

CIAT  
QK  
604  
.55  
C.2

MANUAL DE METODOS PARA LA INVESTIGACION DE LA  
MICORRIZA VESICULO - ARBUSCULAR EN EL LABORATORIO

Ewald Sieverding

Centro Internacional de Agricultura Tropical

CIAT

Proyecto Micorriza

Apartado Aéreo 6713, Cali, Colombia

Septiembre, 1983

CIAT  
BIBLIOTECA  
18 NOV. 1985  
60007



6670

1. PROLOGO E INTRODUCCION
2. MUESTREO DE RAICES Y SUELO EN EL CAMPO
  - 2.1 Muestreo para observaciones cuantitativas de la población de micorrizas
    - 2.1.1 Raíces
    - 2.1.1 Suelos
  - 2.2 Muestreo para coleccionar cepas de hongos micorrizógenos ( Método cualitativo )
3. DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE MICORRIZA EN LAS RAICES DEL HOSPEDERO
  - 3.1 ✓ Coloración del hongo en la raíz y determinación de la infección
    - 3.1.1 Técnicas de coloración
    - 3.1.2 Morfología del hongo dentro de la raíz
    - 3.1.3 Técnicas para la determinación de la infección en microscopios
      - 3.1.3.1 ✓ Determinación del porcentaje de infección, en láminas
      - 3.1.3.2 ✓ Determinación de la longitud de la raíz infectada por micorriza
      - 3.1.3.3 Evaluación visual
      - 3.1.3.4 Puntos de entrada de hifas en la raíz
  - 3.2 Medición de la infección en la raíz por determinación de quitina total de los hongos micorrízicos
  - 3.3 Coloración de raíces y determinación de la cantidad de colorante absorbido por los hongos micorrízicos

- 3.4 Extracción de pigmentos amarillos de raíces infectadas
- 3.5 Conclusiones y discusión de la utilidad de los diferentes métodos
- 4. TECNICAS PARA LA SEPARACION DE ESPORAS DEL SUELO
  - 4.1 Métodos cuantitativos
    - 4.1.1 Método de tamizado y decantación según Gerdemann y Nicolson (1963)
    - 4.1.2 Modificaciones del método de Gerdemann y Nicolson
    - 4.1.3 Método de centrifugación
    - 4.1.4 Método de adhesión y flotación según Sutton y Barron (1972)
    - 4.1.5 Método de decantación y filtración según Saif (1972)
    - 4.1.6 Método de pipeteo según Smith y Skipper (1979)
    - 4.1.7 Método utilizado en CIAT-Proyecto Micorriza
  - 4.2 Métodos cualitativos
    - 4.2.1 Método de "Columna de Gelatina", según Mosse y Jones (1968)
    - 4.2.2 Método de separación por "Flotación y Burbujeo" según Furlan y Fortin (1975)
    - 4.2.3 Método de sedimentación con caolin y flotación en solución de azúcar, según Tomerup y Kidbey (1979)
    - 4.2.4 Método utilizado en CIAT-Proyecto Micorriza
  - 4.3 Discusión de los métodos

- 5. TECNICAS PARA LA PRODUCCION DE CULTIVOS PUROS DE HONGOS MICORRIZOGENOS
  - 5.1 Taxonomía
  - 5.2 Catálogo de cepas aisladas
  - 5.3 Métodos de inoculación de hospederos con esporas aisladas
    - 5.3.1 Método en embudo, según Gerdemann (1955)
    - 5.3.2 Método utilizado en CIAT-Proyecto Micorriza
  - 5.4 Método de esterilización superficial de esporas
- 6. TECNICAS DE GERMINACION DE ESPORAS SIN LA PRESENCIA DE HOSPEDEROS
  - 6.1 Uso de caldos de cultivo
  - 6.2 Germinación de esporas en el suelo
- 7. METODOS PARA ALMACENAJE DE HONGOS MICORRIZOGENOS
  - 7.1 Almacenamiento de cepas puras
    - 7.1.1 Mezcla de suelo-raíces-hongo
    - 7.1.2 Raíces infectadas
    - 7.1.3 Esporas separadas
  - 7.2 Almacenamiento de inoculantes para empleo en el campo
- 8. METODOS PARA LA DETERMINACION DEL MICELIO EXTERIOR DE LA RAIZ
  - 8.1 Determinación del micelio exterior por peso
  - 8.2 Medición de la longitud del micelio exterior
  - 8.3 Medición indirecta de la cantidad del micelio ex-

terior por determinación del suelo adherido a  
las raíces

9. RECuento INDIRECTO DE ORGANISMOS INFECTIVOS DE LA  
POBLACION DE MICORRIZA (NATIVA O AISLADA)

9.1 "Cantidad Más Probable" del hongo en el suelo

9.1.1 Método de Porter (1979)

9.1.2 Variante del método de Porter (utilizado en el  
CIAT-Proyecto Micorriza)

9.2 Determinación de la capacidad de organismos de  
hongos para formar micorriza VA con hospederos

10. REFERENCIAS

11. APENDICE

## 1. PROLOGO E INTRODUCCION

La metodología empleada en la investigación de la micorri-za vesículo-arbúscular (MVA) es diferente a la usada para el estudio de otros hongos del suelo debido a que los hongos productores de MVA son simbioses obligatorios, es decir, no se pueden aislar, mantener o multiplicar en caldos nutritivos. Esto implica el uso de técnicas más laboriosas, que comienzan con la forma de recolección de muestras (Capítulo 2) para la observación directa, de estructuras del hongo presentes en la raíz de la planta (Capítulo 3) ó en el suelo (Capítulo 4, 8, 9).

En los capítulos 4 a 7 se hace énfasis sobre las esporas por considerarse, que ésta es la única estructura del hongo en base a la cual se puede llevar a cabo una identificación. Dicho proceso requiere de varias etapas, que son consideradas aquí: separación de esporas del suelo (Capítulo 4), taxonomía y producción de cultivos puros (Capítulo 5), pruebas de viabilidad (Capítulo 6) y mantenimiento de colecciones (Capítulo 7).

Los dos últimos capítulos (8 y 9) describen metodologías especiales para estimar el crecimiento y la densidad del hongo en un suelo. La capacidad de crecimiento del hongo (Capítulo 8) en el suelo, está determinada por la extensión del micelio fuera de la raíz. Como se recordará, el micelio se considera una estructura importante porque, realiza las funciones de extracción y transporte de fósforo a la raíz de la planta. Finalmente, al determinar la densidad del hongo (Capítulo 9)

se trata así de establecer la probabilidad de éxito del hongo para infectar la planta.

Soy conciente que no ha habido un análisis muy profundo de la utilidad práctica de algunos de los métodos descritos aquí para la investigación de la MVA. El propósito, al realizarlo de esta forma, es evitar una descripción sistemática y metódica de procedimientos de laboratorio, y al mismo tiempo motivar y estimular la creatividad de los investigadores que se inician en este campo, al dejar abierta la posibilidad de múltiple uso de algunos métodos de acuerdo a la necesidad e ingenio de cada uno. Al leer el manual, también, se notará que muchas técnicas son variaciones o modificaciones de otras consideradas básicas, el objetivo de esto, es mostrar las posibilidades de obtener resultados válidos adoptando una metodología acorde con la disponibilidad de materiales y el sitio de trabajo.

Aunque, recientemente el Dr. N. Schenck ha publicado, en inglés, un manual sobre la metodología de investigación en micorriza (Con el título: "Methods and Principles of Mycorrhizal Research" American Society of Phytopathology. 3320 Pilot Knob Road, St. Paul, Minnesota, U.S.A.), se espera que el presente manual se constituya en un aporte para el desarrollo de este conocimiento que, en países en vías de desarrollo como Colombia, apenas se está iniciando.

Por último, agradezco a la "SOCIEDAD ALEMANA PARA LA COOPERACION TECNICA (GTZ)" y a las personas que lo hicieron posible, la fundación y financiamiento del Proyecto Micorriza

en CIAT.

También, me resulta grato agradecer a mi asistente, Larisa Gálvez A., su cooperación en probar la efectividad de algunas técnicas; a Ana del Pilar Hernández C. su colaboración en la redacción de éste manual y a todas las personas que en una u otra forma contribuyeron a la realización de éste.



- 2. MUESTREO DE RAICES Y SUELO EN EL CAMPO
- 2.1 Muestreo para observaciones cuantitativas de la población de micorriza
- 2.1.1 Raíces

Si únicamente se desea determinar la infección por micorriza mediante la observación de las raíces de la planta, se tomarán muestras representativas del sistema radical para un mismo tratamiento, en el campo ó cultivo. Para muestreo representativos ver las descripciones de Böhm, 1979.

En cultivos de yuca, se requiere tomar muestras de la raíz hasta 20 cm de distancia alrededor del tallo de la planta y hasta 20 cms de profundidad. Aunque, se sabe que en el campo la distribución de la infección es muy variable, se acepta, como muestra representativa de un tratamiento, tomar muestras, al azar, de las raíces de 5 plantas en un bloque de 16 m<sup>2</sup>.

Si se quiere observar la infección de raíces de plantas sembradas en pots, se cosechan todas las raíces, se lavan con agua corriente y se sacan submuestras del sistema radical, de tal manera, que la muestra utilizada para evaluar la infección sea representativa del sistema total de la raíz.

En éste tipo de ensayos se tiene la ventaja que se puede determinar, por un método descrito más adelante, la longitud total tanto del sistema radical como de las raíces infectadas. Si tenemos los pesos en fresco del sistema radical total y de la muestra a observar, podemos calcular, nuevamente, la longitud total de la parte infectada y del sistema radical.

En casi todos los casos es necesario guardar las raíces antes de que se puedan colorear. Esto es posible en AFA (95 ml ácido acético, 13 ml formol, 200 ml alcohol al 50%) después de lavarlas en agua. Como medio para guardar raíces, también sirve una mezcla de ácido acético con alcohol en proporción 1:3. Otro método para conservar raíces por varias semanas junto con el suelo, consiste en aplicar alcohol en cantidad superior al 10% del volumen del suelo y guardarlas a temperatura ambiente, (según Böhm, 1979).

Muchas veces el objetivo es la determinación de la infección en las raíces, y el conteo de esporas en el suelo. En este caso se pueden guardar las muestras en la nevera a una temperatura inferior a 0°C, ó se puede secar la muestra al sol almacenándola posteriormente, para evitar una descomposición de las raíces. Por experiencia propia, las raíces no mostraron daño alguno al guardarlas junto con el suelo semi-húmedo en cuarto frío (10°C) durante 1 mes.

#### 2.1.2 Suelo

Las descripciones para tomar muestras representativas de suelo se encuentran en muchos libros e informes como Walker y Bejarano (1978), Böhm (1979). El muestreo para la determinación de la población de esporas en el suelo depende del objetivo de la investigación. Generalmente se toman muestras de la rizósfera de la planta o de la capa con material orgánico, ya que en ésta se encuentra la mayoría de las esporas.

En ensayos de pots, se saca a la cosecha todo el contenido de suelo de los mismos, se homogeniza y se toma una muestra representativa del contenido. El suelo se puede guardar húmedo por cierto tiempo en la nevera (4°C). También se puede guardar secado al sol, a temperaturas de menos 0°C. Es preferible procesar el suelo rápidamente.

## 2.2 Muestreo para coleccionar cepas de hongos micorrizógenos (método cualitativo)

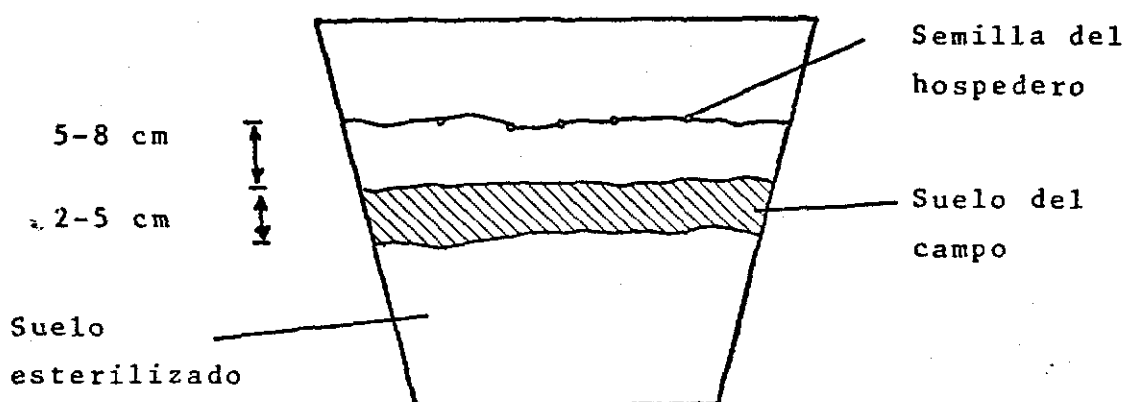
Se pueden sacar muestras representativas del campo (ver descripción en sección 2.1) y separar las esporas por varios procesos (que serán descritos posteriormente). Si la micorriza ayuda a la planta a aumentar la asimilación de fósforo del suelo, las plantas infectadas por una cepa efectiva del hongo deben tener un buen crecimiento. Por eso se toman muestras de suelo y raíces de plantas con buen crecimiento.

Otro método cualitativo para obtener diferentes cepas consiste en trasplantar plantas con raíces, libres de suelo y materia orgánica, del campo a suelo esterilizado en pots. Por este método se obtiene, en los pots, después de cierto tiempo, cepas de hongos con las cuales la planta estaba inicialmente infectada (Método según Gerdemann y Trappe 1974).

Debido a que algunas cepas del hongo no están esporulando en el campo, ó a que hay pocas esporas de un tipo dado, se requiere multiplicar las cepas nativas en el invernadero, antes del aislamiento. El método de multiplicación es sencillo.

Se inocula, con una muestra de suelo mas raíces del campo, pots que tengan suelo esterilizado y se siembra una planta hospedera. (Ver gráfica 1).

Gráfica 1: FORMA DE INOCULACION DE CEPAS NATIVAS EN POTES.



Para la multiplicación se utiliza suelo esterilizado en autoclave que tenga aproximadamente las mismas características químicas que el suelo del campo. Se recomienda mejorar la estructura del suelo mezclándole con arena, antes de la esterilización. No se debe aplicar tanto fósforo al suelo (se recomienda un máximo de 25 kg P/Ha). Los otros elementos nutritivos nunca se aplican en abundancia (dependiendo del contenido ini-

cial del suelo se recomienda 50 kg N/Ha, 50 kg K/Ha, 25 kg Mg/Ha).

Como hospedero se recomienda sembrar leguminosas porque hay buena multiplicación de esporas con ellas (a las leguminosas no se les aplica nitrógeno, sino *Rhizobium*). En el CIAT, se utiliza como hospedero *Pueraria phaseoloides* (kudzú) debido a que el kudzú está adaptado a muchas condiciones y tipos de suelos además, siempre está disponible en el mercado. De todos modos, es recomendable sembrar un hospedero que sea micotrófico obligatorio (necesita micorriza para sobrevivir) y que esté adaptado a las características químicas y físicas del suelo original del campo.

La multiplicación de cepas nativas se demora, según experiencia propia, de 4 a 6 meses. Se debe sembrar también varios pots sin inocular (como control) para comprobar la esterilidad del suelo. Existe la posibilidad de contaminar las plantas hospederas con hongos patógenos o con nemátodos al inocularlas. Se debe tener cuidado con la aplicación de pesticidas. Se sabe que algunos fungicidas pueden evitar la infección del hospedero con micorriza VA. Estos son: Arazan, Benomyl, Botran, Mylone y Thiabendazole. Otros fungicidas mostraron, en estudios con especies de MVA conocidas, poco o ningún efecto negativo en el desarrollo de ésta en los hospederos. Estos son: Ethoprop, Funsophotian, Ethazole, Captan, Maneb, Rido-mil, Aliette, Pyroxiclor y Thiophanate. Algunos fungicidas como Ethazoles (Terrazole y Truban), pueden estimular la infección si se aplican en pocas cantidades (10-40 ppm) entre 30 y 60 días después la inoculación. (Smith 1978, Dehne 1982).

Contra nemátodos se aplica Temik (0.25 g/4 kg suelo) que no produce efecto alguno sobre la infección. Además dá buen control contra ácaros y mosca blanca en invernaderos.

### 3. DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE MICORRIZA EN LAS RAICES DEL HOSPEDERO

En casi todos los experimentos o investigaciones sobre el funcionamiento de la micorriza es necesario determinar la presencia de la infección en las raíces y cuantificarla. Para determinarla existen los siguientes métodos:

- Coloración de estructuras del hongo dentro de la raíz para observarlas al microscopio y hacer conteos de la infección.
- Medición de la cantidad del hongo presente en la raíz por determinación de la quitina total que produce el hongo en sus paredes.
- Coloración de las raíces y determinación de la cantidad de colorante absorbido por la raíz y por el hongo.
- Medición de los pigmentos amarillos en las raíces infectadas.

Con cualquier método hay que asegurar una muestra o submuestra representativa del sistema radical (ver sección 2.1.1).

#### 3.1 Coloración del hongo en la raíz y determinación de la infección.

Este método se utiliza para medir la proporción de la primera corteza de la raíz ocupada por estructuras del hongo.

### 3.1.1 Técnicas de coloración

Se han utilizado muchos métodos (ver Tabla 1. en Apéndice) siendo el más conocido el de Phillips y Hayman (1970). Los otros métodos son variaciones de éste. Generalmente para laboratorios con escasos equipos se puede recomendar el método de Kruckelmann (1973), todo dependiendo de la disponibilidad de reactivos.

Debido a su toxicidad y a la posibilidad de que el fenol produzca cáncer, se recomienda montar las raíces en placas con ácido láctico, glicerol o en agua. La observación directa se hace en agua para evitar la inhalación del vapor de lactofenol. Para la preparación del lactofenol existen varias fórmulas (ver Tabla 2 del Apéndice). Para el efecto de la coloración no hay diferencias entre las composiciones (puede ser una cuestión de economía).

En el CIAT-Proyecto Micorriza se utiliza el siguiente método para colorear raicillas de yuca

- Se separan las raíces del suelo
  - Se las lava y coloca en tubos de ensayo
  - Se aplica KOH al 10% hasta que todas las raíces queden inundadas. Se las deja 1 a 4 días a temperatura ambiente.
- Si hay raíces con muchos pigmentos, se calientan las raíces en KOH por 10 minutos (60-70°C) en baño María. Se decanta el KOH.

- Se lavan las raíces con agua destilada una vez.
  - Se aplica HCL al 10% y se agita para que hay buena neutralización del KOH, hasta que las raíces tomen un color blanco (se dejan las raíces entre 15 y 30 min en HCL al 10%).
  - Se decanta el HCL y se lavan una sola vez las raíces con agua.
  - Se aplica azul de tripano al 0.1% en lactofenol (ver fórmula C en Tabla 2 del Apéndice). Se dejan las raíces uno ó varios días.
  - Se decanta y la decantación "lactofenol con azul de tripano al 0.1%" se filtra en papel Whatman No. 2 para utilizarlo otras dos veces.
  - Se aplica nuevamente lactofenol para extraer el exceso de colorante de las raíces y preservarlas.
  - Para evaluar la infección se montan las raíces con agua en láminas ó se las observa en caja de petri con agua.
- NOTA: Se almacenan las muestras en lactofenol siempre bajo un extractor.

### 3.1.2 Morfología del hongo dentro de la raíz

Una descripción de la morfología y fisiología del hongo dentro de la raíz se encuentra en Cox y Sanders (1974), y Ocampo (1980).

Para conocer las estructuras del hongo dentro de la raíz, y saber que es lo que se debe observar al microscopio, se pre-



sentan fotos de las tres estructuras características: hifas, arbúsculos y vesículas.

#### Hifas.-

De esporas germinadas (foto 1) o del micelio externo (foto 2), las hifas penetran en la raíz y forman un apresorio en las capas más internas del parénquima cortical. La infección también puede ocurrir por hifas que recorren la superficie de las raíces, como se presenta en foto 3. También estas hifas hacen un haustorio para entrar en la raíz. Se pueden presentar dos tipos de hifas-gruesas (foto 4) y delgadas (foto 5)-cuyo crecimiento en la epidermis, de la raíz, pueden ser intracelular (foto 6) y/o intercelular (foto 10).

Las hifas nunca penetran en la endodermis, tejidos vasculares, meristemas, tejidos estacales, clorofílicos, partes viejas de la raíz, o en sistemas especializados de órganos vivos (Ocampo, 1980).

Con el tiempo hay una degeneración y descomposición de las hifas siendo así que la infección por hifas puede aparecer muy oscura (foto 7).

#### Arbúsculos.-

El intercambio de nutrientes del huésped al hongo y viceversa, se da por los arbúsculos, siendo ésta la estructura más importante en la simbiosis.

Al principio, el crecimiento de los arbúsculos es parecido al de hifas intercelulares, pero la fina ramificación característica de los arbúsculos puede llenar la célula por com-

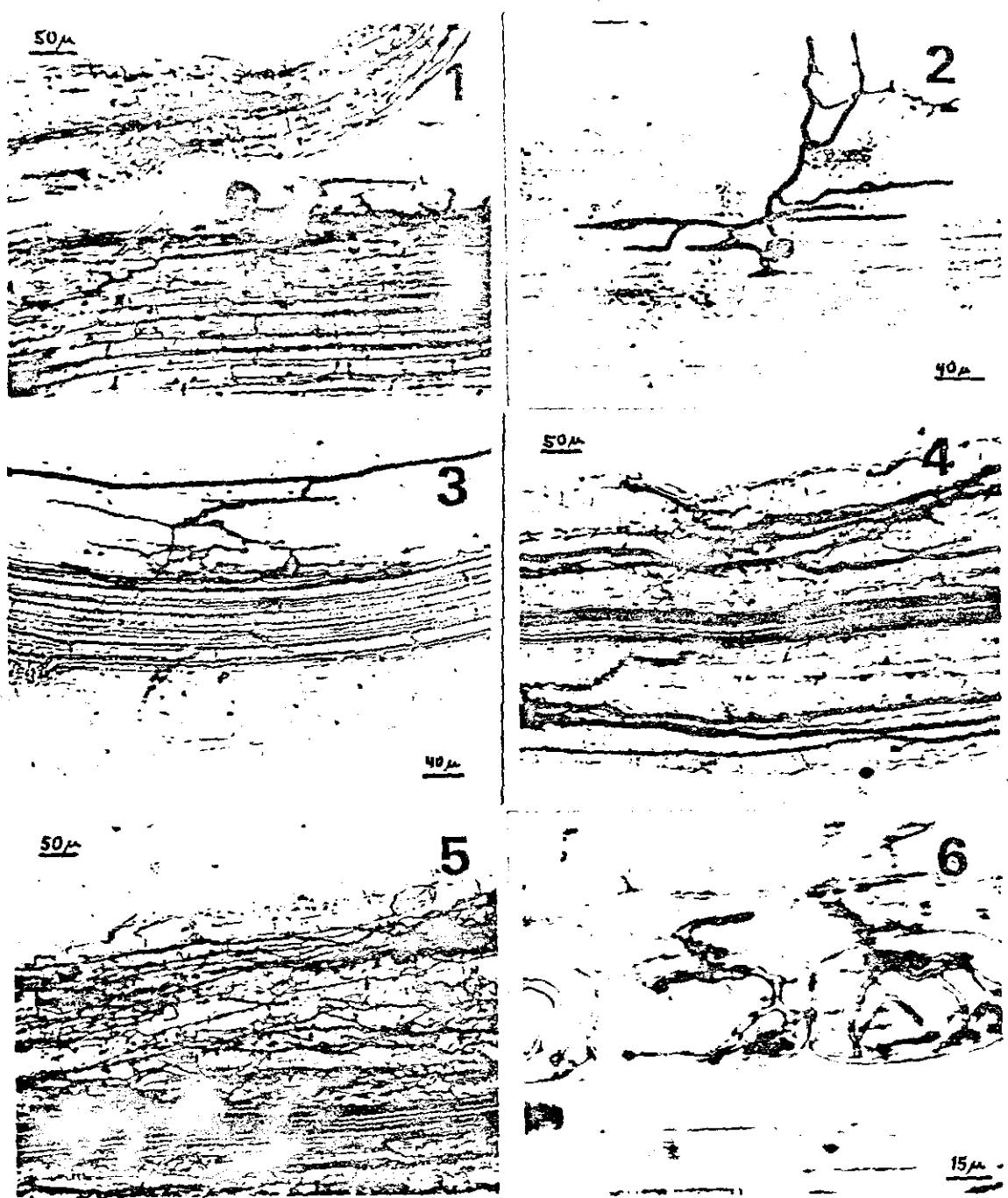


Foto 1: Penetración en la raíz de la hifa de una espora germinada  
 Foto 2: Formación de un apresorio  
 Foto 3: Infección de la raíz debida a hifas que recorren la raíz  
 Foto 4: Hifas gruesas desarrolladas en la epidermis de la raíz  
 Foto 5: Hifas delgadas desarrolladas en la epidermis de la raíz  
 Foto 6: Crecimiento intra\_célular de hifas  
 (Foto 1-6 de Behn, 1979).

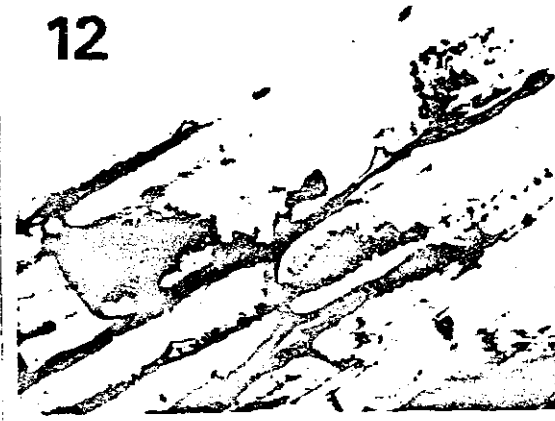
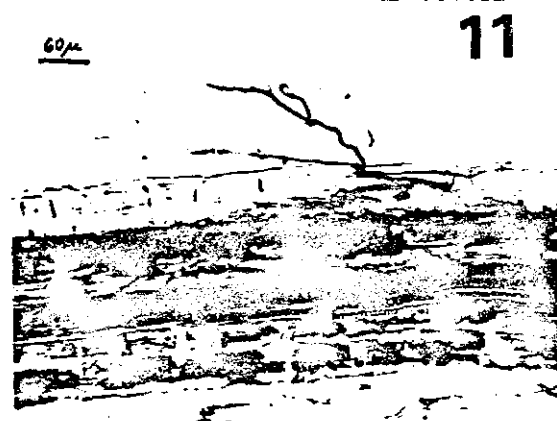
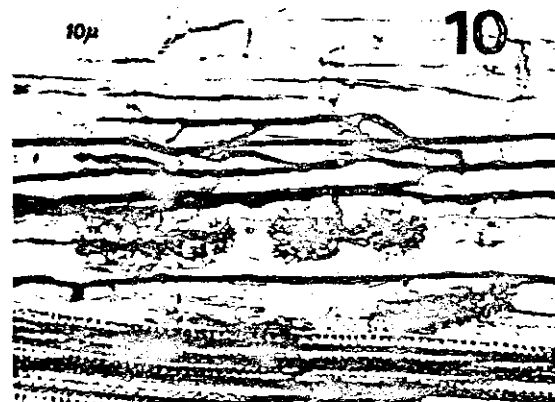
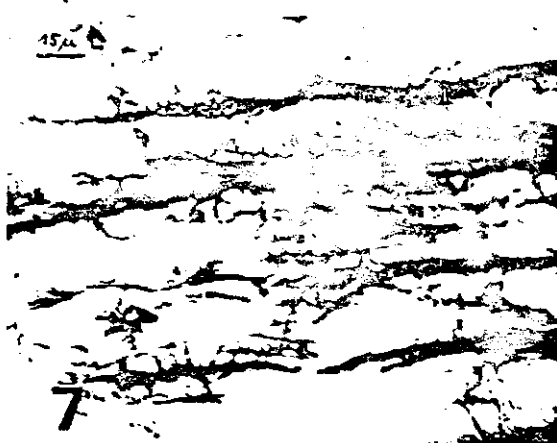


Foto 7: Descomposición de hifas en la raíz

Foto 8: Principio de la formación de un arbúsculo

Foto 9: Arbúsculo completamente desarrollado

Foto 10: Arbúsculos conectados con hifas intercelulares

Foto 11: Apariencia de arbúsculos bien desarrollados en la raíz

Foto 12: Proceso de degeneración de arbúsculos, ver de tales en el texto.

(Fotos 7, 8, 11 de Behn, 1979; 9, 10 de Fabig, 1979; 12 de Sieverding, 1975).

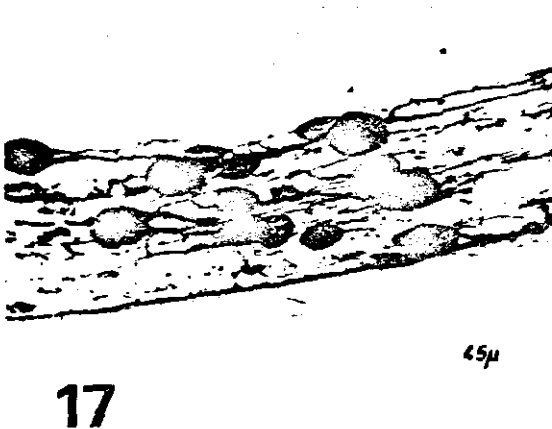
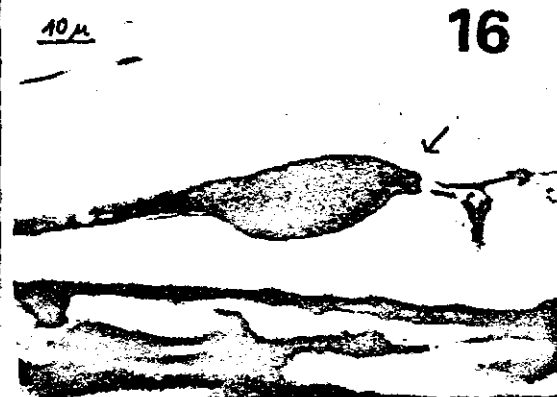
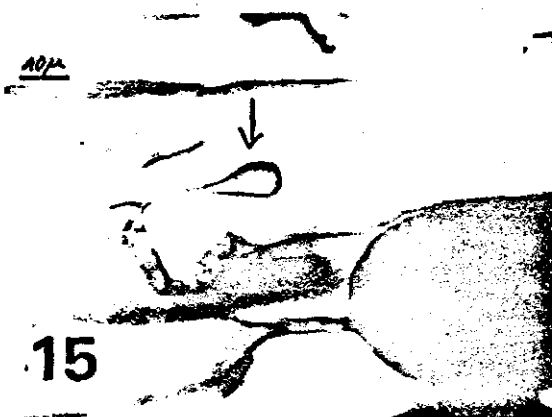
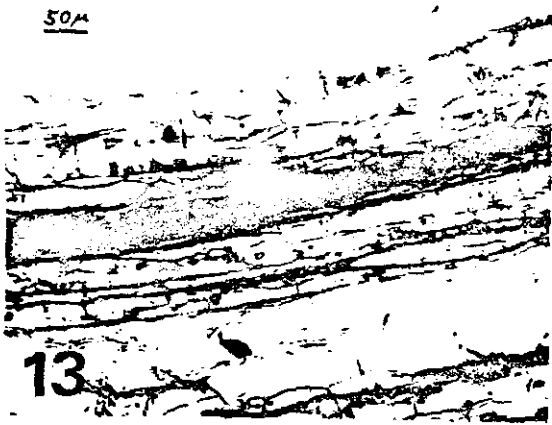


Foto 13: Apariencia de arbúsculos descompuestos en la raíz  
 Foto 14: Formación de la primera vesícula (flecha) en la raíz  
 Foto 15: Formación intracelular de vesícula apical (flecha)  
 Foto 16: Formación intercelular de vesícula intercalar  
 Foto 17: Raíz llena de vesículas  
 Foto 18: Formación de esporas en la superficie de la raíz  
 (Foto 13-16 de Behn, 1979; 17, 18 de Fabig, 1979).

pleto (foto 8, 9). Los arbúsculos siempre están en contacto con hifas intracelulares (foto 10). Una raíz llena de arbúsculos, bien desarrollados, se muestra en la foto 11. La vida de los arbúsculos es corta de 4 hasta 10 días. La degeneración empieza a partir de los extremos de las ramas hacia su base (foto 12). En el interior de la misma célula pueden existir partes vivas (foto 12, izquierda) y partes muertas (foto 12, derecha). El tronco es el último en colapsarse (foto 12, centro).

#### Vesículas.-

Se definen las vesículas como órganos de reserva del hongo. Posterior o simultáneo a la formación de arbúsculos del hongo, aparecen en las raíces formas globosas y/u ovales que se denominan vesículas (foto 14). Se forman intracelular (foto 15 muestra el principio del desarrollo apical de una hifa) o intercelularmente (foto 16 muestra el principio del desarrollo intercalar). La raíz con muchas vesículas aparece como en la foto 17. A veces es difícil distinguir en el microscopio si las formas ovaladas en realidad son vesículas o esporas del hongo (como en foto 18).

### 3.1.3 Técnicas para la determinación de la infección en microscopios.

Giovannetti y Mosse (1980) hicieron una excelente evaluación de técnicas utilizadas por varios investigadores. Una lista de métodos para la determinación se presenta en la Tabla 3 de Apéndice.

Los métodos más comunes, son los siguientes:

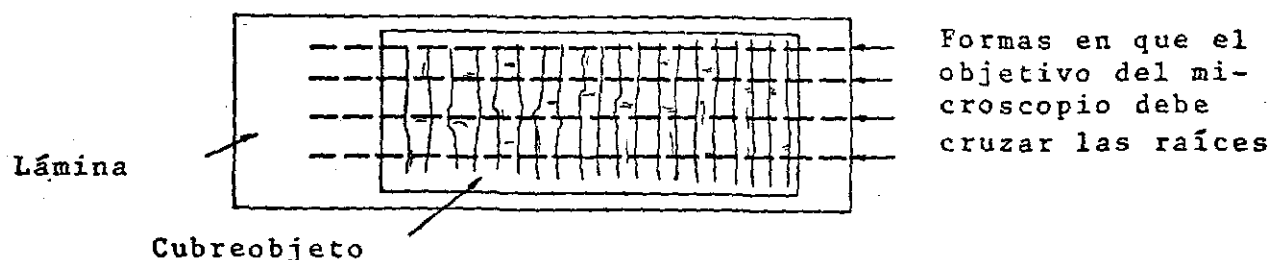
- a. Determinación del porcentaje de infección en láminas
- b. Medición de la longitud de las raíces infectadas; se puede expresar como porcentaje de longitud de raíz infectada
- c. Evaluación visual de la presencia del hongo en la corteza de la raíz
- d. Conteo del número de entradas de hifas en una cierta longitud de la raíz

#### 3.1.3.1 Determinación del porcentaje de infección en láminas

Generalmente se corta el material coloreado en pedazos de uno hasta dos cm, distribuyéndolos al azar en una caja de Petri y colocándolos paralelamente en una lámina. Se montan las raíces con un medio y se tapan con un cubreobjetos. Para determinar el porcentaje hay dos formas de evaluación:

- 1.) Se mueve la lámina por medio de carro portaobjeto del microscopio bajo un cierto objetivo (así, por el objetivo se determina el campo observado de la raíz).

Gráfica 2.: FORMA DE EVALUACION DE CAMPOS INFECTADOS O NO INFECTADOS.



Se cruzan por ciertos puntos las raíces y se cuentan los campos infectados o no infectados (Gráfica 2). La evaluación visual de estructuras y el conteo de campos infectados por vesículas es recomendable.

$$\% \text{ infección} = \frac{\text{Número de campos infectados}}{\text{Número total de campos observados}} \times 100$$

- 2.) Evaluación al microscopio de la presencia o ausencia de infección en el total de segmento montados. Expresión:  
% segmentos con infección.

Se recomienda hacer una evaluación visual del grado de infección de ciertas estructuras del hongo.

### 3.1.3.2 Determinación de la longitud de la raíz infectada por micorriza.

1.) Una técnica consisten en la ampliación de 1 método 3.1.3. 1-2.), por medición de las fracciones del segmento ocupadas por la micorriza. Preferiblemente se coloca la lámina sobre un papel milimetrado y se mide la longitud infectada a través de un microscopio de disección. Si se observan por ejemplo 50 segmentos de 1 cm cada uno, se puede expresar la longitud de la infección en cm por 50 cm de la raíz, ó porcentaje de infección de la longitud total observada.

2.) Otra técnica más rápida y fácil es la determinación de la longitud de la raíz infectada, por el método de intersección de cuadrantes (Newman, 1966; Marsh, 1971). Este método se desarrolló originalmente para determinar la longitud de raíces en el microscopio de disección. Una descripción del método y su comparación con otros se encuentra en Giovannetti y Mosse (1980).

La descripción general del método consiste en marcar una caja de Petri (de plástico) con una red de líneas verticales y horizontales a una distancia de 0.5 pulgadas de tal manera que salgan cuadrados de 0.5 x 0.5 pulgadas. Se distribuyen raíces en la caja, las raíces se pueden cortar con tijera si es necesario, y se cuentan las intersecciones (cruzamientos) de las raíces con todas las líneas verticales y horizontales (ver Gráfica 3a). Si una raíz

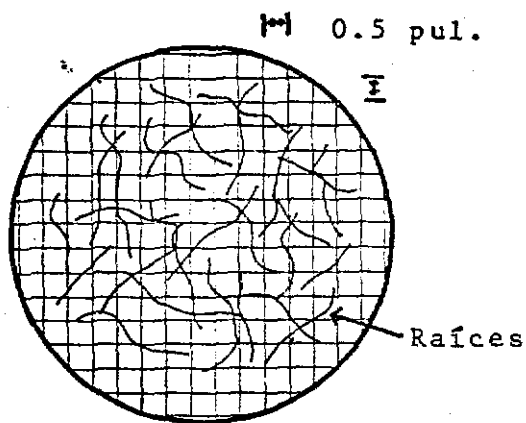


está exactamente arriba de una línea, se cuenta como dos intersecciones. Si una raíz toca la línea, se cuenta como una intersección (ver Gráfica 3b).

Gráfica 3.: a) VISTA SUPERIOR DE CAJA DE PETRI MOSTRANDO EL METODO DE INTERSECCION DE CUADRANTES.

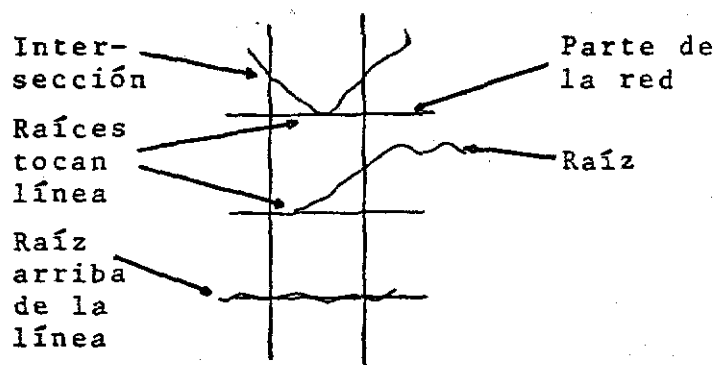
b) POSICIONES POSIBLES DE LA RAIZ CON RELACION A LAS LINEAS DEL CUADRANTE.

a.)



Caja de Petri con una red

b.)



De tal manera que, las intersecciones resultantes correspondan con cm, de longitud de las raíces.

100 intersecciones = 100 cm, de raíz

Si se cambia la distancia de las líneas hay que calcular la longitud por medio de la siguiente fórmula:

$$R = \frac{\pi A_n}{2H}$$

donde,

$R$  = Longitud total de las raíces

$\pi$  = 3.14

$A$  = Area en que las raíces están distribuídas (área de la caja)

$n$  = Número de intersecciones entre raíces y líneas

$H$  = Longitud de las líneas rectas (total vertical y horizontal)

Para determinar la longitud de la raíz infectada por micorriza en un sistema complejo de raíces, se cuentan las intersecciones entre las raíces y las líneas del cuadrante. Al mismo tiempo se cuenta el número de intersecciones en que aparece la infección de la raíz por alguna estructura del hongo. Así se halla la longitud total del sistema de la raíz y la longitud total de la raíz infectada.

Además, es útil contar separadamente, las intersecciones en que aparecen vesículas en las raíces. Si no se observa el sistema de la raíz completamente, se puede observar cierto número de intersecciones (por ejemplo 100) para determinar la presencia o ausencia de infección y calcular el porcentaje de longitud de las raíces infectadas. Cuanto mayor sea el número de intersecciones menor será el error típico. Se puede hacer una evaluación visual de la presencia de cada estructura del hongo como también una evaluación visual del pelo radicales de la raíz.

### 3.1.3.3 Evaluación visual

Se distribuyen las raíces en una caja de Petri, y se

observa la infección a través del microscopio de disección para estimar el porcentaje de infección, expresando dicho porcentaje en escalas de 10 (por ejemplo, 10%, 20%, 30%, etc.). Si la infección no es muy homogénea, es útil dividir el campo a observar en varias partes (por ejemplo: círculos, cuyo diámetro corresponde al campo de visión de un objetivo específico del microscopio, ver Abbott y Robson, 1978), hacen las estimaciones en escalas de 10 y después calcular el promedio de todos los datos para la muestra.

Otro método más subjetivo aún, que la evaluación visual, es la clasificación de la infección en categorías desde 0 hasta abundante: por ejemplo:

- 0 = nada
- 1 = algo
- 2 = medio
- 3 = mucho

#### 3.1.3.4 Puntos de entrada de hifas en la raíz

Los puntos de entrada representan la conexión entre hifas externas y estructuras internas del hongo en la raíz. Estas se cuentan, de raíces montadas en láminas o cajas de Petri, usando un estereoscopio. Se calcula en número de entradas por longitud de raíz, o se relaciona al sistema completo de la raíz. El método requiere no romper la conexión entre hifas externas e internas para lo cual, hay que utilizar mues-

tras frescas y tener cuidado en lavar el suelo y la materia orgánica adheridos a la raíz, al principio mojando lentamente la muestra de suelo con raíces, y teniendo en cuenta no agitar las raíces directamente bajo el chorro de agua. La coloración de todas las raíces se hace en un beaker amplio. La transferencia de los reactivos y los lavados de las raíces se hacen sin mover mucho las raíces.

### 3.2 Medición de la infección en la raíz por determinación de quitina total de los hongos micorrízicos

Hepper (1977) desarrolló un método para la determinación de quitina del hongo, la cual es producida en las paredes de las estructuras del hongo. El método de Hepper está basado en técnicas utilizadas de Ride y Drysdale (1972) para determinar hongos patógenos en tejido vegetal. Una modificación del método de Hepper, utilizada por Fabig (1979) se describe a continuación sin explicar las reacciones químicas involucradas en el cambio de la quitina a glucosamina.

Las raíces a observar deben estar muy bien lavadas con agua y pueden utilizarse frescas o conservadas por enfriamiento. Para los reactivos utilizados en el siguiente proceso se debe consultar la Tabla 4 del Apéndice.

1. Debido a que es necesario tener muestras representativas del sistema total de la raíz, se cortan, al azar, varias secciones de la misma, con una cuchilla fina, hasta obtener un peso fresco de 100 mg.

2. -Los 100 mg peso fresco de la raíz se agitan cuidadosamente con poca agua en un mortero y se transfiere el contenido a tubos de centrifugación ( $\phi$  1/2 pulgada, 10 ml de capacidad).
3. -Se aplican 8 ml de agua destilada a cada tubo y se centrifuga por 3 min a 5000 rpm.
4. -Se decanta cuidadosamente.
5. -Se aplica una cucharadita de perlas finas de vidrio y después 3 ml de KOH (a); se agita mecánicamente.
6. -Se colocan los tubos durante 40 min en un horno, a una temperatura de  $130^{\circ}\text{C}$ , hay que regular esta temperatura constantemente.
7. -Se enfrían los tubos en un extractor de gases.
8. -Se aplican 5 ml de etanol (b) y se agitan con cuidado; evitando la aparición de capas en el tubo.
9. -Se aplica 1 ml de Celite (c) y se centrifuga 3 min a 5000 rpm.
10. -Se decanta y se aplican 5 ml de etanol (d) y se agita mecánicamente. Después se centrifuga durante 3 min a 5000 rpm.
11. -El paso No. 10 se repite 3 veces usando 5 ml de agua destilada en vez de etanol, sin olvidar la agitación.  
Después de la tercera repetición se mide el pH de la solución decantada (con papel indicador). Este debe ser 7; si no es, se repite este último paso una o varias veces.
12. -Al sedimento se le aplica 1 ml de agua destilada, 1 ml de  $\text{NaNO}_2$  (e) y 1 ml  $\text{KHSO}_4$  (f), en este orden, y se agita bien manualmente. Se deja reposar por 15 min.
13. -Se aplica 1 ml  $\text{NH}_4\text{SO}_3\text{NH}_2$  (g) y se agita primero con la mano

y después con agitador. Se deja reposar por 15 min.

14.-Se aplica 1 ml MBPH (h), se agita con agitador y se pone por 3 min al baño María en agua hirviendo.

15.-Se enfrían los tubos en agua con hielo.

16.-Se aplica 1 ml  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  (i) y se agita mecánicamente.

Se deja reposar por 30 min, hasta que se obtenga un color azul.

17.-Se centrifuga por 3 min a 5000 rpm.

18.-Se mide la extinción de la luz del sobrenadante en un espectro fotometro a una longitud de onda de 650 nm.

Se preparan muestras estandar (serie de contrastes) con valores de 0; 2.5; 5.0; 7.5; 10; 12.5; 20 y 25  $\mu\text{g}$  glucosamina/ml, seguir método a partir del paso No. 12, sustituyendo el agua destilada por 1 ml de la concentración correspondiente de glucosamina (j). A veces la concentración de glucosamina en las raíces es tan alta que hay que diluirla muestra. La dilución se hace con la solución 0 de la serie de contrastes.

El cálculo de la concentración de glucosamina se realiza en base al peso seco de la raíz. Para obtenerlo se toma en el paso No. 1 del proceso una muestra representativa adicional que se seca al horno. La concentración de glucosamina en la raíz se expresa como  $\mu\text{g}$  glucosamina/mg peso seco de raíz, que es equivalente a la concentración de quitina en la raíz. Como control, también, se analizan las raíces de plantas no infectadas porque estas pueden mostrar bajas concentraciones de glucosamina.

### 3.3 Coloración de raíces y determinación de la cantidad de colorante absorbido por los hongos micorrízicos

Basado en el método descrito por Phillips y Hayman (1970), ver párrafo 3.1.1, Herrera y Ferrer (1978) desarrollaron una técnica para medir la cantidad de colorante (azul de tripano) absorbido por el hongo dentro de la raíz.

- De cada sistema radical se toman varias muestras, al azar, con un peso fresco de 100 mg cada una. Se colocan en tubos de ensayo y se colorean como está descrito en Phillips y Hayman (1970). Después de la coloración de las raíces, con azul de tripano al 0.2% en lactofenol, se aplican 5 ml de lactofenol puro al tubo y se agita mecánicamente. Se decanta y se repite el proceso dos veces más. Este proceso sirve para lavar el exceso de azul de tripano de las raíces. El sobrenadante obtenido de la tercera decantación se mide en el fotómetro a 600 nm longitud de onda, utilizando como testigo lactofenol puro. Si los valores son diferentes se debe hacer otros lavados.
- Después se aplica a las raíces 5 ml de lactofenol - HCL2N (en proporción de 2 partes de lactofenol: 1 parte HCL2N) como reactivo para extraer el azul de tripano absorbido por el hongo. Se calienta la suspensión de raíces en baño María a 70°C, agitando las muestras cada 20 minutos para mejorar la extracción. Después de una hora de calentamiento se decanta y guarda el lactofenol - HCL2N y se reemplaza por

5 ml de lactofenol - HCL2N fresco. Después de otra hora en baño María se decanta nuevamente la solución y se añade a los 5 primeros ml, obteniendo en total 10 ml de lactofenol HCL2N.

- Se mide la extinción de la luz de la solución en un espectro fotómetro a una longitud de onda de 600 nm.

La serie de contraste se prepara usando concentraciones de azul de tripano en lactofenol, que varían entre 5 y 40 ppm. Como "blanco" (0 ppm) se utiliza lactofenol puro. La concentración de las muestras se expresa como  $\mu\text{g}$  de colorante/g de raíz fresca. Puesto que las células de la raíz también absorben el colorante es necesario tener un "testigo" contra el cual comparar los resultados, éste se prepara desarrollando el mismo método, solo que en este caso se utilizan raíces de plantas no infectadas. La concentración del colorante hallada aquí, se utilizará como factor de corrección para los valores encontrados en las raíces de plantas infectadas.

### 3.4 Extracción de pigmentos amarillos de raíces infectadas.

El método fué desarrollado por Becker y Gerdemann, 1977, basados en la idea que raíces con micorriza tienen una apariencia más amarillosa que las raíces sin el hongo.

Se pesan en fresco 250 mg de raíz y se colocan en un tubo de ensayo. Se aplican 5 ml de agua destilada. Se tapa el tubo con algodón y papel de aluminio. Se trata la muestra en autoclave durante 30 minutos (1.2 bar de presión, 120 °C). Después de en-



friar la muestra, se mide la extinción de luz de la solución en un espectro fotómetro (Bausch & Lomb Spectromic 20) a 400 nm de longitud de onda contra un "Cero" (agua destilada).

### 3.5 Conclusiones y discusión de la utilidad de los diferentes métodos.

#### a. Grado de infección

La coloración de raíces y su observación al microscopio es el único método para determinar la presencia de ciertas estructuras del hongo (i.e., hifas, vesículas, arbúsculos) en la raíz. Además, es posible determinar en cierto estado de desarrollo de la planta, la relación entre las diferentes estructuras. Con ese método se puede determinar si la raíz está infectada por hongos patógenos o por micorriza.

La observación de segmentos de raíces, montados en láminas para determinar porcentaje de infección y porcentaje de longitud infectada puede ser exacta, pero se debe establecer una relación con el sistema radical total. Es decir, si se comparan dos sistemas radicales, uno de mayor tamaño que el otro, y se encuentra en ambos el mismo porcentaje de infección, el sistema radical de mayor tamaño tendrá una infección absoluta mucho mayor que el sistema de menor tamaño.

La determinación de la longitud de la infección por intersección de cuadrantes y la evaluación visual de la infección, son métodos más rápidos, que el montaje en láminas, siendo la

evaluación visual muy subjetiva. Es primordial el conocimiento de las estructuras del hongo para diferenciar la micorriza de los hongos patógenos.

Tanto el método de medir puntos de entrada de hifas en la raíz, como el de la determinación de la longitud total infectada del sistema de la raíz (método intersecciones de cuadrantes) dan un buen indicio sobre la presencia del micelio externo. Evidentemente el primer método determina la conexión entre estructuras externas e internas del hongo. Se sabe que entre la longitud total infectada del sistema de la raíz y peso del micelio externo, como también, entre peso micelio externo y crecimiento de la planta, hay una buena correlación (Sanders et al 1977). El resultado final de la búsqueda de relaciones entre la infección por micorriza y crecimiento de la planta, por un método fácilmente practicable, es la determinación de la longitud total del sistema radical.

Puesto que en ensayos del campo casi no es posible determinar la longitud infectada del sistema completo de la raíz, el uso de varios métodos para determinar porcentaje de infección puede brindar suficiente información.

#### b. Determinación de quitina

La determinación de quitina es válida en ensayos, donde se sabe con certeza que la raíz está infectada únicamente con micorriza y no con hongos patógenos porque la mayoría de éstos también producen quitina en las paredes de sus células.

El método requiere pesar con rapidez y exactitud las raíces frescas para evitar un error grande desde el principio de la medición.

La cantidad de quitina no dice nada sobre las diferentes estructuras del hongo en la raíz, por eso debe ir acompañada de la coloración de raíces infectadas para su comparación. El método es muy exacto y sofisticado pero muy trabajoso necesitando además, equipo y reactivos.

#### c. Determinación del colorante absorbido

Los ensayos de Fabig (1979) indicaron una correlación entre los grados de la infección hallada en microscopio, de la cantidad de quitina y del método de la determinación del colorante absorbido. El método técnicamente es más fácil que la determinación de quitina, pero tiene la desventaja que en la decantación del lactofenol se pierden muchas veces las raicillas finas lo cual constituye una fuente de error. También aquí los datos no dicen nada de las diferentes estructuras del hongo siendo útil solo si no hay infección por hongos patógenos. Una desventaja grande es que la infección en raíces de diferentes especies de plantas o de diferentes edades o crecidas en diferentes climas o suelos no son comparables debido a que los factores ecofisiológicos influyen en la conformación de las paredes celulares de raíces afectando la entrada de azul de tripano en las raíces. Por eso, para cada etapa de coloración

y para cada circunstancia (especie, suelo, tratamiento, etc.) hay que hacer una escala de comparaciones del extracto con una estimación visual de la infección hallada al microscopio.

#### d. Extracción de pigmentos

Como ya describieron los autores del método (Becker y Gerdemann, 1977) este método no sirve para todas las especies de plantas. Becker y Gerdemann recomendaron el método para raíces de cebollas que están produciendo el pigmento amarillo.

### 4. TÉCNICAS PARA LA SEPARACION DE ESPORAS DEL SUELO.

Los hongos que producen micorriza VA pertenecen a la familia Endogonaceae y están produciendo esporas en el suelo. Casi toda la investigación de ecología o de fisiología de la micorriza requiere el aislamiento de esporas del suelo o la separación de esporas de una muestra para estimar la población. Según el objetivo hay varios métodos para separar las esporas del suelo. Se pueden dividir los métodos en dos clases:

- 1) Cuantitativos para la determinación de la población y
- 2) cualitativos para el aislamiento de esporas.

#### 4.1 Métodos cuantitativos

La muestra tomada recientemente o guardada en la nevera se

revuelve bien, con el objeto de sacar una submuestra bien representativa. Se trabaja con más exactitud si se toman varias submuestras. De la muestra se toma además, una submuestra para determinar peso seco del suelo, para calcular los conteos de esporas por peso seco del suelo.

#### 4.1.1 Método de Tamizado y Decantación según Gerdemann y Nicolson (1963).

Usando 250 g de suelo se hace una suspensión en 1 litro de agua. Se deja reposar la suspensión algunos segundos para que las partículas graves se sedimenten. Se tamiza el sobrenadante usando tamices de diferente tamaño de poros empezando con un tamiz con poros de 1 mm. Se colecta la suspensión tamizada y se agita; se deja reposar pocos segundos y se decanta por el tamiz de 710  $\mu\text{m}$ . Se sigue haciendo con los tamices con abertura de poros de 420  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$ , 149  $\mu\text{m}$ , 105  $\mu\text{m}$ , 74  $\mu\text{m}$  y 44  $\mu\text{m}$ . Para trabajo de rutina se puede utilizar menos tamices, por ejemplo: 1 mm, 420  $\mu\text{m}$ , 149  $\mu\text{m}$  y 44  $\mu\text{m}$  ó aún menos tamices. Se pasan las fracciones separadas a cajas de Petri con poca agua; si hay mucho material divide la muestra colectada en varias cajas. Se cuentan las esporas en la caja bajo un microscopio de disección (25 x ó 50 x aumento).

#### 4.1.2 Modificaciones del método de Gerdemann y Nicolson.

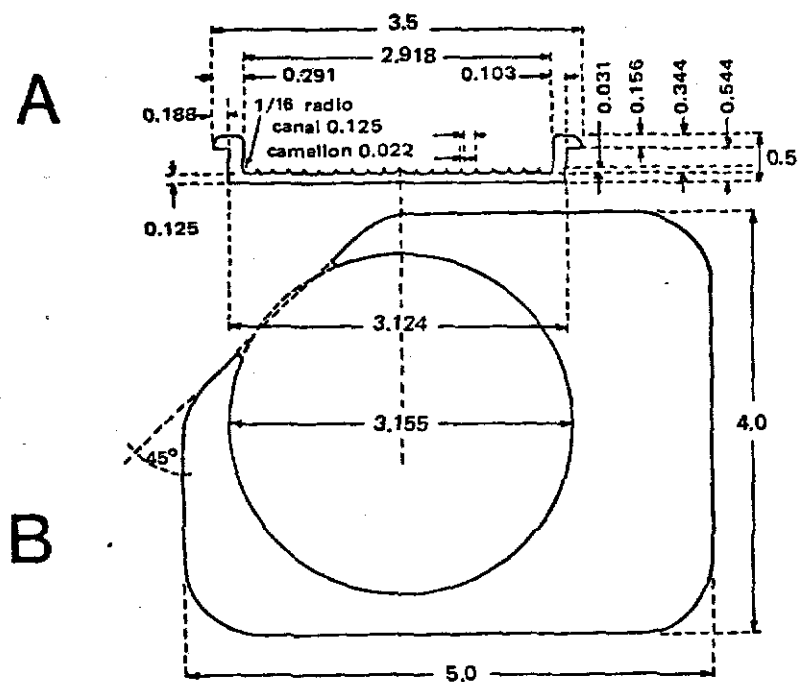
Básicamente las modificaciones del método de Gerdemann

y Nicolson consisten en la variación del tamaño de abertura de los poros de los tamizes, de la cantidad de suelo utilizado para el análisis (Smith y Skipper, 1979), como también variaciones en la forma de llevar a cabo los conteos, unas veces utilizando papel filtro blanco (Mosse y Bowen, 1968; Smith y Skipper, 1979) o cuadriculado, como lo hizo Khan (1971) dibujando cuadros numerados de 2.5 x 2.5 cm, y otras veces colocando las esporas con agua en caja de Petri, facilitando la lectura el uso de una red de cuadrados bajo la caja de Petri. Lecturas de algunas subpartes y el cálculo del número total de esporas/caja son posibles, si las esporas están distribuidas al azar en la caja.

Una forma elegante es pasar la fracción a una caja de Petri especial, que tenga círculos grabados en el fondo de la caja (ver Gráfica 4).

Gráfica 4.: MONTAJE DE DONCASTER (1962) PARA CONTAR ESPORAS

- A) VISION SECCIONAL DE LA CAJA, HECHA DE 'PERSPEX' Y  
B) VISION PLANA DE UN SOPORTE, TAMBIEN HECHO DEL MATERIAL 'PERSPEX'. TODAS LAS DIMENSIONES SON DADAS EN PULGADAS (1 PULGADA = 2.53 cm).



Descripción del montaje de Doncaster (1962)

Muestra un plato circular abierto con canales separados por camellones. Diez canales concéntricos de fondo plano, están separados el uno del otro por camellones angostos y redondeados, cada uno con cerca de 2/3 partes del ancho del campo microscópico.

El disco tiene 1 cm de profundidad con un ancho borde estríado, al cual lo sostiene un soporte hecho de "Perspex", justo encima de la platina del microscopio de conteo; el soporte puede ser movido a través de la platina del microscopio y el plato revuelto dentro del soporte. Más de 40 ml. de una suspensión con esporas bien mezclada, es introducida y permitada asentarse. Las esporas asentándose sobre un camellon divisorio usualmente caen pronto en uno u otro canal. Su distribución entre canales conforme a la ley de Poisson y la exactitud de cada conteo depende, por lo tanto, del número contado.

Si hay muchas esporas, no todas en cada canal necesitan ser contadas pero una corrección puede ser aplicada en base al porcentaje del área total del disco examinado. En un plato de 10 canales todos del mismo ancho, el más interior representa el 1% del área total y los canales sucesivos 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19% respectivamente.

Las esporas necesitan algún tiempo para sedimentar en el plato y el proceso es más rápido, si se está asentando una suspensión en un segundo plato mientras la primera está siendo contada.

#### 4.1.3 Método de centrifugación

El método fue originalmente desarrollado por Jenkins (1964) para separar nemátodos del suelo.

Se mezclan 10 g suelo con 10 ml de agua en un beaker de 250 ml y se agita muy bien. Se vacía la suspensión en un tamiz de 500 um que está colocado sobre otro de 44 um. Se lava el ma-



terial contenido en el tamíz de 500  $\mu\text{m}$  con agua corriente por 15 min. Se pasa el contenido del tamíz de 44  $\mu\text{m}$  a un tubo de centrifugación de 50 ml. Se aplica algo de agua para llenar el tubo, y se centrifuga por 4 min a 1800 rpm. Se decanta el agua y se saca el material orgánico de la pared interna con un dedo. Al residuo en el tubo se aplica una solución de azúcar (500 g azúcar en 1 litro de agua), se disuelve y éste se centrifuga por 2 min a 1800 rpm. Se decanta la solución en un tamíz de 44  $\mu\text{m}$ ; se lavan las esporas con agua y se pasan a papel de filtro para contarlas.

#### 4.1.4 Método de adhesión y flotación según Sutton y Barron (1972).

Se pesan 10 g de suelo fresco en una probeta de 50 ml y se llena con agua hasta 2 cm antes de la boca. Se agita la suspensión fuertemente por 10-15 segundos. Se deja sedimentar el suelo durante 2 min. Se decanta lentamente en un embudo de separación de manera tal, que todo el material que está flotando en la superficie del agua pase al embudo. (Se repite el proceso dos veces). Después del último decante se deja reposar la solución durante 2-3 minutos en el embudo. En este tiempo las esporas flotan en la superficie del agua y se adhieren a la pared del embudo. Se abre la llave del embudo de separación y se deja penetrar 75-100 ml/min a un segundo embudo de separación.

El segundo embudo se vacía como el primero. Todo el material (esporas y material orgánico) que ahora está adherido a paredes internas de ambos embudos, se pasa con agua a papel filtro. El papel filtro se pone en un plato de Petri y se cuentan las esporas.

#### 4.1.5 Método de decantación y filtración según Saif (1977)

Se suspenden 50 g de suelo con 200 ml de agua en un beaker de 500 ml y se agita la suspensión con un agitador magnético durante 2-4 min. Se deja reposar la suspensión para que sedimenten las partículas pesadas por 3-5 min y se filtra el decante directamente por medio de un papel filtro que este cuadrículado y cada cuadrícula numerada (como en Khan, 1971). Se aplica nuevamente agua al sedimento en el beaker y se repite el proceso. Se obtienen dos cajas de Petri con papel de filtro que tiene esporas y material orgánico. La mayoría de las esporas se encuentran en los bordes del papel filtro, pues durante la filtración hay una sedimentación de partículas pesadas. En el papel filtro se cuentan las esporas.

#### 4.1.6 Método de pipeteo según Smith y Skipper (1979).

Se pesa 1 g de suelo en un tubo de ensayo y se añaden 9 ml de agua destilada. Se agita el tubo con la mano y se pipetea rápido 1 ml de la suspensión en líneas paralelas en pa-

✓  
pel filtro de 9 cm de diámetro colocado en una caja de Petri. Se cuentan las esporas sobre el papel, húmedo o seco, usando un microscopio de disección con aumento de 10 X ó 50 X.

#### 4.1.7 Método utilizado en CIAT-Proyecto Micorriza

Se pesan 10 ó 50 g de suelo fresco en un beaker y se añaden 0.5 hasta 1 litro de agua. Durante una hora se agita varias veces la suspensión. Después de la última agitación se dejan sedimentar durante algunos segundos las partículas pesadas y decanta enseguida a una serie de tamices 750  $\mu$ m, 105  $\mu$ m y 63  $\mu$ m, uno colocado sobre el otro. Se aplica nuevamente agua al residuo, se agita y decanta. Este proceso se repite. Después se lava con un chorro fuerte de agua, el tamíz de 750  $\mu$ m para que las partículas pequeñas pasen a los otros tamices. La fracción de 750  $\mu$ m se pasa a un plato de Petri; si tiene todavía mucho micelio y raíces con esporas hay que macerar la fracción en una licuadora por 15-20 segundos y aplicar la suspensión otra vez a la misma serie de tamices (los más finos todavía tienen las fracciones). Se aplica al tamíz de 750  $\mu$ m otra vez agua. Las fracciones del tamíz 105  $\mu$ m (105  $\mu$ m-750  $\mu$ m) y 63 (63-105  $\mu$ m) se pasan separadamente a beakers de 250 ml y se llena hasta 3/4 partes con agua. Se agita bien la suspensión, se espera algunos segundos (para que sedimente el suelo) y se decanta al tamíz de 63  $\mu$ m. La agitación del residuo en el beaker se repite una vez. Al final se pasa la fracción (ahora limpia del suelo) a un beaker pequeño y se la filtra (este proceso se ha-

ce con ambas fracciones, 105  $\mu$ m y 60  $\mu$ m, separadamente). El papel filtro (11 cm de diámetro) tiene una red de 16 cuadrados (pintados a lápiz).

Se pone el papel filtro en una caja de Petri y se cuentan las esporas bajo el microscopio de disección. Los papeles filtro (en cajas de Petri) se pueden guardar en la nevera varios días. Antes de contar las esporas es recomendable mojar el papel con poca agua. El número de esporas se calcula por gramos de suelo seco.

#### 4.2. Métodos cualitativos

El objetivo en éste caso es la separación de las esporas del suelo y del material orgánico para facilitar el aislamiento y la identificación.

##### 4.2.1 Método de "Columna de Gelatina", según Mosse y Jones (1968)

Las columnas de gelatina se producen en tubos de vidrio (30 cm de longitud, 20 mm de diámetro aproximadamente); el tubo está cerrado por debajo con un tapón de caucho. Se disuelve la gelatina en agua destilada en concentraciones de 20%, 15% y 5% (peso/peso). Se dá la solución al 20% al tubo hasta una altura de 5 cm y se la enfría a 4°C para que se solidifique. Este proceso se repite para las soluciones de 15% y 5% en el mismo tubo, una después de la otra. Se aplica a la columna de

las tres capas de gelatina solidificada, agua destilada hasta una altura de 10 cm en el tubo. Se guardan las columnas verticalmente en la nevera (4°C).

Se tamizan 10 g de suelo y se colecta el material de los tamices (por ejemplo, 250  $\mu\text{m}$ , 105  $\mu\text{m}$  y 44  $\mu\text{m}$ ). Antes de la aplicación de las fracciones a las columnas se las coloca verticalmente al baño María para que se licue la gelatina (32°C por 30-40 min). Después de la aplicación de la fracción del tamíz al tubo, el material va a sedimentarse por gravedad. Después de 30 min de la sedimentación se solidifica la columna en la nevera (4°C). Se decanta el agua. Este agua contiene material orgánico. El tubo con la columna de gelatina se introduce en agua caliente hasta que se pueda sacar la columna del tubo (con este fin se quita el tapón de caucho).

La columna de gelatina se corta en secciones:

1. de la sección 5% (1-4 cm de la parte superior)
2. de la sección 5-15% (4-6 cm de la parte superior)
3. de la sección 15-20% (9-11 cm de la parte superior)
4. de la sección 20% (los últimos 3 cm inferior, 13-15 cm).

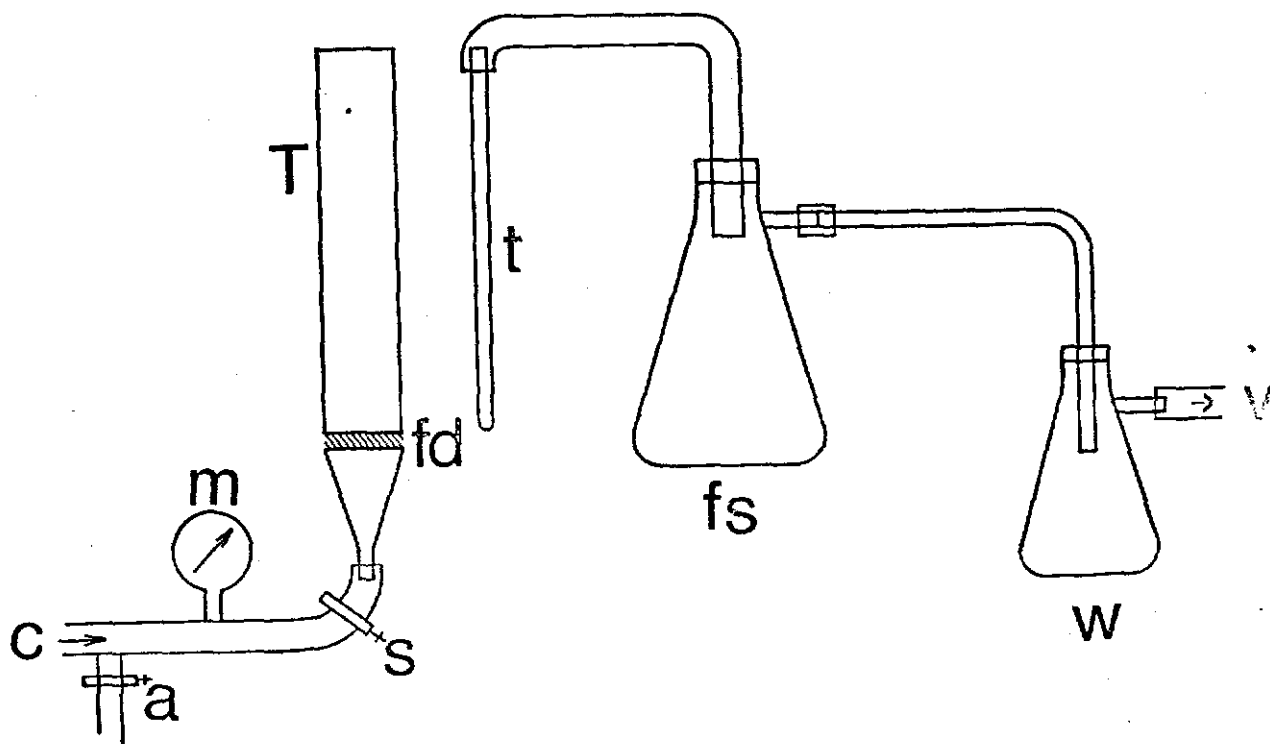
Se colocan las secciones en beakers y se las licua en baño María. Las soluciones se vacían en el tamíz 44  $\mu\text{m}$  separadamente. Se lavan las esporas con agua tibia (30°C) para purificarlas de la gelatina. Se pasan las esporas con agua a papel filtro o a una caja de Petri para separarlas. Se aíslan las esporas usando agujas cuando están en papel filtro o con pipetas

de Pasteur cuando están en cajas de Petri.

#### 4.2.2 Método de separación por "Flotación y Burbujeo" según Furlan y Fortin (1975)

Antes de utilizar el equipo, cuyo diseño se ve en gráfica 5, se tamiza una cierta cantidad del suelo, como se ha descrito en los métodos anteriores.

Gráfica 5.: EQUIPO DEL LABORATORIO NECESARIO PARA LA SEPARACION DE ESPORAS SEGUN FURLAN Y FORTIN (1975).



El equipo consta de un tubo grueso (T) de 6 cm de diámetro y una longitud de 55 cm. 5 cms antes del fondo, en el tubo grueso, hay un plato de porcelana (fd) del mismo diámetro del interior del tubo. El plato está fijo a la pared del tubo. Los poros del plato tienen 4.5-5.5  $\mu\text{m}$ . Se necesita aire comprimido (c) y un manómetro (m) para regular la presión. Estos elementos se fijan. Para sacar la solución del tubo grueso se necesitan otros accesorios; un tubo largo y delgado de 4 mm  $\emptyset$  (t), dos Erlenmeyer de vacío (fs y w). El frasco (w) está conectado a un sistema de vacío producido por agua corriente (v). El segundo frasco (fs) sirve para colectar la solución del tubo grueso a través del delgado (t).

Proceso: (referido a la gráfica 5.)

Se abre la llave de aire comprimido (c) y se controla la presión por medio de la llave (a) de tal manera que la presión corresponda a 12 lb/pul<sup>2</sup> (0.84 kg/cm<sup>2</sup>). La llave (s) debe estar abierta. Se introduce 1 lt de glicerol (50% V/V) al tubo grueso (T) y se aumenta la presión del aire a 15 lb/pul<sup>2</sup> (1.05 kg/cm<sup>2</sup>). Después se aplica, con un poco de agua, la fracción tamizada. Si se pega algo del material orgánico a la pared interna del tubo se puede lavar con glicerol. Se agita la solución de glicerol durante 1 o 2 min por medio del aire comprimido que sale de (c). Se cierra la llave (s) y después la llave que dá acceso al aire. Si aparece espuma en la superficie de la solución, se lavan las partículas pegada al vidrio con glicerol.

Se deja sedimentar las partículas de suelo en el fondo del tubo, por 30 minutos.

Se hace el vacío. El tubo delgado (t) se sumerge un poco en la solución. En la superficie está flotando el material orgánico que no nos interesa. Después de sacar toda la solución se limpia el tubo delgado introduciéndolo en glicerol puro cuando el vacío todavía esta funcionando. Se tamiza la solución con espumas, ahora colectadas en el frasco (fs) en el tamiz de menor diámetro de poros. El glicerol se colecta para reutilizarlo. Las espumas en el tamiz se lavan con agua corriente y se las pasa a una solución de Ringer (ver Apéndice, Tabla 5) para guardarlas; o a papel filtro o a cajas de Petri para separarlas. Si el objetivo es la separación cuantitativa hay que lavar el interior del tubo grueso (T) con glicerol y sacar la suspensión casi completamente. También hay que controlar el sedimento para detectar si tiene espumas.

#### 4.2.3 Método de sedimentación con caolín y flotación en solución de azúcar según Tommerup y Kidbey (1979).

Se agitan en un beaker 50 g de suelo con 150 ml de agua. Se decanta enseguida a una serie de tamices: 2 mm, 250 um, 100 um. Se repite la agitación y la decantación 15-20 veces. Se lava la fracción del tamiz superior (2 mm) con un chorro fuerte de agua. La fracción del tamiz 100 um se pasa con agua a un tubo de centrifugación (50 ml, 3 mm grosor de la pared, Pyrex-tubo); se agita y mezcla la suspensión en el tubo con 2 g de cao-



lin molido (polvo, partículas 130  $\mu\text{m}$ ) y se centrifuga (72 m/sg durante 5 min). El caolín compacta las partículas del suelo y las esporas, y se puede decantar el agua. El sedimento se revuelve con una solución de azúcar (50% P/V en agua). Se centrifuga (72 m/sg durante 45 segundos). El decante se filtra, por vacío, en un papel filtro Whatman GF/A filtro de fibra de vidrio. De aquí se aíslan las esporas con agujas.

#### 4.2.4 Método utilizado en CIAT-Proyecto Micorriza

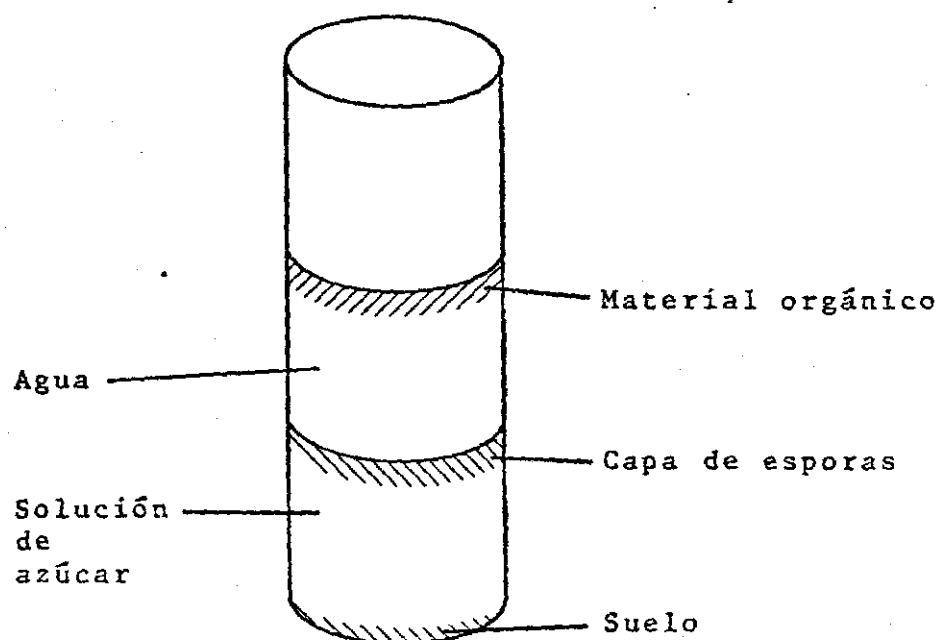
El método está basado en el trabajo de Ohms (1957); aquí se presentan modificaciones y ampliaciones.

Se disuelven entre 50 y 500 g de suelo (dependiendo de la cantidad disponible) en 0.5 hasta 1 litro de agua y se agita varias veces, durante una hora. Después de 30 segundos de la última agitación se decanta a una serie de tamices de 1 mm, 250  $\mu\text{m}$ , 45  $\mu\text{m}$ . La agitación y la decantación se repiten dos veces. Se agita el contenido en el tamíz (1 mm) con un chorro fuerte de agua corriente; usando poca agua (20-25 ml) se pasan, separadamente, las fracciones de los tamices 250  $\mu\text{m}$  y 45  $\mu\text{m}$  a tubos de centrifugación (100 ml volumen) .

Se agita la suspensión en el tubo y se inyecta con una jeringa, al fondo del tubo, 20-25 ml de una solución de azúcar (1 libra de azúcar + 1 litro de agua destilada). Enseguida se centrifuga a 3500 rpm durante 3-4 minutos. Debido a la centrifugación, hay una sedimentación de las partículas pesadas en el fondo del tubo. Las esporas se encuentran formando una ca-

pa en la superficie de la solución de azúcar. El material orgánico se queda en la superficie del agua, como muestra la gráfica 6.

Gráfica 6.: FORMA EN QUE APARECEN LAS DISTINTAS FRACCIONES  
DESPUES DE LA CENTRIFUGACION EN EL TUBO DE CENTRI-



Se saca la capa de esporas, usando una jeringa que tiene adaptada una manguera (5 mm diámetro interno) a la parte donde se coloca la aguja. Las esporas se esparcen sobre un tamíz fino (44  $\mu$ m). Se lavan las esporas en el tamíz durante cinco minutos con agua corriente. Se pasan las esporas con agua a una caja de Petri, de donde se aíslan. Para el aislamiento de esporas, se recomienda utilizar pipetas de Pasteur. La boca de la pipeta se estrecha al fuego.

La materia orgánica (ver Gráfica 6) se decanta también a un tamíz, se lava con agua y se observa, para buscar esporas.

#### Procesos especiales:

- a.) Si hay una mezcla de varios tamaños de esporas se puede separar las grandes de las pequeñas por la gravedad de las mismas. Se coloca las esporas con 20 ml de agua en un tubo de centrifugación y se inyecta al fondo 20 ml de una solución al 20% de azúcar (20 g azúcar disuelta en 80 ml de agua), después se inyectan 20 ml de una solución al 40% de azúcar (40 g azúcar disuelta en 60 ml de agua). Se centrifuga como se explicó anteriormente y se saca, con la jeringa, las capas de esporas de las superficies de las soluciones al 20% y 40% de azúcar, separadamente. En la superficie de la solución al 20% de azúcar se acumulan las esporas livianas, en la de 40% de azúcar las esporas pesadas. El resto del procedimiento se hace como se describió anteriormente.

NOTA: Se trabaja rápido para evitar daños de las esporas

por la presión osmótica del azúcar.

- b.) En el material orgánico, muchas veces, se encuentra mucho micelio del hongo y raicillas, a los cuales pueden estar conectadas las esporas. Si es así, se pueden separar éstas del resto del material adicionando agua y formando una suspensión que se licua durante 15 a 20 segundos. El mismo efecto se consigue por agitación de la suspensión con pedazos finos de vidrio, colocados en un frasco tapado. La centrifugación se hace igual que en los casos anteriores.
- c.) Para aislar esporas muy pequeñas cuyo diámetro es menor de 44  $\mu\text{m}$ , se utiliza en vez de tamices papel filtro, colocado en embudos de filtración.

#### 4.3 Discusión de los métodos

El objetivo de la separación de esporas, para contarlas o aislarlas, es obtener:

- una muestra que contenga la máxima cantidad de esporas del suelo (extracción de 98-100%).
- una muestra libre de suelo y material orgánico para facilitar el conteo e identificación de las esporas.
- una comparación de los métodos se muestran en las tablas 6 y 7. El equipo a veces es importante para decidir qué método se vá a utilizar, pero de todos modos es recomendable adquirir varios tamices (los más importantes son los finos: 44  $\mu\text{m}$  y/o 63  $\mu\text{m}$ ).

## 5. TECNICAS PARA LA PRODUCCION DE CULTIVOS PUROS DE HONGOS MICORRIZOGENOS

La producción de cultivos puros consta de dos etapas igualmente importantes y complementarias, la primera se refiere al conocimiento de la taxonomía y catalogación de estas especies de hongos y la segunda comprende el aspecto práctico de la producción basado, éste, en el uso de métodos que permitan la multiplicación de cepas evitando la contaminación por patógenos.

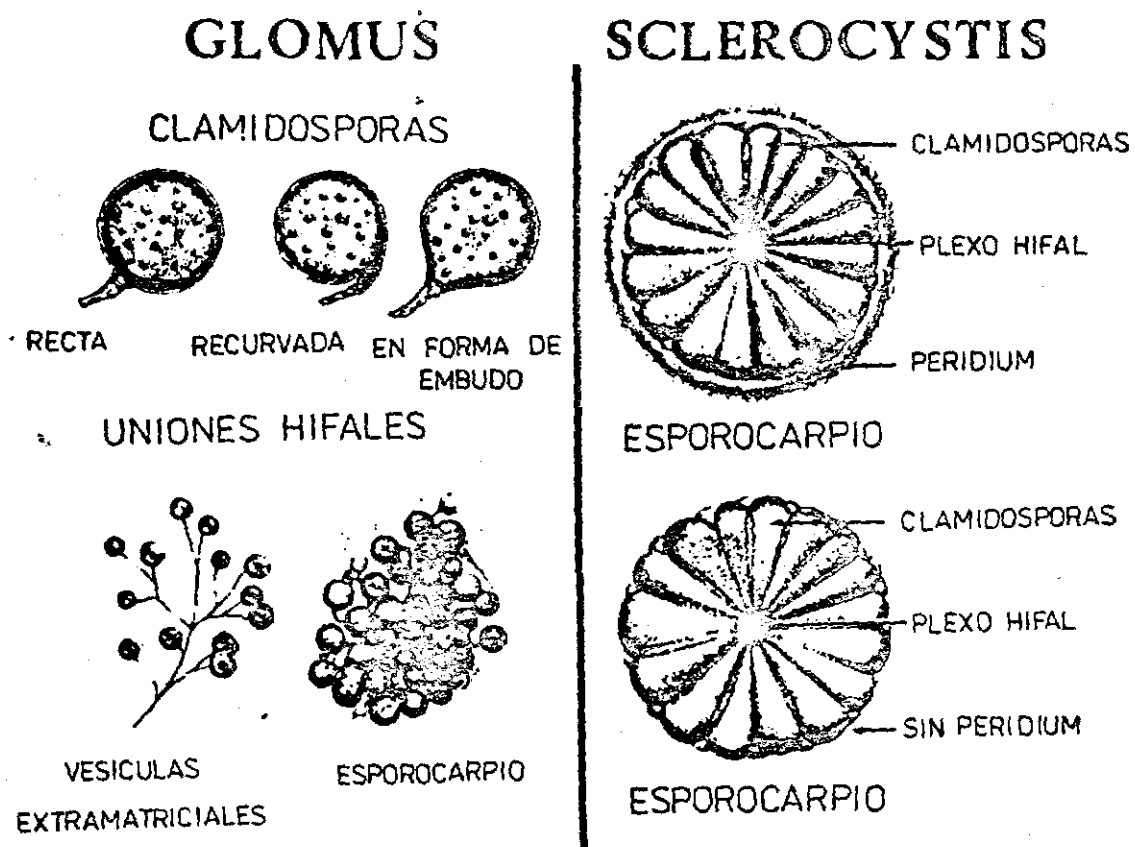
### 5.1 Taxonomía

En la familia Endogonaceae, solamente los géneros *Glomus*, *Sclerocystis*, *Acaulospora*, *Entrophospora* y *Gigaspora* forman micorriza VA.

Basados en la morfología de la formación de esporas, existen dos grupos: a) los géneros que producen clamidosporas, al cual pertenecen *Glomus* y *Sclerocystis* (ver Gráfica 7), y b) los géneros que producen azigosporas que comprende el resto de los mencionados aquí (Gráfica 8).

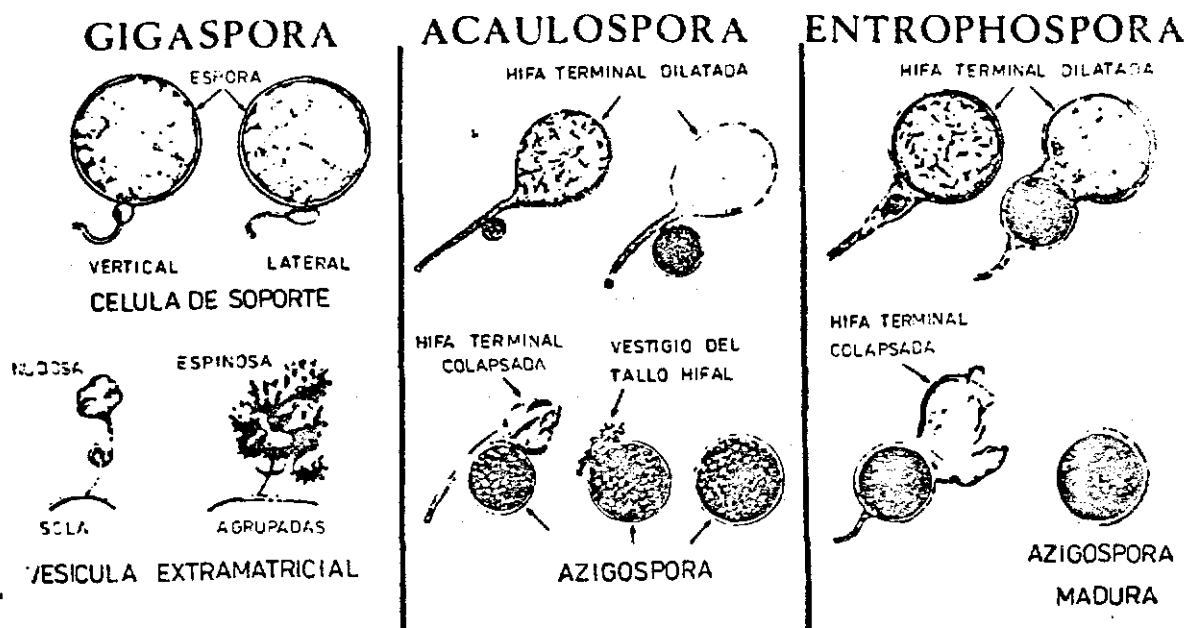
- a) Los géneros *Glomus* y *Sclerocystis* forman esporocarpios en el suelo, siendo mas frecuente en *Glomus* la presencia de esporas simples en el suelo. Del género *Glomus* hay especies que forman esporas en la epidermis de las raíces.

Gráfica 7.: GENEROS QUE FORMAN CLAMIDOSPORAS (CORTESIA DEL DR. N.C. SCHENCK, FLORIDA STATE UNIVERSITY, GAINSVILLE, FLORIDA, 1982).



- b) Los géneros *Acaulospora*, *Gigaspora* y *Entrophospora* no producen esporocarpios. Los géneros se diferencian entre sí por la hifa de soporte típica, como en *Gigaspora* o por la formación de esporas conectadas a hifas terminales dilatadas en *Acaulospora* y *Entrophospora* (ver Gráfica 8).

Gráfica 8.: GENEROS QUE FORMAN AZIGOSPORAS (CORTESIA DEL DR. N.C. SCHENCK).



NOTA: Sin hifa de soporte no es posible realizar la identificación de una espora a nivel de género y mucho menos a nivel de especies.

La identificación de las distintas especies en cada género se hace en base a las siguientes características morfológicas de las esporas:

- Tamaño; diámetro, medido con micrómetro.
- Color; puede ser: hialino, amarillo, rojo, negro, miel, rosa, u otras tonalidades.

- Forma; puede ser: redonda, esférica, ovalada, irregular, elipsoide, subglobosa, u otras.
- Estructura citoplasmática; puede ser: vacuolado o reticulado
- Estructura superficial; puede ser: lisa, áspera, ornamentada, ondulada etc.
- Número de paredes y grosor de las mismas, medido con micrómetro
- Formación de la hifa terminal dilatada en el suelo (ver Gráfica 7 y 8)
- Tipo de hifa de soporte (ver Gráfica 7 y 8)

Descripciones de esporas y claves para separar las especies se encuentran en: Gerdemann y Trappe, 1974; Tandy, 1975; Hall y Fish, 1979; Hall, 1977; Nicolson y Schenk, 1979; Schenck y Smith, 1982; Trappe, 1982.

Es importante anotar que en el suelo natural no solo hay esporas de micorriza VA; también se separan otros microorganismos, tales como esporas de hongos patógenos, huevos de insectos, nemátodos, etc., los cuales pueden tener el mismo tamaño de las esporas de micorriza VA. Si no se conocen las formas de patógenos y demás, la única posibilidad para asegurarse es la inoculación de plantas hospederas con estos organismos. Si estos organismos producen formas vesiculares o arbúsculares en las raíces del hospedero las esporas separadas son de un hongo que forma micorriza VA.



## 5.2 Catálogo de cepas aisladas.

El registro de una cepa dentro del catálogo, consta de dos etapas: La primera consiste en llenar -en forma provisional- un formato (ver Apéndice, Tabla 8) con una descripción preliminar de las esporas aisladas. Una vez que se ha comprobado (ver párrafo 5.3) que dichas esporas pertenecen a algunos de los géneros anteriormente mencionados (párrafo 5.1), se pasa la segunda etapa que consiste en completar la información de la hoja de registro. Es aconsejable tomar de cada cepa aislada fotografías microscópicas.

Además, de la descripción se hace un montaje de esporas en láminas en lactofenol. Se sellan los bordes del cubreobjeto con una sustancia que no se disuelva al contacto con el lactofenol.

Herrera y Ferrer (1980) recomiendan montar las esporas en un medio modificadó de Farrant (40 g goma arábica, 40 ml de agua, 20 ml glicerol y algunos cristales de fenol). Ellos no encontraron cambio en el tamaño ni el grosor de las paredes, pero sí encontraron cambios en la estructura citoplasmática de las esporas y en el color después de 5 años de almacenamiento.

Cristopher Walker, Forest Pathology Laboratory, Depts. Forestry and Botany & Plant Patholog, Iowa State University, Ames, Iowa 50011, U.S.A., propuso distintas formas para preservar esporas.

- 1) en frascos pequeños con lactofenol,
- 2) en frascos pequeños con formol al 5%;
- 3) en láminas montadas en PVL (Polyvinyl alcohol lactofenol)

Se aplica a esporas, aisladas, sobre la lámina, algunas gotas de PVL y se tapan con un cubreobjetos. El PVL se solidifica y conserva las esporas por tiempo indefinido. (Para la preparación de PVL, ver Apéndice, Tabla 9).

### 5.3 Métodos de inoculación de hospederos con esporas aisladas

Para la descripción de especies de los hongos o la prueba de la efectividad de ellas se debe multiplicar las esporas aisladas; con el fin de obtener cultivos puros con grandes cantidades de una sola cepa. Además, la inoculación de plantas hospederas es la única forma para asegurarse que se aisló esporas de hongos que producen micorriza VA.

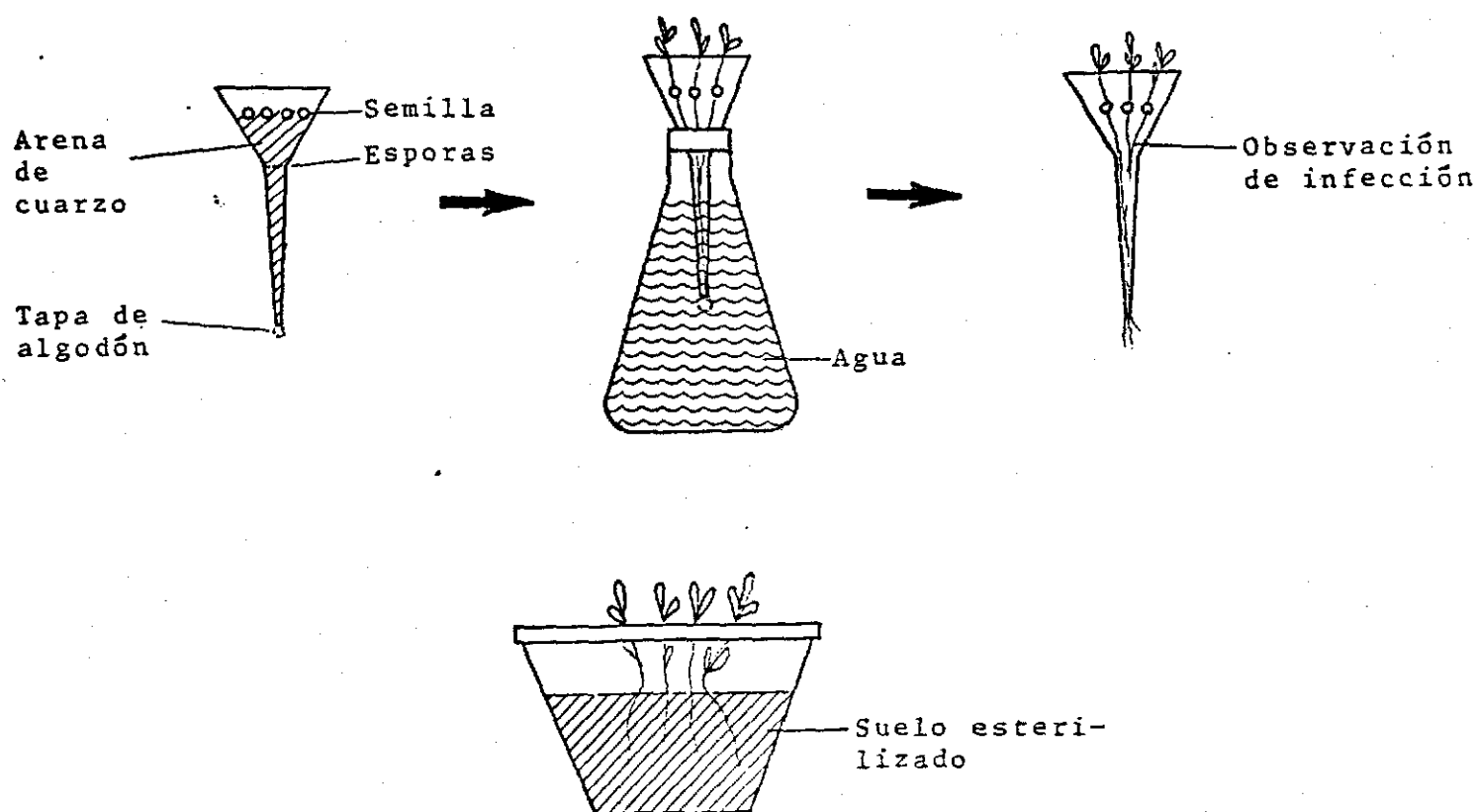
Aquí solamente se tratan dos métodos, los cuales son prácticos y fáciles.

#### 5.3.1 Método en embudo, según Gerdemann (1955).

Se hace un embudo de papel de aluminio. Se tapa la parte terminal del embudo con algodón. Se llena el cuello del embudo con arena de cuarzo y se esparcen sobre la arena entre 20 y 50 esporas aisladas del mismo tipo. Se llena el embudo con arena de cuarzo y se siembran semillas (esterilizadas superficialmente), del hospedero. Como plantas hospederas se recomiendan las leguminosas. Se aplica agua destilada a los embudos hasta que germine la semilla. Después de la germinación se pone el embudo en un frasco de Erlenmeyer (se pueden usar otros frascos con bo-

ca estrecha) que tenga agua (ver Gráfica 9). Así la arena siempre está húmeda debido a la evaporación.

Gráfica 9.: PASOS DE LA INOCULACION DE PLANTAS HOSPEDERAS CON ESPORAS AISLADAS (según GERDEMANN, 1955).



Después de 14 días se reemplaza, por un día, el agua en el frasco de Erlenmeyer por solución de Hoagland (1N) ó como alternativa, por una solución nutritiva de Knopp. No se debe dejar el embudo en la solución nutritiva por más de un día ya que puede haber acumulación de sales en la superficie de la arena lo cual puede ocasionar mal crecimiento de las plantas.

Después de un mes de crecimiento, hay que revisar si las raíces se infectaron (tomando una muestra de raíces del embudo). En caso que haya infección se trasplantan las plantas, cuidadosamente, de los embudos a pots de 1 o 2 litros de capacidad que contengan suelo esterilizado. El suelo debe tener, aproximadamente, las mismas condiciones químicas del sitio de donde salió originalmente la cepa del hongo. Las condiciones físicas del suelo se mejoran si se prepara una mezcla de éste con arena para obtener una buena aireación. Los elementos nutritivos se aplican de acuerdo con los contenidos originales del suelo, pero el fósforo se aplica únicamente en pequeñas cantidades (25 kg P/Ha) si hay menos de 10 ppm P en el suelo.

### 5.3.2 Método utilizado en el CIAT-Proyecto Micorriza

Se utiliza para la multiplicación de cepas aisladas vasos de icopor, que contengan 200 g de suelo, y cuyas condiciones químicas correspondan, aproximadamente, con las del sitio de donde salió originalmente la cepa. El suelo se mezcla con arena para mejorar la aireación y se esteriliza en autoclave.

Se hace un hueco en la superficie del suelo, de una profun-

didad de 2 hasta 3 cm, en el cual se aplican de 25 a 50 esporas. Se cierra el hueco y se siembra semilla de Pueraria phaseoloides, esterilizada superficialmente. Se aplica en solución el equivalente a 12.5 kg P/ha, 50 kg K, 25 kg Mg. La solución nutritiva tiene además Rhizobium (CIAT 2434). Después de seis semanas de crecimiento, se trasplanta todo el contenido del vasito a pots de 3 kg de capacidad con el mismo tipo de suelo utilizado en los vasitos. Contra ácaros se aplican 0.5 g de Temix a estos pots. Si se encuentra alguna formación de hongo en las hojas del hospedero, se fumiga con 500 ppm Captan (1 g Orthocí- de- 50 por 1 litro de agua).

#### 5.4 Método de esterilización superficial de esporas

Es recomendable esterilizar las esporas aisladas superficialmente desde la primera fase de la multiplicación para evitar la contaminación del suelo y del hospedero por patógenos que podrían estar asociados a las esporas. Generalmente la esterilización superficial es similar a la realizada en semillas.

Es importante anotar que se trabaja en condiciones de no contaminación y que todos los instrumentos deben estar esterilizados para tal efecto.

Para la esterilización superficial de esporas, se conocen dos reactivos:

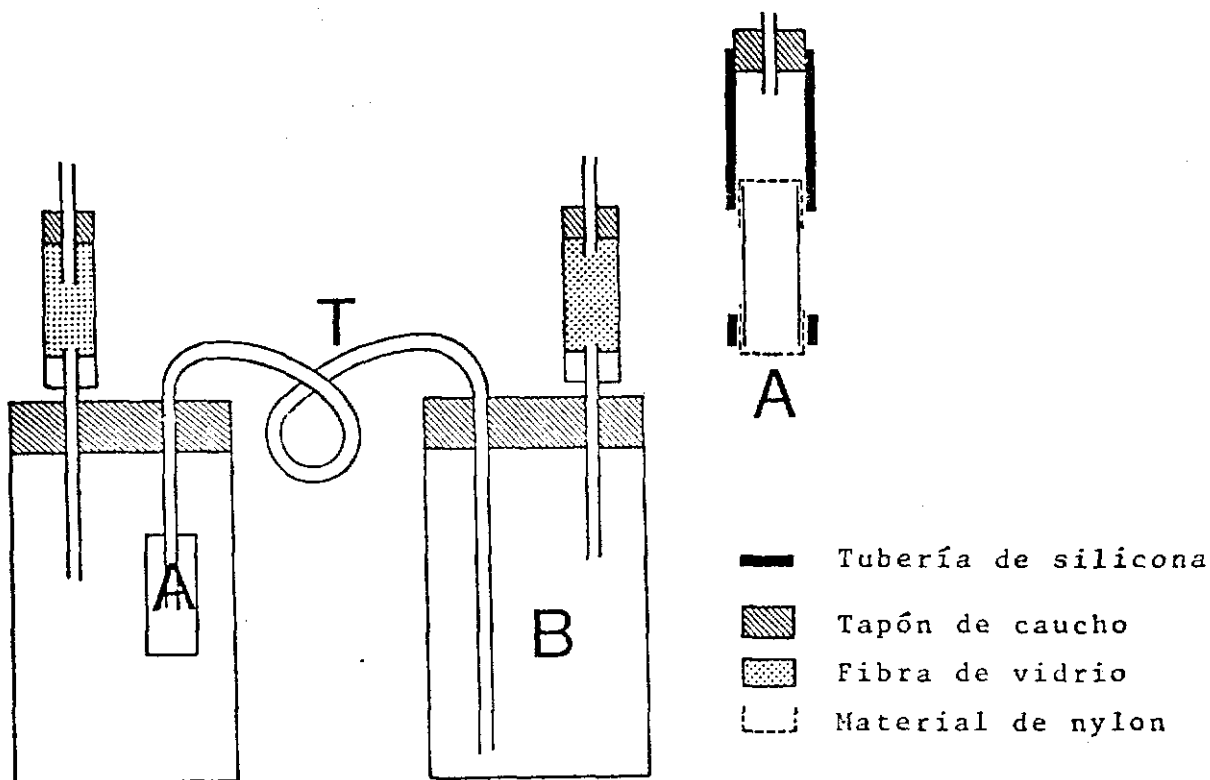
-Chloramine-T e Hipoclorito de sodio.

En la Tabla 10 del Apéndice se encuentra una descripción de las concentraciones utilizadas para estos reactivos, tiempo de expo-

sición de las esporas a los mismos y los medios utilizados por los diferentes autores para verificar la esterilidad de las esporas. Las siguientes, son las técnicas utilizadas para el proceso de la esterilización superficial:

- Mosse (1961) colocó el esterilizante en vidrios de reloj. Aplicó las esporas al esterilizante y las sacó con una pipeta fina, esterilizada, para transferirlas a agua esterilizada en otros vidrios de reloj. El lavado se repitió 3 veces.
- Mosse y Phillips (1971) desarrollaron un aparato simple para la esterilización superficial de esporas (ver Gráfica 10).

Gráfica 10.: SISTEMA DE ESTERILIZACION SUPERFICIAL USADO POR MOSSE Y PHILLIPS.



Las esporas están colocadas en un pequeño tubo de vidrio (A) cerrado en sus extremos por gaza de nylon asegurada en su sitio por un anillo de caucho y conectada a un reservorio (B) que contiene esterilizante o agua por un tubo flexible (T). Las esporas fueron esterilizadas y lavadas en este envase subiendo y bajando el reservorio varias veces.

- McIlveen y Cole (1979) colocaron las esporas en un cuadrado (4 x 4 cm) de tela de almidón y la doblaron antes de meterla en la solución con esterilizante. Después lavaron la bolsita en agua esterilizada.
- Koske (1981) colocó 40-100 esporas en un papel filtro (3 cm diámetro) mojado y lo dobló como un paquete. Este paquete estaba a su vez colocado entre dos papeles de filtro (7.5 cm diámetro) en un embudo de Büchner. Llenó el embudo durante 2 min con el esterilizante y aplicó después varias veces agua destilada y esterilizada, extrayendo el esterilizante y el agua estéril del embudo por medio de vacío.
- MacDonald (1981) ha transferido las esporas con una pipeta fina a papel filtro de 4.5 cm diámetro (Whatman No. 1) y las ha tapado con otro papel filtro del mismo tamaño (sandwich). El "sandwich" se colocó en un sostén para papel filtro (tipo Millipore Swinnex 47). (Los papeles y el sostén se esterilizaron en autoclave antes de aplicarle las esporas). Se inyectó el esterilizante con una

jeringa por un filtro de membranas (0.22  $\mu$ m abertura de poro) al sostén del filtro hasta que salió líquido. Se utilizaron 20 ml de esterilizante para 200 esporas. Se lavó el esterilizante del papel filtro inyectando 200 ml de agua destilada al "sandwich".

#### 6. TECNICAS DE GERMINACION DE ESPORAS SIN LA PRESENCIA DE HOSPEDEROS.

En el capítulo anterior se describió la interacción Hongo-Planta-Suelo, para la producción de la infección; excluyendo la planta de esta interacción, las esporas son capaces de germinar, pero no de multiplicarse.



La idea de hacer pruebas de germinación de esporas en caldos de cultivo o en suelo sin plantas, está basada en la hipótesis que un alto porcentaje de germinación indicaría una alta probabilidad de una especie dada del hongo, de infectar a un hospedero. Basados en esta hipótesis los objetivos son los siguientes:

- Estudiar, bajo condiciones controladas -de laboratorio-, el grado de adaptación, de una determinada especie, del hongo a factores químicos y físicos del suelo, tales como pH, nivel de nutrientes y pesticidas, temperatura, humedad, etc. Así como también, la variación de estos factores.
- Determinar la viabilidad de esporas, bien sea almacenadas (ver capítulo siguiente) o en fresco, medida ésta, como porcentaje de germinación.

Hay dos clases de técnicas a saber:

- Las que utilizan caldos de cultivo, y,
- Las que utilizan suelo como medio de germinación.

#### 6.1 Uso de caldos de cultivo

Los reactivos y procedimientos para la preparación de diferentes medios se encuentran bien documentados en la literatura científica (Mosse, 1961, 1962; Mosse y Phillips. 1971; Mosse y Hepper, 1975; Hepper y Mosse 1975; Hepper y Smith, 1976; Hep-

per, 1981; Daniels y Graham, 1976; Green et al, 1976; Allen et al, 1979, 1980; McIlveen y Cole, 1979; Koske, 1981; MacDonald, 1981; St.John et al, 1981).

Los autores, colocaron esporas esterilizadas superficialmente en un medio (agar con nutrientes específicos) y observaron, después de cierto tiempo de incubación, la germinación de las esporas bajo el microscopio de disección. Los diferentes medios son utilizados más que nada, para estudiar los factores químicos que afectan el proceso, ó para la prueba de viabilidad de esporas.

## 6.2 Germinación de esporas en suelo.

Tienen dos variantes, que son:

- A. Las esporas están en contacto directo con suelo
- B. Las esporas se coloca en papel filtro

A.- Esta variante consiste en mezclar una pequeña cantidad de suelo y esporas, que se colocan en una caja de Petri y después de incubarlas por un período de tiempo, se tamiza la muestra de suelo y se hace un recuento de las esporas germinadas.

Este método especialmente sirve para estudiar factores físicos, como humedad del suelo, estructura etc.

B.- Esta técnica consiste en colocar las esporas aisladas en un papel filtro micropor (Gelman GA-8, 25 mm Ø), doblar

el papel filtro e introducirlo doblado, en una abertura estrecha hecha en suelo esterilizado colocado en una bandeja; el suelo debe mantenerse semi-húmedo; después de 1 a 3 semanas de incubación, se saca el papel filtro y se fija, desdoblado a un cartón. Se colorean las esporas y el micelio de las esporas germinadas con azul de tripano en lactofenol o con cualquier coloreante. Y bajo un microscopio de disección se observan las esporas germinadas.

## 7. METODOS PARA ALMACENAJE DE HONGOS MICORRIZOGENOS

El almacenamiento de estos hongos es utilizado para la conservación de:

- cepas puras, a largo o corto plazo, e
- inóculo cuyo uso, en el campo, no es inmediato.

### 7.1 Almacenamiento de cepas puras.

La conservación de cepas puras en forma activa, es decir, que se están multiplicando, exige una inversión grande en espacio, tiempo y mano de obra en un invernadero. Estos inconvenientes se solucionan almacenando el hongo de diferentes formas, ya que así se puede disponer de la cepa o del inóculo cada vez que sea necesario. Las formas son:

- Mezcla de suelo-raíz-hongo

- Raíces infectadas
- Esporas separadas

#### 7.1.1 Mezcla de suelo-raíces-hongo.

Se utiliza para el almacenamiento el contenido de pots en que crece un hospedero con un cultivo puro del hongo.

El proceso es el siguiente:

Se corta la planta y se homogeniza el material semi-húmedo, del pote (suelo con raíces) pasándolo por un tamíz (apertura de malla: 1 cm). Una buena homogenización se consigue triturando el suelo compacto con raíces en el tamíz. Se seca el material al sol hasta que tenga un porcentaje de humedad menor del 5%; se guarda en bolsas plásticas o frascos de plástico tapados. Se puede guardar en esta forma a temperatura ambiente (20°C) ó refrigerado (4°C). Se sabe que en esta forma el hongo conserva la viabilidad durante 1 a 3 años. Pruebas de viabilidad del hongo se realizan después de cierto tiempo de almacenamiento, inoculando plantas hospederas con el material guardado. El material también, se puede guardar semi-húmedo a temperatura de 4°C. Se sabe que esporas extraídas de suelo húmedo natural donde no hubo hospederos, sobrevivieron por tres años (Rives et al, 1980) ó más de 10 años (Dr. Gerdemann, California-Riverside colectó suelo 5 metros bajo su casa que tenía más de 10 años y separó del suelo esporas vivas). (Comunicación personal del Dr. Schenck).

### 7.1.2 Raíces infectadas.

Varios ensayos han demostrado que la infección de plantas es más rápida si se utilizan raíces infectadas en vez de esporas (Powell, 1976; CIAT, 1982).

Howeler y Sieverding (1982) demostraron que raíces infectadas, lavadas y guardadas por tres semanas en la nevera (10° C) no pierden la infectabilidad. Se sabe que el enfriamiento en agua de raíces infectadas no tiene influencia sobre la capacidad de estas raíces para producir infección en raíces de hospederos. El bloque de hielo con raíces se puede conservar en el congelador varias semanas, o meses. Una vez descongeladas hay que utilizar enseguida las raíces para la inoculación.

Jackson et al (1972) obtuvieron buenos resultados con raíces infectadas y secadas por frío (freeze drying). Lavaron las raíces, infectadas por Glomus mosseae, las secaron en frío, las molieron grueso, guardaron las raíces molidas a -20°C de temperatura. La prueba de viabilidad la hicieron con soya, en arena lavada y esterilizada. Sembraron semilla esterilizada superficialmente, la regaron con una solución, de raíces molidas y agua en proporción de 1:100, y taparon la semilla de soya con 2 cm de arena. Crush y Pattison (1975) repitieron el método de secamiento en frío con varias especies del hongo. Ellos recomiendan la técnica únicamente, para especies que están produciendo muchas vesículas dentro de las raíces. Afirman que, las vesículas como organismos de reserva podrían resistir

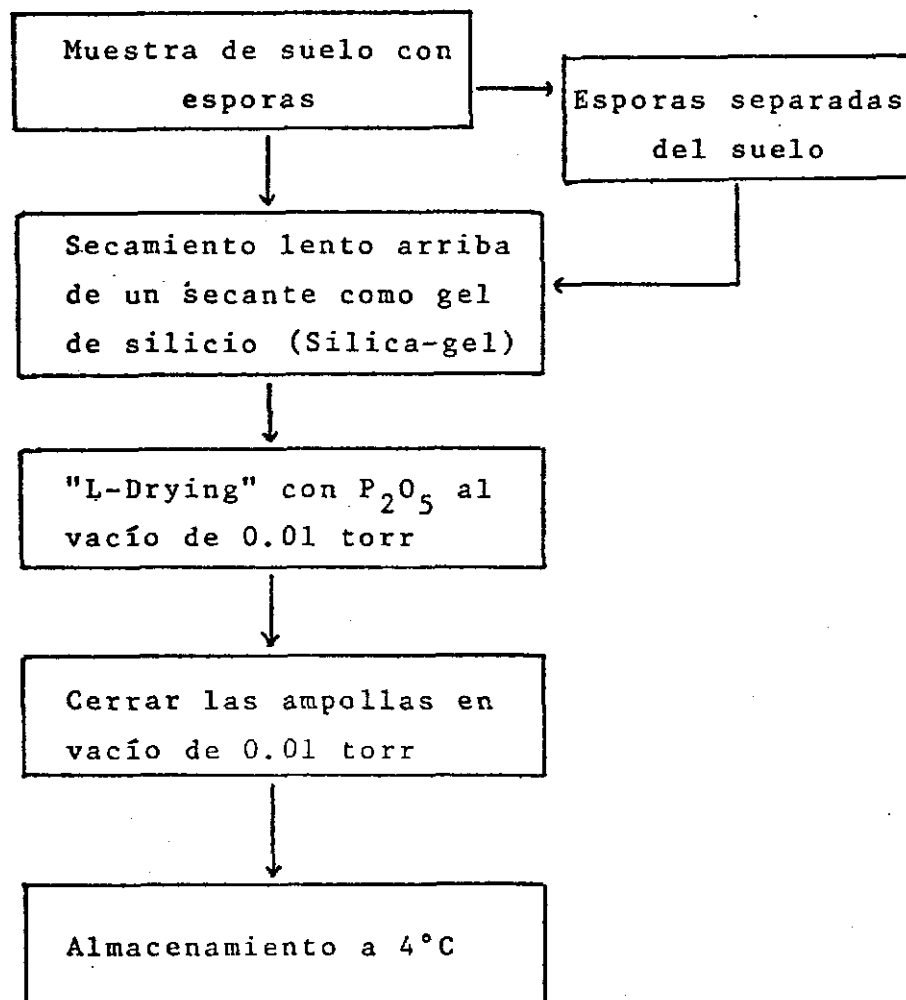
el secamiento en frío. Con esta técnica se puede conservar el hongo por tiempo indefinido.

### 7.1.3 Esporas separadas.

- A.- Las esporas separadas se pueden guardar, en papel filtro mojado (colocado en caja de Petri), en la nevera a una temperatura de 4°C durante un período de tiempo variable; varias semanas (Mosse, 1961) o máximo 4 meses (Sward et al, 1978) , sin que pierdan su viabilidad (ver Tabla 11 en Apéndice).
- B.- También es posible conservar esporas en agua guardándolas en frascos pequeños por 6 meses, aproximadamente (Sward et al, 1978; ver Tabla 11 en Apéndice).
- C.- Otra forma de conservación es en solución de Ringer. (Para su preparación ver Tabla 5, Apéndice), que contenga 250 ppm de estreptomicina (0.25 g ó 0.5 ml/lit). La conservación es por tiempo indefinido.
- D.- Tommerup y Kidby (1979) describieron un método para conservar esporas en ampollas después de un secamiento llanado "L-drying", que consiste en hacer el secamiento directamente del estado líquido, sin enfriar la muestra (temp.: 22°C). Como secante se utiliza pentóxido de fósforo en vacío. (La máquina para se-

car está descrita en Lapage et al, 1970). Tommerup y Kidby encontraron una alta viabilidad de las esporas del hongo almacenadas por este método. También después de una simulación del almacenamiento por largo tiempo (calentando las ampollas 40 min a 80°C) encontraron alta viabilidad. El proceso del secamiento es demostrado en Gráfica 11.

Gráfica 11.: PROCESO DEL SECAMIENTO DE ESPORAS ("L-DRYING")  
SEGUN TOMMERUP Y KIDBY (1979).



## 7.2 Almacenamiento de inoculantes para empleo en el campo.

Hasta el momento no se sabe mucho sobre la materia. Se recomienda, por ahora, utilizar en el campo un inóculo fresco. Como inóculo se entiende raíces infectadas (que no se pueden guardar por largo tiempo) o material (suelo semi-húmedo homogenizado), en que crecían hospederos con una cepa pura del hongo. El secamiento del inóculo (material suelo infectado) al sol puede disminuir la infectabilidad del mismo.

Si el inóculo (suelo infectado, semi-húmedo) no es para uso inmediato, se recomienda almacenarlo protegiéndolo del agua, sol y excesivo calor, evitando además, que los insectos depositen sus huevos en él.

## 8. METODOS PARA LA DETERMINACION DEL MICELIO EXTERIOR DE LA RAIZ

La medida del micelio exterior de la raíz da una determinación de la actividad de la micorriza, como se anotó en el punto 3.5 a.

Teóricamente, existen dos posibilidades para determinar el micelio exterior. La primera, determinando la relación peso micelio en base al peso o volúmen del suelo, y la segunda, midiendo la longitud de hifas en base al peso o volúmen del suelo.

Las técnicas para determinar el peso del micelio no están bien definidas y solo se han realizado trabajos especiales. A pesar de que se ha utilizado un método para medir la longitud



de las hifas exteriores en otros tipos de hongos del suelo, hasta ahora nadie ha desarrollado uno para aplicarlo a micorizas VA. En ambos casos el método sirve solo si se trabaja con cultivos puros, porque hay poca posibilidad de separar las hifas de micorriza de las de otros hongos.

#### 8.1 Determinación del micelio exterior por peso.

Consiste en separar el micelio del suelo y del material orgánico, secarlo y pesarlo. Se calcula el peso del micelio en base al peso ó volumen del suelo, de que se extrajo el micelio.

Métodos para la separación:

- a.) Las raíces de plantas con sistema radicular poco desarrollado y asociado a suelos arenosos se pueden separar del suelo y restos de materia orgánica, sumergiendo un cierto volumen del suelo en un balde con agua, moviendo las raíces lentamente hasta que salgan todas las partículas adheridas. El micelio que flota en el agua del balde se pasa por un tamíz muy fino (44  $\mu$ m). Se agita varias veces el suelo cuidadosamente en agua y se decanta al tamíz. Este proceso se repite varias veces. La fracción en el tamíz se pasa a una caja de Petri y se sacan con pinzas los restos del material orgánico, observando directamente al microscopio de disección.

Se filtra el contenido de la caja de Petri y se seca en horno, para determinar posteriormente el peso del micelio.

El micelio conectado con las raíces se separa con los dedos, frotando las raíces varias veces. El micelio se seca y se pesa. Para calcular el peso total se suma el peso colectado del suelo y el peso del micelio adherido a las raíces. Este método fué utilizado por Sanders et al (1977).

- b.) Nicolson y Johnston (1979) trataron de separar el micelio de raíces creciendo en suelo arenoso (dunas).

Ellos separaron el micelio de 0.5 litros de suelo por el proceso descrito en el punto 4.1.1. Todas las fracciones de los diferentes tamices se vertieron en agua y se sacaron el material orgánico, raíces, etc. Posteriormente, filtraron el micelio y lo secaron en el horno para calcular el peso del micelio en base a un litro de suelo.

- c.) Un método para separar el micelio de micorriza ectotrófica es descrito por Skinner y Bowen (1974).

Ellos tomaron muestras de suelo con un cilindro abierto en ambos extremos (2.4 cm de diámetro y 4 cm de altura).

#### PROCEDIMIENTO:

Se coloca el cilindro, con la muestra de suelo en el interior, en un embudo de Buchner (3.5 cm diámetro) al cual, se le ha colocado previamente un papel filtro.

El espacio entre la pared interior del embudo y la exterior del cilindro se rellena con plastilina para evitar el paso de aire

cuando se aplique el vacío.

Al cilindro que contiene la muestra de suelo, se le coloca en su parte superior, un cilindro adicional-abierto por sus extremos - hecho de un material flexible (cartón o caucho) ajustado al primero por una abrazadera. Este cilindro adicional contendrá gelatina líquida, al 20% P/V. Todo este montaje se pone al horno a calentarlo hasta que alcance una temperatura de 45° C.

Después se enciende el vacío durante 5-15 minutos, para que, por la succión generada por la bomba de vacío, el suelo se vaya impregnando lentamente con la gelatina. Se detiene el proceso cuando el filtro colocado en el embudo de Buchner contenga gelatina en abundancia.

El montaje (embudo-cilindro), se coloca en la nevera a 2°C para que la gelatina solidifique.

Una vez solidificada la muestra, se saca del cilindro y se corta en capas finas (0.5-4mm) con un micrótomo.

Se colocan las capas por separado en tubos (2.5 cm Ø y 10 cm de altura) de polivinilo, los cuales tienen un extremo cerrado con tela doblada, de terileno (un tipo de plástico), asegurada por un anillo de caucho. La tela tiene poros de 160 um de diámetro.

La capa de la muestra de suelo se coloca horizontalmente sobre la tela dentro del tubo. Se disuelve la gelatina colocando los tubos verticalmente en un autoclave por 10 min (los tubos se acomodan en una caja con suficiente agua para inundar las muestras).

Después de enfriar la muestra se drena el exceso de agua y se vierte cuidadosamente el contenido del tubo a cajas de Petri pequeñas. Al repetir el lavado, en la caja, el micelio queda flotando y se decanta a otra caja de Petri. Finalmente, se separa el micelio del suelo y del material orgánico bajo un microscopio de disección, por manipulación con una pinza delgada. Agitar el micelio con ultrasonido durante 3 a 5 min (con 20 kc/sg), puede facilitar la separación de este del material orgánico; el micelio se filtra, se seca y se pesa en una balanza de alta precisión. Los cálculos se hacen por volumen de suelo.

## 8.2 Medición de la longitud del micelio exterior.

- a. Método indirecto para determinar hasta que distancia crecen las hifas fuera de la raíz.

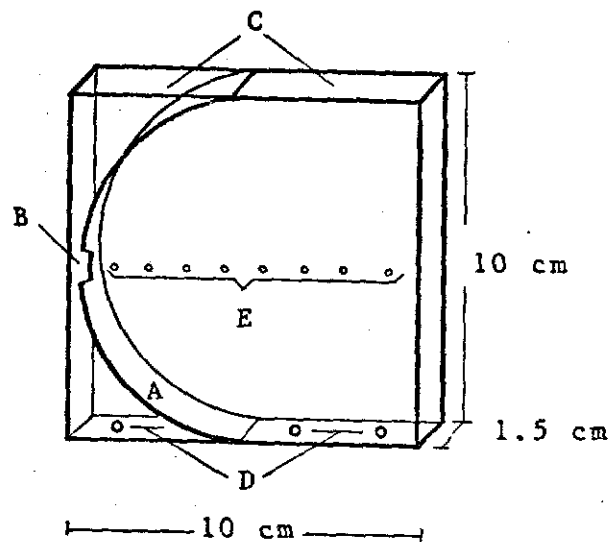
Rhodes y Gerdemann (1975) utilizaron cajas de plástico divididas por un pedazo de plástico como muestra la Gráfica 12.

Illevaron la caja con suelo e inocularon en la parte izquierda con esporas y trasplantaron en este sitio cebolla pregerminada.

Las raíces de cebolla (que no tienen pelo radicales) siguen creciendo al lado de la barrera y no entran por el hueco B (se controla periódicamente). Únicamente las hifas exteriores de micorriza crecen a través del hueco en la caja interior. Por inyección en ciertas posiciones (E) de fósforo radiactivo  $^{32}\text{P}$  se puede determinar

hasta que distancia crecieron las hifas. Las hifas absorben el  $^{32}\text{P}$  y lo transportan a la planta en cuyas hojas se detecta la radioactividad.

Gráfica 12.: DISEÑO DE UNA CAMARA DE SUELO (SEGUN RHODES Y GERDEMANN).



A = Barrera de raíces

B = Puente de suelo

C = Abertura en la parte superior de la cámara

D = Abertura de drenaje

E = Abertura para la inyección de trazadores (Fósforo radioactivo).

b. Métodos directo:

Skinner y Bowen (1974) separaron el micelio exterior como fué descrito en el párrafo 8.1.c. Trataron de medir la longitud del micelio utilizando el método de Newman (1966) descrito en el párrafo 3.1.3.2.-2). Este método no es recomendado por los autores debido a que el micelio aparece muy entrelazado, hasta el punto que no se pueden distinguir las hifas aisladamente.

C. Método directo descrito de Sundman y Sivela (1978)

Preparación:

Se homogeniza 10 g de suelo fresco en 100 ml de agua destilada (siempre se utiliza agua filtrada por una membrana con poros de 1.2  $\mu$ m) en una homogenizadora (MSE Atomix) con velocidad media durante 10 segundos. En la mayoría de los casos se obtienen hifas de 41-50  $\mu$ m.

Se diluye el homogenizado en 1 litro de agua (dilución:  $10^{-2}$ ) y del litro se sacan 10 ml suspensión a la que se aplican 90 ml de agua (dilución:  $10^{-3}$ ).

En un embudo para filtros de membranas se pone un filtro de Gelman, tipo GA (16 mm de diámetro, con poros de 1.2  $\mu$ m) y se aplican 5 ml de agua. De la dilución  $10^{-3}$  se pipetea 1 ml al embudo de membranas con los 5 ml de agua. Se aplican 3 gotas de solución de azul de metile-

no de Loeffler fresca. Se llena el embudo con agua hasta que tenga 15 ml. Después de 30 segundos de coloración se drena la solución por el filtro con vacío. Se lavan las paredes interiores del embudo y del filtro, ligeramente. Se deja secar la membrana. Este filtrado se puede guardar por meses sin problemas.

#### Determinación:

Las membranas secas se montan en láminas con gotas de aceite de inmersión (la membrana debe verse transparente). Se tapa con cubreobjeto. Para la observación se necesita un microscopio de luz directa con 500 x de aumento que tenga espejo de dibujo o cámara lúcida (como referencia siempre hay que anotar la marca del microscopio). Se trazan, en papel, cuadros de 9 X 9 cm, los cuales se reflejan en el campo del objetivo del microscopio por medio del espejo. De tal manera se fijan a la membrana con la muestra cuadrados de tamaño determinable (por ejemplo, con Leitz-Orthoplan a un aumento de 500 x, con una distancia entre la mesa del microscopio y el papel de 22 cm, se obtienen cuadrados de 300 x 300  $\mu$ m en la membrana; de todos modos hay que determinar las medidas). Para el efecto hay que tener en cuenta los datos de dilución del suelo, el tamaño del filtro membrana, el aumento del dibujo, y el tamaño y número de campos observados al microscopio.

Se dibujan todos los segmentos de las hifas de varios sitios de la membrana, escogidos al azar, sobre un cua-

drado en el papel y se anotan los números correspondientes a los campos observados en la membrana, o hasta que se obtengan de 50-100 cm de longitud en las líneas trazadas sobre el cuadrado de 9 x 9 cm (se mide dicha longitud con un planimetro). Así es posible calcular la longitud de las hifas por gramo de suelo.

Según experiencia propia la dilución  $10^{-3}$  es muy alta. Es preferible utilizar para la medición diluciones de  $10^{-2}$  o aún menores; esto, para tener más éxito en encontrar micelio del hongo.

### 8.3 Medición indirecta de la cantidad del micelio exterior por determinación del suelo adherido a las raíces

Graham et al. (1982) describieron un método para estimar la producción del micelio exterior de la raíz por determinación de la cantidad de suelo adherido a las raíces a causa de que el micelio está agregando partículas del suelo y conectándolas a las raíces.

#### Procedimiento:

Sacaron el contenido total del pote cuidadosamente, después de cortar la parte aérea. Secaron en la oscuridad el suelo con raíces durante 48 horas a temperaturas entre 25 y 27°C. Después agitaron las raíces bien con el fin de remover el suelo seco que no estaba adherido a las raíces. Se lavó las raíces, para sacar el suelo que tenían, aún, adherido, sumergiénd-



dolas, varias veces en un beaker con agua.

Se dejó sedimentar el suelo en el beaker, se decantó el agua cuidadosamente y se secó el suelo para la determinación del peso seco. La determinación del peso fresco del sistema completo de la raíz sirvió para dar la expresión en mg suelo adherido por gramo de raíz.

Graham et al. encontraron una interacción entre la efectividad de diferentes cepas de micorriza y la cantidad de suelo adherido a las raíces. Los autores no consideraron que el método fuese ideal, pero serviría para la comparación de la capacidad de diferentes cepas del hongo de crecer en un medio. El método, de todos modos, es simple y practicable en todos los laboratorios. Pero se hace necesario comentar aquí que no en todos los tipos de suelo, este método, ofrece buenos resultados, por ejemplo en suelos arcillosos y limo-arcillosos.

#### 9. RECUESTO INDIRECTO DE LA DENSIDAD DE ORGANISMOS INFECTIVOS DE LA POPLACION DE MICORRIZA (NATIVA O AISLADA)

Como en suelos naturales la infección no ocurre solo debido a esporas germinadas, sino también a raíces infectadas, micelio, etc., el conteo de esporas en el suelo -(aunque se sacaran todas las esporas)- no es una estimación exacta de la infectibilidad de la micorriza nativa. Además, es posible que algunos hongos de micorriza VA no produzcan esporas en cierta época, o que las esporas sean tan pequeñas que se pierdan en el proceso de la separación del suelo. Para obtener un estima-

tivo real de la infactabilidad de la micorriza nativa se conocen dos métodos:

- 1.) El cálculo de la "Cantidad Más Probable" del hongo en el suelo, y
- 2.) La determinación de la capacidad de la micorriza nativa para infectar hospederos.

Sin embargo, ambos métodos no dicen nada sobre la efectividad de los hongos involucrados en la formación de micorriza.

#### 9.1 "Cantidad Más Probable" del hongo en el suelo.

El método fué desarrollado para la determinación de micorriza VA por Porter (1979) y Powell (1980). Anteriormente había sido utilizado para conteo de bacterias, (Vicent, 1975) y hongos del suelo (Maloy y Alexander, 1958; Alexander, 1965). Los cálculos están basados en el cuadro VIII<sub>2</sub> de Fisher y Yates (1970). Ver éste en la Tabla 12 del Apéndice. El método descrito aquí está basado en Porter (1979).

##### 9.1.1 Método de Porter (1979).

###### Preparación de diluciones:

Se mezclan el suelo a examina (a ex.) con suelo esterilizado, y se preparan diluciones. Para la preparación de éstas ver Tabla 13 en Apéndice.

###### Inoculación:

En pots pequeños (7.5 cm de diámetro) se ponen 300 g de suelo esterilizado con todos los nutrientes menos fósforo. El fósforo se aplica en cantidades pequeñas, ya que altas concentraciones impiden el desarrollo de la micorriza (Mosse, 1973).

En el centro del pote, se introduce un tubo de 1.2 cm de diámetro, hasta el fondo, para hacer un hoyo en el suelo. Este se llena primero con 2-3 g del suelo sacado con el tubo, después se aplican 5 g exactos de dilución, y por último se agrega el resto del suelo, sacado inicialmente con el tubo. Se siembran dos semillas pregerminadas de un huésped (leguminosa, maíz u otro) en cada pote, y se aplica agua diariamente. Cada dilución se repite 4 o 5 veces (o más si se desea). Igualmente, se siembran plantas no inoculadas para asegurarse que el suelo para diluir el suelo a examinar realmente esté estéril.

#### Observación y cálculos:

Después de seis semanas de crecimiento se corta la planta y con un tubo de 2 cm de diámetro se saca una muestra de suelo del mismo sitio donde se inoculó.

De la muestra se colectan las raíces y se colorean como se describió anteriormente. Se observan todas las raíces de la muestra sacada para determinar la presencia de infección, y se cuenta el número total de vasitos que tenían raíces infectadas. Según Fisher y Yates (1970) el número de organismos que infectaron ( $\lambda$ ) es:

$$\log \lambda = x \cdot \log a - K$$

$\lambda$  = número de organismos infectivos

$x$  = promedio de vasitos con raíces infectadas

$$x = \frac{\text{No. total infectados}}{\text{No. de replicaciones por dilución}}$$

$y$  = niveles de dilución (s) -  $x$

$a$  = factor de dilución 2 = dilución por duplicado

4 = dilución por cuadruplicado

10 = dilución al décimo

$K$  = se encuentra en la Tabla VIII<sub>2</sub> de Fisher y Yates (1970) observando (x) o (y) y observando los niveles de la dilución (s).

El número de organismos infectivos ( $\lambda$ ), calculado en base a la fórmula, está referido a 5 gramos del suelo a examinar (en el método de Porter).

Ejemplo del proceso:

Se hizo la prueba con diluciones por duplicado con 5 repeticiones y ocho niveles de diluciones.

DILUCION	Gr.SUELO a ex. /VASITO	No. VASITOS CON RAICES INFECTADAS	DILUCION	Gr.SUELO a ex. /VASITO	No. VASITOS CON RAICES INFECTAD
2°	5	5	2 <sup>-4</sup>	0.3125	0
2 <sup>-1</sup>	2.5	5	2 <sup>-5</sup>	0.15625	0
2 <sup>-2</sup>	1.25	4	2 <sup>-6</sup>	0.078125	0
2 <sup>-3</sup>	0.625	2	2 <sup>-7</sup>	0.0390625	0

número total de vasitos con raíces infectadas: 16

promedio infectado  $x = 16:5 = 3.2$

$y = s-x = 8 - 3.2 = 4.8$

Tabla VIII<sub>2</sub> (interpolado):  $K = 0.392$

$\log \lambda = 3.2 \cdot \log 2 - K$

$\log \lambda = 3.2 \cdot 0.031 - 0.392 = 0.5712$

$\lambda = 3.73$

Resultado: En 5 gramos de suelo a ex. se encontró 3.73 organismos que causaron infección en las raíces.

(LC)  
Los límites de confiabilidad de los organismos infectivos se calcula según la siguiente fórmula:

$$\log \lambda (LC) = \log \lambda \pm \frac{\bar{s}_\lambda}{\sqrt{n}} \cdot z$$

$\lambda$  = números de organismos infectivos (encontrado anteriormente)

$\bar{s}_\lambda = \sqrt{0.091}$  para la dilución 2 X (según Fisher y Yates)

$\bar{s}_\lambda = \sqrt{0.201}$  para la dilución 4 X (según Fisher y Yates)

$\bar{s}_\lambda = \sqrt{0.301}$  para la dilución 10 X (según Fisher y Yates)

$n$  = número de repeticiones por dilución

$z$  = valores tabulados para una probabilidad dada.

90% :  $z = 1.282$

95% :  $z = 1.645$

97.5% :  $z = 1.960$

99% :  $z = 2.326$

En el ejemplo los límites de confiabilidad de  $\log \lambda$  para una probabilidad de 95% de los casos es:

$$\log \lambda \pm \frac{\bar{s}_\lambda}{\sqrt{n}} \cdot z$$
$$0.5712 \pm \frac{\sqrt{0.091}}{\sqrt{5}} \cdot 1.645$$

que nos dá  $\log \lambda_s = 0.7932$  como límite superior y

$\log \lambda_i = 0.3492$  como límite inferior

Los antilogaritmos nos dan  $\lambda_s = 6.21$  como límite superior y

$\lambda_i = 2.24$  como límite inferior.

En el ejemplo se espera entonces que el número de organismos infectivos por 5 gramos de suelo ( $\lambda = 3.73$ ) sea confiable entre  $\lambda_s = 6.21/5$  g y  $\lambda_i = 2.24/5$  g en 95% de los casos.

Para que opere el método de estimación de la densidad de organismos infectivos ("cantidad más probable"), Fisher y Yates (1970) y Porter (1979), recomiendan que:

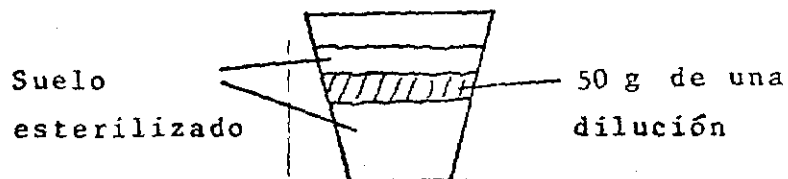
- hacer diluciones por duplicado o cuadruplicado es mejor que a la décima.
- el número de niveles de diluciones depende de la población original del suelo. Se debe hacer tantas diluciones como sea necesario para que en el último nivel de dilución no aparezcan organismos infectivos.

- en la muestra a examinar, los organismos infectivos deben estar muy bien distribuidos (al azar).
- cada organismo infectivo tiene que infectar al hospedero
- no haya contaminación durante el ensayo.

Para cumplir con los puntos de Porter, hay que utilizar una planta que sea un buen hospedero, cuidar además que no haya especificidad de la infección por la especie de planta. El suelo para diluir y el suelo original (a ex) deben tener características físicas y químicas similares. Las condiciones del ambiente deber ser óptimas para el proceso de la infección.

#### 9.1.2 Variante del método de Porter; (utilizado en el CIAT Proyecto Micorriza).

Se trabaja con vasitos de icopor de 250 g de capacidad. Se llenan con 200 g de suelo esterilizado en autoclave y se preparan diluciones en cantidades que alcancen para aplicar a cada vasito 50 g de la dilución. Ejemplo: Si se trabaja con la dilución cuadruplicada y con 4 repeticiones, se mezclan 75g de suelo a examinar con 225 g de suelo esterilizado para obtener la dilución  $4^{-1}$ . De los 300 g conseguidos se necesitan 75g para la próxima dilución ( $4^{-2}$ ); 200 g se necesitan para aplicar cuatro veces 50 g de la dilución a cada repetición en la siguiente forma:



El resto (25 g de la dilución) se desecha. En cada vasito se siembran 5 semillas pregerminadas de Pueraria phaseoloides (Kudzú); la semilla se esteriliza superficialmente, con hipoclorito de sodio al 5%, con anterioridad.

Después de dos meses de crecimiento se cosecha la capa de suelo que contiene la dilución. Se lavan las raíces cuidadosamente con agua, evitando perder las raicillas finas. Se colocan las raíces y de cada repetición se determina bajo un estereoscopio si las raíces están infectadas por micorriza o no. El cálculo de los organismos infectivos se hace en base al peso seco del suelo. (El peso seco del suelo a examinar se determina al mismo tiempo que se prepara la primera dilución). Es lógico que se considere para todo el procedimiento los puntos de precaución mencionados anteriormente en párrafo 9.1.1.

## 9.2 Determinación de la capacidad de organismos de hongos para formar micorriza VA con hospederos.

El método está basado en el trabajo de Moorman y Reeves (1979). Una estimación de la capacidad del hongo para producir infección se consigue sembrando hospederos directamente en el suelo a examinar, sin diluirlo. El grado de la capacidad para infectar se expresa como porcentaje de infección de las raíces, conseguido después de 6 semanas del crecimiento de los hospederos.

### Procedimiento:

Se llenan vasitos de icopor con 250 g de suelo a examinar. Se siembra semilla de un hospedero de micorriza (la semilla ha si-



do esterilizada superficialmente con anterioridad). Después de 6 semanas de crecimiento se cosechan todas las raíces del suelo y se determina el porcentaje de raíces infectadas. (Es lógico que se trabaje con varias repeticiones).

Se anota aquí que el método nunca dá un dato exacto de los organismos infectivos como en el método descrito en 9.1.

## 10. REFERENCIAS

- ABBOTT, L.K. y ROBSON, A.D. 1978. Growth of subterranean clover in relation to the formation of endomycorrhizas by introduced and indigenous fungi in a field soil. *New Phytol.* 81, 575-585
- ALEXANDER, M. 1965. Most-probable-number method for microbial populations. In Black, C.A. ed. *Methods of Soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbiological Properties*. pp.1467-1472. American Soc. Agron., Madison, Wisconsin.
- ALLEN, E.B., y ALLEN, M.F. 1980. Natural re-establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizae following stripmine reclamation in Wyoming. *J. Appl. Ecol.* 17, 139-147.
- ALLEN, M.F., MOOR Jr., T.S., CHRISTENSEN, M., y STANTON, N. 1979. Growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal and non-mycorrhizal *Bouteloua gracilis* in a defined medium. *Mycologia* 71, 66-669.
- ALLEN, M.F., MOORE Jr., T.S., y CHRISTENSEN M. 1980. Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae: I. Cytokinin increases in the host plant. *Can. J. Bot.* 58, 371-374.
- AMBLER, J.R., y YOUNG, J.L. 1977. Techniques for determining root length infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 41, 551-556.
- BACKMAN, P.A., y CLARK, E.M. 1977. Effect of carbofuran and other pesticides on vesicular-arbuscular mycorrhizae in peanuts. *Nematropica* 7, 14-17.
- BALTRUSCHAT, H., y SCHÖNBECK, F. 1975. Untersuchungen über den Einfluß der endotrophen Mykorrhiza auf den Befall von Tabak mit *Thielaviopsis basicola*. *Phytopath. Z.* 84, 172-188.
- BARTSCH, H., y GARRE, J.-P. 1980. Etude comparative de la répartition cytologique de quelques éléments minéraux dans l'écorce de racines saines et d'endomycorhizes de *Vitis vinifera* L. *C.R. Acad. Sc. Paris*, t.290, Série D, 919-922.

- BAYLIS, G.T.S. 1967. Experiments on the ecological significance of phycomycetous mycorrhizas. *New Phytol.* 66, 231-243.
- BECKER, W.N., y GERDEMANN, J.W. 1977. Colorimetric quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in onion. *New Phytol.* 78, 289-295.
- BEHN, I. 1979. Einfluß der Bodentemperatur auf den Infektionsverlauf der vesikulär-arbuskulären Mykorrhiza bei *Ageratum houstonianum* Mill. und *Paspalum scrobiculatum* L. Tesis de Diploma, Inst. Trop. u. Subtrop. Pflanzenbau, Göttingen, Alemania R.F. (no publicado)
- BIERMANN, B., y LINDERMAN, R.G. 1981. Quantifying vesicular-arbuscular mycorrhizae: A proposed method towards standardization. *New Phytol.* 87, 63-67.
- BIRD, G.W., RICH, J.R., y GLOVE, S.M. 1974. Increased endomycorrhizae of cotton roots in soil treated with nematicides. *Phytopathology* 64, 48-51.
- BÖHM, W. 1979. *Methods of Studying Root Systems*. Springer, New York.
- CHAMBERS, C.A., SMITH, S.E., SMITH, F.A., RAMSEY, M.D., y NICHOLAS, D. J.D. 1980. Symbiosis of *Trifolium subterraneum* with mycorrhizal fungi and *Rhizobium trifolii* as affected by ammonium sulfate and nitrification inhibitors. *Soil Biol. Biochem.* 12, 93-100.
- CHRISTIE, P., NEWMAN, E.J., y CAMPBELL, R. 1978. The influence of neighbouring grassland plants on each others' endomycorrhizas and root-surface microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* 10, 521-527.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. 1982. Informe Anual del Programa de Yuca 1981. CIAT, Cali, Colombia.
- COOPER, K.M., y LOSEL, D.M. 1978. Lipid physiology of vesicular-arbuscular mycorrhiza. I. Composition of lipids in roots of onion, clover and ryegrass infected with *Glomus mosseae*. *New Phytol.* 80, 143-151.
- COX, G., y SANDERS, F. 1974. Ultrastructure of the host-fungus interface in a vesicular-arbuscular mycorrhiza. *New Phytol.* 73, 901-912.

- CRUSH, J.R. 1973. The effect of *Rhizophagus tenuis* mycorrhizas on ryegrass, cocksfoot and sweet vernal. *New Phytol.* 72, 965-973.
- CRUSH, J.R. 1974. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza VII. Growth and nodulation of some herbage legumes. *New Phytol.* 73, 743-749.
- CRUSH, J.R., y PATTISON, A.C. 1975. Preliminary results on the production of vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculum by freeze drying. In Sanders, F.E., Mosse, B., and Tinker, P.B., eds. 1975. *Endomycorrhizas*. Academic Press, London, 485-493.
- DAFT, M.J., y HACSKAYLO, E. 1977. Growth of endomycorrhizal and non-mycorrhizal red maple seedlings in sand and antracite soil. *Forest Science* 23, 207.
- DAFT, M.J., y NICOLSON, T.H. 1966. Effect of Endogone mycorrhiza on plant growth. *New Phytol.* 65, 343-350.
- DAFT, M.J., y NICOLSON, T.H. 1972. Effect of Endogone mycorrhiza on plant growth IV. Quantitative relationships between the growth of the host and the development of the endophyte in tomato and maize. *New Phytol.* 71, 287-295.
- DANIELS, B.A., y GRAHAM, S.O. 1976. Effects of nutrition and soil extracts on germination of *Glomus mosseae* spores. *Mycologia* 68, 108-116.
- DEHNE, H.W. 1982. Interaction between vesicular arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. *Phytopathology* 72, 1115-1118.
- DONCASTER, C.C. 1962. A counting dish for nematodes. *Nematologia* 7, 334-337.
- FABIG, B. 1979. Vergleich zwischen mikroskopischer Untersuchung und vier chemischen Methoden zur Bestimmung der Infektion mit VA-Mykorrhiza in Wurzeln von *Eupatorium odoratum* L. bei verschiedenn Ernteterminen. Tesis de Diploma, Inst. Trop. u. Subtrop. Pflanzenbau, Göttingen, Alemania, R.F. (no publicado).
- FISHER, R.A., y YATES, F. 1970. Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research. Edición sexta., Hafner Publ. Comp., Davieu, Conn.
- FITTER, A.H. 1977. Influence of mycorrhizal infection on competition for phosphorus and potassium by two grasses. *New Phytol.* 79, 119-125.

- FURLAN, V., y FORTIN, J.-A. 1973. Formation of endomycorrhizal by *Endogone calospora* on *Allium cepa* under three temperature regimes. *Naturaliste can.* 100, 467-477.
- FURLAN, V., y FORTIN, J.A. 1975. A flotation-bubbling system for collecting Endogonaceae spores from sieved soil. *Naturaliste can.* 102, 663-667.
- GERDEMANN, J.W. 1955. Relation of a large soil-borne spore to phycomycetous mycorrhizal infections. *Mycologia* 47, 619-632.
- GERDEMANN, J.W., y NICOLSON, T.H. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Brit. mycol. Soc.* 46, 235-244.
- GERDEMANN, J.W., y TRAPPE, J.M. 1974. The Endogonaceae in the Pacific Northwest. *Mycologia Memoir* No.5.
- a GIOVANNETTI, M., y MOSSE, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84, 489-500.
- GRAHAM, J. H., LINDERMAN, R.G., y MENGE, J. A. 1982. Development of external hyphae by different isolates of mycorrhizal *Glomus* spp. in relation to root colonization and growth of troyer citrange. *New Phytol.* 91, 183-189.
- GREEN, N.E., GRAHAM, S.O., y SCHENCK, N.C. 1976. The influence of pH on the germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal spores. *Mycologia* 68, 929-933.
- HALL, J.R. 1977. Species and mycorrhizal infections of New Zealand Endogonaceae. *Trans. Br. mycol. Soc.* 68, 341-356.
- HALL, J.R., y FISH, B.J. 1979. A key to the Endogonaceae, *Trans. Br. mycol. Soc.* 73, 261-270.
- HAYMAN, D.S. 1970. *Endogone* spore numbers in soil and vesicular-arbuscular mycorrhiza in wheat as influenced by season and soil treatment *Trans. Br. mycol. Soc.* 54, 53-63.
- HAYMAN, D.S. 1974. Plant growth response to vesicular-arbuscular mycorrhiza. VI. Effect of light and temperature. *New Phytol.* 73, 71-80.

HAYMAN, D.S. 1978. Mycorrhizal population of sown pastures and native vegetation in Otago, New Zealand. N.Z. J. Agric. Res. 21, 271-276

HAYMAN, D.S., BARCA, J.M., y AZCON, R. 1976. Vesicular-arbuscular mycorrhiza in Southern Spain: its distribution in crops growing in soil of different fertility. *Phytopath. mediterr.* 15, 1-6.

Hayman, D.S., y MOSSE, B. 1971. Plant growth responses to vesicular arbuscular mycorrhiza I. Growth of *Endogone*-inoculated plants in phosphate-deficient soils. *New Phytol.* 70, 19-27.

HEPPER, C.M. 1977. A colorimetric method for estimating vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *Soil Biol. Biochem.* 9, 15-18.

HEPPER, C.M. 1981. Techniques for studying the infection of plants by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi under axenic conditions. *New Phytol.* 88, 641-647.

HEPPER, C.M., y MOSSE, B. 1975. Techniques used to study the interaction between *Endogone* and plant roots. In: Sanders *et al* (eds.) 1975. *Endomycorrhizas*. Academic Press, London, 65-75.

HEPPER, C.M., y SMITH, G.A. 1976. Observations on the germination of *Endogone* spores. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 66, 189-194.

HERRERA, R.A., y FERRER, R.L. 1980. Vesicular-arbuscular mycorrhiza in Cuba. En: Mikola, P.(ed.), 1980. *Tropical Mycorrhiza Research*. Clarendon Press, Oxford, 156-162.

HIRREL, M.C., MEHRAVARAN, H., y GERDEMANN, J.W. 1978. Vesicular-arbuscular mycorrhiza in the *Chenopodiaceae* and *Cruciferae*: do they occur. *Can. J. Bot.* 56, 2813-2817.

HOWELER, R., y SIEVERDING, E. 1982. La importancia de las micorrizas en la absorción de fósforo por la yuca. *Suelos Ecuatoriales*, XII-vol 2, 182-195.

JACKSON, N.E., FRANKLIN, R.E., y MILLER, R.H. 1972. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae on growth and phosphorus content of three agronomic crops. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 36, 64-67.

- JENKINS, W.R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Rep.* 48, 692.
- JOHNSON, P.N. 1976. Effects of soil phosphate level and shade on plant growth and mycorrhizas. *New Zealand J. of Bot.* 14, 333.
- KHAN, A.G. 1971. Occurrence of *Endogone* spores in West Pakistan Soils. *Trans. Br. mycol. Soc.* 56, 217-224.
- KHAN, A.G. 1974. The occurrence of mycorrhizas in halophytes, hydrophytes and xerophytes, and of *Endogone* spores in adjacent soils. *J. gen. Microbiol.* 81, 7-18.
- KORMANIK, P.P., BRYAN, W.C., y SCHULTZ, R.C. 1980. Procedures and equipment for staining large numbers of plant root samples for endomycorrhizal assay. *Can. J. Microbiol.* 26, 536-538.
- KOSKE, R.E. 1981. *Gigaspora gigantea*: observations on spore germination of a VA-mycorrhizal fungus. *Mycologia* 73, 288-300.
- KOSKE, R.E., SUTTON, J.C., y SHEPPARD, B.R. 1975. Ecology of *Endogone* in Lake Huron sand dunes. *Can. J. Bot.* 53, 87-93.
- KRUCKELMANN, H.W. 1973. Die vesikulär-arbuskuläre Mykorrhiza und ihre Beeinflussung in landwirtschaftlichen Kulturen. Disertación, Braunschweig, Alemania, R.F.
- LAPAGE, S.P., SHELTON, J.E., MITCHELL, T.G., y MACKENZIE, A.R. 1970. Culture collections and the preservation of bacteria. En Norris, J.R. y Ribbons, D.W. (eds). *Methods in Microbiology*. Vol 3A, p. 135-228. Academic Press, London.
- LUEDDERS, V.D., CARLING, D.E., y BROWN, M.F. 1979. Effect of soybean plant growth on spore production by *Glomus mosseae*. *Plant and Soil* 53, 393-397.
- MacDONALD, R.M. 1981. Routine production of auxenic vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytol.* 89, 87-93.
- MALLOY, O.C., y ALEXANDER, M. 1958. The "Most Probable Number" method for estimating populations of plant pathogenic organisms in the soil. *Phytopathology* 48, 126-128.

MARONEK, D.M., HENDRIX, J.W., y KIERNAN, J. 1980. Differential growth response to the mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatus* of southern magnolia and bar harbor juniper grown in containers in composted hardwood bark-shale. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 105, 206-208.

MARSH, B.A.B. 1971. Measurement of length in random arrangements of lines. J. App. Ecology 8, 265.

McILVEEN, W.D., y COLE, Jr., H. 1979. Influence of zinc on development of the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and its mediation of phosphorus uptake by *Glycine max* 'Amsoy 71'. Agriculture and Environment 4, 245-256.

MENGE, J.A., La RUE, J., LABANAUSKAS, C. K., y JOHNSON, E.L.V. 1980. The effect of two mycorrhizal fungi upon growth and nutrition of avocado seedlings grown with six fertilizer treatments. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 105, 400-404.

MILLER, R.H., CARDOZO, E.J.B.N., y CARDOZO, C.O.N. 1979. Some observations on mycorrhizal infection of tropical forage legumes and grasses in Brasil. Summa Phytopathologica 5, 168-172.

MOORMAN, T., y REEVES, F. B. 1979. The role of endomycorrhizae in vegetation practices in the semi-arid West. II. A bio-assay to determine the effect of land disturbance on endomycorrhizal populations. Amer. J. Bot. 66, 14-18.

MOSSE, B., 1961. Experimental techniques for obtaining a pure inoculum of an *Endogone* sp., and some observations on the vesicular-arbuscular infections caused by it and by other fungi. Rec. Adv. Bot. 2, 1728-1732.

MOSSE, B. 1962. The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. J. gen. Microbiol. 27, 509-520

MOSSE, B. 1973. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza IV. In soil given additional phosphate. New Phytol. 72, 127-136.

MOSSE, B. 1977. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. X. Responses of *Stylosanthes* and maize to inoculation in unsterile soils. New Phytol. 78, 277-288.

MOSSE, B., y BOWEN, G.D. 1968. A key to the recognition of some *Endogone* spore types. Trans. Br. Mycol. Soc. 51, 469-483.



- MOSSE, B., y JONES, G.W. 1968. Separation of *Endogone* spores from organic soil debris by differential sedimentation on gelatin columns. Trans. Br. mycol. Soc. 51, 604-608.
- MOSSE, B., y PHILLIPS, J.M. 1971. The influence of phosphate and other nutrients on the development of vesicular-arbuscular mycorrhiza in culture. J. gen. Microbiol. 69, 157-166.
- MOSSE, B., y HEPPEL, C. 1975. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organ cultures. Physiological Plant Pathology 5, 215-223.
- NEWMAN, E.J. 1966. A method of estimating the total length of root in a sample. J. Appl. Ecol. 3, 139.
- NICOLSON, T.H. 1960. Mycorrhiza in the Gramineae. II. Development in different habitats, particularly sand dunes. Trans. Br. mycol. Soc. 43, 132-145.
- NICOLSON, T.H., y JOHNSTON, C. 1979. Mycorrhiza in the Gramineae. III. *Glomus fasciculatus* as the endophyte of pioneer grasses in a maritime sand dune. Trans. Br. mycol. Soc. 72, 261-268.
- NICOLSON, T.H., y SCHENCK, N.C. 1979. Endogonaeceous mycorrhizal endophytes in Florida. Mycologia 71, 178-198.
- OCAMPO, J.A. 1980. Micorrizas VA. I. Características generales. Anales de Edafología y Agrobiología 39, 351-365.
- OCAMPO, J.A., MARTIN, J., y HAYMAN, D.S. 1980. Influence of plant interactions on vesicular-arbuscular mycorrhizal infections. I. Host and non-host plants grown together. New Phytol. 84, 27-35.
- OHMS, R. E. 1957. A flotation method for collecting spores of a phycomycetous mycorrhizal parasite from soil. Phytopathology 47, 751-752.
- PEUSS, H. 1958. Untersuchungen zur Ökologie und Bedeutung der Tabakmykorrhiza. Archiv. f. Mikrobiologie 29, 112-142.
- PHILLIPS, J.M., y HAYMAN, D.S. 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.

PORTER, W.M. 1979. The 'Most Probable Number' method for enumerating infective propagules of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Aust. J. Soil Res.* 17, 515-519.

POSSINGHAM, J.V., y OBRINK, J.G. 1971. Endotrophic mycorrhiza and the nutrition of grape vines. *Vitis* 10, 120-130.

POWELL, C.LI. 1976. Development of mycorrhizal infections from Endogone spores and infected root segments. *Trans. Br. mycol. Soc.* 66, 439-445.

POWELL, C. LI. 1979. Spread of mycorrhizal fungi through soil. *New Zealand J. Agric. Res.* 22, 335-339.

POWELL, C. LI. 1980. Mycorrhizal infectivity of eroded soils. *Soil Biol. Biochem.* 12, 247-250

READ, D.J., KONCHETI, H.K., y HODGSON, J. 1976. Vesicular-arbuscular mycorrhiza in natural vegetation systems. I. The occurrence of infection. *New Phytol.* 76, 641-653.

RHODES, L.H., y GERDEMANN, J.W. 1975. Phosphate uptake zones of mycorrhizal and non-mycorrhizal onions. *New Phytol.* 75, 555-561.

RIDE, J.P., y DRYSDALE, R.B. 1972. A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. *Physiol. Plant Pathol.* 2, 7-15.

RIVES, C. S., BAJWA, M. I., LIBERTA, A. E., y MILLER, R. M. 1980. Effects of topsoil storage during surface mining on the viability of VA mycorrhiza. *Soil Science* 129, 253-257.

ROSE, S.L. 1980. Mycorrhizal associations of some actinomycete nodule-fixing plants. *Can. J. Bot.* 58, 1449-1454.

ROSS, J.P., y RUTTENCUTTER, R. 1977. Population dynamics of two vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi and the role of hyperparasitic fungi. *Phytopathology* 67, 490-496.

SAIF, S.R. 1977. The influence of stage of host development on vesicular-arbuscular mycorrhizas and endogonaceous spore population in field-grown vegetable crops. I. Summer-grown crops. *New Phytol.* 79, 341-348.

SANDERS, F.E., TINKER, P.B., BLACK, R.L.B., y PALMERLEY, S.M. 1977. The development of endomycorrhizal root systems: I. Spread of infection and growth-promoting effects with four species of vesicular-arbuscular endophyte. *New Phytol* 78, 257-268.

SCHENCK, N.C. y HINSON, K. 1971. Endotrophic vesicular-arbuscular mycorrhizal on soybean in Florida. *Mycologia* 63, 672-675.

SCHENCK, N.C. y SCHROEDER, V.N. 1974. Temperature response of *Endogone* mycorrhiza on soybean roots. *Mycologia* 66, 600-605.

SCHENCK, N.C., y SMITH, G.S. 1982. Additional new and unreported species of mycorrhizal fungi (*Endogonaceae*) from Florida. *Mycologia* 74, 77-92.

SIEVERDING, E. 1975. Einfluss von symbiontischen Pilzen auf Wachstum und Nährstoffaufnahme von *Eupatorium odoratum* L. und *Tagetes erecta* L. bei verschiedenen Wasserregimen und Phosphatformen im Boden. Tesis de Diploma, Inst. Trop. u. Subtrop. Pflanzenbau, Göttingen, Alemania R.F. (no publicado).

SIEVERDING, E. 1980. Einfluss der Bodenfeuchte auf Entwicklung und Effektivität der vesikulär-arbuskulären Mykorrhiza. Dissertación, Göttingen, Alemania, R.F.

SKINNER, M.F. y BOWEN, G.D. 1974. The penetration of soil by mycelial strands of ectomycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* 6, 57-61

SMITH, G.W., y SKIPPER, H.D. 1979. Comparison of methods to extract spores of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 43, 722-725.

SMITH, S.E., y BOWEN, G.D. 1979. Soil temperature, mycorrhizal infection and nodulation of *Medicago truncatula* and *Trifolium subterraneum*. *Soil Biol. Biochem.* 11, 469-473.

SMITH, T. F. 1978. Some effects of crop protection chemicals on the distribution and abundance of vesicular-arbuscular endomycorrhizas. *J. Aust. Inst. Agric. Sci.* 44, 82-88.

St. JOHN, T.V., HAYS, R.J., y REID, G.P.P. 1981. A new method for producing pure vesicular-arbuscular mycorrhiza-host cultures without specialized media. *New Phytol.* 89, 81-86.

STREMSKA, J. 1975. Mycorrhiza in farm crops grown in monoculture. En: Sanders, F.E., Mosse, B., y Tinker, P.B. (eds.). Endomycorrhizas. Academic Press, London, 527-535.

SUNDMAN, V., y SIVELA, S. 1978. A comment on the membrane filter technique for estimation of length of fungal hyphae in soil. Soil Biol. Biochem. 10, 399-401.

SUTTON, J.A. 1973. Development of vesicular-arbuscular mycorrhiza in crop plants. Can. J. Bot. 51, 2487-2493.

SUTTON, J.C., y BARRON, G.L. 1972. Population dynamics of *Endogone* spores in soil. Can. J. Bot. 50, 1909-1914.

SWARD, R. J., HALLAM, N. D., y HOLLAND, A. A. 1978. *Endogone* spores in a heathland area of South-eastern Australia. Aust. J. Bot. 26, 29-43.

TANDY, P.A. 1975. Sporocarpic species of Endogonaceae in Australia. Aust. J. Bot. 23, 849-866.

TOMMERUP, J.C., y KIDBY, D.K. 1979. Preservation of spores of vesicular-arbuscular endophytes by L-drying. App. Environ. Microbiol. 37, 831-835.

TRAPPE, J. M. 1982. Synoptic keys to the genera and species of zygomycetous mycorrhizal fungi. Phytopathology 72, 1102-1108.

VINCENT, J.M. 1975. Manual Práctico de Rizobiología. Primera Edición. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires.

VOZZO, J.A., y HACSKAYLO, E. 1974. Endo-and ectomycorrhizal associations in five *Populus* species. Bull. Torrey Bot. Club 101, 182-186.

WALKER, J.L., y BEJARANO, W. 1978. Uso práctico de los Modelos Discontinuos para Interpretación Rápida de la Respuesta de Cultivos a la Aplicación de Fertilizantes. CATIE, Turrialba, Costa Rica.

11. APENDICE

TABLA 1. METODOS Y REACTIVOS UTILIZADOS PARA COLOREAR RAICES (PARA OBSERVACION DE LA INFECCION)

TRATAMIENTO PARA ACLARAR LAS RAICES: REACTIVOS, DURACION, TEMPERATURA	LAVADO CON AGUA	ACIDIFICACION CON	LAVADO CON AGUA	COLORACION: COLORANTE, DURACION, TEMPERATURAS	EXTRACCION DEL EXCESO DE COLORANTE	REACTIVO PARA MONTAJE EN LAMINAS U OBSERVACION DE INFECCION	REFERENCIA
---	---	---	---	Fucsina ácida al 0.1% en solución de clorhidrato saturado	---	Lactofenol	Gerdemann (1955)
No (cortes de raíces)	---	---	---	Azul de metileno: gelatina de glicerol, en proporción 1:4	---	---	Peuss (1958)
Raíces pigmentadas: KOH al 10%, 2h, 90°C en baño María: lavar con KOH fresco; sumergir en H <sub>2</sub> O, alcalino (10% vol), 10 min, hasta 1 h, 20°C	Si enteramente con agua	HCl diluido	No	Azul de tripano al 0.05% en lactofenol, 5 min, 100°C en baño María	Lactofenol	Lactofenol	Phillips y Hayman (1970)
Raíces no pigmentadas: KOH al 10%, 1 h, 90°C en baño María	Si	HCl diluido	No	Azul de tripano al 0.05% en lactofenol, 5 min, 100°C en baño María	Lactofenol	Lactofenol ó polyvinil alcohol resina	Phillips y Hayman (1970)
---	---	---	---	Azul de algodón al 0.01% (P/V)	Varios cambios de lactofenol		Mosse y Phillips (1971)
HCl 1N, 10 min, a temperatura ambiente		Clorhidrato solución saturada, 10 min, 100°C en baño María		Fucsina ácida al 0.1%, 10 min, solución caliente	2 veces en lactofenol	Lactofenol	Possingham y Obrink (1971)
Como Phillips y Hayman (1970)				Fucsina ácida al 0.01% en lactofenol, 10 min, 100°C en baño María			Schenck y Hinson (1971)

CONTINUACION TABLA 1

TRATAMIENTO PARA ACLARAR LAS RAÍCES: REACTIVOS, DURACION, TEMPERATURA	LAVADO CON AGUA	ACIDIFICACION CON	LAVADO CON AGUA	COLORACION: COLORANTE, DURACION, TEMPERATURAS	EXTRACCION DEL EXCESO DE COLO- RANTE	REACTIVO PARA MONTAJE EN LAMINAS U OBSERVACION DE INFECCION	REFERENCIA
KOH al 10%, 1 noche a temperatura am- biente	Sí, con agua des- tilada	HCl al 10%	Sí, con agua des- tilada	Azul de tripano en lactofenol, 1 ó varios días, a temperatura am- biente	Varios días en ácido láctico	Acido láctico	Kruckelmann (1973)
KOH al 10%, 10 min, en autoclave 121°C, lavar en KOH al 10%, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> alcalino al 3%, 10 min a temperatura ambiente	Sí	HCl al 1%		Clorhidrato de fucsina ácida (900 ml agua, 100 ml clorhidrato, 0.5 gr. fucsina ácida), 30 min, en autoclave 121°C	Lactofenol		Bird <i>et al</i> (1974)
KOH al 10%, 30 min, 90°C en baño María	Sí	HCl diluido	---	Mezcla de azul de tripa- no (0.05%) y Sudan IV (saturado) en lacto- fenol	Lactofenol	Lactofenol	Cox y Sanders (1974)
KOH al 10%, 30 min, 90°C en baño María	Sí			Azul de tripano al 0.05% en agua	Acido láctico	Acido láctico	Crush (1974)
KOH al 10%, 30 min, 90°C en baño María				Fucsina ácida al 0.01% en lactofenol, 10 min, en autoclave 110°C			Schenck y Schroeder (1974)
En lactofenol				Azul de anilina			Vozzo y Hacskaylo (1974)
KOH al 10%, 1 ó va- rios días, ambiente; si es necesario, ca- lentar después du- rante 10 min, a 100°C en baño María; pasar a hipoclorito de so- dio al 3%	Sí con agua des- tilada	HCl al 10%	Sí	Azul de metileno al 0.1%		Glicerol al 50%	Read <i>et al</i> (1976)

TRATAMIENTO PARA ACLARAR LAS RAICES: REACTIVOS, DURACION, TEMPERATURA	LAVADO CON AGUA	ACIDIFICACION CON	LAVADO CON AGUA	COLORACION: COLORANTE DURACION, TEMPERATURAS	EXTRACCION DEL EXCESO DE COLORANTE	REACTIVO PARA MONTAJE EN LAMINAS U OBSERVACION DE INFECCION	REFERENCIA
KOH al 10%, 1-2 h, 70°C, ó 1 a 3 días, temperatura ambiente, si es necesario blanquear como Phillips y Hayman (1970)	Sí con agua aireada, remojar en agua varias horas	Azul de tripano al 0.01% en ácido acético al 50%.	No	Azul de tripano al 0.1% en lactofenol, varias horas		Glicerol	Ambler y Young (1977)
KOH al 10%, 15 min, 90°C en baño María				Fucsina ácida al 0.01% en clorhidrato saturado 30 min, 121°C en autoclave		Glicerol	Backman y Clark (1977)
KOH al 10%, 1 h, 90°C en baño María	Si	HCl diluido	No	Sudan IV saturado en lactofenol	Lactofenol		Cooper y Lösel (1978)
KOH al 10%, 10 min, en autoclave	Si	HCl diluido		Azul de tripano al 0.05% en lactofenol, 5 min, en vapor caliente	1 noche en lactofenol		Luedders et al (1979)
KOH al 10%, 1 h, 90°C en baño María	Si	HCl diluido	No	Azul de tripano al 0.05% en lactofenol, 1 noche a temperatura ambiente			Miller et al (1979)
KOH al 10%, 30 min, 95°C en baño María	Si	HCl diluido ó HCl 0.1N		Azul de tripano al 0.05% en lactofenol, 5 min, a 100°C en baño María			Powell (1979)
KOH al 10%, 2-3 días a temperatura ambiente	Si	HCl 1N		Azul de tripano al 0.05% en lactofenol, 1 día a temperatura ambiente			Smith y Bowen (1979)
Remojar en agua, 1 noche				Azul de algodón al 0.5% en lactofenol	Lactofenol	Lactofenol	Allen y Allen (1980)



CONTINUACION TABLA 1

...4/

TRATAMIENTO PARA ACLARAR LAS RAICES: REACTIVOS, DURACION, TEMPERATURA	LAVADO CON AGUA	ACIDIFICACION CON	LAVADO CON AGUA	COLORACION: COLORANTE DURACION, TEMPERATURAS	EXTRACCION DEL EXCESO DE COLO- RANTE	REACTIVO PARA MONTAJE EN LAMINAS U OBSERVACION DE INFECCION	REFERENCIA
KOH al 20%, 1 h, 75°C en baño María		Solución (de 20 ml KOH, 2-3 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 110 ml agua desti- llada 20 ml al- cohol de 95%), 15 min, 75°C en baño María		Azul de tripano al 0.05% en lactofenol, 5 min, en autoclave 115°C			Bärtshel y Garre (1980)
KOH al 10%, 1 h, 90°C en baño María	Si	HCl diluido	No	Azul de tripano al 0.05% en lactofenol, sin calentar	Lactofenol ó glicerol		Chambers <i>et al</i> (1980)
KOH al 10%, 10 min en autoclave (15 lb/pu <sup>2</sup> ) ó 1 h, 90°C en baño Ma- ría; después lavar 3 veces en agua corriente, blanquear con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> alca- lino (3 ml NH <sub>4</sub> OH, 30 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 10%, 567 ml agua)	Si 3 veces	HCl al 1%, 3 min		a. Fucsina ácida al 0.01% en lactofenol, 10 min en autoclave, ó 10-60 min, 90°C en baño María  b. Fucsina ácida al 0.01% en ácido láctico (875 ml ácido láctico, 63 ml glicerol, 62 ml agua) 10 min en auto- clave, ó 10-60 min, 90°C en baño María	a. Lactofenol (Fórmula D Tabla 2 del Apéndice) ó glicerol  b. Acido láctico ó glicerol	Glicerol	Kormanik <i>et al</i> (1980)

TRATAMIENTO PARA ACLARAR LAS RAICES: REACTIVOS, DURACION, TEMPERATURA	LAVADO CON AGUA	ACIDIFICACION CON	LAVADO CON AGUA	COLORACION: COLORANTE DURACION, TEMPERATURAS	EXTRACCION DEL EXCESO DE COLO- RANTE	REACTIVO PARA MONTAJE EN LAMINAS U OBSERVACION DE INFECCION	REFERENCIA
KOH al 10%, 10 min en autoclave, lavar en KOH al 10%; tra- tar 45 min en H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> alcalino	Si	HCl al 1% rápidamente		Fucsina ácida al 0.01% en lactofenol	Lactofenol		Maronek <i>et al</i> (1980)
KOH al 10%, 5-10 min en vapor caliente	Si	HCl diluido	No	Azul de tripano al 0.05% en lactofenol, 5 min en vapor ca- liente	Lactofenol		Rose (1960)

TABLA 2. FORMULAS PARA LA PREPARACION DE LACTOFENOL.

- A. 500 ml fenol, 500 ml ácido láctico, 1000 ml glicerol, 500 ml agua destilada
- B. 1 parte fenol, 1 parte ácido láctico, 1 parte glicerol, 1 parte agua destilada,
- C. 82 ml (80 g) fenol, 65 ml (80 g) glicerol, 83 ml (40 g) ácido láctico, 40 ml agua.
- D. 300 g fenol, 250 ml ácido láctico, 250 ml glicerol, 300 ml de agua.

TABLA 3. METODOS EMPLEADOS PARA LA DETERMINACION CUANTITATIVA DE LA INFECCION EN MICROSCOPIOS (TABLA MODIFICADA Y AMPLIADA DE GIOVANNETTI Y MOSSE 1980).

MATERIAL	TIPO DE REGISTRO	No. SEGMENTOS /MUESTRA	LONGITUD SEGMENTO (cm.)	No. INTERSECCION MUESTRA	DIAMETRO DEL CAMPO ( $\mu$ m)	No. CAMPOS /MUESTRA	REFERENCIA
Segmentos de raíces seleccionadas y montados en placas; observación con microscopio de luz directa.	Presencia o ausencia de infección en punto de intersección.	150	0.5 - 1	1,200	---	---	Nicolson, 1960
		500	0.5 - 1	4,000	---	---	Daft y Nicolson, 1966
		50	0.5 - 1	400	---	---	Crush, 1973
	Presencia o ausencia de infección en el campo del microscopio.	50	Variable	---	1,000	50	Baylis, 1967
		100	1.0	---	150	500	Furlan y Fortin, 1973
		80	1.5	---	1,000	800	Sutton, 1973
		40	1.0	---	1,000	400	Koske et al, 1975
		Variable	Variable	---	100	100	Hayman, 1978
		10	1.0	---	500	50	Allen y Allen, 1980
		75-100	2.0	---	1,500	300-400	Sieverding, 1980
	Presencia o ausencia de infección en el segmento total de la raíz	50	1.0	---	---	---	Hayman, 1970
		200	1.5	---	---	---	Daft y Nicolson, 1972
		50	1.0	---	---	---	Khan, 1974
		50	1.0	---	---	---	Johnson, 1976
		100	1.0	---	---	---	Daft y Hacskeylo, 1977
		100	1.0	---	---	---	Ross y Ruttencutter, 1977
		50- 80	1.0	---	---	---	Saif, 1977
	Promedio de % de longitud de infección/segmento	50	1.0	---	---	---	Hayman, 1970
		50- 80	1.0	---	---	---	Saif, 1977
		60	1.0	---	---	---	Sanders et al, 1977
		20	1.0	---	---	---	Ocampo et al, 1980
		10	1.0	---	---	---	Menge et al, 1980

MATERIAL	TIPO DE REGISTRO	No. SEGMENTOS /MUESTRA	LONGITUD SEGMENTO (cm.)	No. INTERSECCION MUESTRA	DIAMETRO DEL CAMPO ( $\mu$ m)	No. CAMPOS /MUESTRA	REFERENCIA
Segmentos de raíces seleccionadas y montados en placas; observación con microscopio de luz directa	Puntos de entrada por hifas externas	Variable 20	2.0 1.0	---	---	---	Abbott y Robson, 1978 Ocampo <i>et al.</i> , 1980
	Promedio de área de infección/segmento. (área en base a longitud x ancho de corteza infectada)	20	1.0	---	---	---	Ocampo <i>et al.</i> , 1980
	/campo del microscopio	Variable	Variable	---	100	100	Hayman, 1978
	/categoría 0-4	12-20	2.0	---	1,600-6,400 $\mu$ m <sup>2</sup>	60-100	Christie <i>et al.</i> 1978
Secciones transversales.	Área de corteza infectada, categoría 1-6	225	---	---	---	---	Strzemska, 1975
Aprox. 1.5 g peso fresco de raíz	Estimación visual (microscopio de disección).	Variable	Variable	---	---	---	Mosse, 1977
	Porcentaje corteza infectada.	Variable	Variable	---	---	---	Giovannetti y Mosse, 1980
5 g peso fresco de raíz.	Promedio de área de infección en campo de microscopio de disección	Variable	---	---	Ap.650	20	Abbott y Robson, 1978
Sistema completo de la raíz	Categoría visual 1-4	Variable	---	---	---	---	Baltruschat y Schönbeck, 1975
	Categoría visual 1-10	Variable	---	---	---	---	Fitter, 1977
Sistema completo o partes de raíces.	Clase visual 1-5 (1:0-5%; 2:6-25%; 3:26-50%; 4:51-75%; 5:76-100% infección)	Variable	---	---	---	---	Kormanik <i>et al.</i> , 1980

MATERIAL	TIPO DE REGISTRO	No. SEGMENTOS /MUESTRA	LONGITUD SEGMENTO (cm.)	No. INTERSECCION MUESTRA	DIAMETRO DEL CAMPO (m)	No. CAMPOS /MUESTRA	REFERENCIA
Sistema completo de la raíz	Estimación visual (microscopio de disección) % longitud infectada de la raíz	Variable Variable	Variable ---	--- ---	--- ---	--- ---	Hayman y Mosse, 1971 Hayman, 1974
	Promedio de la proporción de longitud infectada de la raíz estimado en escala de 10 (ejemplo: 10%, 20%, etc.); microscopio de disección	25,50 6 100	0.5 - 1	---	---	---	Biermann y Linderman, 1981.
Sistema completo de la raíz	Longitud infectada (método de intersección de cuadrante); en microscopio de disección	Variable Variable	Variable Variable	Variable Variable	--- ---	--- ---	Hirrel et al, 1978 Giovannetti y Mosse, 1980
Alicuota del peso del sistema completo de la raíz	Porcentaje de longitud infectada (método de intersección de cuadrante); observación con microscopio de luz directa	Variable	Variable	Variable	---	---	Ambler y Young, 1977
Sistema completo de la raíz	Estimación de puntos de entrada de hifas externas con microscopio de disección	Variable	---	---	---	---	Smith y Bowen, 1979

TABLA 4. REACTIVOS NECESARIOS PARA LA DETERMINACION DE QUITINA  
EN LAS PAREDES DE ESTRUCTURAS DE LOS HONGOS PRODUCTO-  
RES DE MICORRIZA VA.

- a. KOH concentrado (120 g píldoras de KOH en 100 ml de agua destilada) Merck No. 5032.
- b. Etanol al 75% (volúmen/volúmen)
- c. 1 g Celite (tipo 545, 20-45  $\mu$ m) en 20 ml etanol al 75% (V/V)  
Celite: SERVA No. 16391.
- d. Etanol al 40% (volúmen/volúmen)
- e. Nitrito de sodio,  $\text{NaNO}_2$  (5%, peso/volúmen), Merck No. 6549.
- f. Sulfato monoaácido de potasio,  $\text{KHSO}_4$  (5%, peso/volúmen),  
Merck No. 4885.
- g. Amidosulfonato de amonio,  $\text{NH}_4\text{SO}_3\text{NH}_2$  (12.5%, peso/volúmen),  
Merck No. 1220.
- h. 3-methyl-2benzothiazolinonhydrazon·HCL, (MBTH), (0.5%,  
peso/volúmen, disuelto antes en agua), Merck No. 4527.
- i. Se debe disolver 0.830 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Merck No. 3943) en  
100 ml agua destilada.
- j. Glucosamina HCL (hay que disolver en agua destilada). SERVA  
No. 22670.

El reactivo MBTH se prepara diariamente.

TABLA 5. PREPARACION DE SOLUCION DE RINGER.

- a.) Se disuelve en un litro de agua destilada 6 g NaCl, 0.1 g KCL, 0.1 g  $\text{CaCl}_2$ .
- b.) El pH se regula a  $7.4 \pm 0.2$  con NaOH.
- c.) La solución se filtra y esteriliza en autoclave.



**TABLA 6 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS METODOS PARA OBSERVACION  
CUANTITATIVA DE LAS ESPORAS.**

<b>METODO No.</b>	<b>OBJETO DE OBSERVACION</b>	<b>VENTAJAS</b>	<b>DESVENTAJAS</b>
4.1.1	Tamizado y Decantación (Gerdemann y Nicolson, 1963).	Buen porcentaje de extracción de esporas; fácil de entender.	Proceso largo, posiblemente no hay buena separación de esporas del material orgánico.
4.1.2	Modificaciones del método de Gerdemann y Nicolson.	Se facilita el conteo, menor cantidad de suelo para tamizar.	Por la relación cantidad de suelo/muestra posiblemente no hay conteos representativos.
4.1.3	Centrifugación (Jenkins, 1964).	Buena separación de esporas del suelo y del material orgánico; separación de esporas muertas de las vivas.	El decantado "agua y material orgánico" puede contener muchas esporas que se pierden.
4.1.4	Adhesión y Flotación (Sutton y Barron, 1972).	No se necesitan tamices; buen porcentaje de extracción.	Posiblemente hay mucho material orgánico en la muestra; un poco demora do.
4.1.5	Decantación y Filtración (Saif, 1977).	Rápido; hay buena extracción; no se necesitan tamices.	Mucho material orgánico en el papel filtro; difícil de contar las esporas.
4.1.6	Pipeteo al plato (Smith y Skipper, 1979).	Rápido y fácil.	Muy poco suelo para observar (0.1 g); el suelo debe tener por lo menos 10 esporas/g para encontrar 1 espora. No sirve si hay varios tipos de esporas en el suelo; los conteos generalmente son perestimados.
4.1.7	Método CIAT-Proyecto Micorriza	Buena extracción y separación de esporas de suelo o material orgánico.	Proceso largo.

TABLA 7 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS METODOS PARA EL AISLA-  
MIENTO CUALITATIVO DE LAS ESPORAS.

METODO No.	OBJETO DE DESCRIPCION	VENTAJAS	DESVENTAJAS
4.2.1	Columna de Gelatina (Mosse y Jones, 1968).	Buena separación de esporas del suelo y material orgánico.	Proceso largo.
4.2.2	'Flotación y Burbujeo' (Furlan y Fortin, 1975).		Se necesita mucho equipo.
4.2.3	Sedimentación con caolin y flotación en solución de azúcar. (Tommerup y Kidby, 1979).	En algunos casos sir- ve también para con- teos de esporas; buena separación de las es- poras del material or- gánico y suelo.	Esporas pesadas se- dimentan en la se- gunda centrifugación.
4.2.4	Separación por solu- ciones de azúcar (u- tilizado en CIAT-Pro- yecto Micorriza).	Buena separación de las esporas del suelo y material orgánico; buena extracción.	Trabajoso.

TABLA 8. FORMA DE REGISTRO DE INFORMACION SOBRE CEPAS AISLADAS

A. NUMERO DE LA COLECCION

B. GENERO Y ESPECIE

C. DESCRIPCION

- 1) Color
- 2) Forma
- 3) Medidas (diámetro)
- 4) Estructura superficial
- 5) Paredes (Nos., medidas)
- 6) Tipos de hifa de soporte
- 7) Arbúsculos
- 8) Vesículas

NOTA: (Sinónimos, placas, fotografías, etc) .

D. AISLADO ORIGINALMENTE DE (especie de planta)

E. FECHA DE AISLAMIENTO

F. PROCEDENCIA

- 1) Lugar
- 2) Suelo
  - a. Tipo y estructura
  - b. pH
  - c. P (Bray II)
  - d. Materia orgánica
  - e. Saturación Al
  - f. Otros elementos
- 3) Temperatura media del lugar
- 4) Precipitación media
- 5) Historia de la utilización del campo

G. PROCESO DEL AISLAMIENTO

- 1) Suelo utilizado para multiplicar la cepa
- 2) Hospedero para multiplicar la cepa
- 3) Suelo para guardar cepa
- 4) Notas de pasos del aislamiento y almacenamiento

TABLA 9. PREPARACION DE PVL (Polyvinyl-alcohol-lactofenol).

Se disuelven 15 g de alcohol polivinilo (polyvinyl alcohol, 75% hydrolizado) en 100 ml de agua destilada en un baño María a 80°C. Esta solución (base) se guarda en un frasco oscuro bien tapado (solución base). La fórmula de PVL consiste en 22 partes de ácido láctico, 22 partes de fenol y 56 partes de la solución base. El PVL preparado se guarda en un frasco de plástico bien cerrado.

TABLA 10. DATOS DE AUTORES Y REACTIVOS PARA LA ESTERILIZACION SUPERFICIAL DE ESPORAS.

ESTERILIZANTE	TIEMPO DE EXPOSICION DE ESPORAS AL ESTERILIZANTE	MEDIOS PARA LA PRUEBA DE ESTERILIDAD	REFERENCIA
Chloramine T al 2% (P/V) y 200 ppm de sulfato de streptomícina, traza de detergente	15 min	Sobre un pedazo de celofán, esterilizado, mojado y puesto a suelo-agar no estéril	Mosse, 1961; Mosse y Phillips, 1971
Hipoclorito de sodio al 0.525%	2 min	Varios medios	Daniels y Graham, 1976
Hipoclorito de sodio al 0.5%	2 min	Bacto-Difeo agar al 2% (P/V)	Allen et al, 1979
Hipoclorito de sodio al 0.52%	1 min		McIlveen y Cole, 1979
Como Mosse, 1961	15 min	Difeo agar al 1%; incubadas por 2-7 días a 25°C	Hepper, 1981
Hipoclorito de sodio al 0.5%	2 min		Köske, 1981
Chloroamine T al 2% y streptomícina al 0.02%	20 min	Agar con nutrientes, dados en la referencia	MacDonald, 1981
Tres paso: a) Cloramine T al 2% (P/V) y después lavar con agua estéril b) repetir paso a. con cloramine T fresco c) solución de sulfato de streptomícina (200 mg/lt)-sulfato de gentamicina (100 mg/lt)	a) 10 min b) 10 min c) 20 min a 4°C	Difco agar nutritivo; incubadas por 5 días a 25°C; después pasar a Bacto-Difco-agar al 0.5% en agua por 2 días.	St. John et al, 1981

TABLA 11. PORCENTAJE DE GERMINACION DE UNA GIGASPORA sp. PROBA-  
DO A INTERVALOS DE 8 SEMANAS DESPUES DE DIFERENTES  
METODOS DEL ALMACENAMIENTO (SEGUN SWARD et al, 1978)

METODO DE ALMACENAR	GERMINACION % SEMANAS DE ALMACENAMIENTO			
	0	8	16	24
-almacenar en suelo (ambiente)	85	80	30	20
-almacenar en suelo (en cuarto frío)	80	90	80	40
-papel filtro no estéril (ambiente)	100	85	15	0
-papel filtro no estéril (cuarto frío)	85	85	40	0
-papel filtro estéril (ambiente)	90	70	35	0
-papel filtro (en cuarto frío)	95	85	60	0
-agua no estéril (ambiente)	90	80	60	20
-agua no estéril (cuarto frío)	95	85	55	25
-agua estéril (ambiente)	100	65	50	15
-agua estéril (cuarto frío)	85	70	75	30

NOTA: No se sabe como se comportan otras especies de hongos MVA;  
no se puede generalizar la investigación de Sward et al.

TABLA 12. DE FISHER Y YATES (1970). DENSIDAD DE ORGANISMOS ESTIMADOS POR EL METODO DE DILUCIONES.

Dilución por duplicado

	Número de niveles (s)								11 o mas
x	4	5	6	7	8	9	10		
0.4	.757	.773	.781	.785	.787	.788	.789	.789	
0.6	.622	.640	.649	.653	.655	.656	.657	.657	
0.8	.537	.556	.566	.571	.573	.574	.575	.575	
1.0	.479	.500	.511	.516	.518	.520	.520	.521	
1.2	.437	.461	.472	.478	.480	.482	.482	.483	
1.4	.406	.432	.444	.450	.453	.455	.456	.456	
1.6	.381	.411	.424	.431	.435	.436	.437	.438	
1.8	.361	.394	.410	.417	.421	.423	.424	.425	
2.0	.344	.382	.399	.408	.412	.414	.415	.416	
2.5		.358	.382	.394	.399	.402	.403	.405	
3.0			.370	.386	.394	.398	.400	.402	
3.5				.379	.390	.396	.399	.401	
4.0					.386	.394	.397	.401	
4.5						.390	.396	.401	
5.0							.394	.401	
y								.401*	
7.0								.399	
6.0								.397	
5.0							.394	.394	
4.5						.390	.390	.390	
4.0					.386	.386	.386	.386	
3.5				.379	.379	.379	.379	.379	
3.0			.370	.370	.370	.370	.370	.370	
2.5		.358	.356	.356	.356	.356	.356	.356	
2.0	.344	.334	.334	.334	.334	.334	.334	.334	
1.8	.327	.323	.323	.323	.323	.323	.323	.323	
1.6	.311	.309	.309	.309	.309	.309	.309	.309	
1.4	.293	.292	.292	.292	.292	.292	.292	.292	
1.2	.271	.271	.271	.271	.271	.271	.271	.271	
1.0	.245	.245	.245	.245	.245	.245	.245	.245	
0.8	.212	.212	.212	.212	.212	.212	.212	.212	
0.6	.167	.167	.167	.167	.167	.167	.167	.167	
0.4	.101	.101	.101	.101	.101	.101	.101	.101	

Dilución al décimo (tres o mas niveles)

x < 1		x > 1, y > 2			y < 2			
x	K	x	K	y	K	y	K	y
		.0	.763	.0	.761	2.0	.744	1.0
		.1	.768	.9	.766	1.9	.744	0.9
		.2	.768	.8	.764	1.8	.734	0.8
		.3	.760	.7	.755	1.7	.712	0.7
0.4	.761	.4	.747	.6	.741	1.6	.684	0.6
0.5	.740	.5	.736	.5	.729	1.5	.658	0.5
0.6	.733	.6	.733	.4	.724	1.4	.638	0.4
0.7	.736	.7	.736	.3	.726	1.3		
0.8	.744	.8	.744	.2	.732	1.2		
0.9	.753	.9	.753	.1	.739	1.1		
1.0	.763	.0	.763	.0	.744	1.0		

Cuando  $x > 1, y > 2$  entre, a la Tabla, solo con la parte decimal de  $x$  ó  $y$ .

Dilución por cuadruplicado

x	Número de niveles		
	4	5	6 o mas
0.4	.704	.706	.707
0.6	.615	.617	.618
0.8	.573	.576	.577
1.0	.555	.558	.559
1.5	.545	.551	.553
2.0	.537	.548	.551
2.5		.545	.552
y			.552*
3.5			.550
3.0			.548
2.5		.545	.545
2.0	.537	.537	.537
1.5	.522	.522	.522
1.0	.488	.488	.488
0.8	.464	.464	.464
0.6	.431	.431	.431
0.4	.375	.375	.375

Nota: Cuando  $x$  y  $y$  están fuera del rango tabulado use el valor, marcado con un asterisco (\*). En el cálculo de organismos infectivos siempre se debe incluir como nivel inicial el no diluido aunque no se utilice en el trabajo, considerando todas repeticiones, del nivel "no diluido", como infectadas.

TABLA 13. PREPARACION DE DILUCIONES POR DUPLICADO, CUADRUPLICADO Y AL DECIMO.

a. Diluciones por duplicado:

Dilución  $2^0$ : suelo a examinar (a ex) no diluido.

Dilución  $2^{-1}$ : Se mezclan 50 g de suelo (a ex) con 50 g de suelo esterilizado en un cilindro métrico de 150 ml.

Dilución  $2^{-2}$ : Se mezclan 50 g de dilución  $2^{-1}$  con 50 g de suelo esterilizado.

Dilución  $2^{-3}$ : Se mezclan 50 g de dilución  $2^{-2}$  con 50 g de suelo esterilizado.

Hasta:

Dilución  $2^{-n}$ : Se mezclan 50 g de dilución  $2^{-(n-1)}$  con 50 g de suelo esterilizado

b. Diluciones por cuadruplicado:

Dilución  $4^0$ : Suelo a ex no diluido.

Dilución  $4^{-1}$ : Se mezclan 25 g de suelo a ex. con 75 g de suelo esterilizado.

Dilución  $4^{-2}$ : Se mezclan 25 g de dilución  $4^{-1}$  con 75 g de suelo esterilizado.

Dilución  $4^{-3}$ : Se mezclan 25 g de dilución  $4^{-2}$  con 75 g de suelo esterilizado.

Hasta:

Dilución  $4^{-n}$ : Se mezclan 25 g de dilución  $4^{-(n-1)}$  con 75 g de suelo esterilizado.



Continuación Tabla 13 ...

c. Diluciones al décimo:

Dilución  $10^0$ : Suelo a ex. no diluído.

Dilución  $10^{-1}$ : Se mezclan 10 g de suelo a ex. con 90 g de suelo esterilizado.

Dilución  $10^{-2}$ : Se mezclan 10 g de la dilución  $10^{-1}$  con 90 g de suelo esterilizado.

Dilución  $10^{-n}$ : Se mezclan 10 g de dilución  $10^{-(n-1)}$  con 90 g de suelo esterilizado.

NOTA: Porter (1979) observó que 50 agitaciones del suelo a ex. con suelo estéril eran suficientes para conseguir una buena mezcla. Es aconsejable, secar el suelo a ex., un poco en un sitio aireado, y tamizarlo, antes de usarlo, a fin de obtener una buena homogenización de éste suelo con el estéril.