

## Efecto de la esterilización con métodos físicos en suelo, sobre la flora micorrícica y en el cultivo del yacón (*Smallanthus sonchifolius*) en Horco Molle, Tucumán

G. Giampaoli<sup>1\*</sup>; C.I. Brandán de Weht<sup>2</sup>; R.J. Enrico<sup>3</sup>; M.V. Coll Aráoz<sup>4</sup>; V. Lencina<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo, Universidad Nacional de Tucumán. Miguel Lillo 205. 4000. San Miguel de Tucumán.

<sup>2</sup> Microbiología Agrícola, Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán. Florentino Ameghino s/n, El Manantial. 4105. Tucumán.

<sup>3</sup> Biología Celular y de los Microorganismos, Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo. Miguel Lillo 205. 4000. San Miguel de Tucumán.

<sup>4</sup> PROIMI. Avenida. Belgrano y Pasaje Caseros. 4000. San Miguel de Tucumán.

<sup>5</sup> Instituto de Investigaciones Estadísticas. Facultad de Ciencias Económicas. Av. Independencia 1900. 4000. San Miguel de Tucumán.

\* Autor de correspondencia: giselagiam@gmail.com

**Palabras clave:** hongos vesículo-arbusculares, simbiosis, sustrato, esterilización

Los microorganismos del suelo son responsables de diversas actividades bioquímicas que influyen en el crecimiento de las plantas (Frioni, 2006). Es el caso de los hongos formadores de micorrizas vesículo-arbusculares, que colonizan las raíces de las plantas superiores e inferiores, estableciendo asociaciones simbióticas mutualistas, en la que los dos componentes son beneficiados. Estudios realizados en rizomas de plantas como Orquídeas, *Psilotum* y *Tmesipteris* demostraron que estos también pueden ser colonizados por estos simbiontes (Brundett, 2002; Duckett y Ligorne, 2006). Las micorrizas incrementan la superficie radical para la absorción de agua y elementos nutritivos como N, P, K, Mg, Ca, Cu, Mn, y Zn. La planta provee al hongo de fotosintatos, fitohormonas, y un hábitat para su crecimiento (Blanco y Salas, 1997). Los hongos que la forman, están dentro del Phylum Glomeromycota, clase Glomeromycetes, cuyos integrantes mueren cuando se les priva de la presencia de raíces (son biótrofos obligados). Son de reproducción asexual en su mayoría (De Souza *et al.*, 2008). Las investigaciones de la actividad de una clase específica de microorganismo del suelo y su influencia en el desarrollo vegetal, requieren de la esterilización de los sustratos empleados. En los estudios sobre micorrizas, la comparación del crecimiento de plantas micorrizadas y no micorrizadas es indicadora de la magnitud del beneficio de la simbiosis (Covacevich y Echeverría, 2003). Las esterilizaciones químicas y/o físicas de suelo lo modifican; por ejemplo, el bromuro de metilo se transforma en metanol

e iones bromuro, provocando fitotoxicidad (Covacevich y Echeverría, 2003). Los fungicidas del grupo de los benzimidazoles (Benomyl), reducen la colonización por hongos micorrícicos arbusculares, pero no los elimina totalmente, ya que actúa sobre hifas en estado vegetativo, sin afectar las esporas y sin afectar el crecimiento de las plantas (Paul *et al.* 1989). El vapor húmedo saturado a presión como agente esterilizante, es uno de los métodos más utilizados en las prácticas de laboratorio. Hay antecedentes que registraron que el tratamiento en autoclave de 50 g. de suelo a 120 °C, durante 90 minutos, lo esterilizó totalmente (López y Barbaro, 1988). Sin embargo, los sustratos tratados con este método son susceptibles a ser recolonizados, debido a que, como consecuencia del método, se forma un vacío biológico que puede ser llenado por organismos saprófitos, patógenos, u organismos presentes en el polvo trasladados por el viento y la lluvia (Centro Internacional de la Papa, 2008). *Smallanthus sonchifolius* (yacón), es un cultivo andino de gran interés debido a sus propiedades dietéticas y medicinales. Se registran antecedentes de asociaciones simbióticas micorrícicas vesículo arbusculares en su sistema radical (85%), Mercado *et al.*, 2013. Además, se comprobó que los canales secretores de las raíces de esta planta contienen ácido kaurenico en más de un 90% del exudado (Coll Aráoz, 2011); este ácido es precursor de las giberelinas, hormonas que regulan la germinación y el crecimiento vegetal, y son sustancias de defensa frente a condiciones desfavorables y predadores naturales (Ghisal-

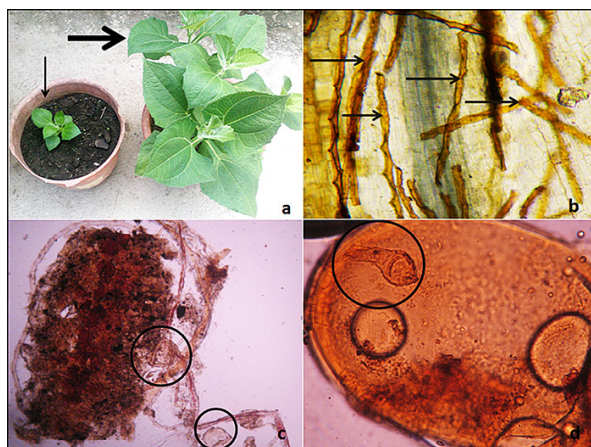
**Tabla 1.** Valores promedio de parámetros agronómicos, obtenidos a los 202 días de crecimiento de las plantas de ambos tratamientos, Tucumán, Instituto de Ecología Regional, 2013.

Trat.	Altura (cm)	Vástagos/macetas (n)	Hojas/vástago (n)	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Peso seco (g.)		
					Raíces	Rizomas	Parte aérea
T <sub>0</sub>	46	2	2,5	21,7	24	3,32	7,15
T <sub>1</sub>	50	7	5,3	18,8	85,25	15,5	27,65

berti, 1997). Se ha demostrado que las giberelinas influyen la colonización micorrícica, suprimiendo la formación de arbusculos e inhibiendo la colonización por micorrizas vesículo arbusculares (Foo *et. al.*, 2013). Los objetivos propuestos fueron: evaluar el efecto de la esterilización por vapor saturado a presión, sobre las esporas formadoras de micorrizas vesículo-arbusculares, en los parámetros fisicoquímicos del suelo, y su incidencia en los agronómicos de las plantas de *Smallanthus sonchifolius* crecidas en el sustrato tratado. El trabajo se realizó en el Laboratorio de Control de Calidad de Inoculantes (LABOCOIN) de la Facultad de Agronomía y Zootecnia, UNT. Se diseñó un ensayo en el que se usaron 10 macetas, con una mezcla de arena y suelo (1:2), provenientes del campo experimental de Horco Molle. El sustrato de 5 de ellas fue esterilizado con vapor saturado a presión en autoclave, a 120°C y 1 atm. de presión durante 30 minutos. En cada contenedor se plantaron rizomas de *S. sonchifolius*, y se mantuvieron en invernadero. Se realizó un análisis fisicoquímico del sustrato de ambos tratamientos. Durante el período de crecimiento de las plantas se evaluaron las siguientes variables: altura de parte aérea, cantidad de vástagos y hojas, cada 15 días. Los valores de área foliar, producción de rizomas, raíces tuberosas y absorbentes, peso seco y peso fresco de partes aéreas y subterráneas, se determinaron al finalizar el ensayo. Se realizó el Test de Mann-Whitney para comparar las distribuciones de altura y número de vástagos, y cantidad de hojas promedios por vástago en cada momento de desarrollo evaluado. Se tomaron muestras de raicillas absorbentes a partir de las plantas de ambos tratamientos; se procesaron de acuerdo al protocolo de decoloración y tinción de Phillips y Hayman (1970) a fin de observar la colonización de micorrizas en sus tejidos. Posteriormente, se prepararon 2 muestras; una a partir de macetas con sustrato sin esterilizar, testigo (T<sub>0</sub>), y la otra (T<sub>1</sub>), a partir de macetas con sustrato esterilizado. El número esporas presente en las muestras de sustrato, se determinó siguiendo el protocolo de Gerdemann y Nicolson, 1963; se tomaron alícuotas de 50 g y se suspendieron en agua corriente en un bol; se agitaron manualmente y el sobrenadante se pasó por un juego de tamices con mallas de medidas: 2 mm, 60, 80 y

230 mallas/pulgada cuadrada. Las suspensiones de los tamizados se llevaron a un tubo de centrifuga en el cual se estableció el gradiente de concentración compuesto por 25 ml de la suspensión y 25 ml de una solución de sacarosa estéril al 60%. Los tubos se centrifugaron y de la interfase agua-sacarosa se extrajeron con pipeta Pasteur las esporas; se resuspendieron en placa de Petri con agua corriente, se observaron al microscopio óptico, se colectaron con micropipeta y se llevaron a cubreobjetos, en solución de PVLG (alcohol polivinílico en lactoglicerol) y en una solución con reactivo de Melzer (PVLG más yodo). Las identificaciones se realizaron con claves específicas (Schenck y Pérez, 1987); se hicieron consultas al sitio web del INVAM y en antecedentes de otros investigadores (Brandán de Weht, 2013; Irrazábal *et al.*, 2005). El análisis fisicoquímico de los sustratos, mostró que en T<sub>1</sub>, la esterilización disminuyó la materia orgánica en un 57% y aumentó a más del doble el fósforo disponible; el pH tuvo un leve aumento, resultando neutro para el sustrato estéril, y ligeramente ácido para aquel no esterilizado. El número de vástagos fue la única variable en la que se detectó diferencias significativas para el T<sub>1</sub> respecto de T<sub>0</sub>, en todos los momentos evaluados. Sin embargo, se observaron valores de cantidad de hojas por vástago, peso fresco y seco de partes aéreas y subterráneas superiores en T<sub>1</sub>, con respecto a T<sub>0</sub> (Tabla 1). Las raicillas de T<sub>0</sub> presentaron un alto grado de colonización de hongos VA en la primera y segunda colección (72% y 86% respectivamente). También se detectó la presencia de hongos VA en las raicillas de T<sub>1</sub> en porcentajes menores (32 y 40 %). En las raicillas de ambos tratamientos, se observaron canales secretores de ácido kaurenico (Figura 1b), en menor cantidad en estado vegetativo y en gran cantidad en senescencia de las plantas; estos canales se hicieron más evidentes en las raíces a medida que avanzaba el ensayo. De la muestra T<sub>0</sub> se colectaron numerosas esporas y en menor cantidad esporocarpos; se las identificó como pertenecientes a los géneros *Scutellospora* (Figura 1d), *Acaulospora*, *Glomus* y *Pacispora*. Se determinaron 4 especies: *Acaulospora denticulata*, *Acaulospora spinosa*, *Scutellospora pellucida* y *Glomus clarum*. En T<sub>1</sub>, las suspensiones de los tamices con mallas de mayor tamaño eviden-

ciaron la presencia de 2 esporocarpos (Figura 1c); el resto de las esporas se encontraban muertas, producto del tratamiento de esterilización y por el ataque de nemátodos.



**Figura 1.** (a) Plantas crecidas en  $T_0$  (flecha delgada) y  $T_1$  (flecha gruesa), a los 70 días de cultivo. (b) Canales de ácido kaurenoico visibles en una raicilla, a los 202 días. (c) Esporocarpo obtenido a partir de  $T_1$ . Son visibles sus esporas vivas (círculos negros). (d) *Scutellospora* sp. viva de  $T_0$  en la que se observa la hifa suspensora bulbosa (círculo negro).

La esterilización altera la disponibilidad de nutrientes del suelo para las plantas; algunos autores comprobaron aumentos de fósforo y nitrógeno disponibles (López y Barbaro, 1988); ello lleva a un mayor desarrollo de los vegetales cultivados (Jakobsen, 1984; Covacevich y Echeverría, 2003). Resultados semejantes se obtuvieron en este experimento, respecto al aumento en el fósforo disponible. A pesar del mayor crecimiento de parte aérea de las plantas crecidas en  $T_1$  (Fig. 1.a), éstas no experimentaron tuberización, resultado que sugiere que invirtieron más recursos en generar raicillas absorbentes en comparación con las plantas en  $T_0$ , debido a su mayor abundancia. Los porcentajes de colonización observados en las raicillas de  $T_0$  fueron similares a los obtenidos por Mercado *et al.* (2013); por el contrario, para las de  $T_1$ , los porcentajes fueron menores. Estos resultados podrían indicar una esterilización insuficiente del sustrato utilizado, o una asociación simbiótica presente en los rizomas de yacón, según lo descrito por Brundrett, 2002 y Duckett y Ligrone, 2006. El descenso en los porcentajes de colonización micorrícica en senescencia, observados en  $T_0$  y  $T_1$ , coincidió con un aumento en la notoriedad de los canales secretores de ácido kaurenoico, por lo que se deduce las giberelinas influyeron en la disminución de la colonización por micorrizas vesículo arbusculares, en coincidencia con Foo *et al.*, 2013. El proceso de extracción de esporas del suelo tratado con el

método físico, reveló un remanente muy pequeño de hongos formadores de micorrizas vesículo arbusculares, correspondientes a esporas de gran tamaño. Es conocido que la resistencia térmica de estas estructuras aumenta en forma paralela a las dimensiones de las mismas; a partir de los tamizados de mallas pequeñas no se pudo aislar ninguna espора, por lo que se deduce que las primeras podrían haber sobrevivido a las condiciones de esterilización empleadas en este estudio (120°C, 30 minutos). Los resultados obtenidos y las consideraciones anteriormente realizadas permiten realizar las siguientes conclusiones: 1. La esterilización promovió la disponibilidad de nutrientes del suelo que aparentemente permitieron el mayor desarrollo de las yemas del rizoma de origen, en detrimento de la micorrización. 2. El descenso de los porcentajes de colonización observado en la última toma de muestra de raicillas se estima que se debe a la producción de giberelinas, cuyos niveles endógenos podrían ser superiores en las plantas que presentaron en mayor cantidad los canales secretores de ácido kaurenoico, su precursor. 3. La carencia de raíces tuberosas se infiere que se debe a la eliminación de la microflora autóctona del suelo interviniente en la transformación y solubilización de nutrientes, importantes en la nutrición de la planta y su translocación para la tuberización. 4. La sobreproducción de raicillas fibrosas garantizaría la sobrevivencia de la planta en la condición de estrés impuesta.

### Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por los Proyectos PICT 2011 N° 1781 y CIUNT 26/A 403.

### Referencias bibliográficas

- Blanco F.A., Salas, E.A. (1997). Micorrizas en la agricultura: contexto mundial e investigación realizada en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. 21 (1): 55-67.
- Brandán de Weht, C.I. (2013). Estudio de micorrizas en zonas disturbadas, no disturbadas y en recuperación, en el Parque Biológico Sierra de San Javier (PSSJ), Tucumán, Argentina. Tesis de doctorado. ISBN 978-950-554-797-5. FAZ, UNT: 117 p.
- Brundrett M.C. (2002). Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytol.* 154: 275-304.
- Centro Internacional de la Papa (CIP). División de Manejo Integrado de Cultivos. (2008). Alternativas al uso del bromuro de metilo en la producción de semilla de papa de calidad. Lima, Perú. 53 p. Documento de Trabajo 2007-2.
- Coll Aráoz M.V. (2011). "Variabilidad interespecifici-

- ca de lactonas sesquiterpénicas en el género *Smalanthus*. Composición y estudios morfoanatómicos de las raíces almacenadoras. Tesis doctoral. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia.
- Covacevich F., Echeverría H.E. (2003). Utilización de formaldehído para la erradicación de hongos micorrízicos arbusculares de muestras de suelo. *Ciencia del Suelo*. 21 (1): 9-17.
- De Souza F.A., Da Silva I.C.L., Barbara R.L.L. (2008). Fungos micorrízicos arbusculares: muito mais diversos do que se imaginava. *Biodiversidade do Solo em Ecossistemas Brasileiros*. UFLA, Lavras, 483-536.
- Duckett J.G., Ligrone R. (2006). A comparative cytological analysis of fungal endophytes in the sporophyte rhizomes and vascularized gametophytes of *Tmesipteris* and *Psilotum*. *Canadian Journal of Botany*. 83(11): 1443-1456.
- Foo E., Ross J.J., Jones W.T., Reidi J.B. (2013). Plant hormones in arbuscular mycorrhizal symbioses: an emerging role for gibberellins. *Annals of Botany*. 111: 769-779.
- Frioni L. (2006). Introducción a la Microbiología. En "Microbiología: básica, ambiental y agrícola. Lillian Frioni (Ed.). Ed. Facultad de Agronomía, Universidad de la república, Montevideo, Uruguay. pp. 11-18.
- Gerdemann J.W., Nicolson T.H. (1963). Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Brit. Myc. Soc.* 46: 235-244.
- Ghisalberti E.L. (1997). The biological activity of naturally occurring kaurane diterpenes. *Fitoterapia*. 68: 303-325.
- Irrazábal G., Schalamunk S., Velázquez M.S., Cabello M. (2005). Especies de hongos formadores de micorrizas arbusculares: nuevas citas para la República Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 40:1-2.
- Jakobsen I. (1984). Mycorrhiza infectivity of soils eliminated by low doses of ionizing radiation. *Soil Biol. Biochem.* 16: 282-282.
- López S.C., Barbaro N.O. (1988). Efecto de la irradiación y el autoclavado sobre el fósforo extractable e intercambiable de los suelos. *Ciencia Del Suelo*. 6 (2): 159-161.
- Mercado M.I., Coll Aráoz M.V., Brandán de Weht C.I., Ponessa G.I., Grau A. (2013). Arbuscular mycorrhizal Associations and dark septate endophytes in yacon (*Smalanthus sonchifolius*) and a wild relative (*Smalanthus macroscyphus*). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 48 (2): 193-200.
- Paul N.D., Ayres P.G., Wyness L.E. (1989). On the use of fungicides for experimentation in natural vegetation. *Funct. Ecol.* 3: 79-769.
- Phillips J.M., Hayman D.S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158-161
- Schenck N.C., Pérez Y. (1987). Manual for the Identification of VA Mycorrhizal Fungi, 3rd Edtn., Synergistic Publications, P.O. Bo. 90066, Gainesville, Florida, USA, p 245. [www.ivam.wvu.edu](http://www.ivam.wvu.edu)