

## TP N°7: Micorrizas

### Objetivos

- Reconocer hongos asociados con plantas herbáceas y árboles.
- Conocer las técnicas de aislamiento, cultivo en placa y la preparación de un inoculante sobre especies de plantas de interés en la región.

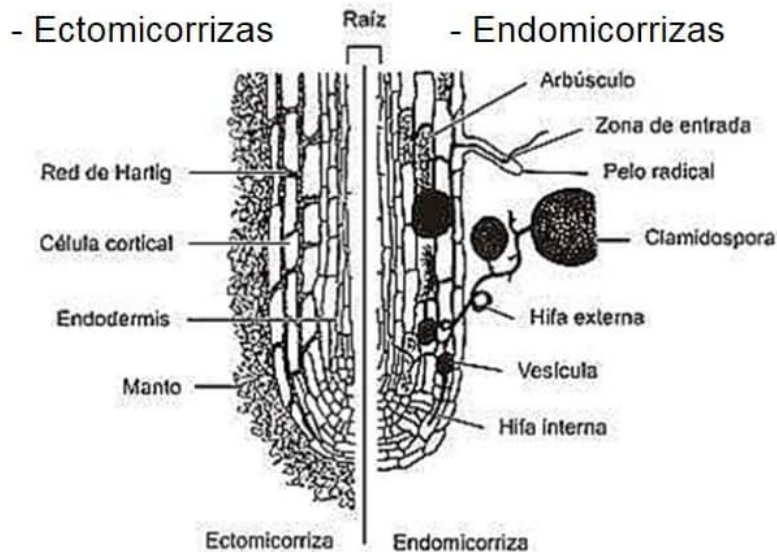
Las plantas parecen totalmente autónomas, pero la mayoría están asociadas con hongos, en sus raíces formando micorrizas o, endófitos dentro del tallo. Una de las funciones más importantes de las micorrizas (asociaciones entre hongos y plantas) es absorber los elementos minerales menos móviles del suelo (fosfatos, cobre, zinc) y transferirlos a la planta hospedadora, así como amonio. La planta proporciona azúcares al hongo. Se conoce con el nombre de micorriza a la asociación mutualista establecida entre las raíces de la mayoría de las plantas y ciertos hongos del suelo. Se trata de una simbiosis prácticamente universal, no sólo porque casi todas las especies vegetales son susceptibles de ser micorrizadas sino también porque puede estar presente en la mayoría de los hábitats naturales. Los hongos micorrízicos son uno de los microorganismos beneficiosos más estudiados y empleados en la actualidad.

Los tipos de micorrizas son las siguientes:

**Endomicorrizas:** Cuando el hongo penetra en el interior de las células de la raíz, formando minúsculas arborescencia y vesículas, se las llama Endomicorrizas vesículo-arbusculares. Los arbusculos suelen tener una vida efímera, de algunos días a pocas semanas, siendo luego digeridos por el hospedador. Los hongos de este tipo de micorrizas, generalmente presente en la vegetación herbácea, pertenecen a la familia de la endogonáceas.

**Orquidoides o micorrizas de oville:** Son micorrizas de orquídeas. Forman ovillos intracelulares en las orquídeas, los cuales son imprescindibles para su desarrollo y vida juvenil. Una vez que la planta crece y fotosintetiza, cuando está en la fase adulta generalmente se independiza del hongo.

**Ectomicorrizas:** Se caracterizan porque el hongo rodea la raíz con un manto de filamentos y una red miceliar del hongo no penetran en el interior de las células de la raíz, si no que se ubican sobre y entre las separaciones de éstas. Los hongos que forman ectomicorrizas en árboles son macrocárpicos y típicamente basidiomicetos superiores, por ejemplo, *Amanita*, *Boletus*, *Pisolithus*, *Suillus*. Más raramente los ascomicetos forman micorrizas, por ejemplo, *Tuber*. Es poca la especificidad de estas asociaciones ya que varios árboles pueden formar micorrizas con un hongo dado y viceversa. Algunas especies de árboles, por ej. los eucaliptos, poseen a la vez ecto y endo-micorrizas. Se pueden observar a simple vista.



**Fig. 1:** Colonización de ectomicorrizas a la izquierda, Endomicorrizas (micorrizas vesículo-arbusculares). A la derecha.

### Inoculación

La falta de micorrización acarrea problemas en el trasplante de las plántulas de árboles y plantas ornamentales, excepto en los casos en que el suelo contenga especies fúngicas. Para inocular con cultivos puros, el substrato (suelo, turba) debe ser previamente pasterizado con el fin de disminuir la población fúngica nativa competitiva. Los hongos son incorporados al substrato de siembra como trozos de raíces micorrizadas, pedazos de ascoma o basidioma, o micelio obtenido in vitro. El agregado de micelio ofrece mayores garantías en el caso de hongos que se desarrollan bien en cultivo axénico. El primer paso de toda inoculación consiste en la selección del hongo.

### Ventajas y beneficios de las micorrizas

Gracias a las micorrizas, la planta es capaz de explorar más volumen de suelo del que alcanza con sus raíces, al sumarse en esta labor las hifas del hongo; también capta con mayor facilidad ciertos elementos (fósforo, nitrógeno, calcio y potasio) y agua del suelo. La protección brindada por el hongo hace que, además, la planta sea más resistente a los cambios de temperatura y la acidificación del suelo derivada de la presencia de azufre, magnesio y aluminio.

### Observación de micorrizas

- Se lava la raíz de alguna planta herbácea, con agua corriente.
- Se corta trozos de un centímetro de largo y colocarlos en solución de hidróxido de sodio o potasio al 10% p/v.
- Se calienta a 90°C durante 30 minutos o más si es necesario.

- Cuando el material es oscuro se sumerge en agua oxigenada de 10 volúmenes durante 15 minutos, sino omitir este paso.
- Se lava 4 veces con agua corriente.
- Se pone los trozos en solución de ácido clorhídrico 0,1 N durante 10 minutos.
- Se colorea con azul-lactofenol a 90°C por 5 minutos.
- Luego se pasa a lactofenol.
- Se coloca un trozo de la raíz tratada entre dos portaobjetos y se aplasta.
- Se observa al microscopio entre porta y cubreobjetos.

### **Determinación del porcentaje de colonización**

Con ayuda de las pinzas se colocan las raíces teñidas en cajas de Petri con agua corriente para evitar que se sequen. En un portaobjetos y con ayuda de una aguja de disección, se coloca cuidadosamente 10 segmentos de aproximadamente 1 cm de longitud, paralelamente unos a otros. Se debe observar al menos tres preparaciones por cada planta. Se adiciona unas gotas de agua sobre las raíces y se cubre con cubreobjetos, evitando la formación de burbujas. Para realizar la evaluación se observa en el aumento de 40X (en algunos casos es necesario el aumento de 100X, depende del tipo de raíz utilizada).

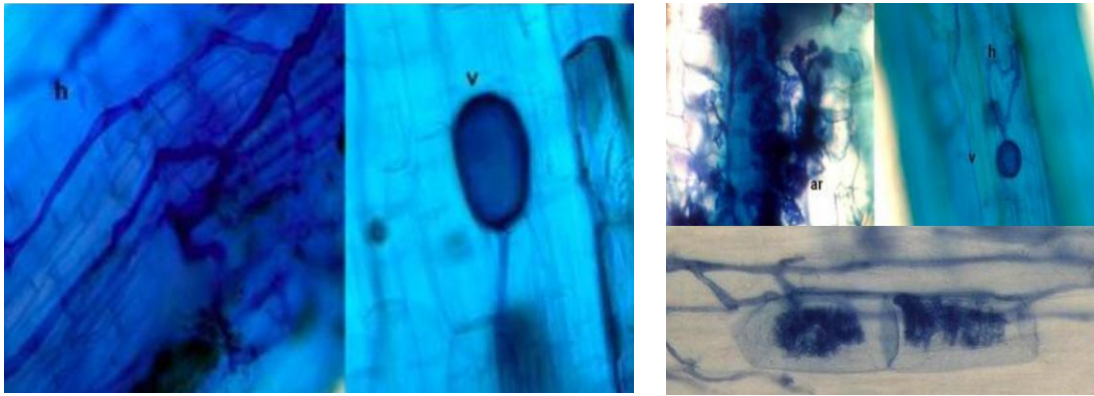
Al revisar un campo óptico donde se encuentra un segmento que contiene hifas, vesículas y/o arbusculos independientemente de la intensidad de la micorrización se da el valor de uno para la evaluación total y por estructuras.

Para obtener el porcentaje de colonización, se realizan los cálculos partiendo de las siguientes formulas:

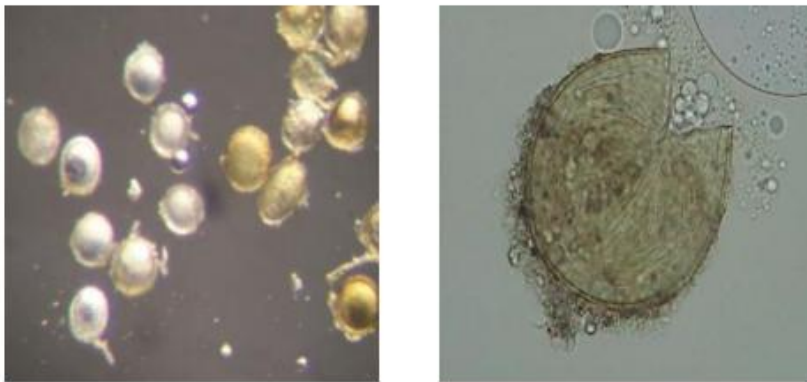
$$\text{Porcentaje de colonización total} = \frac{\text{Núm. de segmentos colonizados}}{\text{Núm. de segmentos totales observados}} \times 100$$

$$\text{Porcentaje de colonización por vesículas} = \frac{\text{Núm. de segmentos con vesículas}}{\text{Núm. de segmentos totales observados}} \times 100$$

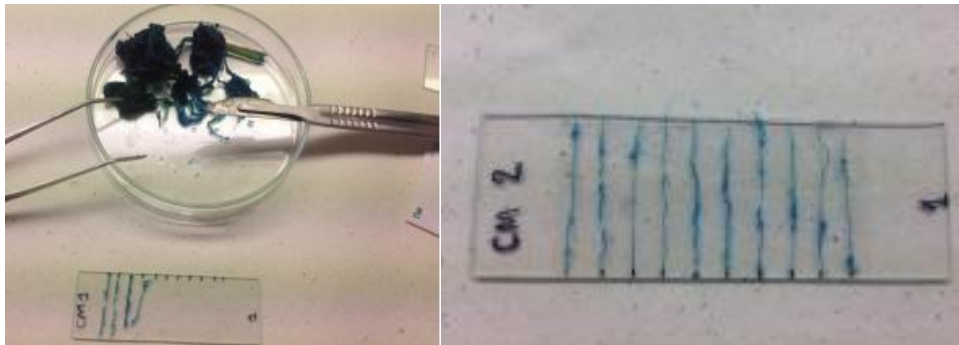
$$\text{Porcentaje de colonización por arbusculos} = \frac{\text{Núm. de segmentos con arbusculos}}{\text{Núm. de segmentos totales observados}} \times 100$$



**Fig. 3:** Estructuras endomicorrízicas.



**Fig. 4:** Esporas



**Fig. 5:** Procedimiento para calcular el porcentaje de colonización.

## BIBLIOGRAFÍA

- Hernández, M. I. 2000. Las micorrizas arbusculares y las bacterias rizosféricas como complemento de la nutrición mineral de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) [Tesis de Maestría], INCA.
- Ferrera-Cerrato R. y A. Alarcón. 2001. La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *Ciencia Ergo Sum* 8:175-183.
- Johnson, N. C., Tilman D. y Wedin D. 1992. Plant and soil controls on mycorrhizal fungal communities. *Ecology* 73: 2034-2042.