

UTILIZACION DE FORMALDEHIDO PARA LA ERRADICACION DE HONGOS MICORRITICOS ARBUSCULARES DE MUESTRAS DE SUELO

F COVACEVICH, HE ECHEVERRIA

UIB EEA INTA-FCA, BALCARCE. CC 276 (7620) BALCARCE - ARGENTINA E-mail: covac@mdp.edu.ar

Recibido 25 de septiembre de 2002, aceptado 3 de marzo de 2003

THE USE OF FORMALDEHYDE FOR ELIMINATING ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI FROM SOIL SAMPLES

A limitation for mycorrhizal research is the adequate control of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) which normally colonizes roots plants. For manipulating mycorrhizal population, it is necessary to develop an appropriate substrate free of AMF when they could be latter propagated. The substrate, however, should not be different from the used soil in the most of the characteristics that influence mycorrhizal development and activity. The aim of this work was to determine the formaldehyde ability to eliminate AMF, without affecting plant growth, mycorrhizal development and mycorrhizal benefit on the host plant. The effects of formaldehyde supply in a soil-sand (1:1) mixture were evaluated in three pot assays: the appropriate concentration was selected, the propagation of two AMF isolates was performed, and the effects of disinfecting and inoculating soil on colonization and growth of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) and wheatgrass (*Thinopyrum ponticum* Podp = *Agropyron elongatum* Beauv.) were evaluated. The soil Bray-P ($15,2 \pm 1,56 \text{ mg kg}^{-1}$), pH ($5,60 \pm 0,29$) and organic matter ($7,07 \pm 0,20 \%$) content were not affected by formaldehyde supply. Formaldehyde soil application at concentrations higher than 10 ul.g^{-1} impeded plants emergency. The concentration range of $3,33\text{-}10 \text{ ul.g}^{-1}$ effectively eliminated indigenous mycorrhizal colonization without deterring plant growth. Concentrations lower than 10 ul.g^{-1} , however, allowed fungal development of non-mycorrhizal fungi. Mycorrhizal development of *Acaulospora longula* and *Glomus claroideum* isolates, as a result of maize inoculation, was possible after disinfecting soil with 10 ul formaldehyde g^{-1} . Colonization of *G.claroideum* in tall fescue inoculated plants growing within the formaldehyde disinfected soil reached about 30 %, being three fold higher than native mycorrhizal plants. Formaldehyde did not negatively affect tall fescue and wheatgrass growth. In addition, it showed both indigenous and *G. claroideum* mycorrhizal benefit. Formaldehyde fumigated soil can be used for propagation of AMF inoculum. More research on formaldehyde effects on the development of soil microorganisms other than mycorrhizal must be further developed.

Key words: formaldehyde, arbuscular mycorrhizal fungi, arbuscular mycorrhizal colonization, inoculum propagation.

INTRODUCCION

Los microorganismos del suelo son responsables de numerosas y diversas actividades bioquímicas que pueden afectar el crecimiento de las plantas. La eliminación de microorganismos nativos puede ser necesaria para evaluar las transformaciones efectuadas por ellos, o para estudiar el crecimiento o actividad metabólica de microorganismos específicos inoculados en el suelo (Wolf, Skipper 1994). Los hongos micorríticos arbusculares (MA) que colonizan las raíces de las plantas superiores, son ampliamente conocidos por beneficiar el crecimiento del hospedador, puesto que incrementan la absorción de fósforo (P) del suelo (Schweiger, Jakobsen 1999). Para ello,

la comparación del crecimiento en plantas micorrizadas y sin micorrizar pueden ser indicativos de la magnitud del beneficio de la simbiosis. Sin embargo, en general resulta dificultoso eliminar estos hongos sin afectar propiedades del suelo que inciden en el desarrollo de la simbiosis. Una vez que una cepa ha sido identificada como benéfica, es deseable proceder a su multiplicación. Dicha multiplicación debería realizarse en un sustrato libre de otras poblaciones fúngicas, y cuyas propiedades que inciden en el desarrollo de la simbiosis no difieran en gran medida a la del suelo a inocular.

La esterilización del suelo implica la destrucción de los microorganismos en activo

crecimiento y sus estructuras de resistencia tales como las esporas (Joslyn 1983). Un método muy utilizado para la esterilización del suelo en el manejo de los hongos MA es la aplicación de calor húmedo mediante dos autoclavados sucesivos con incubación intermedia (Oba *et al.* 2001). Sin embargo, esto puede producir cambios de una amplia gama de propiedades químicas del suelo, tales como incrementos en el contenido de determinados compuestos orgánicos, como en el contenido de P, N, S (Eno, Popenoe 1964) y Mn (Wolf *et al.* 1989). El incremento en el contenido de P, puede afectar en gran medida el desarrollo vegetal (Wolf, Skipper 1994) y la formación de micorrizas (Pfleger, Linderman 1996). Para suelos del sudeste de la Provincia de Buenos Aires se han detectado incrementos de hasta 40 ppm de P por efecto del autoclavado, hecho que ha afectado negativamente el desarrollo de hongos MA nativos (Covacevich 1998). Otra forma de esterilización del suelo a veces utilizada para el manipuleo de hongos MA es el empleo de irradiación γ (Frey, Schuepp 1993). Esta metodología permite la esterilización de volúmenes de suelos relativamente aceptables (25 kg) (Cawse 1975), aunque actualmente la disponibilidad de equipos limita su utilización.

La aplicación de fungicidas es muy utilizada para los ensayos de evaluación de efectos de la micorrización (Wilson *et al.* 2001). El Benomyl es efectivo en reducir la colonización MA, sin afectar el crecimiento de las plantas (Paul *et al.* 1989). Sin embargo, no elimina totalmente los hongos MA, puesto que actúa sobre hifas en estado vegetativo y no afecta la germinación de esporas (Pedersen, Sylvia 1997). Por esta razón no es factible utilizar el Benomyl para situaciones en las cuales el objetivo sea trabajar en un suelo libre de poblaciones MA nativas.

En general, todos los fumigantes operan por acción de sus gases. El gas debe penetrar en el suelo, ponerse en contacto con los microorganismos y actuar sobre ellos (Worf 1990). El empleo de compuestos gaseosos tales como el etileno o el óxido de propileno en general presenta, por un lado, el inconveniente de la poca cantidad de suelo que puede ser esterilizada (100 g), por otro, el peligro ocasionado por la inflamabilidad de los compuestos (Wolf, Skipper 1994). El bromuro de metilo ha

sido muy utilizado para la erradicación de hongos MA en suelos (Gianinazzi *et al.* 1990). Sin embargo, debido al impacto negativo de los gases emanados sobre la capa de ozono, deberá ser sustituido en proyectos agrícolas por otras sustancias en los próximos cinco años de acuerdo al Protocolo de Montreal de 2002. Además, debido a que se descompone en metanol e iones bromuro (Br⁻), estos últimos presentan problemas de fitotoxicidad luego de la fumigación.

Un compuesto resultante de la oxidación del metanol, el formaldehído, se encuentra disponible comercialmente como formol (37-40%) y es ampliamente utilizado como bactericida y fungicida para esterilizar elementos hospitalarios (Skisak 1983). Se lo reconoce como uno de los tratamientos más antiguos y simples para fumigar jardines a nivel doméstico (Worf 1990). El formol es completamente soluble en agua y, aunque sus efectos no son bien conocidos, no se ha reportado bioacumulación como resultado de su aplicación en el suelo. Su infiltración en las napas es de baja importancia debido a su tendencia a evaporarse del suelo. Además, en contacto con suelo o agua, puede ser degradado por los microorganismos. Por estas razones, es deseable evaluar la importancia de este fumigante para la manipulación de los hongos MA. Su aplicación en la propagación de inóculos MA en sustratos libres de poblaciones nativas y en la evaluación del beneficio otorgado por la simbiosis se ha puesto a prueba. El objetivo del trabajo ha sido cuantificar la concentración dosis de formaldehído que, aplicada a muestras de suelo, permita eliminar las poblaciones de hongos MA establecidas, sin afectar el posterior crecimiento de las plantas. Además, evaluar el desarrollo y la expresión del beneficio de la micorrización en el sustrato fumigado.

MATERIALES Y METODOS

Evaluación de la concentración óptima de formaldehído

Se empleó una muestra del horizonte superficial de un suelo sin fertilizar (Reserva 7) de la Unidad Integrada INTA-FCA Balcarce, Buenos Aires (Argentina; 37° 45' Lat. Sur, 58° 18' Long. Oeste). El suelo es de aptitud agrícola representativo del sudeste de la Provincia de Buenos Aires, clasificado como Natralbol y que había sido mantenido bajo pastura. La muestra (10 kg) fue extraída

en octubre de 2000 de los primeros 20 cm del perfil. Esta fue tamizada (1 cm), homogenizada, y los restos vegetales de mayor tamaño fueron extraídos. Una submuestra (500 g) fue secada (30 °C) y tamizada (0,5 mm), para la determinación del contenido de P disponible (P-Bray I: 8,02 mg kg⁻¹) por colorimetría de molibdato de amonio-ácido ascórbico (Bray, Kurtz 1945); la determinación de pH (5,9) se efectuó en una suspensión suelo-agua (1:2,5) con un potenciómetro con electrodo combinado; y se realizó la cuantificación del contenido de MO (6,4%) mediante la titulación con sal de Mohr del dicromato de K residual a la reducción efectuada por el carbono de la submuestra (Walkley 1947).

La muestra fue conservada húmeda (50 %) en bolsas de polietileno negro en frigorífico (4 °C) hasta su utilización tres meses después. Se extrajeron submuestras con 150 g de sustrato que fue mezclado con 30 ml de solución de agua destilada y formaldehído (CAS 50-00-0) en 11 concentraciones (Tabla 1). Cada submuestra fue conservada separadamente en bolsas de polietileno negro que se mantuvieron cerradas a 24 °C durante dos días. Cada ocho horas las submuestras eran homogeneizadas sin abrir. Posteriormente, las bolsas fueron abiertas y el suelo aireado durante cinco días a temperatura y humedad ambiente (20 °C, 50%), durante los cuales el sustrato era removido cada ocho horas. Transcurridos al menos quince días de la aplicación de formaldehído, el sustrato con cada concentración fue mezclado (1:1 p:p) con arena (2 mm) autoclavada a los efectos de favorecer el desarrollo de los hongos MA (Taylor, Harrier 2002). De esta manera resultaron submuestras de sustrato fumigado+arena de 300 g. Cada submuestra fue empleada para llenar 5 micromacetas de (50 g) en los que se sembraron separadamente semillas de agropiro (*Thinopyrum*

poncticum Podp = *Agropyron elongatum*. Beauv) y festuca (*Festuca arundinacea* Schreb.). Se contó con un total de 110 unidades experimentales: 11 concentraciones formaldehído x 2 especies x 5 repeticiones. Las plantas fueron mantenidas en invernáculo (13 °C - 31 °C, humedad relativa 39-100%, radiación solar 8.1 ± 1.1 MJ m⁻² día⁻¹) y regadas día por medio con agua destilada. Cinco días después de la siembra se registró el porcentaje de germinación en todos los tratamientos. Cincuenta días después de la emergencia (DDE) se dio por finalizado el periodo experimental. La parte aérea fue llevada a estufa, se cuantificó el número de hojas y el peso de las mismas (MSH). Las raíces fueron lavadas y teñidas con azul tripán en lactofenol (Phillips, Hayman 1970); se realizó observación microscópica (40 X) de la colonización micorrizica y se estimó la intensidad de micorrización (M %) (Trouvelot *et al.* 1986). En los tratamientos en que se registró germinación positiva, se determinó el contenido de P-Bray, pH y MO en las submuestras de suelo+arena.

Multiplificación de inóculos *Acaulospora longula* y *Glomus claroideum* en suelo fumigado

Se utilizaron los inóculos micorrizicos *Acaulospora longula* Spain & Schenck (BEG 8) y *Glomus claroideum* Schenck & Smith (BEG 31) que fueron proporcionados por la Banca Europea de Glomales (BEG LPA-INRA-Dijón, Francia). Según detalle de la BEG, la infectividad potencial media de cada inóculo (n=4) era: *A. longula*: 40 % M, y *G. claroideum*: 44 % M, con baja o nula presencia de esporas.

Cada inóculo fue homogenizado separadamente y conservado en frigorífico a 4 °C. Se extrajo una muestra de suelo (100 kg) del mismo lote de la

Tabla 1. Concentraciones de formaldehído en agua aplicadas a las muestras de suelo (150 g) extraídas de un Natralbol.

Table 1. Concentrations of water-formaldehyde solution supplied to soil samples (150 g) from a Natralbol.

Formaldehído	Agua	Concentración	
-----ml-----	-----	ul.g ⁻¹	%-----
5	25	33,33	16,67
4	26	26,67	13,33
3	27	20	10
2	28	13,33	6,67
1,5	28,5	10	5
1	29	6,67	3,33
0,5	29,5	3,33	1,67
0,25	29,75	1,67	0,83
0,125	29,875	0,83	0,42
0,065	29,935	0,43	0,22
0	30	0	0

Experiencia 1. La muestra fue tratada y fumigada en submuestras de 20 kg empleando la concentración determinada como adecuada en la Experiencia 1. La inoculación se inició 30 días después de la aplicación de formaldehído a la muestra de suelo. Se llenaron 50 macetas de 2 kg de suelo fumigado+arena y se colocaron 5 g de inóculo a 5 cm de la base y otros 5 g a 5 cm de la superficie de la maceta. Además, se contó con cuatro macetas con suelo fumigado+arena sin inocular. Se sembraron semillas de maíz (*Zea mays*, 4 semillas/maceta) y trébol (*Trifolium repens*, 15 semillas/maceta), las que fueron mantenidas en invernáculo (11 °C-30 °C, humedad relativa 40-100%, radiación solar $7.8 \pm 1.1 \text{ MJ m}^{-2} \text{ día}^{-1}$) y regadas día por medio con agua destilada. Transcurridas ocho semanas se cortó la parte aérea. El sustrato con raíces fue disgregado, las raíces fueron cortadas en segmentos de 1 cm y todo el material fue secado al aire (10 días, 10 °C, en oscuridad). Se realizó la cuantificación de la M (%) para cada cepa inoculada y se verificó la presencia de esporas. Cada inóculo (suelo inoculado+raíces de maíz y trébol) fue almacenado separadamente en bolsas de polietileno negro y conservado en frigorífico (4 °C) hasta su utilización. Posteriormente, se repitió un nuevo ciclo de multiplicación de inóculos de manera similar a lo detallado anteriormente.

Crecimiento y micorrización de agropiro y festuca en suelo fumigado, inoculado con *G.claroideum*

Se utilizó una muestra (100 kg) del horizonte superficial de suelo del mismo lote de la Experiencia 1 extraída en septiembre de 2001, la cual fue tamizada (2 cm), homogenizada y los restos de material vegetal extraídos. Por una parte se evaluó la aplicación o no de formaldehído a la muestra de suelo. Por otra parte, se evaluó la inoculación o no con *G.claroideum* para una muestra de suelo fumigada. La aplicación de formaldehído se realizó un mes antes de la siembra en submuestras de 20 kg, a la concentración estipulada como adecuada de acuerdo a la Experiencia 1. El sustrato que no recibió formaldehído fue manipulado de manera similar al que fue fumigado. Semillas de agropiro y festuca (30 semillas/maceta) fueron sembradas separadamente en macetas de 1 kg con suelo fumigado o no+arena (1:1 p:p) y dispuestas en bloques con tres repeticiones. La inoculación se realizó a la siembra, el inóculo consistió en el material propagado durante la Experiencia 2: suelo fumigado+arena, raíces de maíz y trébol infectadas con *G.claroideum* y esporas. Para la inoculación, se colocaron 80 g de inóculo a 5 cm de la base y otros 80 g a 5 cm de la superficie de la maceta. Diez días después de la siembra se registró una emergencia media del 85%. A los efectos de que las plantas crecieran sin deficiencias nutricionales, todas las macetas fueron fertilizadas

a la siembra con 0.45 g roca fosfato/maceta y 0.57 g urea/maceta; a los 40 DDE se refertilizó con roca fosfato y urea al 50% de la dosis inicial; y a los 90 y 120 DDE se aplicaron 0.15 g $\text{SO}_2(\text{NH}_4)_2$ /maceta en solución acuosa. Las macetas fueron mantenidas a la intemperie elevadas a 80 cm del suelo y bajo un techo de policarbonato que interceptaba el 49 % de la radiación solar. Día por medio todas las macetas fueron regadas con 100 ml de agua destilada. Cada 20 días las macetas eran rotadas por bloques. A los 150 DDE se finalizó el período experimental. Se cuantificó la producción de materia seca aérea (MSA) por gravimetría. Del material vegetal total se extrajeron 20 hojas totalmente expandidas, se cuantificó el área foliar (AF) con un Licor Area Meter, el largo foliar (LH) y la MSH. Las raíces fueron extraídas, lavadas con agua para la eliminación total del suelo. Se cuantificó la producción de materia seca de raíces (MSR) y se estimó la M (%) así como el contenido de arbusculos (Trouvelot *et al.* 1986).

Análisis de los resultados

Se calcularon los promedios y los desvíos estándar de los resultados obtenidos en los Experimentos 1 y 2. Los resultados del experimento 3 fueron analizado mediante ANOVA, cuando las diferencias entre medias fue significativa ($P=0,05$), estas fueron separadas mediante las mínimas diferencias significativas (DMS).

RESULTADOS

Dosis de formol

Las semillas expuestas a los sustratos fumigados a concentraciones de formaldehído mayores de 10 ml.g^{-1} no germinaron (Tabla 2), probablemente debido a la toxicidad del producto en el suelo. A partir de las concentraciones menores o iguales a 10 ml.g^{-1} , el porcentaje de germinación de agropiro y festuca superó el 86 % y no difirió ($P \leq 0,05$) entre tratamientos. Para ambas especies no se determinaron diferencias en el peso/hoja para las concentraciones menores o iguales a 10 ml.g^{-1} . Las muestras de suelo en las que se registró crecimiento vegetal no difirieron en cuanto al contenido de P-Bray, pH y MO. Sin embargo, se detectaron incrementos en el contenido de P-Bray y MO en todas las muestras tratadas con concentraciones menores o iguales a 10 ml.g^{-1} , incluyendo el testigo sin fumigar, en relación a la muestra de suelo extraída del campo.

No se registró infección MA para las plantas crecidas en sustratos con concentraciones de formaldehído 10 ml.g^{-1} y las dos inferiores (Tabla 2). En las que crecieron en

Tabla 2. Porcentaje de germinación, peso de hojas (MSH), intensidad de micorrización nativa (M%) en agropiro y festuca a los 50 días después de la emergencia en muestras de suelo con distintas dosis de formaldehído. Contenido de P-Bray, pH y materia orgánica (MO) en suelo donde germinaron las plantas.
 Table 2. Germination percentage, leaf dry matter (MSH), indigenous mycorrhizal intensity (M%) on wheatgrass and tall fescue at 50 days after emergence on soil samples with different rates of formaldehyde. Soil Bray-P, pH, organic matter (MO) content within plants germinated soil.

Concentración de formaldehído mg l ⁻¹	Germinación %		MSH mg hoja l ⁻¹		M %		P-Bray	pH	MO
	Agropiro	Festuca	Agropiro	Festuca	Agropiro	Festuca			
33,33	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
200,00	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
100	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13,33	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10	87 (±6)	86 (±6)	3,9 (±0,36)	2,3 (±0,40)	0	0	15,0 (±1,1)	5,9 (±0,6)	6,97 (±0,6)
6,67	87 (±6)	79 (±5)	4,8 (±0,40)	3,3 (±0,70)	0	0	16,6 (±1,2)	5,5 (±0,7)	7,10 (±0,7)
3,33	87 (±6)	84 (±5)	3,8 (±0,38)	3,7 (±0,60)	0	0	17,8 (±1,2)	6 (±0,7)	7,31 (±0,6)
1,67	95 (±7)	89 (±6)	4,5 (±0,43)	3,8 (±0,70)	0,2 (±0,01)	0,3 (±0,01)	15,6 (±1,1)	5,8 (±0,8)	6,97 (±0,7)
0,833	91 (±6)	90 (±4)	4,1 (±0,37)	3,6 (±0,60)	3,5 (±0,08)	3,5 (±0,08)	14,1 (±0,9)	5,3 (±0,7)	7,31 (±0,8)
0,22	89 (±4)	89 (±6)	4,5 (±0,36)	2,1 (±0,71)	6,8 (±0,17)	4,7 (±0,08)	13,6 (±1,2)	5,3 (±0,6)	7,10 (±0,6)
0	90 (±5)	93 (±7)	4,0 (±0,38)	2,7 (±0,66)	17,4 (±0,4)	17,1 (±0,6)	13,8 (±1,1)	5,4 (±0,6)	6,76 (±0,7)

Valores entre paréntesis corresponden a desvíos estándar. ND: no determinado.
 Values in parenthesis correspond to standard deviation . ND: not determined.

Tabla 3. Materia seca aérea (MSA), materia seca de hoja (MSH), largo de hoja (LH), área foliar (AF), materia seca radical (MSR) e intensidad de micorrización nativa (M) en agropiro y festuca a los 150 días después de la emergencia, en función de la aplicación o no de formaldehído 10 ml.g⁻¹ (Fumigado y NF, respectivamente).
 Table 3. Shoot dry matter (MSA), leaf dry matter (MSH), leaf length (LH), leaf area (AF), root dry matter (MSR) and indigenous mycorrhizal intensity (M) on wheat grass and tall fescue at 150 days after emergency, as a function of formaldehyde (10 ml.g⁻¹) supply or not (Fumigated and NF, respectively).

Espece	Suelo	MSA	MSH	LH	AF	MSR	M
		-----g-----	mg hoja ⁻¹	cm hoja ⁻¹	cm ² hoja ⁻¹	-----g-----	%-----
Agropiro	NF	2,92	29,3	40,7	6,06	0,8	9,1
	Fumigado	1,98	19,6	42,5	5,52	0,43	0
	DMS	1,26	7,9	11,56	2,57	0,41	5,9
Festuca	NF	1,6	24,9	27,4	5,23	0,19	8,33
	Fumigado	2,58	22,4	30,9	6,49	0,48	0
	DMS	1,79	17,6	6,42	2,31	0,19	5,3

DMS: mínima diferencia significativa ($P=0,05$)

DMS: least significant difference ($P=0,05$)

sustratos con la concentración de 1,67 ml.g⁻¹ y todas las inferiores, se detectó presencia de colonización micorrítica, la que fue incrementando a medida que la concentración de formaldehído aplicada al suelo disminuyó hasta ser nula. Por otra parte, cabe mencionar que en los tratamientos con concentración de 6,67 ml.g⁻¹ y las inferiores se observó, además, infección por otros hongos no micorríticos (no se observaron estructuras características de los hongos MA tales como arbusculos y vesículas, y además los hongos no presentaron la coloración azul característica luego de la tinción con azul tripán).

En síntesis, las plantas expuestas a sustratos fumigados a una concentración de 10 ml.g⁻¹ no han manifestados colonización fúngica alguna (micorrítica o no) ni depresiones de crecimiento. Por lo tanto, dicha concentración ha sido seleccionada para ser utilizada en las experiencias de multiplicación de inóculos y de respuesta de crecimiento por la inoculación.

Propagación de inóculos *A. longula* y *G.claroideum* en suelo formolizado

En cada ciclo de propagación de inóculos, la intensidad de micorrización incrementó. Luego del primer ciclo de propagación se cuantificó un 17,6 % ($\pm 0,6$) de M para *G. claroideum* y un 4,4 % ($\pm 0,2$) de M para *A. longula*. Luego del segundo ciclo de

propagación la M fue de 40.2 % ($\pm 1,8$) para *G. claroideum* y de 10.3 % ($\pm 0,5$) para *A. longula*. En ambos ciclos de propagación se verificó la presencia de esporas en el sustrato. Como era de esperar, las plantas que no fueron inoculadas no presentaron colonización micorrítica. Asimismo, tanto las plantas inoculadas como las que no, presentaron crecimiento similar (datos no mostrados). Para ambos inóculos se lograron grados de colonización inferiores a los reportados como de infectividad media en el inóculo original sin propagar.

Crecimiento y micorrización de agropiro y festuca inoculados con *G.claroideum*

La aplicación de formaldehído no afectó, en general, el crecimiento de agropiro y festuca (Tabla 3). Sin embargo, el peso por hoja fue mayor cuando no se aplicó formaldehído para agropiro, mientras que para festuca se obtuvo mayor MSR por la fumigación de la muestra de suelo. Cuando se procedió a la inoculación con *G.claroideum* de la muestra de suelo fumigada se obtuvieron, en general, los mayores crecimientos aéreos y de raíces (Tabla 4). En particular, el peso por hoja y la MSR fueron mayores en agropiro inoculado que en no inoculado y, para festuca, el incremento de crecimiento por la inoculación se manifestó significativamente en la producción de MSA y MSH.

La aplicación de formaldehído eliminó

Tabla 4. Materia seca aérea (MSA), materia seca de hoja (MSH), largo de hoja (LH), área foliar (AF), materia seca radical (MSR) e intensidad de micorrización (M) en agropiro y festuca por *Glomus claroideum* a los 150 días después de la emergencia, en función de la inoculación o no (*G. claroideum* y NI, respectivamente) en muestras de suelo fumigadas con formaldehído (10 ml.g⁻¹).

Table 4. Shoot dry matter (MSA), leaf dry matter (MSH), leaf length (LH), leaf area (AF), root dry matter (MSR) and mycorrhizal intensity of *Glomus claroideum* on wheat grass and tall fescue at 150 days after emergency, as a function of inoculation or uninoculation (*G. claroideum* and NI, respectively) within fumigated soil samples (10 ml.g⁻¹) with formaldehyde.

Especie	Inoculación	MSA	MSH	LH	AF	MSR	M
		-----g-----	mg hoja ⁻¹	-----cm hoja ⁻¹	cm ² hoja ⁻¹	-----g-----	%-----
Agropiro	NI	1,98	19,6	42,5	6,06	0,43	0
	<i>G.claroideum</i>	3,39	30	39,8	6,34	0,54	12,26
	DMS	1,53	8,24	6,68	5,46	0,06	0,57
Festuca	NI	2,58	22,4	30,9	6,49	0,48	0
	<i>G.claroideum</i>	4,95	35,5	34,8	3,64	0,57	30,73
	DMS	1,8	12,04	12,15	5,48	0,16	4,8

DMS: mínima diferencia significativa ($P= 0,05$)

DMS: least significant difference ($P= 0,05$)

la micorrización nativa en agropiro y festuca (Tablas 3 y 4), la que no se restableció hasta el final de la experiencia. Sin embargo, permitió el desarrollo de la micorrización resultante de la posterior inoculación con *G.claroideum* en ambas especies (Tabla 4). El grado de micorrización cuantificado luego de la inoculación alcanzó el 30 % en festuca, el que fue tres veces mayor que el registrado para las dos especies micorrizadas con las poblaciones MA nativas (Tabla 3), o para las de agropiro inoculadas con *G.claroideum* (Tabla 4). El contenido de arbuscúlos fue bajo en todos los casos (datos no mostrados). No superó el 5 % para las plantas de agropiro micorrizadas con las poblaciones MA nativas y con *G.claroideum*. Para festuca, si bien no superó el 5 % cuando fue micorrizada con las MA nativas, alcanzó el 15% cuando lo fue con *G.claroideum*.

DISCUSION

La fumigación con formaldehído a concentraciones entre 0-10 ul.g⁻¹ no afectó el contenido de P-Bray, pH y MO de la muestra de suelo extraída de un Natralbol representativo del sudeste bonaerense, y permitió además el regular crecimiento vegetal. Se detectaron incrementos en el contenido de P-Bray y MO en todas las muestras tratadas en relación a las

concentraciones iniciales del suelo a campo. Esto podría atribuirse al manipuleo del suelo para su fumigación, independientemente de la concentración aplicada, es decir, sea agregado o no. Para lograr el adecuado uso de los fumigantes hay que tener que su acción no es extensiva de manera similar a todos los tipos de suelos (Worf 1990). La MO y la arcilla actúan, en general, atrapando el producto aplicado, detectándose que a mayor contenido de ambas, el suelo responde menos al producto. Por esta razón, es necesario ajustar la dosis y tiempos de exposición a al tipo de suelo a esterilizar. Por otra parte, se han reportado efectos tóxicos de la aplicación de formaldehído sobre algunos miembros de las coles. El tiempo transcurrido entre la fumigación y la siembra, llamado también 'tiempo de aireación', afecta el crecimiento vegetal, y no debe ser inferior, por lo general, a dos semanas (Worf 1990). Para el Natralbol en estudio, se ha puesto de manifiesto que la aplicación de formaldehído a razón de 0-10 ul.g sustrato⁻¹, y con un período de aireación superior a quince días, no ha incidido sobre el regular crecimiento de agropiro y festuca.

La aplicaciones de formaldehído a concentraciones entre 3,33-10 ul.g⁻¹, eliminaron efectivamente los hongos MA nativos ca-

paces de formar micorrizas. Sin embargo, en concentraciones menores a 10 ul.g^{-1} , la colonización por hongos no micorríticos podría incidir en las actividades metabólicas del vegetal. Además, podrían interferir en el desarrollo de hongos MA resultado de posteriores inoculaciones. Al respecto, se ha reportado que el formaldehído aplicado en suelos sin disturbar no es totalmente efectivo para combatir la enfermedad del trigo producida por el hongo *Tilletia indica* (Smilanick, Prescott 1986). Esto ha sido atribuido a la baja penetración del producto en el suelo, la que no supera los 10 cm del perfil. Como se ha puesto de manifiesto en este trabajo, la fumigación con formaldehído a 10 ul.g^{-1} fue efectiva para la eliminación de los hongos MA como no-MA nativos, cuando la aplicación se realizó en muestras de suelo, dado que su manipulación favoreció el adecuado contacto entre el químico y el sustrato.

La aplicación de formaldehído al sustrato a una concentración de 10 ul.g^{-1} no impidió la multiplicación de los hongos *A.longula* y *G.claroideum* inoculados en la muestra fumigada. Para las plantas inoculadas con ambas cepas, se lograron grados de micorrización inferiores a los reportados como infectividad media en el inóculo original sin propagar. Sin embargo, esto podría atribuirse a la baja o nula presencia de esporas, y no a la aplicación del formaldehído. Es probable que posteriores multiplicaciones favorezcan el incremento de la infectividad potencial y contenido de esporas en ambos inóculos. Por último, la fumigación del suelo puso en evidencia el beneficio neto de la micorrización con *G.claroideum*. Aunque deberían ajustarse las condiciones de fumigación a cada situación, su empleo podría permitir el manejo de los hongos MA, es decir la propagación de inóculos a efectos de incrementar el crecimiento de las plantas.

En síntesis, las experiencias presentadas ponen de manifiesto que mediante la fumigación con formaldehído (10 ul.g^{-1}) de muestras de suelo extraídas de un Natralbol, es factible eliminar del suelo las poblaciones MA establecidas, sin afectar negativamente el crecimiento de las plantas, el desarrollo y la expresión de la micorrización resultado de la inoculación. Sin embargo, no hay que dejar de considerar que, para lograr la eliminación de los

hongos MA, el producto provoca alteraciones en el equilibrio suelo-microorganismos-planta. Por esta razón, es necesario realizar estudios tendientes a evaluar el impacto de la aplicación de formaldehído sobre otras poblaciones microbianas y propiedades del suelo, con el objetivo de evitar su deterioro.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto 15/A107 de la FCA UNMP, y corresponde a parte de la tesis de Doctor en Ciencias Agrarias (FCA-UNMP) en realización de F. Covacevich. Los autores agradecen a Vivienne Gianinazzi-Pearson (BEG LPA-INRA-Dijón, Francia) por proporcionar los inóculos MA.

REFERENCIAS

- Bray RH, Kurtz LT. 1945. Determination of total, organic and available form of phosphorus in soil. *Soil Sci.* 59:360-361.
- Cawse PA. 1975. Microbiology and biochemistry of irradiated soils. En: *Soil Biochemistry*. Vol. 3. Paul EA, McLaren AD (eds). Marcel Dekker, New York.
- Covacevich F. 1998. Tesis Magister Scientiae: El rol del fósforo como regulador de la infección micorrítica y efecto de esta sobre el crecimiento del trigo. En: *Biblioteca FCA; UNMDP Balcarce* 88 pp.
- Eno CF, Popenoe H. 1964. Gamma radiation compared with steam and methyl bromide as a soil sterilizing agent. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 28:533-535.
- Frey B, Schuepp H. 1993. Acquisition of nitrogen by external hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Zea mays* L. *New Phytol.* 124:221-230.
- Gianinazzi S, Trouvelot A, Gianinazzi-Pearson V. 1990. Role and use of mycorrhizas in horticultural crop production. En: *XXIII International Horticulture Congress I.S.H.S.* Firenze, Italy. pp 25-30.
- Joslyn L 1983. Sterilization by heat. En: *Disinfection, sterilization, and preservation*. Block SS (ed). 3 ° ed. Lea, Febiger Philadelphia.
- Oba H, Tawaraya K, Wagatsuma T. 2001. Arbuscular mycorrhizal colonization in *Lupinus* and related genera. *Soil Sci. Plant Nutr.* 47: 685-694.
- Paul ND, Ayres PG, Wyness LE. 1989. On the use of fungicides for experimentation in natural vegetation. *Funct. Ecol.* 3: 79-769.
- Pedersen CT, Sylvia DM. 1997. Limitations to using benomyl in evaluation mycorrhizal functioning. *Biol. Fertil. Soils* 25:163-168

- Pfleger FL, Linderman RG. 1996. Mycorrhizae and plant health, 2nd edn. APS Press, USA.
- Phillips JM, Hayman DS. 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
- Schweiger PF, Jakobsen I. 1999. Direct measurement of arbuscular mycorrhizal phosphorus uptake into field-grown winter wheat. *Agron. J.* 91:998-1002.
- Skisak CM. 1983. Formaldehyde vapors exposures in anatomy laboratories. *Am. Ind. Hyg. Assoc.* 144: 948-950.
- Smilanick JL, Prescott JM. 1986. Effect of soil fumigation with methyl bromide, metham and formaldehyde on germination of teliospores of *Tilletia indica*. *Phytopathology* 76:1060.
- Taylor J, Harrier L. 2000. A comparison of nine species of arbuscular mycorrhizal fungi on the development and nutrition of micropropagated *Rubus idaeus* L. cv. Glen Prosen (Red Raspberry). *Plant and Soil* 225: 53-61.
- 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: Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (eds) *Physiological and genetical aspects of mycorrhiza*. INRA, Paris. pp 101-109.
- Walkey A. 1947. A critical examination of rapid method for determining organic carbon in soils – effect of variations in digestion condition an of inorganic soil constituents. *Soil Sci* 63:251-264.
- Wilson GW, Hartnett DC, Smith MD, Kobberman K. 2001. Effects of mycorrhizae on growth and demography of tallgrass prairie forbs. *Am. J. Bot.* 88:1452-1457.
- Wolf DC, Dao TH, Scott HD, Lavy TL. 1989. Influence of sterilization methods on selected soil microbiological, physical, and chemical properties. *J. Environ. Qual.* 18:39-44.
- Wolf DC, Skipper HD. 1994. Soil Sterilization. En: *Methods of Soil Analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*. SSSA Book Series. pp. 41-51.
- Worf GL 1990. Selecting and using chemical fumigants and soil sterilants for ornamental diseases control. En: *Urban Fitonarian Series*. Agricultural Bulletin, Madison, Wisconsin. 4 pp.