

Bioproceso reductor de la solubilidad del Cadmio rizosférico

Producto 2: Nota Técnica 1 -Manual de técnicas para el estudio y aislamiento de endófitos de raíz de cacao

Pablo M. Calzada, Vanesa A. Silvani, Sofía Utge Perri, Roxana P. Colombo, Alicia M. Godeas

2024



.UBA
Universidad de
Buenos Aires



FONTAGRO

I B B E A



Códigos JEL: Q16

FONTAGRO (Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria) es un mecanismo único de cooperación técnica entre países de América Latina, el Caribe y España, que promueve la competitividad y la seguridad alimentaria. Las opiniones expresadas en esta publicación son de los autores y no necesariamente reflejan el punto de vista del Banco Interamericano de Desarrollo (BID), del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), FONTAGRO, de sus Directorios Ejecutivos ni de los países que representan.

El presente documento ha sido preparado por el Lic. Pablo M. Calzada, Dra. Vanesa A. Silvani, Lic. Sofía Utge Perri, Dra. Roxana P. Colombo y Dra. Alicia M. Godeas.

Copyright © 2024 Banco Interamericano de Desarrollo. Esta obra se encuentra sujeta a una licencia Creative Commons IGO 3.0 Reconocimiento-NoComercial- SinObrasDerivadas (CC-IGO 3.0 BY-NC-ND) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/igo/legalcode>) y puede ser reproducida para cualquier uso no comercial otorgando el reconocimiento respectivo al BID. No se permiten obras derivadas. Cualquier disputa relacionada con el uso de las obras del BID que no pueda resolverse amistosamente se someterá a arbitraje de conformidad con las reglas de la CNUDMI (UNCITRAL). El uso del nombre del BID para cualquier fin distinto al reconocimiento respectivo y el uso del logotipo del BID no están autorizados por esta licencia CC-IGO y requieren de un acuerdo de licencia adicional. Note que el enlace URL incluye términos y condiciones adicionales de esta licencia.

Esta publicación puede solicitarse a:

FONTAGRO

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org

www.fontagro.org





RESUMEN

En el Proyecto titulado “Bioproceso reductor de la solubilidad de cadmio rizoanférico” se realiza una capacitación a distintos niveles sobre métodos de estudio de hongos formadores de micorrizas arbusculares (MA) para su aplicación en el bioproceso reductor de la solubilidad de cadmio rizoanférico. Esta nota técnica presenta una guía de métodos, específicamente modificados para el estudio, aislamiento y propagación de hongos MA a partir de suelos de plantaciones de cacao, en condiciones puras y viables. A su vez, se detallan las metodologías para la medición de parámetros edáficos (humedad del suelo, pH y carbono total), que complementan los parámetros biológicos y que son indicadores de la calidad del suelo. La presente guía se utilizó para la capacitación de estudiantes y personal técnico que participaron y participarán en los distintos ensayos a escalas TRL4 y TRL6. Además, se detallan las metodologías empleadas para la propagación *in vivo* de hongos MA que actúan como inoculante microbiano, paso determinante a efectos del escalamiento en los distintos niveles de maduración del producto.



ABSTRACT

In the Project entitled 'Bioprocess that reduces the solubility of rhizospheric cadmium' training is carried out at different levels, about the study methods of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi for their application in the bioprocess that reduces the solubility of rhizospheric cadmium. This technical note presents a guide of specifically modified methods for the study, isolation and propagation of AM fungi from cocoa plantation soils, under pure and viable conditions. In turn, the methodologies for measuring edaphic parameters (soil moisture, pH and total carbon) are detailed, which complement the biological parameters and are indicators of soil quality. The guide was used for the training of students and technical personnel who participated and will participate in the different assays at TRL4 and TRL6 scales. In addition, the methodologies used for the *in vivo* propagation of this microbial inoculant are detailed, a determining step for the purposes of scaling up the different levels of product maturation.



INTRODUCCIÓN

El empoderamiento del mercado latinoamericano de cacao Nacional fino de aroma se ha visto limitado por los altos contenidos de cadmio (Cd) en las almendras. En el proyecto titulado: Bioproceso reductor de la solubilidad de cadmio rizosférico, seleccionado en la convocatoria de Fontagro 2020 (ID 401), se propone un bioproceso innovador, eficiente y climáticamente inteligente para reducir la bioacumulación del Cd, acompañado por un protocolo de aplicación en territorio. El bioproceso implicará: (a) el aislamiento de un consorcio de hongos nativos de suelos en plantaciones de cacao, capaces de disminuir el coeficiente de bioacumulación y el factor de translocación del Cd; (b) la validación del bioproceso en biorreactores y el escalamiento a Niveles de Maduración Tecnológica (TRL) 6 y 7 a fincas de cacao de agricultores familiares. Las micorrizas arbusculares (MA) son asociaciones simbióticas establecidas entre las raíces de la mayoría de las plantas terrestres y ciertos hongos del suelo del filo Glomeromycota, entre esas especies vegetales, el cacao resulta ser una especie altamente micotrófica.

Los estudios biológicos de los hongos MA son difíciles debido a su naturaleza biotrófica obligada, es decir, no pueden completar su ciclo de vida en ausencia de una planta huésped. Por lo que resulta necesario para su aislamiento y reproducción, el establecimiento de cultivos con plantas hospedantes, tanto en condiciones *in vivo* (bajo invernadero) como *in vitro* (como por ejemplo mediante el uso de raíces transformadas). En particular, el uso de cultivos *in vitro* de raíces transformadas como huésped adecuado permite el establecimiento de la simbiosis y la formación de miles de esporas viables y abundante micelio extrarradical, asegurando la monoespecificidad del inóculo y la ausencia de microorganismos indeseables. Sin embargo, para obtener cultivos *in vitro* es necesario partir de inóculo viable producido en un cultivo trampa (en condiciones *in vivo*), ya que el aislamiento directo a partir de propágulos aislados del suelo e inoculación en raíces transformadas resulta poco eficiente, debido al estado de los propágulos inviables, dañados o parasitados hallados en el suelo. Por lo tanto, esta etapa inicial de armado de cultivos trampa es esencial para alcanzar el objetivo final de obtener inóculo puro y viable de estos hongos mediante



el cultivo *in vitro*. Por otro lado, muchas especies de hongos MA no son capaces de reproducirse en condiciones *in vitro*, por lo que es necesario reproducir esos hongos en condiciones *in vivo*, mediante la preparación de cultivos monospóricos. Estos cultivos *in vivo* son iniciados a partir de una espora de hongo MA aislada de una muestra de suelo, y asociada a una planta hospedante mantenida en condiciones controladas de invernadero. Asimismo, el análisis de la diversidad de especies presentes en el suelo permite identificar el método de cultivo adecuado para su aislamiento y propagación, por lo que conocer la metodología básica para el reconocimiento de estructuras de estos hongos es sumamente importante.

El Banco de Glomeromycota In vitro (BGIV), que funciona en el Laboratorio de Microbiología del Suelo (IBBEA, CONICET-UBA) nos permite conservar y documentar cepas de hongos MA aisladas de diversas áreas naturales y agrícolas proporcionando germoplasma de alta calidad y libre de contaminantes para sectores científicos e industriales. El aislamiento de nuevas cepas, como aquellas provenientes de plantaciones de cacao, su propagación *in vivo* e *in vitro* y la obtención de inóculo viable, requieren de un manejo de técnicas variadas y específicas y, por lo tanto, de la formación de profesionales capaces del manejo de este tipo de metodologías. A su vez, las técnicas deben modificarse acorde al hospedante vegetal y las especies de hongos MA involucradas. Conocer las metodologías involucradas en cada etapa es sumamente importante para alcanzar los objetivos planteados. Desde el inicio del proyecto Fontagro 2022 (ID 401), estas técnicas clásicas para el estudio de hongos MA fueron puestas a punto para optimizar y adecuar según el material biológico del cual partimos (raíces de plantas de cacao, hongos MA y el suelo a ellas asociado).

Objetivos

El objetivo de esta nota técnica es presentar una guía de métodos, específicamente modificadas, para el estudio, aislamiento y propagación de hongos MA a partir de suelos de plantaciones de cacao, en condiciones puras y viables. La misma se utilizó para la capacitación de estudiantes y personal técnico que participaron y participarán en los distintos ensayos a diferentes escalas



(TRL4, TRL6 y TRL7) en el marco de la obtención de un bioproceso reductor de Cd.

PALABRAS CLAVE

CAPACITACIÓN- ENDOFITOS – CACAO – TINCIÓN DE RAÍZ – AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS – PROPAGACIÓN DE INÓCULO

TÉCNICAS DE TINCIÓN

La técnica clásica de tinción de raíces colonizadas y la observación de estructuras fúngicas así como la cuantificación de la micorrización intra-radical consiste de tres pasos básicos (Phillips y Hayman, 1970): 1) El vaciamiento del contenido celular y despigmentación de las raíces (KOH 10%, 10 min, 90°C), 2) la acidificación del pH (HCl 0.1N, 3 min), y 3) la tinción con colorante específico (Azul de Trypan 10%, 10 min, 90°C). Sin embargo, para la posible observación de estructuras de hongos MA en raíces de cacao, cuyo grosor y pigmentación es considerable, se requiere de modificaciones en la técnica para un adecuado vaciamiento y clarificación. Por ello, se utilizó la técnica presentada por Muñoz-Márquez y colaboradores (2009), con modificaciones:

Metodología propuesta para raíces de cacao

- Vaciamiento del contenido celular y clarificación:

1) Lavar con abundante agua las raíces de cacao a teñir, eliminando cualquier partícula de suelo o sustrato adherida a la superficie.

2) Colocar en un tubo de ensayo, cubrir con KOH (10 %), y dejar actuar por 24 hs a temperatura ambiente o a 90°C (en baño térmico) durante 10 minutos.

3) Transcurrido el tiempo, eliminar el KOH usado (el KOH debe ser descartado apropiadamente por ser un residuo peligroso), y reemplazar por una alícuota de KOH nuevo.

4) Repetir el paso 3) hasta un total de 5 veces.

5) Retirar el KOH usado, y enjuagar con abundante agua.

6) Sumergir las raíces en una solución de H₂O₂ (10 %) por 1 a 3 min. a temperatura ambiente, o hasta que se observe decoloración de las mismas sin destrucción del tejido.

- Acidificación de las raíces:

7) Cubrir con HCl (0.1N), y dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente.

8) Retirar el HCl y enjuagar con agua corriente.

- Coloración con Azul Trypan:

9) Cubrir las raíces con Azul de Trypan en ácido láctico (0.05 %), y llevar a 90°C (en baño térmico) durante 10 minutos, retirar y dejar enfriar a temperatura ambiente. También se puede realizar la tinción a temperatura ambiente dejando el material en contacto con el colorante durante 24 horas.

10) Retirar el colorante (el Azul de Trypan debe ser descartado apropiadamente por ser un residuo peligroso, o bien, puede ser reutilizado mediante su almacenaje en envase de vidrio oscuro), enjuagar las raíces con abundante agua, y conservar en ácido láctico hasta su observación.

11) Colocar segmentos de raíz (3 a 5 cm) en un portaobjeto, y cubrir con un cubreobjeto. Observar en microscopio binocular a diferentes aumentos (200X y 400X) para distinguir las estructuras típicas de la colonización micorrícica arbuscular, como hifas, arbuscúlos, vesículas, esporas y/o enrollamientos hifales) (Fig.1).

La cuantificación de la micorrización se realiza según McGonigle et al. (1990).

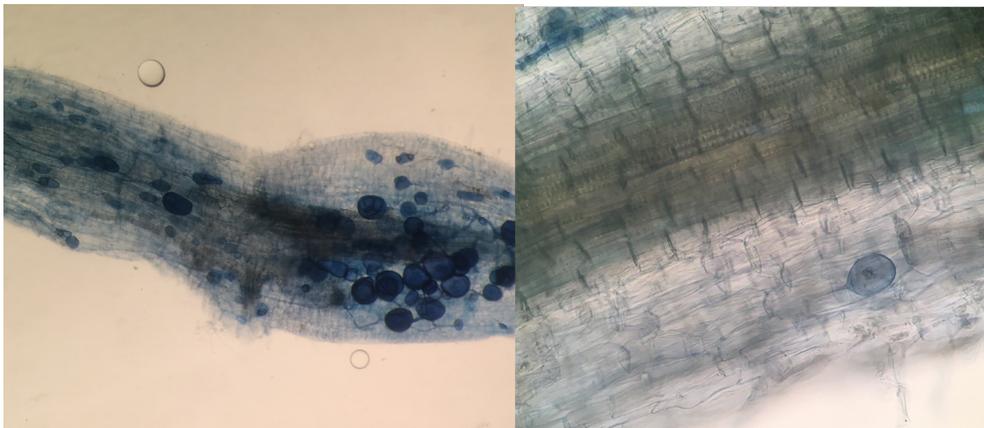


Figura 1. Raíces de cacao teñidas con la metodología propuesta. Las estructuras micorrícicas intrarradicales se reconocen por su coloración azul.

TÉCNICAS DE AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN

Aislamiento de propágulos de hongos MA

Con el fin de recuperar y observar las estructuras extra-radicales de los hongos MA presentes en los suelos asociados a cultivos de cacao para su identificación y aislamiento, se utilizó el método de tamizado húmedo y decantación (Gerdermann y Nicolson, 1963), el cuál se describe a continuación:

- 1) Suspender una alícuota de suelo equivalente a 10 g de peso seco en 500 ml de agua corriente y agitar para la ruptura de los agregados.
- 2) Pasar la suspensión a través de un set de tamices de diferentes tamaños de mallas (875 μm , 250 μm y 50 μm) (Fig. 2 a).
- 3) Recoger el contenido de los últimos tamices y transferirlo a una placa de conteo con anillos concéntricos (Fig. 2 b).
- 4) Seleccionar las esporas de aspecto “saludable” (paredes sanas y contenido citoplasmático) (Fig. 3), y aislarlas bajo lupa binocular con la ayuda de una micropipeta. Dichas esporas serán utilizadas para su identificación, o bien, para iniciar cultivos monospóricos.



Figura 2. Set de tamices y placa de anillos concéntricos para aislamiento y conteo de esporas.

Caracterización morfológica e identificación de los hongos MA



Para la identificación de especies de hongos MA se observan los caracteres morfológicos de las esporas a nivel microscópico. Para ello: 1) montar las esporas recuperadas por tamizado del suelo, y 2) fijarlas en el portaobjeto con polivinil alcohol lactoglicerol (PVLG) y/o una mezcla de PVLG y reactivo de Melzer (1:1). Luego, 3) observar bajo microscopio binocular, y tener en cuenta los siguientes aspectos de las esporas para su correcta identificación (Fig. 3):

- Determinar si las esporas son solitarias o se encuentran formando agregados.
- Color de la espora inmersas en agua o PVLG iluminadas bajo luz constante de fibras ópticas en lupa binocular.
- Morfología de las hifas sustentoras.
- Diámetro de las esporas, utilizando micrómetro ocular bajo microscopio.
- Subestructuras de las paredes de esporas: observación del número de capas, el color de cada una, su reacción en reactivo de Melzer y la presencia de ornamentaciones e indicios de germinación.

Teniendo en cuenta estas características de las esporas, la clasificación taxonómica se realiza según las descripciones pertinentes del Filo Glomeromycota, y los aislamientos de referencia descritos en la página web del Prof. Błaszowski J. (<http://www.agro.ar.szczecin.pl/~jblaszkowski/>) y en el INVAM (International Culture Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi) (<http://invam.caf.wvu.edu>).





Figura 3. Esporas de hongos MA con diferentes características morfológicas aisladas de suelos de plantaciones de cacao.

TÉCNICAS DE PROPAGACIÓN

Cultivos trampa

El establecimiento de cultivos trampa tiene el objetivo de propagar especies de hongos MA presentes en las muestras de suelo, incluyendo aquellas que al momento del muestreo no se encontraban esporuladas, y obtener inóculo nuevo y viable. Además, la obtención de nuevas esporas ayuda a la identificación de las especies dado que se encuentran en mejor estado y se pueden reconocer las estructuras con mayor facilidad. Para ello, se preparan cultivos utilizando plantas hospedantes como lechuga, tomate, puerro, arveja, lino, trébol ó maíz, creciendo en macetas conteniendo sustratos estériles mezclados con la muestra de suelo que se quiere estudiar. Las macetas se rellenan con la mezcla estéril de sustrato compuesto por suelo:perlita:vermiculita (1:1:1, v/v/v). La esterilización de este sustrato se realiza por tinalización (100 °C por 1 h, 3 días consecutivos). En cada maceta se agrega una alícuota del correspondiente suelo tomado de la rizósfera de una planta de cacao, conteniendo inóculo de hongos MA (micelio, esporas y fragmentos de raíces colonizados), y se siembran semillas germinadas de algunos de los hospedantes mencionados. Las plantas se mantienen en invernadero regándose por capilaridad.

A los 2, 4 y 6 meses se toman al azar raíces de cada cultivo trampa, y se tiñen (como se describió anteriormente) para observar la micorrización. Además, a partir de muestras de suelo se recuperan esporas mediante la técnica de tamizado húmedo (descrita anteriormente) (Fig. 4) para su identificación y/o armado de cultivos monospóricos.

Cultivos monospóricos

Los cultivos monospóricos son cultivos iniciados a partir de una única espora viable de hongo MA,



se realizan con el fin de obtener inóculo puro de esa cepa en particular (Fig. 4). Para obtener este tipo de cultivos se siguen los siguientes pasos:

- Esterilizar superficialmente semillas de tomate mediante una solución de hipoclorito de sodio al 6%, y ponerlas a germinar en placa de Petri sobre papel de filtro humedecido con agua destilada, previamente esterilizada.
- Rellenar bandejas de germinación con sustrato tinalizado de suelo:perlita:vermiculita (1:1:1).
- Sembrar una semilla germinada por pocillo, y cultivar por 10 días en condiciones de invernadero.
- Luego de 10 días, aislar esporas de aspecto saludable de la muestra de suelo original colectada de las plantaciones de cacao o de las macetas correspondientes a los cultivos trampa .
- Tomar una plántula de tomate e inocular inmediatamente una espora sobre su raíz, volver a colocarla en el pocillo con el sustrato estéril.
- Cubrir con más sustrato esteril
- Al cabo de 2 meses, controlar la micorrización de las plantas de tomate mediante la tinción de una porción de sus raíces, y una vez corroborada la micorrización, transferir el cultivo monoespecífico a una maceta de 500 mL relleno con sustrato estéril.



Figura 4. Cultivos trampa con plantas de lechuga como hospedante y suelo de plantaciones de cacao, y cultivos monospóricos con plantines de tomate inoculados con una espora.

ESTIMACIÓN DE HUMEDAD DEL SUELO

La cantidad de agua del suelo puede afectar fuertemente la actividad microbiana y la movilidad de nutrientes y otros metales pesados. La metodología para determinar la humedad del suelo se describe a continuación:

- Pesar un trozo de papel aluminio, rotular, y registrar su peso.
- Sin quitar el papel de la balanza, tarar y pesar aproximadamente dos gramos de muestra de suelo, cerrar el papel sobre la muestra formando un sobre y registrar su peso.
- Llevar a estufa en 105°C hasta peso constante.
- Pesar el sobre (aluminio + muestra) y calcular por diferencia de peso el % de humedad presente según la siguiente fórmula:

Porcentaje de humedad: $((\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}) / \text{Peso seco}) \times 100$

Las cuantificaciones deben realizarse con al menos tres réplicas y obtener el valor promedio.



DETERMINACIÓN DEL PH DEL SUELO

El valor de pH de un suelo es un indicador de la acidez o alcalinidad, e influye en la disponibilidad de nutrientes y metales pesados, así como sobre el desarrollo de los microorganismos, por lo que es importante determinar dicho parámetro en los suelos bajo estudio. La metodología para determinar el pH del suelo se describe a continuación:

- Dejar secar el suelo
- Tamizar el suelo con tamiz menor de 2 mm.
- Pesar 10 gr. de suelo y colocarlo en un vaso de precipitado (por triplicado).
- Agregar aproximadamente 25 ml de agua destilada y agitar por 15 segundos cada 5 minutos, 3 veces.
- Dejar reposar 1 hora, y medir el pH utilizando tiras colorimétricas o pHmetro. Obtener el valor promedio del pH.

DETERMINACIÓN DEL CARBONO TOTAL DEL SUELO

El Carbono total del suelo es un indicador importante de la calidad del suelo, tanto en sus funciones agrícolas como ambientales. Es un indicador del secuestro de Carbono (y la disminución de GEIs), la actividad y diversidad biológica, y cumple un rol importante en la interacción con metales pesados, como el Cd. La metodología para determinar el contenido total de Carbono del suelo se describe a continuación:

- Pesar un crisol de porcelana y registrar su peso.
- Llevar a peso seco constante la muestra de suelo, y registrar su peso seco.
- Colocar en el crisol la muestra de suelo seca, y pesar nuevamente la muestra más el crisol (a diferencia de la metodología para estimar la humedad del suelo, en este caso no hay que tarar la



balanza luego de pesar el crisol).

- Colocar los crisoles en una mufla, y calcinar a 700 °C.
- Pesar las cenizas obtenidas y descontar al peso anterior.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bohn H, Mc Neal B, O' Connor G (1993). *Química de suelos*. Editorial Limusa.

Gerdermann J, Nicolson T (1963). "Spores of mycorrhizal endogone species extracted from the soil by wet sieving and decanting". *Trans Br Mycol Soc* 46, 235-244,

McGonigle TP, Miller MH, Evans DG, Fairchild, GL, Swan JA (1990). "A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular—arbuscular mycorrhizal fungi". *New Phytologist* 115: 495-501.

Muñoz-Márquez E, Macías-López , Franco-Ramírez A, Sánchez-Chávez E, Jiménez-Castro J, González-García J. (2009) "Identificación y colonización natural de hongos micorrízicos arbusculares en Nogal". *Terra Latinoamericana* 27(4), 355-361

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.

INSTITUCIONES PARTICIPANTES



FONTAGRO



.UBA
Universidad de
Buenos Aires



I B B E A

Secretaría Técnica Administrativa



Con el apoyo de:



www.fontagro.org

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org