

## COMPARACION DE DOS TECNICAS DE CUANTIFICACION DE INFECCION MICORRITICA

F COVACEVICH, HE ECHEVERRIA, LAN AGUIRREZABAL

UI EEA INTA-FCA, Balcarce. CC 276, 7620 Balcarce - Argentina.

E-mail: hecheverr@balcarce.inta.gov.ar

Recibido 12 de junio de 2001, aceptado 7 de noviembre de 2001

### COMPARISON OF TWO TECHNIQUES FOR DETERMINING MYCORRHIZAL INFECTION

Our aims were to compare the techniques for determining root mycorrhizal infection proposed by Giovanetti-Mosse and by Trouvelot *et al.* Data were extracted from a glasshouse experiment where wheat plants were grown in pots filled with a Petrocalcic Paleudoll soil. Treatments were nitrogen and phosphorus fertilization levels and three sampling depths. Mycorrhization (M) estimated by both methods ranged from 0 to about 68 %. Arbuscules (A) estimated by both methods ranged from 0 to about 61 %. There were found positive (up to  $r^2=0,77$ ) relationships between M and A. Similarly, there were found positive (up to  $r^2=0,76$ ) relationships when M or A estimated by the two methods were correlated. Mycorrhization estimated by the Giovanetti-Mosse method showed M% values slightly highest from the estimated by Trouvelot *et al.* ( $M_{\text{Trouvelot}}(\%)=0,98 M_{\text{Giovanetti}}(\%)-4,1$ ;  $r^2=0,81$ ). Arbuscules showed a similar trend ( $A_{\text{Trouvelot}}(\%)=0,82 A_{\text{Giovanetti}}(\%)-4,2$   $r^2=0,76$ ).

**Key words:** Mycorrhizal Colonization, Arbuscules Content, Giovanetti-Mosse method, Trouvelot *et al.* method.

### INTRODUCCION

La formación de micorrizas arbusculares (MA) en las raíces de las plantas incrementa la absorción de P por las plantas y consecuentemente su crecimiento (Pfleger, Linderman 1996).

Varias técnicas son empleadas para estimar la micorrización, algunas estiman la biomasa fúngica determinando el contenido de quitina. Sin embargo, la utilidad de estas determinaciones químicas se limita a condiciones experimentales controladas y suelos esterilizados (Bethlenfalvay *et al.* 1981). Las técnicas mas utilizadas se basan en la observación microscópica de las raíces y la estimación del cortex primario que es ocupado por las estructuras MA fúngicas. La estimación del porcentaje de colonización micorrítica por el método de la cuadrícula (Giovanetti, Mosse 1980) es muy utilizado para estimar el grado de micorrización y arbusculos en un sistema radical (Schweiger, Jakobsen 1999; Covacevich *et al.* 1995). Dicho método presenta además, la ventaja de proporcionar una estimación del largo total de raíz que es micorrizado, ajustando las condiciones de observación al método de la cuadrícula propuesto por Tennant (1975), que cuantifica la longitud radical en una

muestra. En tal sentido, cuando condiciones tales como la fertilización pueden afectar tanto el grado de micorrización como el desarrollo radical, es de interés conocer la cantidad total de raíces micorrizadas. Sin embargo, Mc Gonigle *et al.* (1990) han manifestado que el método de las interceptas presenta dos limitaciones: por una parte dicha técnica es subjetiva, dado que los arbusculos no son fácilmente reconocibles microscópicamente a aumentos menores que 200x, y, por otra, que la intensidad de colonización en el cortex radical del segmento observado no es estimado. Al respecto, otra metodología que considera la densidad de colonización y la riqueza de arbusculos en el cortex radical es empleada por su mayor rapidez (Trouvelot *et al.* 1986).

El objetivo ha sido comparar las técnicas de cuantificación de la infección micorrítica arbuscular propuestos por Giovanetti y Mosse y por Trouvelot *et al.*, y determinar el grado de asociación entre las estimaciones logradas por ambas técnicas.

### MATERIALES Y METODOS

La experiencia se realizó en invernáculo (EEA INTA, Balcarce). Tubos de PVC de 30 cm de profundidad por 10 cm de diámetro fueron llenados

simulando el perfil con un Paleudol Petrocálcico, con pH 5,7; materia orgánica 6,2%, 6,5 mg P Bray  $\text{kg}^{-1}$  y 15 mg  $\text{N-NO}_3^- \text{kg}^{-1}$  en el horizonte A y pH 5,9, materia orgánica 3,7%, y 4 mg P Bray  $\text{kg}^{-1}$  en el B<sub>1</sub>. Se sembraron tres semillas de trigo (ProINTA FEDERAL) por tubo el 29 de agosto de 1996. El suelo fue mantenido a no menos del 65% de su capacidad de retención hídrica. Con el objeto de obtener un amplio rango de micorrización los tratamientos resultaron de la combinación factorial de: niveles de nitrógeno (0 y 0,33 g N tubo<sup>-1</sup>), niveles de fósforo (0, 0,05 y 0,10 g P tubo<sup>-1</sup>) y profundidad de muestreo (0-10, 10-20 y 20-30 cm) con cuatro repeticiones. La fertilización se realizó a la siembra con urea y superfosfato triple de calcio en solución acuosa.

A los 35 días después de la siembra, cuando las plantas estaban en espiguilla terminal (código decimal 15, Zadoks *et al.* 1974), se cortó el material vegetal aéreo y los tubos fueron vaciados. El suelo con todo el material radical fue fraccionado a los 0-10; 10-20 y 20-30 cm. Cada fracción fue tamizada (0,2 cm), lavada con agua y las raíces recuperadas. Estas fueron secadas al aire (20 °C, 72 hs), divididas en dos submuestras de peso equivalente y teñidas (Phillips, Hayman 1970). En una submuestra se estimó el grado de micorrización y de arbusculos por el método de la cuadrícula de Giovanetti y Mosse (1980). Para ello, las raíces fueron cortadas en segmentos de 1 cm, se distribuyeron al azar sobre una grilla de 1 cm x 1 cm. Se registró la presencia de estructuras MA en las intersecciones horizontales y verticales entre raíces y líneas mediante observación microscópica (45x). El número de intersecciones cuantificadas en cada muestra se mantuvo dentro del rango 112-395, con un promedio de 193 raíces/muestra.

Se calculó la frecuencia de infección micorrítica,  $M_{\text{Giovanetti}}(\%) = \text{N}^\circ \text{ SI} \times 100 / \text{N}^\circ \text{ SO}$ , donde SI corresponde al número de segmentos infectados (hifas+arbusculos+vesículas) y SO al número de segmentos observados (hifas + arbusculos + vesículas + sin infección).

La frecuencia de aparición de arbusculos, fue calculada como:  $A_{\text{Giovanetti}}(\%) = \text{N}^\circ \text{ SA} \times 100 / \text{N}^\circ \text{ SO}$ , donde SA corresponde al número de segmentos con arbusculos.

En la submuestra restante, se realizó la cuantificación de la micorrización por la técnica de Trouvelot *et al.* (1986). Para ello, se cortaron 30 segmentos de 1 cm de las raíces teñidas, se montaron paralelamente en portaobjetos y se realizó la observación microscópica (45 x). Cada segmento fue categorizado entre las clases 0 (0% infección) hasta 5 (>95% infección). Simultáneamente, la proporción de arbusculos en cada porción infectada fue categorizada entre A<sub>0</sub> (0% arbusculos) hasta A<sub>5</sub> (100% arbusculos).

Se calculó la intensidad de micorrización como:  $M_{\text{Trouvelot}}(\%) = (n_1+5 n_2+30 n_3+70 n_4+95 n_5) / N$ , donde  $M_{\text{Trouvelot}}(\%)$  es simétrica en el rango 5-95 %, N es el número de fragmentos observados, y n<sub>1</sub> .... n<sub>5</sub> representan el número de fragmentos categorizados como 1 .... 5, respectivamente.

El contenido relativo de arbusculos del sistema radical  $A_{\text{Trouvelot}}(\%)$  fue calculado como:  $A_{\text{Trouvelot}}(\%) = a \cdot \text{mA} / 100$  con  $a(\%) = (10 \text{mA}_1 + 50 \text{mA}_2 + 100 \text{mA}_3) / 100$  con  $\text{mA} = (n_1A + 5 n_2A + 30 n_3A + 70 n_4A + 95 n_5A)$  donde A es, n<sub>1</sub>A.... n<sub>5</sub>A, corresponden al número de fragmentos con arbusculos pertenecientes a las categorías 1 .... 5, respectivamente. Las variables cuantificadas fueron sometidas a análisis de correlación y regresión (SAS 1988).

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los tratamientos evaluados permitieron obtener un rango de  $M_{\text{Giovanetti}}$  que se mantuvo entre 1-68 %, y entre 0-67 % para la  $M_{\text{Trouvelot}}$ . Para el  $A_{\text{Giovanetti}}$  el rango fue 0-61 % y para el  $A_{\text{Trouvelot}}$  0-58 %. Los rangos de micorrización son coincidentes con los reportados por Schweiger y Jakobsen (1999) en plantas de trigo. La  $M_{\text{Giovanetti}}$  (24 %) superó al  $A_{\text{Giovanetti}}$  (17 %). Un comportamiento similar se encontró para  $M_{\text{Trouvelot}}$  (19 %) que superó al  $A_{\text{Trouvelot}}$  (10 %). Esta situación es esperable si se considera que el parámetro M incluye la cuantificación de arbusculos. Dado que en los arbusculos se realiza el intercambio de nutrientes (Pfleger, Linderman 1996), ambos parámetros (A y M) deben ser considerados en los casos en que se evalúan los efectos provocados como resultado de la formación de micorrizas.

La M y el A correlacionaron positiva y significativamente, tanto cuando fueron estimados por la técnica de Giovanetti y Mosse ( $r^2 0.96 P \leq 0.0001$ ) o por la de Trouvelot *et al.* ( $r^2 0.87 P \leq 0.0001$ ). De manera similar, cuando la M o el A estimados por las dos técnicas fueron correlacionados, se relacionaron positiva y significativamente (Figura 1). Tanto la  $M_{\text{Giovanetti}}$  como el  $A_{\text{Giovanetti}}$  mostraron valores superiores ( $P=0.01$ ) en cuatro unidades en relación a la  $M_{\text{Trouvelot}}$  y  $A_{\text{Trouvelot}}$ , respectivamente. Las pendientes de la relación obtenida para la estimación de la M no difirió de uno ( $P=0.67$ ), mientras que para la estimación del A si ( $P=0.001$ ). Por lo mencionado, podría asumirse una sobreestimación en la estimación por la técnica

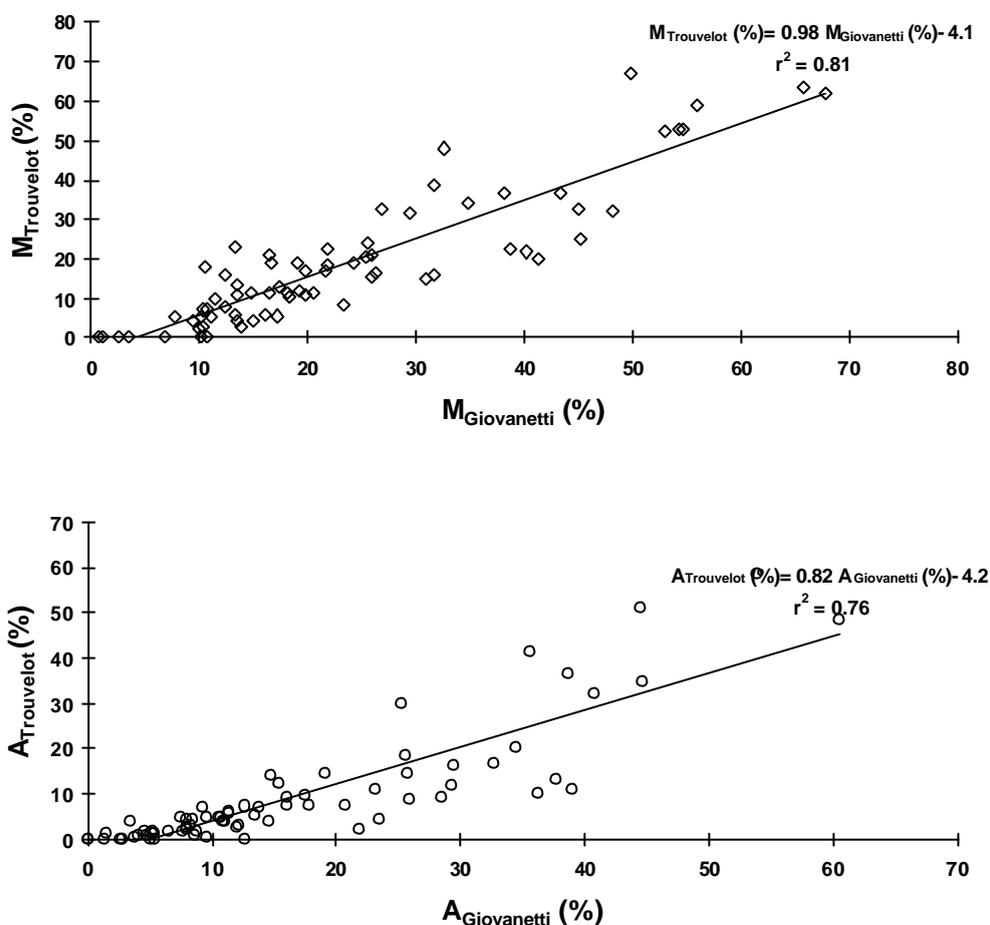


Figura 1. Relación entre la intensidad de micorrización (a) y contenido de arbusculos (b) cuantificados por el método de Trouvelot y colaboradores (MTrouvelot y ATrouvelot, respectivamente), con el porcentaje de micorrización (a) y de arbusculos (b) cuantificados por el método de Giovanetti y Mosse (MGiovanetti y AGiovanetti, respectivamente).

Figure 1. Relationship between mycorrhizal intensity (a) and arbuscules content (b) estimated by Trouvelot et al. method (MTrouvelot y ATrouvelot, respectively), and the percentage of mycorrhizal infection (a) and the arbuscules content (b) estimated by Giovanetti-Mosse method (MGiovanetti y AGiovanetti, respectively).

de Giovanetti y Mosse en relación a la de Trouvelot *et al.*, fundamentalmente para el contenido de arbusculos.

Los resultados obtenidos muestran una concordancia general entre las dos técnicas evaluadas para estimar tanto la M como el A. Mediante la técnica de Giovanetti y Mosse es posible realizar conjuntamente la cuantificación de la M, el A y la determinación del largo de raíz micorrizado. El tiempo empleado en la preparación del material a observar microscópicamente por la técnica de la cuadrícula, excede en al menos cinco veces al em-

pleado para la confección de los preparados a observar para realizar la estimación por el método de Trouvelot *et al.* Para el tiempo empleado en la observación microscópica de las muestras, se mantiene la misma diferencia entre las dos técnicas para la preparación del material.

Las relaciones halladas entre las técnicas de Giovanetti y Mosse y de Trouvelot *et al.* podrían permitir la transformación de estimaciones de la micorrización y el contenido de arbusculos realizadas por una técnica, hacia la otra.

**AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo fue financiado con fondos del Proyecto 15-A107 de la FCA-UNMP.

**REFERENCIAS**

- Bethlenfalvay GJ, Pacovsky RS, Brown MS. 1981. Measurement of mycorrhizal infection in soybean. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 45: 871-874.
- Covacevich F, Echeverría HE, Andreoli YE. 1995. Micorrización vesículo arbuscular espontánea en trigo, en función de la disponibilidad de fósforo. *Ciencia del Suelo.* 13: 47-51.
- Giovanetti M, Mosse B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84: 489-500.
- Mc Gonigle TP, Miller MH, Evans DG, Fairchild GS, Swan JA. 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 115:495-501.
- Pfleger FL, Linderman RG. 1996. *Mycorrhizae and plant health*, 2<sup>nd</sup> edn. APS Press, USA. 344 pp.
- Phillips JM, Hayman DS. 1970. Improves procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assesment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- SAS. 1988. *SAS user's Guide: Statistics.* 6.06 ed. SAS Inst., Cary, NC. 1028 pp.
- Schweiger PF, Jakobsen I. 1999. Direct measurement of arbuscular mycorrhizal phosphorus uptake into field-grown winter wheat. *Agron. J.* 91: 998-1002.
- Tennant D. 1975. A test of a modified line intersect method of estimating root length. *J. Ecol.* 63: 995-1001.
- Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V. 1986. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. En 'Physiological and genetical aspects of mycorrhizae'. Gianinazzi-Pearson V and Gianinazzi S eds., INRA, Paris, 101-109.
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF. 1974. A decimal code for the growth stage of cereals. *Weed Res.* 14: 415-421.