos.

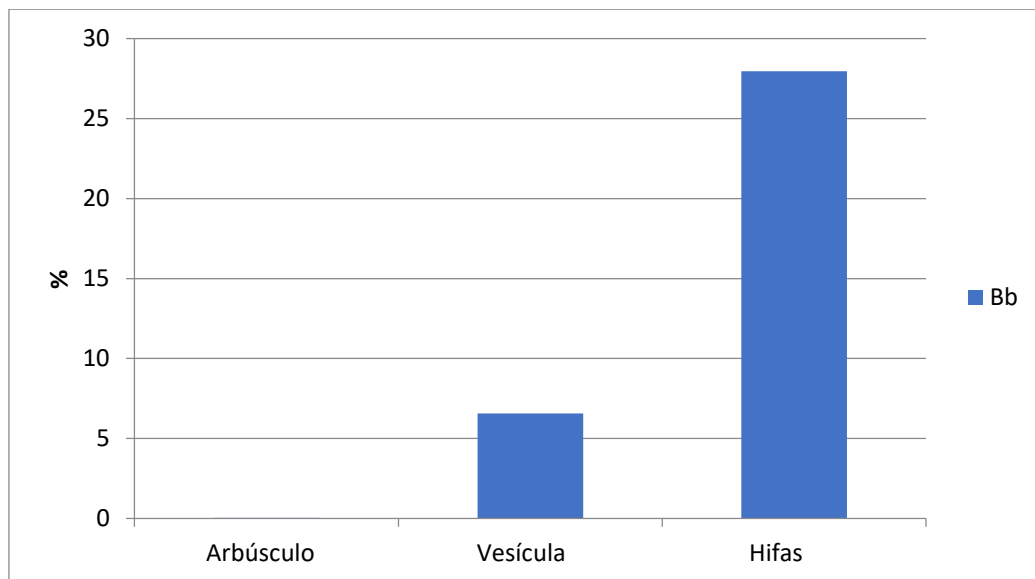


Fig. 6. Porcentaje de colonización micorrícica en raíces de *Brachiaria brizantha*.

En *B. brizantha* se puede observar la presencia de estructuras fúngicas en el 35% de las observaciones, siendo predominantes las hifas por su presencia (casi el 83% de los positivos) y en segundo lugar las vesículas (17%). En esta especie prácticamente no se observaron arbuscúlos, los que solo estuvieron presentes en un 0,04% de las observaciones, lo que representa el 0,22% de las estructuras fúngicas (Fig 6). Cabe destacar que en *B. brizantha* hubo mayor porcentaje de colonización que en *M. alba*, en la cual se registró un 29% de colonización micorrícica en las raíces.

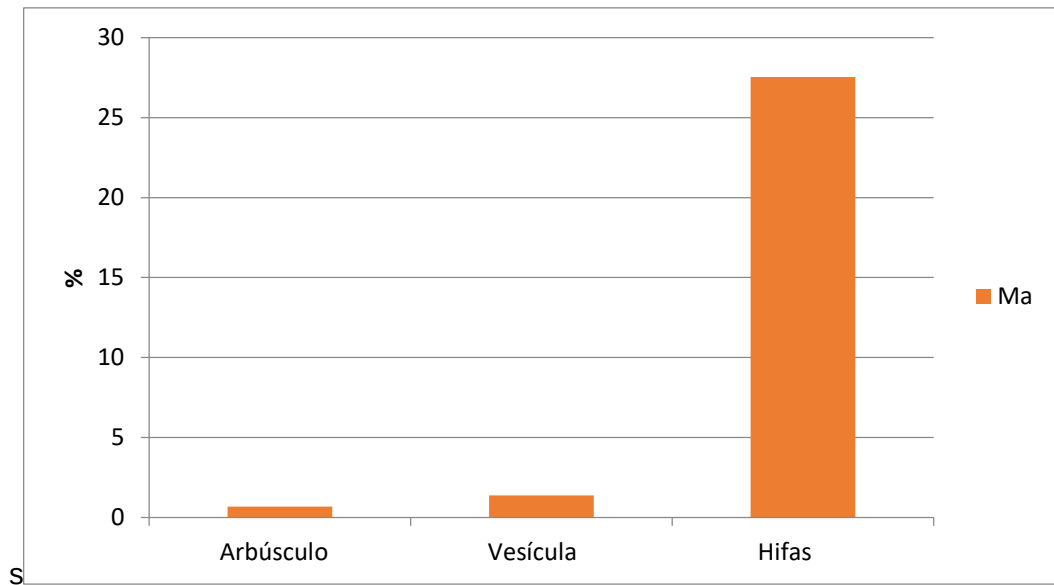


Fig. 7. Porcentaje de colonización micorrícica en raíces de *Melilotus alba* (Ma)

En esta especie también se observaron las tres estructuras fúngicas, siendo mayor el porcentaje de hifas, que se observaron en el 27,5% de los fragmentos radicales analizados, lo que en este caso representó el 93,83% del total de observaciones positivas (Fig. 7). En comparación a *B. brizantha* hubo una mayor cantidad de arbúsculos, que en este caso estuvieron presentes en 0,67% de los fragmentos (2,46% de las estructuras observadas). El hecho de que haya mayor presencia de arbúsculos resulta de interés ya que éstos son los principales sitios de intercambio de nutrientes entre la planta hospedadora y el hongo (Gianinazzi et al., 1979). Los arbúsculos se forman dentro de las células corticales poco después de la penetración a la raíz (2 a 5 días). El contacto entre el arbúsculo y el citoplasma celular no es directo, sino que se encuentra separado a través de una membrana periarbuscular que deriva de la planta (Parniske, 2008). La formación de los arbúsculos aumenta la actividad metabólica de la célula huésped, lo que se debe principalmente a la transferencia bidireccional de metabolitos y nutrientes. El proceso de formación y degeneración de los arbúsculos ocurre simultáneamente en la raíz, y a menudo se observan todas las etapas del ciclo. También son muy importantes las vesículas que son estructuras de gruesas paredes que se desarrollan en extremos de hifas inter o intracelularmente, se encuentran en general en las capas superficiales de la raíz y funcionan como órganos de almacenamiento de lípidos, lo que insume un gran gasto de energía en la simbiosis, entonces la presencia de las mismas podría indicar que la planta no está sufriendo ningún tipo de estrés. Por último, las estructuras que más estuvieron presentes en ambas especies fueron las hifas, que después de la infección primaria y durante la primera fase de la propagación en la raíz, crecen desde la raíz hacia la rizosfera. Esta

parte externa del micelio es importante, ya que lleva a cabo la absorción de nutrientes de la solución del suelo y los transporta hacia la raíz. La red de micelio consiste en hifas principales de 5 a 20 μm de diámetro que pueden ramificarse dicotómicamente, e hifas secundarias más finas de 1 a 5 μm de diámetro. El crecimiento del micelio externo puede estar influenciado por diferentes factores bióticos y abióticos del suelo. Otro aspecto a tener en cuenta es que los HMA forman esporas a partir de las hifas del micelio externo y que estas esporas son las que aseguran la supervivencia del hongo en el suelo (Saparrat, et al.,2020). Otra característica de las hifas es que, debido a su forma de crecimiento, favorecen la formación o unión de los agregados del suelo, y la relativa persistencia de las mismas y sus productos (glomalina, etc.), hacen a los HMA importantes estabilizadores de los agregados a largo plazo.

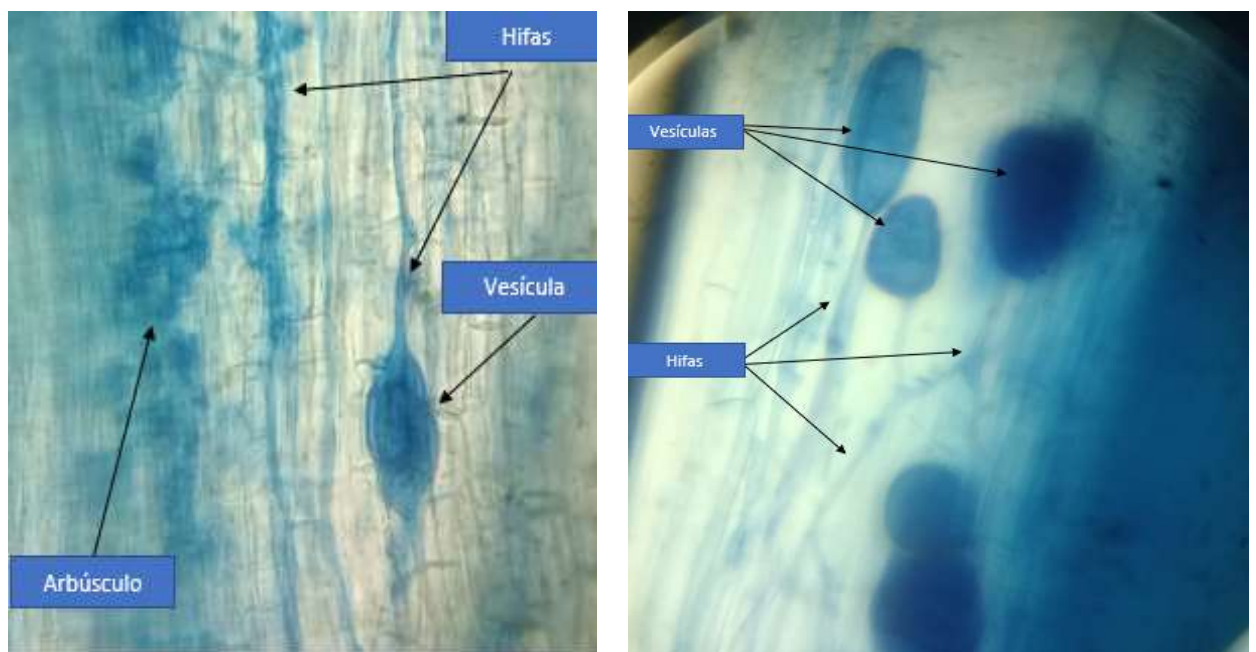


Fig. 8. estructuras fúngicas visualizadas en *Melilotus alba* .

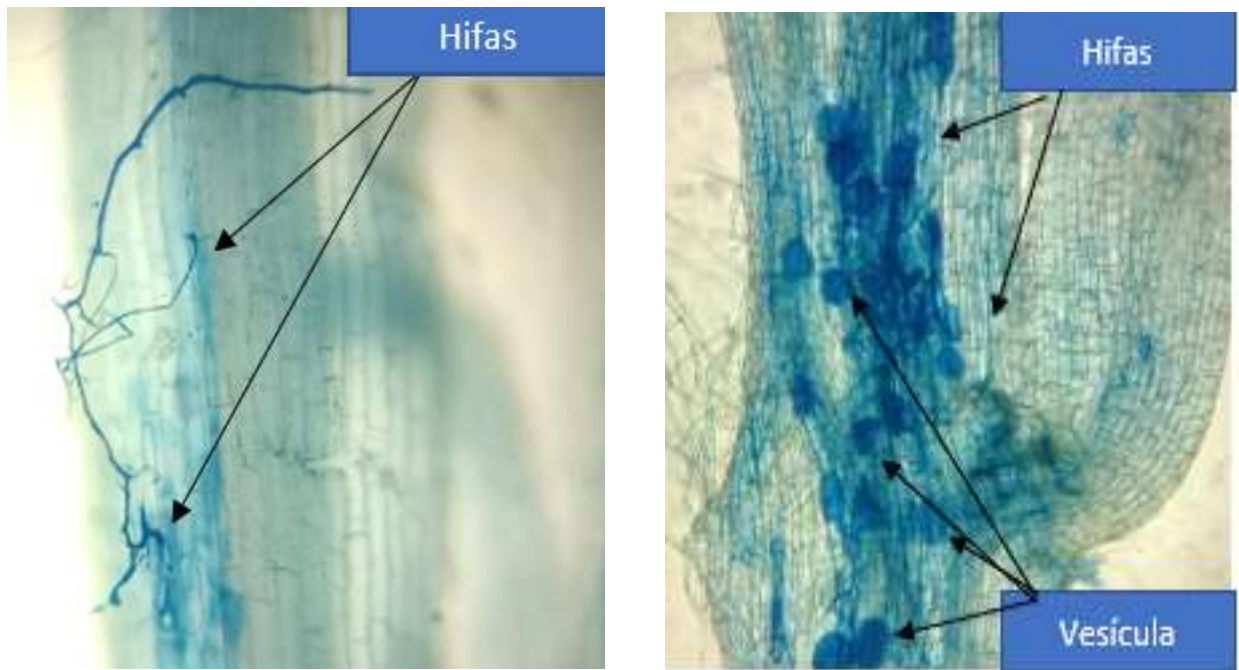


Fig. .9. estructuras fúngicas visualizadas en *Brachiaria brizantha*.

Comentarios finales

Con la técnica de tinción y de observación microscópica pude observar las diferentes estructuras de los hongos para determinar así la colonización en las dos especies forrajeras analizadas. Es importante tener en cuenta los HMA ya que constituyen la base de algunos biofertilizantes cada vez más utilizados en las prácticas agrícolas a nivel mundial, en los últimos años se está incrementando exponencialmente la importancia de estos tipos de microorganismos en las explotaciones agrícolas, lo que está transformando de forma radical la industria de los fertilizantes, con una sustitución muy importante de los productos químicos por productos biológicos basados en microorganismos.

Personalmente, al realizar las tareas del laboratorio y transitar todas las instancias, desde el lavado de raíces, la tinción de las mismas hasta llegar a la observación en microscopio, adquirí destreza en la preparación y acondicionamiento de las muestras, entendí que es un trabajo que requiere de mucha precisión y dedicación, y sobre todo mucho tiempo en el microscopio. Aprendí a manipular las raicillas que son muy delicadas y los materiales para realizar los preparados. Además, aprendí a volcar todos los datos en planillas y luego utilizar herramientas como Excel e InfoStat, que me permitieron resumir gran cantidad de datos en solo un cuadro y poder analizarlos y comprenderlos. También al transitar la etapa de la escritura, tanto del proyecto como

del informe final, aprendí nuevas formas de buscar y utilizar en la redacción bibliografía científica referente al tema trabajado.

Puedo decir que fue una experiencia enriquecedora, positiva y de aprendizaje permanente, donde pude integrar conceptos teóricos con la práctica profesional.

BIBLIOGRAFÍA

- Allen, M. F. (2011). Linking water and nutrients through the vadose zone: a fungal interface between the soil and plant systems: linking water and nutrients through the vadose zone: a fungal interface between the soil and plant systems. *Journal of Arid Land*, 155–163.
- Avelar Lizama, P. A., & Vásquez, J. (2001). Evaluación biológica y económica del uso de micorrizas (Mycoral®) en cuatro pastos.
- Bennett, A. E., Bever, J. D., y Bowers, M. D. (2009). Arbuscular mycorrhizal fungal species suppress inducible plant responses and alter defensive strategies following herbivory. *Oecologia*, 160, 771-779.
- Burggraaf, A. J. P., y Beringer, J. E. (1987). Nuclear division and VA-mycorrhizal in-vitro culture. In *Mycorrhizae in the next decade: Practical applications and research priorities; Proceedings of the 7th North American conference on mycorrhizae*, 190. University of Florida.
- Cossoli, M. R., Romero A. M. E., Correa M.E., Serafini M.H., & Iglesias, M.C. (2023). Determinación de infección micorrízica. En: *Metodologías microbiológicas de indicadores ambientales del suelo* (pp.59-65). EUDENE.
- Genre, A., Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P., y Barker, D. (2005). Arbuscular Mycorrhizal Fungi Elicit a Novel Intracellular Apparatus in *Medicago truncatula* Root Epidermal Cells before Infection. *Plant Cell*, 17(12), 3489-3499.
- Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V., y Dexheimer, J. (1979). Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. III. Ultrastructural localization of acid and alkaline phosphatase in onion roots infected by *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.). *New Phytologist*, 82, 127-132.
- Giovannetti, M., & Mosse, B. (1980). An Evaluation of Techniques for Measuring Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Infection in Roots. *New Phytologist*, 84, 489-500. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x>

- Hack, C. M., Porta, M., Schäufele, R., & Grimoldi, A. A. (2019). Arbuscular mycorrhiza mediated effects on growth, mineral nutrition and biological nitrogen fixation of *Melilotus alba* Med. in a subtropical grassland soil. *Applied Soil Ecology*, 134, 38-44.
- Koide, R.T. (1991). Nutrient supply, nutrient demand and plant response to mycorrhizal infection. *New Phytologist* 117: 365–386.
- Olivera, Y., Machado, R., Del Pozo, P.P. 2006. Características botánicas y agronómicas de especies forrajeras importantes del género *Brachiaria*. *Pastos y Forrajes* 29(1):1-23.
- Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 763.
- Phillips, J.M. y Hayman, D.S. 1970. Improved procedure for clearing root and staining parasitic and VA-mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158-161.
- 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.
- Smith, F. A., Jakobsen, I., y Smith, S. E. (2000). Spatial differences in acquisition of soil phosphate between two arbuscular mycorrhizal fungi in symbiosis with *Medicago truncatula*. *The New Phytologist*, 147(2), 357-366.
- Smith, S.E. & Read, D.J. (1997). *Mycorrhizal Symbiosis*, 2nd edn. Cambridge, UK: Academic Press. 605 páginas.