

COVACEVICH, F. 2017. HONGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES: Muestreo de suelo para determinación de actividad y diversidad de hongos micorrizicos arbusculares. En: Metodología de muestreo de suelo y ensayos a campo: Protocolos básicos comunes. D. J. Santos, M. Wilson y M. Ostinelli (Eds.) Ediciones INTA. (En Prensa).

MUESTREO DE SUELOS PARA DETERMINACION DE ACTIVIDAD Y DIVERSIDAD DE HONGOS

Fernanda Covacevich

Fundamento y Objetivos de muestreo

La mayoría de los hongos pueden sobrevivir durante tiempos prolongados en el suelo aun cuando las condiciones no son adecuadas para su desarrollo. Esto es posible dado que los hongos poseen estructuras de resistencia tales como esporas, clamidosporas, esporangios que pueden permanecer en dormancia hasta que las condiciones ambientales sean las adecuadas para su desarrollo. Asimismo, algunos hongos pueden también reiniciar su desarrollo a partir de segmentos de hifas secas que se encuentran en el suelo durante un tiempo. Todas estas estructuras son consideradas propágulos, los que, cuando las condiciones vuelven a ser adecuadas para el desarrollo germinan o inician su actividad, permitiendo el crecimiento fúngico.

Debido a la naturaleza heterogénea del suelo, varios grupos funcionales de organismos serán encontrados en las proximidades cercanas de uno a otro, asociados a características edáficas químicas o físicas que favorezcan el crecimiento de dichos organismos. Particularmente para hongos, el crecimiento se verá favorecido en sectores del suelo que contengan cierta humedad y un estado físico que permita el crecimiento de la red de hifas. La biomasa fúngica varía a través del suelo en relación a la composición y abundancia de los residuos, la densidad de raíces y la disponibilidad de nutrientes. El micelio fúngico crece, en general, de manera radial rodeando y atravesando suelo, madera y residuos. La elevada variabilidad en las condiciones edáficas, generalmente requiere la colecta de más replicas espaciales y temporales a campo que en las requeridas en muestras pre-incubadas (ej. macetas).

Especial atención debe disponerse para grupos fúngicos asociados a las raíces o sus exudados radicales. Los *Hongos formadores de Micorrizas Arbusculares* (HMA; Phylum Glomeromycota) son reconocidos promotores de crecimiento vegetal por incrementar la nutrición mineral e hídrica de las plantas, contribuir al control de patógenos de raíces, así como contribuir a la estabilidad de los agregados del suelo. Los HMA se distribuyen en el perfil de suelo de manera no aleatoria, ya que, debido a su característica biótropa-obligada su presencia está condicionada a la existencia de material radical (vegetal) vivo. Por esta razón, si lo que se desea colectar son propágulos activos de HMA, el material colectado deberá consistir en raíces y suelo rizosférico asociado. El micelio extra-radical de los HMA incrementa la exploración del volumen de suelo, incrementando la absorción de nutrientes (ej. P, Zn) y agua. Además, las hifas externas están involucradas en la estabilización de los agregados del suelo y pueden representar una considerable proporción (aproximadamente el 15 %, variable dependiendo del tipo de suelo) del carbono orgánico del suelo. En este sentido, puede resultar de interés para algunos estudios la cuantificación del largo o biomasa de hifas de HMA.

Otros hongos de especial interés por ser también promotores de crecimiento vegetal y biocontroladores son los correspondientes al género *Trichoderma*. Estos hongos, si bien no son simbioses de las raíces, su distribución y abundancia se asocia a los exudados radicales, por lo que las mismas consideraciones para el muestreo de HMA pueden ser tomadas para colectar *Trichoderma*. Otros hongos se asocian a los tejidos subterráneos de las plantas (raíces, hipocotilos, raíces seminales) penetrando sus tejidos y causando enfermedades a la planta hospedadora. Debido a las pérdidas económicas que en ocasiones ocurren debido a la infección de raíces por hongos patógenos, en algunos casos puede requerirse el muestreo de un lote para prevenir o diagnosticar una enfermedad en un cultivo.

Por lo mencionado, para el caso de Hongos, podrían plantearse tres objetivos principales:

- Colecta de propagulos viables de hongos (esporas, segmentos de hifas tanto asociadas a raíces viejas o libres en el suelo)
- Colecta de raíces con endofitos asociados (particularmente HMA)
- Colecta para cuantificación de largo de hifas de HMA

Para ello, se recomienda tener en cuenta los siguientes aspectos

Aspectos generales a tener en cuenta

- Evitar realizar la colecta de muestras en áreas atípicas (a menos que el objetivo de estudio sea específicamente evaluar dicha área) tales como: zonas con fertilización despareja o sitios donde se observa el desecho de excedentes de fertilizantes y pesticidas (en general en sitios próximos a alambrados), áreas cercanas a árboles, a depósitos de compost u otros depósitos, espejos de agua o zonas encharcadas y otros sitios no representativos
- Evitar todo tipo de contaminación de las muestras. Las muestras de suelo nunca deben dejarse expuestas al sol, en contacto con zonas de depósito de fertilizantes, detergentes o pesticidas.

Materiales necesarios (Foto 1)

- Bolsas de tamaño adecuado el permita la homogenización de las submuestras (para 10 submuestras de 5 por 20 cm, se recomienda un tamaño no menor a 20 x 30 cm)
- Tarjetas de identificación de las bolsas, hilo, marcadores permanentes.
- Una herramienta que permita colectar las muestras siempre del mismo volumen y profundidad de suelo. Se recomiendan muestreadores metálicos de 5 o 10 cm de diámetro por 20 cm de profundidad. En suelos muy secos donde los primeros centímetros son de difícil penetración puede requerirse una maza, anillos sinfin o algún elemento que permita la mejor penetración del muestreador en el suelo.
- En caso de no contar con muestreador, las muestras pueden ser colectadas con pala. Sin embargo, si el objetivo requiere que el volumen de cada submuestra sea idéntico (por ejemplo para cuantificación de volumen de raíces o de hifas) debe tenerse especial precaución de realizar extracciones del mismo volumen de suelo.
- Bidones con agua (opcional). Esto será de utilidad en ocasiones de extrema sequedad del perfil, en las que se recomienda mojar con abundante agua (aproximadamente 2 lt) en cada punto de muestreo, luego de esperar unos minutos para permitir el mojado del perfil, proceder a colectar la muestra con muestreador.
- Herramienta que permita despegar el cilindro de suelo del muestreador. Requerida en caso que la humedad del perfil sea excesiva.
- Ropa de trabajo y elementos de seguridad adecuados para el operador.

Colecta espacial de las muestras

La forma de muestreo deberá ser tal que abarque la mayor superficie del sitio a muestrear, pudiendo ser en zig-zag o guardia griega, tratando de evitar bordes de cultivos, cercanías a alambrados o a sectores atípicos del terreno.

Si bien no hay un número aceptado universalmente de número de sub-muestras para diferentes situaciones de campo, en todos los casos se recomienda la colecta de submuestras (no menos de 10 por hectárea) que deberán ser homogeneizadas en la bolsa de colecta. El número de submuestras puede aumentar si el sitio a muestrear presenta zonas atípicas (donde se recomienda colectar muestras de dicha zona y almacenarlas de manera separada a las del resto del sitio) o fertilización localizada.

Asimismo, en función a los objetivos de muestreo:

- *Colecta de propagulos viables de hongos:*

- Se recomienda la colecta de las muestras en cercanías de plantas así como en sectores sin presencia vegetal.
- Si el perfil presenta pendiente debe tenerse especial atención a coleccionar muestras representativas de las diferentes pendientes.
- Si el sector a muestrear presenta alguna característica de atención (afloramiento mineral o de tosca, cercanía a un curso de agua, sector quemado, entre otros) deben coleccionarse muestras que representen especialmente ese sector atípico en el paisaje.
- Para sitios agrícolas que han sido fertilizados o cuentan con tratamientos especiales entre surcos (incorporación de abonos verdes, abonos orgánicos cultivos entre hileras etc.), se debe tener en cuenta de coleccionar la misma cantidad de submuestras del surco que del entre surco, las que deberán ser luego homogeneizadas o almacenadas separadamente dependiendo del objetivo de la colecta.
- Si el sector a muestrear cuenta con presencia vegetal, debe registrarse el tipo de cultivo-cubierta que presenta el sitio

- *Colecta de raíces con endofitos asociados*

- Registrar el tipo de cultivo o cubierta vegetal del sector a muestrear
- Se recomienda coleccionar las muestras aproximadamente a 1-2 cm del tallo de plantas de porte pequeño (gramíneas en general, pasturas, trigo o cereales relacionados en estado vegetativo) y jóvenes; mientras que para plantas de porte grande (maíz, girasol, vid, hortícolas) se recomienda aumentar la separación de la perforación del suelo para la colecta de la muestra en aproximadamente 3-6 cm.
- De manera similar a lo descrito en el objetivo anterior, para sitios agrícolas que han sido fertilizados o cuentan con tratamientos especiales entre surcos (incorporación de abonos verdes, abonos orgánicos cultivos entre hileras etc.), se debe tener en cuenta de coleccionar la misma cantidad de submuestras del surco que del entre surco, las que deberán ser luego homogeneizadas o almacenadas separadamente dependiendo del objetivo de la colecta.
- Una vez coleccionadas las muestras verificar que se coleccionó material radical con raíces de diferentes tamaños y diámetros. Excluir muestras sin material radical o que solo presenten raíces muy gruesas (mas de 3 mm) o en estado avanzado de suberización (coloración marrón oscura). Se prefieren raíces de coloración amarillo claro.

- *Colecta para cuantificación de largo de hifas de HMA*

- La colecta debería realizarse en un sector del suelo que no haya sido recientemente disturbado
- Dependiendo del objetivo de muestreo, puede requerirse que la muestra sea de mayor volumen de suelo que el indicado en los puntos anteriores. Si ese fuera el caso puede requerirse la extracción de un monolito de suelo de volumen conocido, el que debería mantenerse sin disturbar hasta su transporte al laboratorio.

Colecta estacional de las muestras

La colecta estacional de las muestras de suelo dependerá del objetivo que se persigue. Si el sitio a muestrear presenta cultivos estacionales o no. Las muestras pueden ser coleccionadas cuando las condiciones de clima y ambiente lo permitan, aunque debería evitarse realizar colecta de suelo inmediatamente después de alguna aplicación de fertilizantes o pesticidas, a menos que el objetivo de la colecta sea específicamente ese.

Si las colectas van a ser repetidas a lo largo de los años, debe considerarse especialmente que sean realizadas en momentos similares (estacionales o fenológicos del cultivo, según corresponda) cada año.

Asimismo, en función a los objetivos de muestreo:

- *Colecta de propagulos viables de hongos:*

- Si se realiza la colecta en parcelas sin cultivo o con suelo desnudo, puede decidirse el momento de muestreo en función de la disponibilidad del operador.
- Si se cuenta con previsión de clima, y la región a muestrear es de clima seco, se recomienda realizar la colecta aproximadamente 10-15 días después de un evento de lluvia. Dependiendo

de los objetivos de la colecta, y debido a que la humedad en el suelo favorece la proliferación de propagulos de hongos, la misma puede realizarse antes y después de la lluvia.

- *Colecta de raíces con endófitos asociados*

- Se recomienda realizar el muestreo no antes de 15 o 20 días después de la emergencia de las semillas. Para cultivos anuales este plazo puede extenderse a aproximadamente 8 semanas después de la siembra.
- Si se pretende realizar el monitoreo de la colonización/infección de raíces, se recomienda realizar colectas estacionales al menos en estado vegetativo, floración y madurez del cultivo.
- Si se realiza el monitoreo en cultivos perennes, que pueden presentar raíces con elevado grado de suberización (coloración marrón oscura), y se conoce tentativamente el momento de proliferación de raíces nuevas, se recomienda realizar el muestreo 15 días después de dicho momento.

- *Colecta para cuantificación de largo de hifas de HMA*

- Se recomienda realizar el muestreo al menos 4 meses luego de instalado un cultivo anual, o 6 meses para un cultivo perenne.
- De la misma manera que para la colecta de propagulos viables, si se cuenta con previsión de clima, y la región a muestrear es de clima seco, se recomienda realizar la colecta aproximadamente 10-15 días después de un evento de lluvia. Dependiendo de los objetivos de la colecta, y debido a que la humedad en el suelo favorece la proliferación de propagulos de hongos, la misma puede realizarse antes y después de la lluvia.

Ubicación en el perfil – Profundidad de muestreo (Foto)

En general, la mayor abundancia de hongos se encuentra en los primeros 20 cm del perfil, particularmente en suelos con cobertura de rastrojos que mantienen la humedad superficial. Si el suelo se encuentra desnudo y los primeros cm están expuestos a radiación solar y desecación, es probable que la mayor abundancia y actividad de hongos se encuentre en la fracción 10-20 cm de suelo.

Se ha evidenciado que la abundancia y riqueza de esporas de HMA, así como la colonización micorrizica se distribuyen diferencialmente en el perfil de suelo, alcanzándose los mayores grados de colonización micorrizica entre los 10-20 cm del sistema radical de las plantas hospedadoras. En este sentido, dependerá del objetivo de la investigación, la profundidad a la que se desea coleccionar el material y si se desea fraccionar la profundidad de muestreo en sub-muestras.

Tamaño de la muestra (Foto)

El tamaño de la muestra dependerá del tamaño del muestreador o pala utilizada, y de la cantidad de submuestras que se coleccionen por sitio. En cualquiera de los casos, el tamaño de cada muestra (compuesta por submuestras como se indicó previamente) no debería ser menor a 500 g. Para muestras en las cuales se requiere coleccionar las raíces, el tamaño de la muestra debería ser un tanto mayor, aproximadamente 700-900 g. Esto es debido a que en ocasiones alguna submuestra podría no contener raíces o éstas podrían ser viejas o encontrarse en un estado de suberización avanzado que impida la observación de colonización por HMA, por lo que deberán ser descartadas. Para los estudios de colonización por HMA se requiere que al menos cada muestra (compuesta por submuestras) contenga al menos 10 g de raíces adecuadas para el procesamiento y cuantificación de la colonización micorrizica. Además, se prefiere la obtención de raíces de diferentes partes del sistema radical. Para los estudios de cuantificación de propagulos de hongos se requerirán al menos 100 g de muestra de suelo. Para los estudios de cuantificación de hifas de HMA pueden requerirse al menos 200 g de muestra de suelo. Para los estudios moleculares se requiere no más de 1 g de muestra de suelo o raíz. En todos los casos las muestras deben estar adecuadamente homogeneizadas en las diferentes muestras coleccionadas y debe ser representativa del sitio de muestreo.

Muestreo para análisis moleculares

Utilizando un muestreador como indicado anteriormente se extraen pequeñas cantidades de suelo o de raíces (dependiendo del objetivo del muestreo), a una profundidad de 20 cm al menos en 10 submuestras/ha distribuidas al azar que deberán homogenizarse. Se deberían tener en cuenta las condiciones de cultivo y fertilización del sitio a muestrear mencionadas anteriormente.

Todos los materiales de muestreo (muestreador, espátula, etc.) deberán lavarse antes y después de colectar las muestras, con abundante agua y alcohol 70% con el fin de evitar la contaminación entre puntos de muestreo.

Previo al muestreo la hojarasca deberá ser removida.

Transporte y acondicionamiento de las muestras

Se recomienda que las muestras sean transportadas en oscuridad, sin exposición directa a elevadas temperaturas o luz solar.

Las muestras deben ser transportadas en contenedores preferentemente refrigerados hasta la llegada al laboratorio.

Para la extracción del DNA, las muestras del suelo deberán trasladarse al laboratorio utilizando un recipiente con aislamiento y frío, preferentemente a 4°C y congelarse lo más pronto posible para su futuro procesamiento.

Si el suelo se encontraba con un contenido excesivo de humedad al momento de la coleta de las muestras de raíces, las bolsas en las cuales estas han sido transportadas deben abrirse inmediatamente a la llegada del material al laboratorio. Preferentemente el procesamiento debería ser en un plazo no menor a las 72 hs.

Si las muestras de raíces van a ser sometidas a análisis molecular o no se prevee la llegada de las muestras al laboratorio en las próximas 24 hs, se recomienda lavar las raíces con abundante agua y almacenarlas en recipientes con alcohol 70%. Las muestras de raíces deben ser colocadas en recipientes de tamaño tal que permitan el completo remojo de las mismas (aproximadamente para 100 g de raíz fresca, almacenar en recipientes no menores de 250 mL).

FOTOS. ESTO LO COMPLETO PARA EL 18/08, SERAN 3 O 4 FOTOS



Material bibliografico consultado

Covacevich F, Consolo VF (Eds.) 2014. Manual de protocolos: Herramientas para el estudio y manipulación de Hongos Micorrícicos Arbusculares y Trichoderma / 115 p. UNMDP ISBN 978-987-544-606-9

Estefan G, Sommer R, Ryan J Methods of Soil, Plant, and Water Analysis: A manual for the West Asia and North Africa region –Third Edition ICARDA Editorial

Jimenez Diaz RM, Castillo Castillo P, Navas Cortes JA. 2004. Muestreo, cuantificación y caracterización patogénica de hongos y nematodos fitopatógenos en el suelo: implicaciones para el control de enfermedades. *Phytoma* 164: 138-

Shukla A., Vyas D., Anuradha Jha. 2013 Soil depth: an overriding factor for distribution of arbuscular mycorrhizal fungi *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 13(1), 23-33

Shen Q, Kirschbaum MUF, Hedley MJ, Camps Arbestain M (2016) Testing an Alternative Method for Estimating the Length of Fungal Hyphae Using Photomicrography and Image Processing. *PLoS ONE* 11(6): e0157017. doi:10.1371/journal.pone.0157017