




DETECCIÓN DE HONGOS MICORRÍDICOS ARBUSCULARES EN LA HOJARASCA DE DISTINTAS ESPECIES ARBÓREAS: EVALUACIÓN DE TRES TÉCNICAS DE CLARIFICACIÓN

DETECTION OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI IN THE LITTER OF DIFFERENT TREE SPECIES: REVIEW OF THREE CLARIFICATION TECHNIQUES

Sofía Crescio^{1*}, Alicia M. Godeas^{1,2} & Vanesa Analía Silvani^{1,2}

1. Laboratorio de Microbiología del Suelo, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Argentina


2. Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada, UBA-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Argentina

*sofiacrescio.r@gmail.com

Citar este artículo

CRESCIO, S., A. M. GODEAS & V. A. SILVANI. 2023. Detección de hongos micorrízicos arbusculares en la hojarasca de distintas especies arbóreas: evaluación de tres técnicas de clarificación. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 58(2):1-10. Versión en línea.

DOI: <https://doi.org/10.31055/1851.2372.v58.n2.37810>

Recibido: 31 May 2022
Aceptado: 25 Ene 2023
Publicado en línea: 31 Mar 2023
Editora: María Victoria Vignale

ISSN versión impresa 0373-580X
ISSN versión on-line 1851-2372

SUMMARY

Background and aims: Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are obligate symbionts with plant roots, and they colonize the surrounding soil and leaf litter. A unique clarification technique has been used for studying AMF in decomposing leaves, but it is not optimal for all types. This study aimed to evaluate and adjust three clearing techniques on leaf litter of diverse plant species for the detection of AMF structures.

M&M: We collected leaf litter of *Quercus robur*, *Tipuana tipu*, *Ulmus minor*, *Fraxinus pennsylvanica*, *Platanus acerifolia*, *Laurus nobilis*, *Populus alba* and *Melia azedarach* from soil surface of two parks in Buenos Aires (Argentina). Also, we inoculated leaf litter of *F. pennsylvanica* with *Rhizoglyphus intraradices* in a pot culture under semi-controlled conditions. Three clarification techniques were tested: the “5-5-5 staining technique” by Arambarri (2018), the root clarification technique by Phillips & Hayman (1970), and Peterson *et al.* (2008). The time and temperature to reagent exposure were adjusted according to each decomposing leaf.

Results: The clarification technique of Peterson *et al.* (2008) was the most appropriate for all the tested leaf litters. An effective clarification, conservation of leaf structure and visualization of extraradical spores and mycelia of AMF was achieved.

Conclusions: The selection of the appropriate technique greatly depends on the quality and composition of leaf litter. By the optimization of Peterson *et al.* (2008) technique, we were able to detect structures of AMF on decomposing leaves of *F. pennsylvanica* and *T. tipu*.

KEY WORDS

Arbuscular mycorrhizal fungi, clarification techniques, fungal structures, histochemistry, leaf litter.

RESUMEN

Introducción y objetivos: Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son simbioses obligados de las raíces de las plantas y se desarrollan en el suelo y hojarasca. Hasta el momento, se ha empleado una única técnica de clarificación en hojarasca para el estudio de los HMA, pero, es necesario analizar otras metodologías de acuerdo con las diferencias anatómicas y bioquímicas de las hojas. En este trabajo se evaluaron y ajustaron tres técnicas de clarificación en hojarasca de distintas especies arbóreas para la detección de HMA.

M&M: Se recolectó hojarasca de *Quercus robur*, *Tipuana tipu*, *Ulmus minor*, *Fraxinus pennsylvanica*, *Platanus acerifolia*, *Laurus nobilis*, *Populus alba* and *Melia azedarach* de la superficie del suelo en dos parques de la ciudad de Buenos Aires. Además, se inoculó hojarasca de *F. pennsylvanica* con *Rhizoglyphus intraradices* en un cultivo bajo condiciones semicontroladas. Se evaluaron tres técnicas de clarificación: “5 – 5 – 5” de Arambarri (2018), Phillips & Hayman (1970) y Peterson *et al.* (2008), y se ajustaron modificando la duración y temperatura de exposición a los reactivos.

Resultados: La técnica de clarificación propuesta por Peterson *et al.* (2008) fue la más apropiada para todas las hojarascas evaluadas. Se obtuvo una eficaz clarificación, conservación de la estructura foliar y visualización de esporas e hifas de HMA.

Conclusión: La selección adecuada de la técnica depende de la calidad de la hojarasca. La optimización del método de Peterson *et al.* (2008) permitió detectar estructuras de HMA en la hojarasca de *F. pennsylvanica* y *T. tipu*.

PALABRAS CLAVE

Clarificación, estructuras fúngicas, histoquímica, hojarasca, hongos micorrízicos arbusculares.

INTRODUCCIÓN

Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) pertenecientes al Phylum Glomeromycota, establecen asociaciones simbióticas mutualistas con las raíces de la mayoría de las plantas (Smith & Read, 2008; Valdés *et al.*, 2020). En esta simbiosis, el hongo recibe fotosintatos para su crecimiento y propagación, y la planta obtiene una mejora en la absorción de nutrientes (principalmente P y N) y una mayor tolerancia frente a distintos tipos de estrés biótico y abiótico (Smith & Read, 2008).

Los HMA no sólo se desarrollan en el suelo y en las raíces de las plantas hospedantes, sino que también, se ha detectado micelio y esporas extra-radicales en hojarasca de diversos ecosistemas naturales y agrícolas (Bunn *et al.*, 2019; Díaz Ariza *et al.*, 2021). Su función en la hojarasca aún no ha sido esclarecida (Bunn *et al.*, 2019), ya que son incapaces de descomponer materia orgánica (MO) por carecer de enzimas líticas (Tisserant *et al.*, 2011; Kobayashi *et al.*, 2018). Sin embargo, los HMA cumplen una función indirecta en la descomposición de la MO tras favorecer la promoción del crecimiento de microorganismos descomponedores asociados a sus hifas (Churchland & Grayston, 2014; Linlin *et al.*, 2019; Mei *et al.*, 2022). En los últimos años ha crecido el interés por el estudio de los HMA presentes en la hojarasca de distintas especies vegetales y en diversos ambientes, con el fin de comprender su rol en los ciclos biogeoquímicos de nutrientes, en particular, en el subciclo del carbono del suelo y su efecto sobre el cambio climático (Gougoulias *et al.*, 2014).

En el campo de la histología vegetal existen varios métodos de clarificación de hojas con un mismo objetivo: la eliminación del contenido celular y la facilitación de la observación de los tejidos. Estos métodos de clarificación, seguidos de tinción, han permitido el estudio de la epidermis foliar, el tejido parenquimático, la presencia de estructuras de secreción, y la disposición de los haces vasculares de las hojas (Peterson *et al.*, 2008; Arambarri, 2018). La selección del método de clarificación suele depender de la pigmentación, del grosor de la hoja y de las estructuras a preservar (Peterson *et al.*, 2008).

Una de las técnicas más utilizadas para la detección de endófitos fúngicos en raíces y la observación de las estructuras extra-radicales de

HMA desarrolladas en la hojarasca, es la técnica de clarificación y tinción descrita por Phillips & Hayman (1970) (Aristizábal *et al.*, 2004; Bunn *et al.*, 2019; Díaz Ariza *et al.*, 2021). Esta técnica se basa en la inmersión del material vegetal en una solución alcalina a alta temperatura para el vaciamiento del contenido celular, con una posterior acidificación y coloración con azul de tripán. Sin embargo, esta metodología no resulta adecuada para todos los tipos de hojarasca debido a la gran diversidad anatómica y bioquímica que posee este material. En el presente trabajo se evaluaron y ajustaron tres técnicas de clarificación, con su posterior tinción, en hojarasca de ocho especies arbóreas, con el objetivo de determinar el método más apropiado que logre un adecuado vaciamiento de las células y conservación de los tejidos foliares, y de esta manera, poder detectar estructuras extra-radicales de los HMA desarrolladas en los distintos tipos de hojarasca.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

En el otoño e invierno del año 2020 en el parque de Ciudad Universitaria de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina), se recolectó hojarasca ubicada sobre la superficie y en contacto directo con el suelo, y cercana al tronco de las siguientes especies de árboles: *Tipuana tipu* (Benth.) Kuntze, *Fraxinus pennsylvanica* Marshall., *Ulmus minor* Mill., *Platanus acerifolia* (Aiton) Willd., *Laurus nobilis* L., *Populus alba* L., *Melia azedarach* L. y *Quercus robur* L.). Por otro lado, se recolectó únicamente hojarasca de *F. pennsylvanica* en el Parque Tres de Febrero (Bosques de Palermo, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina) para su inoculación con el hongo *Rhizoglyphus intraradices* (N.C. Schenck & G.S. Sm.) Sieverd., G.A. Silva & Oehl asociado a *Medicago sativa* L. (alfalfa) creciendo en condiciones controladas de invernadero. Esto nos permitió obtener hojarasca con estructuras extra-radicales del HMA que fue utilizada en la evaluación de las distintas técnicas. Toda la hojarasca recolectada se secó a temperatura ambiente (aprox. 25 °C) por 5 días, y se conservó en condiciones de oscuridad hasta su procesamiento.

Para la inoculación de la hojarasca de *F. pennsylvanica*, se sembró una semilla germinada de *M. sativa* en una maceta (12 cm de diámetro) conteniendo sustrato estéril (perlita:vermiculita:suelo tinalizado, v/v/v, 2:1:1), la cual fue inoculada con 5 g de inóculo general de la especie *R. intraradices* cepa GA5 (provista por el Banco de Glomeromycota *in vitro*, BGIV, <https://bgiv.com.ar/>, FCEN, UBA). Luego de 40 días, en cada maceta se colocaron tres bolsitas de malla plástica de 6 cm² y de 1 mm de porosidad, lo que permitió el paso del micelio y la exclusión de las raíces. Cada bolsita conteniendo 0,5 g de hojarasca de *F. pennsylvanica* (equivalente a 2-3 hojas) fue ubicada dentro del sustrato, distanciadas entre sí y a aproximadamente a 5 cm del tallo de la planta. Se realizaron cuatro cultivos que se mantuvieron durante 4 meses en condiciones de invernadero bajo luz natural, humedad y temperatura semicontrolada. Transcurrido ese período, se recogieron las bolsitas, se eliminaron las partículas del sustrato adheridas a ella con la ayuda de un pincel, y se separó la hojarasca, la cual fue secada al aire a temperatura ambiente (aprox. 25 °C) para ser posteriormente clarificada y teñida.

Procesamiento de la hojarasca

Cada hojarasca se colocó en placas de Petri de vidrio (9 cm de diámetro), evitando su superposición y asegurando el contacto directo con las soluciones. De acuerdo con el tamaño, se colocaron dos a tres hojas por placa de Petri de *T. tipu*, *U. minor*, *M. azedarach* y *F. pennsylvanica*, mientras que para *P. acerifolia*, *P. alba*, *L. nobilis* y *Q. robur* solo se colocó una hoja por caja de Petri. Por técnica y especie vegetal se realizaron tres réplicas, y en todos los casos se eligieron hojas enteras que presentaban un estado de descomposición similar.

Técnica modificada de Phillips & Hayman (1970) para hojarasca

Cada hojarasca se sumergió en una solución de hidróxido de potasio (KOH 10%, p/v) durante 48 a 72 hs a temperatura ambiente (aprox. 25 °C) ó a 90 °C (sin llegar a ebullición) por 30 a 90 min. El estado del material fue controlado cada 15 min en el tratamiento con calor, y cada 24 hs en el de temperatura ambiente. Luego, las hojas fueron lavadas tres veces con agua destilada, y se transfirieron a otra caja de Petri con una solución

de ácido clorhídrico (HCl 0,1 N; v/v) por 20 min a temperatura ambiente (aprox. 25 °C). Por último, se realizó un lavado con agua destilada, y se sumergió en una solución de Azul de Tripán en ácido láctico 0,05% (p/v) por 16 a 20 hs a temperatura ambiente (aprox. 25 °C) (Fig.1A). El exceso de colorante se eliminó mediante varios lavados con agua destilada, y se conservó el material teñido en agua destilada a 25 °C en oscuridad hasta su observación bajo lupa binocular (Fig. 1A).

Técnica 5 - 5 - 5 de Arambarri (2018)

Se fijó el material en una solución de etanol 50% (v/v) durante 7 días en oscuridad, y luego se lavó con agua destilada. Posteriormente, la hojarasca fue sumergida en una solución de hidróxido de sodio e hipoclorito de sodio (NaOH 5%:NaClO 5%; 1:1; v/v) durante 90 min para su clarificación, controlando cada 15 min que no se degraden los tejidos (Fig. 1B). En aquellos casos que no se alcanzó la clarificación, se dejó la hojarasca en la misma solución controlando diariamente. Se lavó en agua destilada, y aquella hojarasca que requirió blanqueamiento fue colocada en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO 50%, v/v) durante 10 a 15 min para completar su decoloración. Por último, se sumergió en una solución de hidrato de cloral (5%, p/v) por 1 h en oscuridad, y se lavó con agua destilada. La tinción se realizó con la solución de Azul de Tripán (0,05% p/v) durante 48 hs, y se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de colorante. Todos los pasos de esta técnica se realizaron a temperatura ambiente (aprox. 25 °C). El material teñido fue conservado en agua destilada a 25°C en oscuridad hasta su observación bajo lupa binocular (Fig. 1B).

Técnica de Peterson et al. (2008)

La hojarasca se fijó con una solución de Carnoy modificada (ácido acético glacial:etanol 95%, 1:3, v/v) a temperatura ambiente durante 5 días. Luego, el material vegetal se separó en dos grupos, los cuales recibieron un tratamiento de clarificación alcalina o ácida para evaluar la respuesta de los tejidos. En el tratamiento ácido, cada hojarasca se sumergió en una solución de ácido láctico 85% (v/v) durante 6 días a temperatura ambiente ó a 90 °C por 30 a 40 min; y en el tratamiento alcalino, se utilizó una solución de NaOH 5% (p/v) durante 24 hs a temperatura ambiente (Fig. 1C).

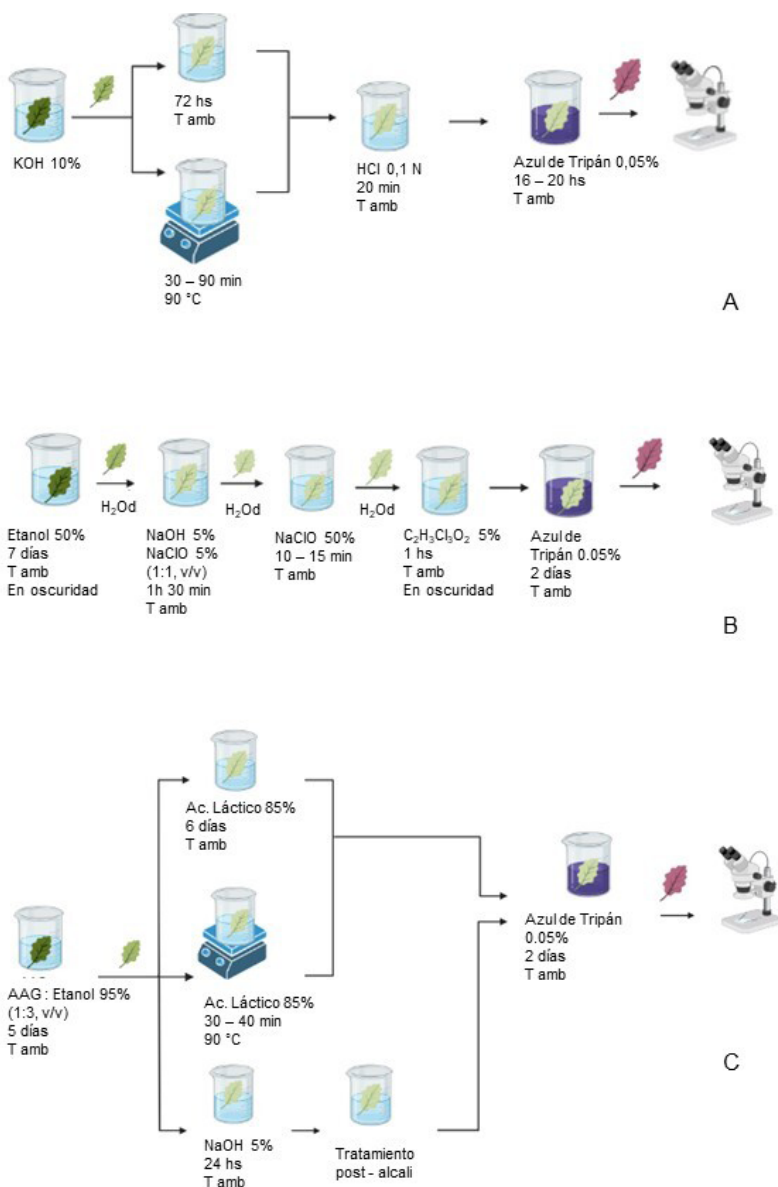


Fig. 1. A: Método de clarificación modificado de Phillips & Hayman (1970). **B:** Método modificado “5 - 5 - 5” de Arambarri (2018). **C:** Método de Peterson *et al.* (2008).

A la hojarasca tratada con NaOH 5% (p/v) que formó precipitados de compuestos fenólicos, se le realizó un tratamiento post-álcali (Gardner, 1975), lavándola sucesivamente en agua destilada a 90 °C, etanol 70% (v/v) a 70 °C, y por último, en etanol 96% (v/v) a 72 °C, entre 5 a 10 min por lavado, hasta observar la desaparición de los precipitados

oscuros. Para la observación de estructuras fúngicas, la hojarasca se tiñó con la solución de Azul de Tripán (0,05% p/v) a temperatura ambiente por 48 hs, y luego se lavó con agua destilada. La hojarasca teñida se conservó en agua destilada a 25 °C y en oscuridad hasta su observación bajo lupa binocular (Fig. 1C).

Estimación de la frecuencia e intensidad de HMA

Para estimar la frecuencia e intensidad de la presencia de HMA en la hojarasca recolectada y en la de *F. pennsylvanica* expuesta a *R. intraradices*, se utilizó la técnica de Plenchette & Morel (1996) que fue adaptada para este material. En un portaobjetos se montaron 30 segmentos de hoja de 5 mm² seleccionados al azar y en grupos de a 10, los cuales se examinaron bajo microscopio a un aumento de 200X. La frecuencia (% F) de presencia de estructuras de HMA se calculó como el porcentaje de segmentos que contenían hifas y esporas extra-radicales de HMA respecto al total. La intensidad de la presencia de HMA (% I) fue calculada como la abundancia de estructuras extra-radicales de HMA en cada segmento usando distintas clases de intensidad (v: 1-20%; w: 21-40%; x: 41-60%; y: 61-80%; z: 81-100%), y el resultado expresado utilizando la siguiente fórmula matemática: $%I = (10v + 30w + 50x + 70y + 90z) / (v + w + x + y + z)$, donde v, w, x, y, z son el número de segmentos de hojarasca de cada clase.

RESULTADOS

Técnica modificada de Phillips & Hayman (1970) para hojarasca

Fijación: La técnica propone fijar el tejido con una solución de FAA (200 ml 50% etanol, 5 ml de ácido acético y 13 ml formaldehído), pero esto no se realizó dado que la hojarasca fijada se desintegró durante el proceso de clarificación.

Clarificación: La duración del tratamiento y la temperatura de inmersión en álcali (KOH 10%) fueron las dos variables controladas para conservar la estructura del material. El calentamiento propuesto por Phillips & Hayman (1970) aceleró el proceso pero deterioró todos los tipos de hojarasca, mientras que a temperatura ambiente se obtuvo una mejor clarificación en todas las muestras. Sin embargo, las características de la hoja de cada especie fueron determinantes en la duración del tratamiento. En las hojas de *T. tipu*, *M. azedarach* y *F. pennsylvanica* se logró el vaciamiento del contenido celular tras ser expuesta a KOH 10% por 72 hs a temperatura ambiente, aunque el tejido quedó debilitado y quebradizo. La hojarasca de *T. tipu*, a diferencia de *F. pennsylvanica* y *M. azedarach*, comenzó a clarificarse a los 5 minutos, sin embargo, se observó un oscurecimiento alrededor de la nervadura media

que bajo esta metodología no logró eliminarse. Para lograr una clarificación completa y la conservación de los tejidos en la hojarasca de *P. alba*, *L. nobilis* (Fig. 2A), *Q. robur* (Fig. 2B), *P. acerifolia* y *U. minor* fue necesario dejarlas en KOH 10% por 72 hs a temperatura ambiente. Por el contrario, el tratamiento con calor aceleró el proceso de clarificación aunque se observó degradación de la hojarasca, variando el efecto según la especie. En particular, la hojarasca de *L. nobilis* mantuvo mejor su estado de conservación, y en *P. acerifolia* se observó un oscurecimiento del tejido, que luego de 30 min comenzó a clarificarse, siendo necesario dejarla por 90 min más para completar el proceso. La hojarasca de *P. acerifolia*, *Q. robur*, *L. nobilis* y *U. minor* requirió un recambio de la solución alcalina pasados los primeros 30 min de calentamiento debido al oscurecimiento de la solución.

Etapas previas a la tinción: La acidificación del material durante 20 min a temperatura ambiente no alteró la estructura original de las hojarascas evaluadas (Fig. 2B), y fue necesaria para el proceso de tinción.

Técnica modificada "5-5-5" de Arambarri (2018)

Fijación: La fijación del tejido en etanol 50% durante 7 días mejoró la preservación del material y la extracción de los componentes solubles.

Clarificación: La duración del tratamiento con NaOH 5%:NaClO 5% fue variable dependiendo del tipo de hojarasca. La hojarasca de *T. tipu* comenzó a clarificarse luego de 60 min, mientras que la de *M. azedarach* lo hizo después 90 min. Este procedimiento fue muy agresivo para la hojarasca de *F. pennsylvanica* (Fig. 2C), la cual se fragmentó y perdió su integridad tras 7 días de tratamiento. En cambio, para la hojarasca de *U. minor*, *P. acerifolia*, *P. alba*, *Q. robur* y *L. nobilis* la clarificación duró 7 días en la misma solución (Fig. 2D-F).

Blanqueamiento: La hojarasca de *Q. robur* y *P. acerifolia* no se decoloró completamente, por lo que requirió un blanqueamiento con NaClO 50% durante 10 a 15 min. Luego del lavado con agua destilada e inmersión en hidrato de cloral 5% durante 1 h se clarificaron por completo, aunque se observó ablandamiento y fragmentación de los tejidos bajo este procedimiento.

Técnica de Peterson et al. (2008)

Fijación: No se observó degradación del material tras

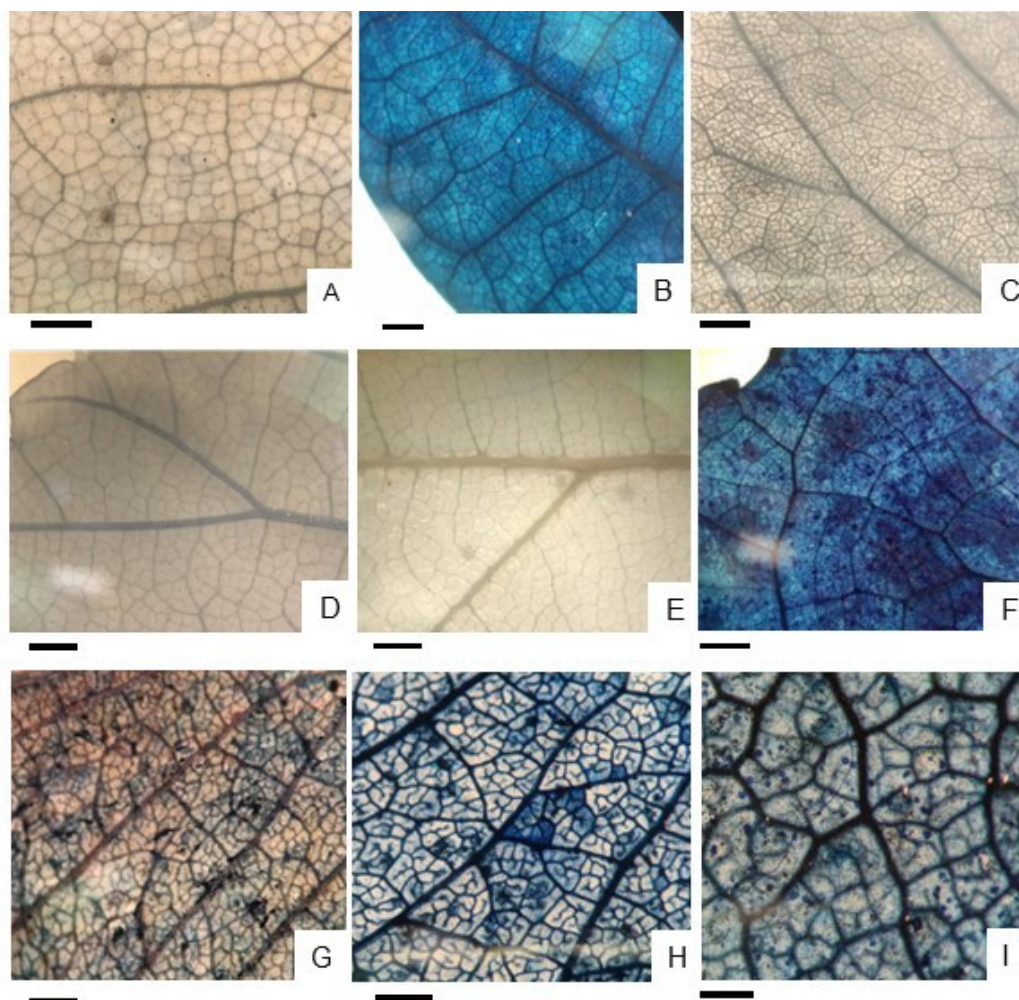


Fig. 2. Fragmentos de hojarasca tratada bajo los distintos métodos de clarificación. **A-B** según Phillips & Hayman (1970). **A:** Detalle de *Laurus nobilis* clarificado. **B:** Detalle de *Quercus robur* clarificado y teñido. **C-F** según Arambarri (2018). **C:** Detalle de *Fraxinus pennsylvanica* clarificado. **D:** *Ulmus minor* clarificado. **E:** Detalle de *Platanus acerifolia* luego de clarificación. **F:** Detalle de *Populus alba*. **G-H-I:** según Peterson *et al.* (2008). **G:** Detalle de *Tipuana tipu* bajo tratamiento ácido y teñida con azul de tripan 0,05%. **H:** Detalle de *T. tipu* tratada con NaOH 5% y teñida con azul de tripan 0,05%. **I:** Aspecto general de hojarasca de *F. pennsylvanica* bajo clarificación alcalina y teñida. Escalas= A-I: 0,5 mm.

la fijación con la solución de Carnoy durante 5 días a temperatura ambiente (25 °C).

Clarificación: En ambos tratamientos ensayados (alcalino y ácido), todos los tipos de hojarasca se clarificaron al ajustar el tiempo y la temperatura de exposición a los reactivos. Para la hojarasca de *F. pennsylvanica*, *T. tipu* (Fig. 2G) y *M. azedarach*, se logró la clarificación en medio ácido después de 24 hs a temperatura ambiente, mientras que

el tratamiento con calor (90 °C) resultó ser muy agresivo para los tejidos. En cambio, la clarificación alcalina a temperatura ambiente resultó ser la más adecuada para este tipo de material, dado que se pudo eliminar todos los precipitados fenólicos oscuros (Fig. 2H-I). Para la hojarasca de *Q. robur*, *U. minor*, *P. acerifolia*, *L. nobilis* y *P. alba*, ambos métodos de clarificación (ácida y alcalina) fueron óptimos a temperatura ambiente y no se observaron

alteraciones de los tejidos. La duración de la clarificación ácida pudo reducirse a 40 min cuando se sometió a 90 °C.

Etapa previa a la tinción: La solución de NaOH 5% formó precipitados fenólicos oscuros en la hojarasca de *F. pennsylvanica* y *T. tipu*, por lo que fue necesario su eliminación con sucesivos lavados con agua destilada (90 °C), etanol 70% (70 °C) y etanol 96% (72 °C). Este procedimiento no perjudicó al tejido de la hojarasca de dichas

especies (Fig. 2 H-I). En cambio, el tratamiento con ácido láctico evitó la formación de los precipitados fenólicos, pero resultó ser más agresivo para la hojarasca.

Tinción y visualización de estructuras de HMA

En las tres metodologías ensayadas se usó el colorante azul de tripán 0,05%, el cual coloreó eficazmente las paredes celulares del tejido foliar y las estructuras fúngicas halladas en la hojarasca (Fig. 3).

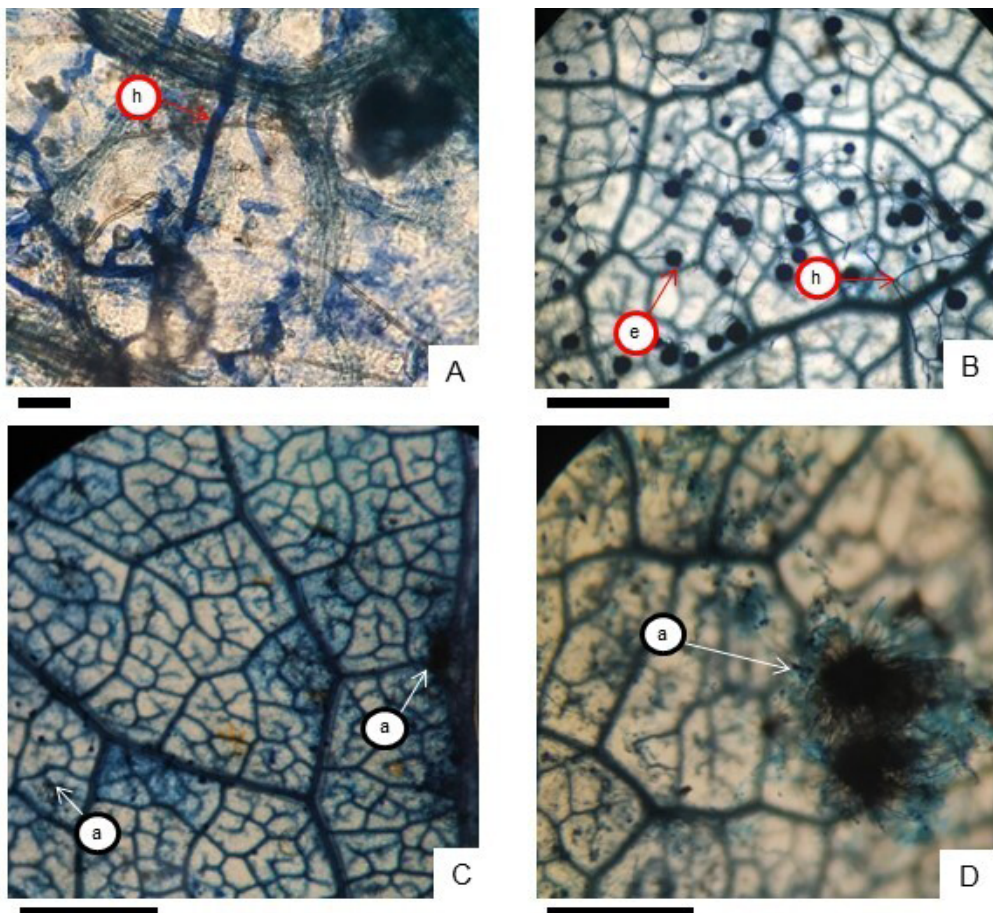


Fig. 3. Detección de estructuras fúngicas en la hojarasca. **A:** Hifas extra-radicales de HMA sobre hojarasca recolectada de *Tipuana tipu*, previamente clarificada con el método modificado de Phillips & Hayman (1970) y teñida con azul de tripán 0,05%. **B:** Hifas y esporas extra-radicales de *Rhizoglyphus intraradices* desarrolladas en hojarasca de *Fraxinus pennsylvanica* previamente clarificada con el método de Peterson *et al.* (2008) y teñida con azul de tripán 0,05%. **C:** Vista general de estructuras de hongos pertenecientes a los ascomycetes sobre hojarasca clarificada de *T. tipu* según Peterson *et al.*, (2008). **D:** Detalle de estructuras de hongos del grupo de los ascomycetes sobre hojarasca de *F. pennsylvanica* previamente clarificada con el método de Peterson *et al.*, (2008). Abreviaturas= h: hifas de HMA; e: esporas de HMA; a: estructura de hongos Ascomycota. Escalas= A-D: 0,5 mm.

Las paredes hifales permanecieron intactas luego de la clarificación y tinción bajo todos los tratamientos.

Únicamente en una hoja recolectada de *T. tipu* se observaron hifas extra-radicales de HMA, ocupando menos del 10 % de la superficie del tejido (Fig. 3A), mientras que el $22,5 \pm 16,9$ % (media \pm desvío estándar) de la hojarasca de *F. pennsylvanica* inoculada con *R. intraradices*, presentaba micelio y esporas formadas a partir de ramificaciones hifales (Fig. 3B), con una intensidad de colonización del $30,3 \pm 16,8$ %. Por otro lado, en las hojarascas de *T. tipu* (Fig. 3C), *F. pennsylvanica* (Fig. 3D), *P. acerifolia*, *P. alba*, *U. minor*, *Q. robur*, *L. nobilis*, y *M. azedarach* se detectaron numerosas hifas delgadas y tabicadas, y otras estructuras de hongos saprobios y/o fitopatógenos pertenecientes al grupo de los ascomycetes. Los HMA en la hojarasca se diferenciaron del resto de los hongos por sus hifas cenocíticas de mayor grosor, la arquitectura del micelio y el patrón de esporulación, en el caso de la hojarasca de *F. pennsylvanica* en contacto con *R. intraradices* (Fig. 2I; 3A-B).

En cuanto a la conservación del material, la hojarasca clarificada y teñida bajo el método de Peterson *et al.* (2008) pudo mantenerse en agua destilada hasta por lo menos 16 semanas bajo condiciones de oscuridad y temperatura ambiente, sin observar modificaciones en su estructura y manteniendo la coloración.

DISCUSIÓN

Los estudios que analizan la presencia de HMA en hojarasca han utilizado el método de clarificación y tinción de Phillips & Hayman (1970), propuesto para la detección de estructuras de HMA en raíces de plantas hospedantes (Aristizábal *et al.*, 2004; Bunn *et al.*, 2019; Díaz Ariza *et al.*, 2021). Sin embargo, este método puede no ser adecuado para todos los tipos de hojarasca dada la gran diversidad anatómica y bioquímica, y el estado de descomposición en que se hallan. Por lo que resulta necesario estudiar otras técnicas que logren una buena clarificación y conservación del material, con el fin de poder visualizar estructuras fúngicas en toda el área de la hojarasca bajo estudio. En el presente trabajo, se evaluaron tres técnicas de clarificación y tinción sobre hojarasca de ocho especies arbóreas: Phillips & Hayman (1970), “5 – 5 – 5” de Arambarri

(2018) y Peterson *et al.* (2008). Estos métodos se diferenciaron en los reactivos utilizados, la duración y las condiciones de temperatura a las cuales fue sometido el material en cada una de las etapas.

La técnica de Phillips & Hayman (1970) no resultó apropiada para aquella hojarasca de pocas capas de células, como la de *T. tipu*, *M. azedarach* y *F. pennsylvanica*, ya que se degradó su estructura, principalmente cuando eran expuestas a altas temperaturas. En cambio, para la hojarasca de *P. alba*, *P. acerifolia*, *U. minor*, *Q. robur* y *L. nobilis* se logró una buena clarificación a temperatura ambiente tras un mayor tiempo de exposición frente a los reactivos. Este tratamiento se redujo en calor aunque se observó una mayor degradación de los tejidos. Al aplicar la técnica “5-5-5” (Arambarri, 2018), la hojarasca de *F. pennsylvanica*, *T. tipu* y *M. azedarach* perdió su integridad al completar el proceso. Mientras que la hojarasca de *Q. robur*, *L. nobilis*, *P. acerifolia* y *P. alba* quedó bien clarificada, aunque el proceso de blanqueamiento comprometió gran parte de su estructura. Gardner (1975) menciona que el tratamiento con hidrato de cloral o con blanqueadores fuertes, como NaClO ó peróxido de hidrógeno, puede afectar al tejido ya que actúa sobre los componentes de celulosa y lignina. Por otra parte, la metodología de Peterson *et al.* (2008) fue la más conveniente para todos los tipos de hojarasca ensayadas, dado que permitió la clarificación completa del tejido. Sin embargo, la clarificación ácida y en calor resultó ser más agresiva que el tratamiento alcalino, por lo que se requiere de un mayor control sobre el tiempo de exposición. Por otro lado, el tratamiento alcalino conservó mejor la estructura vegetal, aunque en algunos casos se produjeron precipitados fenólicos oscuros que sólo pudieron eliminarse con un tratamiento de lavado *post-álcali*. En cuanto a la fijación del material, Gardner (1975) sugiere que la solución de etanol o Carnoy aceleran la clarificación, mientras que la fijación con FAA (propuesta por Phillips & Hayman, 1970) es perjudicial para el proceso, ya que la hojarasca en FAA resiste el tratamiento con KOH y daña la celulosa. Además, el formaldehído puede reaccionar con compuestos fenólicos de la hojarasca (como los taninos condensados), y formar polímeros oscuros que sólo pueden ser eliminados a través del blanqueamiento (aunque este proceso puede ser perjudicial para la integridad del tejido en algunas especies) (Gardner, 1975).

Nuestros resultados revelan que la anatomía y bioquímica foliar de cada especie arbórea son factores determinantes a tener en cuenta al seleccionar la técnica de clarificación. La mayoría de las hojas poseen una capa simple de células epidérmicas en su superficie adaxial y abaxial, pero las características de la cutícula ó el contenido de fenoles y pigmentos pueden variar e influir sobre la efectividad de cada método (Peterson *et al.*, 2008).

En cuanto a la presencia de HMA en la hojarasca recolectada de los parques urbanos, sólo se encontraron hifas de HMA en un ejemplar de hojarasca de *T. tipu*. La falta de estructuras de HMA en la hojarasca de estos ambientes urbanos podría deberse a la ausencia o baja densidad del micelio extra-radical de HMA cercano a la superficie del suelo, o por algún disturbio que evitó la colonización de la hojarasca por estos hongos, y no a causa del proceso de clarificación y tinción, ya que se observaron estructuras de otros grupos de hongos. En ambientes naturales (no urbanizados) y agroecosistemas que se han analizado hasta el momento, la colonización de la hojarasca por HMA suele ser más frecuente (Bunn *et al.*, 2019; Díaz Ariza *et al.*, 2021). El análisis del estado micorrícico de la vegetación y el estudio de las comunidades de HMA en estos parques podría brindar más información sobre la frecuencia e intensidad de colonización de la hojarasca. En cuanto a la hojarasca de *F. pennsylvanica* expuesta al micelio extra-radical de *R. intraradices* bajo condiciones controladas, alcanzó valores similares a los hallados en hojarasca colonizada por HMA de *Myrica parvifolia* Benth. (aprox. 37%) y *Coffea arabica* L. (aprox. 6 - 36%) (Aristizábal *et al.*, 2008; Díaz Ariza *et al.*, 2021). Las variaciones en la frecuencia e intensidad de colonización podrían ser atribuidas al tipo de hojarasca y su estado de descomposición, y a las especies de HMA que se encuentran en cada ecosistema (Bunn *et al.*, 2019; Chowdhury *et al.*, 2022), siendo necesario más estudios que analicen posibles preferencias de los HMA por el sustrato y su relación con el proceso de descomposición. A su vez, las técnicas evaluadas permitieron detectar eficientemente estructuras de otros hongos pertenecientes a los ascomycetes sobre la epidermis y el parénquima de la hojarasca de todas las especies arbóreas. Su abundante presencia resultó esperable dado que estos microorganismos son fitopatógenos y/o saprobios descomponedores del material vegetal (Cao *et al.*, 2022).

En conclusión, la metodología propuesta por Peterson *et al.* (2008) permitió una buena clarificación y conservación de las hojarasca evaluadas, y la observación de estructuras fúngicas. Sin embargo, es necesario adaptar la técnica según las características de la hojarasca en estudio teniendo en cuenta el número de capas de células, contenido de pigmentos, taninos y otros componentes de difícil remoción, así como también, su estado de descomposición.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

SC y VS diseñaron y realizaron la investigación. Todas las autoras han participado conjuntamente en la interpretación de los datos y redacción del manuscrito.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por UBACYT 20020170100142BA y el programa de Becas de Estímulo a las Vocaciones Científicas. Además, se agradece el aporte valioso de los revisores y la editora a cargo del boletín de la SAB.

BIBLIOGRAFÍA

- ARAMBARRI, A.M. 2018. La “técnica de clarificación 5-5-5”, un método natural para el tratamiento de material vegetal. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 53: 579-586. <http://dx.doi.org/10.31055/1851.2372.v53.n4.21980>.
- ARISTIZABAL, C., E.L. RIVERA & D.P. JANOS. 2004. Arbuscular mycorrhizal fungi colonize decomposing leaves of *Myrica parvifolia*, *M. pubescens* and *Paepalanthus* sp. *Mycorrhiza* 14: 221-228. <https://doi.org/10.1007/s00572-003-0259-0>
- BUNN, R.A., D.T. SIMPSON & L.S. BULLINGTON. 2019. Revisiting the ‘direct mineral cycling’ hypothesis: arbuscular mycorrhizal fungi colonize leaf litter, but why? *ISME J.* 13: 1891-1898. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0403-2>
- CAO, T., Y. CHENG, Y. FANG, X. KONG, J. YANG, H. ALHARBI, Y. KUZUYAKOV & X. TIAN. 2022. Synergy of saprotrophs with mycorrhiza for litter decomposition and hotspot formation depends on nutrient availability in the rhizosphere. *Geoderma*

- 410:115662.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2021.115662>
- CHOWDHURY, S., M. LANGE, A.A. MALIK, T. GOODALL, H. JIANBEI, R.I. GRIFFITHS & G. GLEIXNER. 2022. Plants with arbuscular mycorrhizal fungi efficiently acquire Nitrogen from substrate additions by shaping the decomposer community composition and their net plant carbon demand. *Plant Soil* 475: 473-490.
<https://doi.org/10.1007/s11104-022-05380-x>
- CHURCHLAND, C. & S. GRAYSTON. 2014. Specificity of plant-microbe interactions in the tree mycorrhizosphere biome and consequences for soil C cycling. *Front. Microbiol.* 5: 261.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00261>
- DÍAZ ARIZA, L.A., E.L. RIVERA & N. SÁNCHEZ. 2021. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in leaf litter and roots of shaded coffee plantations under organic and conventional management. *Rev. Bras. Cienc. Solo* 45: e0200110.
<https://doi.org/10.36783/18069657rbcs20200110>
- GARDNER, R.O. 1975. An overview of botanical clearing techniques. *Stain. Technol.* 50: 99-105.
<https://doi.org/10.3109/10520297509117042>
- GOUGOULIAS, C., J.M. CLARK & L.J. SHAW. 2014. The role of soil microbes in the global carbon cycle: tracking the below-ground microbial processing of plant-derived carbon for manipulating carbon dynamics in agricultural systems. *J. Sci. Food Agric.* 94: 2362-71. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6577>
- KOBAYASHI, Y., T. MAEDA, K. YAMAGUCHI, H. KAMEOKA, S. TANKA, T. EZAWA, S. SHIGENOBU M. & KAWAGUCHI. 2018. The genome of *Rhizophagus clarus* HR1 reveals a common genetic basis for auxotrophy among arbuscular mycorrhizal fungi. *BMC Genomics* 19: 465. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4853-0>
- LINLIN SHI, L., G.G.O. DOSSA, E. PAUDEL, H. ZANG, J. XU & RD. HARRISON. 2019. Changes in fungal communities across a forest disturbance gradient. *Appl. Environ. Microbiol.* 85: e00080-19.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00080-19>
- MEI, L., P. ZHANG, G. CUI, X. YANG, T. ZHANG & J. GUO. 2022. Arbuscular mycorrhizal fungi promote litter decomposition and alleviate nutrient limitations of soil microbes under warming and nitrogen application. *App. Soil. Ecol.* 171: 104318.
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104318>
- PETERSON, R.L., C.A. PETERSON & L.H. MELVILLE. 2008. *Teaching plant anatomy through creative laboratory exercises*. NRC ResPress. Ottawa, Ontario, Canada.
- PHILLIPS, J.M. & D.S. HAYMAN. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
[https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(70\)80110-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(70)80110-3)
- PLENCHETTE, C., & C. MOREL. 1996. External phosphorus requirement of mycorrhizal and non-mycorrhizal barley and soybean plants. *Biol. Fertil. Soils* 21: 303-308.
<https://doi.org/10.1007/BF00334907>
- SMITH, S.E., & D. READ. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd ed. Elsevier Ltd, London.
- TISSERANT, E., A. KHOLER, P. DOZOLME-SEDDAS, R. BALLESTRINI... & F. MARTIN. 2011. The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *New Phytol.* 193: 755-769.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03948.x>
- VALDÉS, F.E., C. ABARCA, R.P. COLOMBO & V.A. SILVANI. 2020. Capítulo 1: Introducción y generalidades. En: SAPARRAT M.C.N., M.F. RUSCITTI & M.C. ARANGO (eds.). *Micorrizas arbusculares: Biología y aplicaciones en el sector agroforestal*. Buenos Aires: Editorial Edulp.