



Manual de Protocolos

**Herramientas para el estudio y
manipulación de Hongos Micorrícicos
Arbusculares y *Trichoderma***



Fernanda Covacevich y V. Fabiana Consolo

INBIOTEC

CONICET




UNIVERSIDAD NACIONAL
DE MAR DEL PLATA
.....



Covacevich, Fernanda

Manual de protocolos, herramientas para el estudio y manipulación de Hongos Micorrízicos Arbusculares y *Trichoderma* / Fernanda Covacevich y Verónica Fabiana Consolo. - 1a ed. - Mar del Plata: Universidad Nacional de Mar del Plata, 2014.

115 p ; 23x16 cm.

ISBN 978-987-544-606-9

1. Biología. 2. Manual. 3. Hongos. I. Consolo, Verónica Fabiana II. Título
CDD 571.592

Fecha de catalogación: 11/11/2014

Fotos de tapa: Fernanda Covacevich-V. Fabiana Consolo

Libro revisado por el Ing. Agr. (M.Sc) Hernán E. Echeverría

Manual de Protocolos

**Herramientas para el estudio y
manipulación de Hongos Micorrícicos
Arbusculares y *Trichoderma***

Fernanda Covacevich^{1,2} y V. Fabiana Consolo¹
Editoras

¹Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología (INBIOTEC-CONICET), y Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas (FIBA), Mar del Plata, Argentina.

²Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), UI INTA-FCA, Balcarce

✉: covacevich.fernanda@inta.gob.ar; faconsolo@fiba.org.ar

Indice

	Página
➤ Prefacio	1
➤ Sección I: Colecta, multiplicación y almacenamiento de Hongos formadores de Micorrizas Arbusculares (HMA) y <i>Trichoderma</i>	
-Colecta y almacenamiento de muestras de suelo para el estudio de HMA y <i>Trichoderma</i>	3
-Aislamiento, multiplicación y conservación de hongos del HMA	5
-Aislamiento, cultivo, conservación y multiplicación de <i>Trichoderma</i>	24
➤ Sección II: Procesamiento, cuantificación y recuento de HMA y <i>Trichoderma</i>	
- Tinción de raíces para la observación de HMA	34
- Cuantificación de la colonización micorrícica	47
- Cuantificación de propágulos de HMA y Potencial micorrícico de muestras de suelo	55
- Determinación del número de microorganismos en una muestra	60
-Cuantificación de proteínas relacionadas con la Glomalina (GRSP): Glomalina fácilmente extraíble	65
➤ Sección III: Lineamientos generales de ensayos de inoculación con HMA y <i>Trichoderma</i>	
- Ensayos de inoculación con HMA	74
- Ensayos de inoculación con <i>Trichoderma</i>	78
➤ Sección IV: Utilización de herramientas moleculares para el estudio de HMA y <i>Trichoderma</i>	
- Extracción de DNA de HMA	87
- Extracción de DNA de <i>Trichoderma</i>	90
- Amplificación por PCR	94
- Estudios de diversidad	105
➤ Consideraciones Finales	115

AUSPICIOS

- FUNDACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS APLICADAS (FIBA)
- INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN BIODIVERSIDAD Y BIOTECNOLOGÍA (INBIOTEC-CONICET)
- ESCUELA DE POSGRADO, UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA
- INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA (INTA)

APORTES ESPECIALES

Rhizobacter

Embiotec SRL

Seasinglab

MardelLab

Prefacio

La explotación intensiva del suelo de la agricultura convencional (de alto insumo) de las últimas décadas en Argentina, con permanente extracción de nutrientes, está afectando su fertilidad natural y diversidad microbiana lo que podría poner en peligro su productividad y sostenibilidad.

La aplicación excesiva de fertilizantes y de pesticidas afecta negativamente la actividad de poblaciones microbianas edáficas que pueden contribuir a reducir el uso de agroquímicos y fertilizantes sintéticos. Sin embargo, estos aspectos no siempre son considerados al planificar emprendimientos productivos.

Varios grupos microbianos están siendo centro de estudio y manipulación por ser considerados promotores de crecimiento vegetal (PGPM del inglés *Plant Growth Promoting Microorganism*). Entre ellos se destacan los Hongos formadores de Micorrizas Arbusculares (HMA), quienes colonizan internamente las raíces de las plantas hospedadoras y son reconocidos por incrementar la nutrición vegetal, la capacidad de recuperación de las plantas frente a estrés tanto biótico como abiótico, y por incrementar la estabilidad de los agregados y la biodiversidad edáfica. La formación de micorrizas, es una de las simbiosis mutualistas más extendida en la naturaleza. Por ser los HMA simbiosiontes obligados, las tecnologías de estudio y manipulación son diferentes al de los restantes microorganismos PGPM. Otro grupo con potencialidad para la formulación de bioinoculantes lo constituyen los hongos del género *Trichoderma* quienes son reconocidos como agentes de control biológico contra hongos patógenos, solubilizadores de P y productores de factores de promoción del crecimiento vegetal.

El entendimiento y conocimiento de la manipulación de microorganismos claves en el ciclado de nutrientes y transferencia a las plantas tales como los HMA, que además contribuyen a la estabilidad y calidad del suelo resulta estratégico. Asimismo, el conocimiento de microorganismos también considerados PGPM tales como hongos del género *Trichoderma*, amplía el marco

conceptual de las potencialidades de la microbiota edáfica para la promoción sustentable del crecimiento vegetal.

El propósito de este Manual de Protocolos es aportar los fundamentos básicos para promover el entendimiento, reconocimiento, caracterización y cuantificación de la colonización por HMA en raíces, así como hongos del género *Trichoderma* nativos del suelo.

En la primera sección se describen los fundamentos básicos a seguir para la colecta de muestras de suelo y la manipulación del material a ser analizado, así como para el aislamiento y multiplicación de HMA y *Trichoderma*. En la segunda sección se describen las principales técnicas destinadas a cuantificar la colonización por HMA en raíces, así como la presencia de HMA, *Trichoderma* y microorganismos cultivables en muestras de suelo. También se detalla la cuantificación de la glomalina, una proteína asociada a la actividad HMA. En la tercera sección se describen los lineamientos básicos para estudios experimentales en laboratorio y a campo con HMA y *Trichoderma*. En la última sección se describen los fundamentos y alcances de algunas técnicas moleculares destinadas a la determinación e identificación de los microorganismos motivo de este Manual.

A partir de un compilado de técnicas utilizadas en los principales laboratorios especializados en la temática, nos proponemos brindar las herramientas básicas sobre su reconocimiento y manipulación. La información aportada en este Manual de Protocolos puede facilitar tanto el estudio básico de estos microorganismos, como para potenciales aplicaciones como biofertilizantes.

Para finalizar, agradecemos al Ing. Hernán E. Echeverría (INTA-FCA UNMdP) quien realizó la lectura crítica de este Manual y que, con sus comentarios, permitió mejorar la versión final del mismo.

Fernanda Covacevich y Verónica Fabiana Consolo
Editoras

SECCION I

Colecta, aislamiento, conservación y multiplicación de Hongos formadores de Micorrizas Arbusculares (HMA) y Trichoderma

Los *Hongos formadores de Micorrizas Arbusculares* (HMA; Phylum Glomeromycota) se distribuyen en el perfil de suelo de manera no aleatoria, ya que, debido a su característica biótrofa-obligada su presencia está condicionada a la existencia de material radical (vegetal) vivo. Por esta razón, si lo que se desea colectar son propágulos activos de HMA, el material colectado deberá consistir en raíces y suelo rizosférico asociado. Si bien hongos del género *Trichoderma* no son simbioses de las raíces, su distribución y abundancia se asocia a los exudados radicales, por lo que las mismas consideraciones para el muestreo de HMA pueden ser tomadas para colectar *Trichoderma*.

Profundidad de muestreo

Diversos estudios indican que la mayor abundancia y actividad de los HMA y *Trichoderma* se encuentra en los 10-20 cm de suelo. Dependerá del objetivo de la investigación, la profundidad a la que se desea colectar el material y si se desea fraccionar la profundidad de muestreo en sub-muestras.

Colecta de muestras de suelo

Las muestras pueden ser colectadas bien con muestreador de suelo y raíces (de preferencia con al menos 5 cm de diámetro y 20 cm de profundidad). El suelo deberá tener una humedad adecuada a capacidad de campo para que el cilindro de suelo pueda retirarse sin problemas del muestreador. Sin embargo, si la humedad es excesiva es probable que la muestra de suelo quede adherida al muestreador por lo que será necesaria la ayuda de algún elemento para retirar el cilindro de suelo del

muestreador. Por el contrario, si el suelo esta excesivamente seco, es probable que el operador encuentre dificultad al penetrar el muestreador en el mismo. Una alternativa es mojar con abundante agua (aproximadamente 2 L) en cada sector seleccionado para la extracción de la muestra, esperar unos minutos que el agua sea absorbida en el suelo y luego se podrá proceder a la colecta de la muestra con menos dificultad.

 Una vez colectadas las muestras verificar que se colectó material radical con raíces de diferentes tamaños de diámetro. Excluir muestras sin material de raíces o que solo presenten raíces muy gruesas (mas de 3 mm) y muy suberizadas (coloración marrón oscura). Las muestras serán rotuladas correctamente y colocadas en bolsas plásticas.

Transporte de las muestras de suelo

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

 Si se realizaran estudios moleculares en el suelo o raíces es requisito que las muestras sean transportadas rápidamente al laboratorio en contenedores de conservación con frío.

Aislamiento de Hongos formadores de Micorrizas Arbusculares

Los propágulos infectivos de los HMA pueden ser esporas, hifas o raíces previamente colonizadas por los hongos. Para el aislamiento de dichos hongos se puede proceder a tamizado de las muestras de suelo en tamices de tamaños de malla de 420-30 μm . Sin embargo, para una mejor visualización-colecta de los propágulos se recomienda la extracción de esporas o hifas mediante tamizado en húmedo y centrifugación en sacarosa.

Protocolo de la extracción de esporas de HMA por tamizado en húmedo y centrifugación en sacarosa (a partir de muestras de suelo o inoculantes sólidos)

Materiales y reactivos necesarios:

Tubos de centrífuga de 50 mL

Tamices de suelo con malla 0,42 e 0,053 mm (420-30 μm)

Placas de Petri

Piseta

Baldes plásticos

Varillas de vidrio

Sacarosa o azúcar refinada

Agua destilada

Equipamientos

Lupa (microscopio estereoscópico)

Centrífuga con rotor para tubos de 50 ml

Balanza – Agitador con temperatura – Heladera

Preparación de la Solución de Sacarosa

La extracción de esporas de HMA puede ser realizada utilizando una solución de 45, 50 o 60% de sacarosa.

Sacarosa 45 % (450 g de azúcar refinado o cristal, llevando la solución a 1L con agua destilada).

Sacarosa 50 % (500 g de azúcar refinado o cristal, llevando la solución a 1L con agua destilada).

Sacarosa 60 % (600 g de azúcar refinado o cristal, llevando la solución a 1L con agua destilada).

✎ Para favorecer la disolución puede requerirse agitación o calor de la solución. Cuando la sacarosa este totalmente disuelta la solución presentará una coloración amarillenta y traslúcida.

✎ En caso de no utilizar toda la solución, almacene en heladera para evitar la proliferación de microorganismos.

Procedimiento

- Lavar los tamices con esponja y detergente
- Homogenizar las muestras de suelo y separe 50 mL (aprox. 50 g) para la extracción.
- Transferir los 50 mL de la muestra en un balde plástico de 2 L.
- Humedecer y disgregar los terrones de suelo presionándolos con los dedos o contra las paredes del balde. Suspender el suelo en el agua con la ayuda de una varilla de vidrio mediante movimientos circulares durante 1 minuto.
- Dejar en reposo por aproximadamente 1 minuto (a efectos de que las partículas más gruesas decanten por su propio peso).
- Vertir el agua sobre los tamices (los cuales deben estar superpuestos, con el tamiz de mayor abertura de malla en el extremo superior y disminuyendo de acuerdo a disminución en abertura de malla). Solo verter el líquido flotante, mientras que las partículas decantadas permanecerán en el fondo del balde.
- Repetir el procedimiento al menos 2 veces más, hasta que el agua permanezca prácticamente limpia, sin abundantes partículas en suspensión.
- Descartar el suelo restante en el balde en recipientes a tal fin.
- Recoger el material retenido en el tamiz de 130 μm malla en una placa de Petri con ayuda de corriente de agua aportada con piseta a efectos de observar (y recolectar) esporas de gran tamaño, grupos de esporas o esporocarpos.
- Recoger el material retenido en el tamiz de 53 μm malla y con ayuda de corriente de agua aportada con piseta transferirlo a un tubo centrífuga de 50 mL.

- Lavar bien los tamices con esponja y detergente y repetir el procedimiento para otras muestras, si las hubiera.
- Pesar los tubos con el suelo recogido de los tamices y completarlos con agua de manera que todos los tubos queden con el mismo peso.

✎ Trabajar siempre con un número par de muestras y considerando la capacidad de muestras de la centrífuga. En caso de número impar de muestras deberá equilibrar la centrífuga incorporando un tubo extra con agua.

- Centrifugar a 3000 rpm por 3 minutos.
- Retirar los tubos y descartar cuidadosamente el sobrenadante sin mover las partículas sólidas decantadas en el fondo del tubo. En esta primera centrifugación, las esporas se encuentran decantadas junto con las partículas de suelo que atravesaron el tamiz. Partículas de suelo de bajo peso se encuentran en el sobrenadante.
- Agregar a los tubos una solución de sacarosa 45, 50 o 60 % hasta completar aproximadamente 40 mL.

✎ Es probable que dependiendo de las características del suelo de la muestra deberá poner a punto la concentración de sacarosa adecuada a utilizar para la extracción

OTRA OPCION: Con el agua y el residuo de los tamices (punto anterior) en un tubo de 50 mL lleno hasta la mitad, agregar (hasta completar) una solución de sacarosa (azúcar doméstica) al 80 % en agua (si es sacarosa pura al 60 %) con una jeringa desde el fondo del tubo para formar un gradiente.

✎ A partir de este punto el procesamiento de extracción de esporas no podrá ser interrumpido y se recomienda que sea realizado lo más rápido posible debido a la probabilidad de deshidratación de las esporas por ósmosis.

- Suspender la muestra contenida en el tubo con sacarosa mezclando el precipitado con la solución (puede utilizarse una

varilla de vidrio teniendo cuidado de que esta sea lavada entre muestra y muestra a efectos de evitar contaminación).

- Equilibrar todos los tubos a efectos que tengan el mismo peso.
- Centrifugar a 2000 rpm por 2 minutos.

☞ En este procedimiento las esporas quedarán suspendidas en el sobrenadante.

- Verter el sobrenadante cuidadosamente sobre un tamiz de al menos 53 μm cuidando de no arrastrar las partículas decantadas en el fondo del tubo.

EN CASO DE HABER ELEGIDO LA OTRA OPCION: Extraer la fase inferior (de sacarosa) del tubo, volcar sobre un tamiz y lavar con abundante agua corriente para eliminar la sacarosa y evitar la ruptura de esporas por presión osmótica.

Para cualquiera de las dos opciones elegidas:

- Lavar el material retenido en el tamiz con agua corriente para eliminar los residuos de sacarosa. Llevar con la corriente de agua las esporas en un extremo lateral del tamiz, teniendo cuidado de no expulsar fuera el material del mismo.
- Transferir con ayuda de una piseta con agua destilada el material retenido en el tamiz a una placa de Petri o tubo con tapa (si el material será almacenado en heladera) a efectos de ser analizado bajo lupa binocular.

☞ En caso de que el material sea almacenado en heladera, la conservación no debe superar los 3 días, debido a que las esporas podrían comenzar a germinar, lo que afectaría la cuantificación y determinación. Si el material es almacenado en heladera por más de un día es probable que estas comiencen a aglomerarse. Por lo tanto se recomienda, antes de la observación, que sean nuevamente lavados a efectos de desprenderlas.

Extracción de esporas del material tamizado y centrifugado

Los esporocarpos que habían sido retenidos en el tamiz de 130 μm antes de las centrifugaciones se levantan fácilmente de la muestra con la ayuda de pinzas de punta fina. Las esporas (del material tamizado y centrifugado) se pueden reunir en un centro del campo de observación de la placa de Petri y se pueden coleccionar con ayuda de pipetas. En el proceso de observación y aislamiento las esporas se separan en grupos individuales de acuerdo a rasgos morfológicos (tamaño, color, conexiones hifales morfológicamente semejantes, características de la superficie de la spora, para posterior manipulación de los grupos individuales se transfieren en agua a vidrios de reloj).

Cuantificación de esporas de HMA

Procedimiento

- Transferir el material a una placa para recuento de esporas (se recomienda contar con placa con líneas acanaladas o dibujadas)
- Contabilizar el número de esporas HMA (de morfotipos de HMA) bajo lupa estereoscópica. Referir el número total de esporas HMA a 100 g de suelo o material analizado. Para ello, deberá calcularse el grado de humedad de la muestra y realizar la corrección correspondiente.

Preparación de muestras de HMA para determinación taxonómica

Las esporas coleccionadas como fue indicado pueden ser transferidas en portaobjetos a los que se les pueden adicionar gotas de soluciones (PVLG, Meltzer) que facilitarán la observación de las estructuras de carácter taxonómico de los HMA (Morton, INVAM).

PVLG Polivinil - lacto – glicerol

El PVLG es utilizado como montaje permanente de esporas de HMA enteras o quebradas sobre el portaobjeto de

observación. Para obtener mejores resultados, las esporas no deberían ser evaluadas luego de 2-3 días del montado. Las esporas podrían cambiar de coloración, oscureciéndose; también puede ocurrir plasmólisis de contenidos celulares.

Preparación del PVLG

- 100 mL de agua destilada con
- 100 mL de ácido láctico y
- 10 mL de glicerina en un vidrio oscuro.
- Agregar 16,6 g de alcohol polivinílico, y
- Llevar a 70-80 °C por 4 a 6 horas

 Es importante mezclar todos los ingredientes en una botella oscura antes de adicionar el PVA. El PVA se disuelve lentamente en un baño María. La solución debería presentar aspecto claro en 4-6 horas. El PVLG se puede almacenar aproximadamente durante un año.

Reactivo de Melzer

El reactivo de Melzer es una herramienta importante para el diagnóstico de morfología de esporas de HMA. Las reacciones de tinción con Iodo variarán desde rosado (reacción débil) a rojizo-amarronado (reacción moderada) a púrpura-rojizo oscuro (reacción intensa dextrinoide). El Iodo se liga a las regiones hidrofóbicas de las macromoléculas de la espora o paredes germinales y la intensidad de la reacción se relaciona en parte con la longitud de sus cadenas de carbohidratos.

Preparación del Reactivo de Melzer

- Diluir 1,5 g de iodo y 5,0 g de iodato de potasio en
- 100 mL de agua destilada (es probable que se requiera agitación y calor para facilitar la dilución).
- Agregar 100 g de tricloroacetaldehído monohidratado (también comúnmente llamado hidrato de cloral) y facilitar la dilución. Conservar en frasco oscuro y en oscuridad.

👉 Cuando el reactivo de Melzer es usado como se indicó, las reacciones de tinción serán bien intensas y los montajes durarán aproximadamente 1-2 años (aún con el cubreobjetos sellado). Si se desean obtener montajes mas permanentes se recomienda mezclar el reactivo de Melzer con el PVLG en proporción 1:1 en volumen y almacenar la muestra en una botella oscura. La intensidad de la tinción disminuirá, pero no excesivamente.

👉 Si la mezcla adquiere color verdusco, esta no se encuentra en condiciones para ser utilizada y debe ser descartada siguiendo las normas de seguridad en los laboratorios.

☠ El tricloroacetaldehído monohidratado presenta riesgos para la salud humana y ambiente.
http://www.biopack.com.ar/Catalogo_OnLine_FichaTecnica.asp?Cat_codProductoGeneral=2000971300

Montado y observación de esporas de HMA para determinación taxonómica (utilizando cualquiera reactivos de PVLG y/o PVLG-Melzer)

Procedimiento

- Colocar las esporas a ser observadas (previamente colectadas como se indicó) en un portaobjetos (para ello puede requerir el auxilio de una pipeta de bajo volumen o una pinza de punta fina). Es deseable contar con más de una espora igual por determinación. En caso posible, colocar las esporas en dos grupos en ambos extremos del mismo portaobjetos.
- Dejar secar al aire la gota de agua con la cual las esporas fueron transferidas. Retirar con una punta restos de detritos, si los hubiere.
- Colocar una gota de solución de montado (PVLG o PVLG-Melzer) en uno de los grupos de esporas. Si se desea realizar la

observación con los dos reactivos, colocar el otro reactivo en el otro grupo de esporas.

- Tapar con cubreobjetos y esperar a que el reactivo se desparrame uniformemente. En caso de que sobrepase el cubreobjetos, retirar el material excedente con un papel.



En caso de haber agregado la solución PVLG+Melzer (1:1), luego de tapar con el cubreobjetos, deberá realizar una leve presión sobre este y la espora a ser observada. Como resultado de dicha presión la espora se romperá y el reactivo penetrará en su interior y entre las paredes de la espora.

Si se dispone de material (esporas) suficiente se recomienda el montaje de las esporas (iguales) en dos grupos en el mismo portaobjetos, uno es adicionado con PVLG y el otro con PVLG+Melzer.

- Observar en microscopio compuesto con 100-1000 X de aumento. Es imprescindible para medir las esporas que el ocular esté provisto de regla. Cuando la espora muestra claramente la conexión hifal puede determinarse el género del hongo del que se trata.



Para consultas sobre la morfología de las esporas y su pertenencia a los diferentes géneros y especies, se puede acceder a sitios de Internet (BEG, INVAM, MycoBank, Barreto de Novais 2007, entre otros) en los cuales se disponen de imágenes fotográficas así como a revistas científicas en las que se reportan estudios taxonómicos de HMA.

Cultivo y multiplicación de Hongos Micorrícicos Arbusculares

Los protocolos de inoculación de HMA pueden ser divididos en dos categorías principales, dependiendo si se utilizan condiciones axénicas o no axénicas. La manipulación en condiciones axénicas requiere la producción de material fúngico estéril evitando la contaminación con patógenos u otros microorganismos rizosféricos. En todos los casos se sugiere la multiplicación en sustrato estéril.

Para la manipulación en condiciones axénicas totales, la estrategia actual es la utilización de raíces transformadas con *Agrobacterium rhizogenes* Ri T-DNA creciendo en medio conteniendo sacarosa (Fortin et al. 2002). El material fúngico estéril es directamente producido *in vitro* (esporas o raíces micorrizadas) u obtenido vía esterilización de esporas de HMA producidas en condiciones no axénicas.

Condiciones axénicas

Cultivos de raíces transformadas

Los protocolos para la obtención de raíces de *Medicago truncatula* transformadas con *Agrobacterium rhizogenes* (Ri T-DNA) están descritos en Fortin et al. (2002). Una vez obtenidas las raíces transformadas, los clones de raíces son propagadas mediante subcultivos cada 4 semanas en placas de Petri grandes (14 cm de diámetro) ubicadas en posición horizontal conteniendo medio M con 0,3 % Phytigel (Sigma, St Louis, MO, USA). El cultivo es mantenido en oscuridad a 25 °C.

Para la inoculación se utilizan raíces transformadas de crecimiento vigoroso de 15-20 días. Una planta (raíz transformada) individual (de aproximadamente 4 cm de largo, considerando la raíz principal con varias raíces laterales) es colocada en la parte inferior de una placa de Petri cuadrada (12 x 12 cm) conteniendo medio M (0.5 % Phytigel).

Las esporas germinadas (con hifas de aproximadamente 0,1-0,5 cm de largo) son transferidas en el medio de la placa de

Petri, justo por debajo de una raíz lateral. Aproximadamente se inoculan 4-5 esporas pregerminadas por planta. Las plantas inoculadas son ubicadas verticalmente en la placa de cultivo. Las raíces transformadas crecen hacia abajo hacia la parte inferior de la placa (Figura 1).

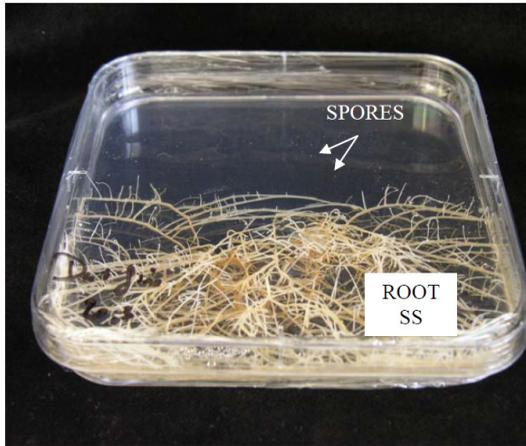


Figura 1. Producción axénica (*in vitro*) del Hongo Micorrizico Arbuscular *Gigaspora rosea* utilizando la técnica de cultivo en raíz transformada de *Medicago truncatula* mediante Ri-T-DNA de (foto extraída de Chabaud et al. 2006).

Composición de Medio M (Bécard y Fortin, 1988)

Macro elementos (20X)	Solución stock (500 mL)	Concentración Final (mM)
MgSO ₄ 7H ₂ O	7,31 g	3,0
KNO ₃	0,8 g	0,79
KCl	0,65 g	0,87
Ca (NO ₃) ₂ 4H ₂ O	2,88 g	1,22
Micro elementos (100X)		Concentración Final (µM)
KH ₂ PO ₄	240 mg	35,0
Na Fe EDTA	400 mg	21,7
KI	37,5 mg	4,5
MnCl ₂ 4H ₂ O	300 mg	30,3
ZnSO ₄ 7H ₂ O	132,5 mg	9,2
H ₃ BO ₃	75 mg	24,0
CuSO ₄ 5H ₂ O	6,5 mg	0,5
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,12 mg o 120 µL de solución 10mg/10mL	0,01
Vitaminas (100X)		µM
Glicina	150 mg	40
Tiamina HCl	5 mg	0,3
Piridoxina HCl	5 mg	0,5
Acido nicotínico	25 mg	4
Myo-inositol	2,5 g	277
Sacarosa		10 g/L
Phytigel		3 a 5 g*/L
pH		5,5

 NOTAS:

- Cuando se crecen plantas enteras en medio M, no es necesario el agregado de sacarosa, por lo tanto puede no ser incluida.
- Dado que el uso de Phytigel es un agente gelificante y no puede ser recalentado, el medio M debe ser vertido inmediatamente después de autoclavar.
- Se utilizan unas pocas gotas de KOH (0,1M) para ajustar el pH.
- * Para cultivos verticales se usan 5 g/L (en vez de 3 g/L) de Phytigel.

 **Para 1 L de medio M:**

- 50 mL de la solución de Macro-elementos (20X)
- 10 mL de la solución de stock micro-elementos (100X)
- 10 mL de la solución stock de vitaminas
- Ajustar a 1L con agua ultra pura
- Agregar 10 g de sacarosa
- Ajustar a pH 5,5 con KOH 0,1M
- Verter en una botella conteniendo 3 o 5 g/L Phytigel
- Autoclavar

Multiplicación de HMA en Cultivos Trampa

Debido a la característica biótropa obligada de los HMA, su multiplicación requerirá en todos los casos de la presencia de una raíz metabólicamente activa para sostener una simbiosis funcional. Una forma de multiplicar HMA es mediante cultivos trampa en los cuales se pueden multiplicar los HMA monospóricos o multiespóricos.

Materiales necesarios

- Suelo (colectado del perfil superficial 0-20 cm), esterilizado (de acuerdo a Covacevich et al. 2014)
- Arena de río y perlita lavadas y autoclavadas
- Macetas, cámara de crecimiento de plantas
- Esporas aisladas, estériles
- Semillas estériles
- Plántulas (5 días de germinadas)

☞ Para la germinación pueden colocarse semillas estériles en cajas de Petri conteniendo papel de filtro (previamente esterilizadas), humedecidas con agua estéril durante 5 días.

Otra opción es realizar la germinación en bandejas con arena o vermiculita estéril durante 5 días. Ver imagen en Foto 1A, Sección III).

Esterilización de esporas de HMA

Sonicado

Colocar las esporas aisladas en un vaso de precipitado de 10 mL con agua destilada estéril en un sonicador aproximadamente durante 15 segundos, tres veces, enjuagando con agua destilada estéril entre cada sonicado. Verificar que las esporas no se hayan roto por el sonicado dado que afectará su viabilidad.

CloraminaT/Tween 20-Sulfato estreptomycin (Chabaud et al. 2006)

Soluciones

- Cloramina T 2%: 0,4 g de Cloramina T en 20 mL H₂O, adicionarle 50 µL de Tween 20
- Sulfato de estreptomycin (200 µg/mL – esterilizado por filtración).
- Agua destilada estéril.

Procedimiento

- Colocar las esporas aisladas en 20 mL de solución ChloraminaT/Tween 20 recién preparada. Agitar durante 15 minutos. Dejar decantar las esporas y remover la solución. Repetir el procedimiento 2 veces.
- Adicionar 20 mL de sulfato de estreptomycin. Incubar a 4 °C por al menos una hora (las esporas pueden permanecer en esta solución toda la noche. No dejarlas en la solución más de un día ya que puede reducir la germinación).
- Remover la estreptomycin y enjuagar 5 veces con agua destilada estéril (puede realizarse esta actividad con ayuda de una pipeta, cuidando de no coleccionar y descartar las esporas durante los lavados).

Sulfato de Mg/antibioticos/Tween80 (Hildebrandt et al. 2002)

Soluciones

- 0,1% MgSO₄·7H₂O (estéril)
- Penicilina G, Sulfato de estreptomycin y Sulfato de neomicina, cada una a 5 mg/L
- 2,5 mg de hydrochloride de tetraciclina/L
- 50 µL de Tween 80/L en 0,1% MgSO₄ · 7H₂O).

Procedimiento

- Lavar las esporas con el MgSO₄·7H₂O (5 veces, dos minutos cada vez, enjuagar con agua destilada estéril entre cada vez)

- Incubar con la mezcla de antibioticos, 2,5 mg de Clorhidrato de Tetraciclina/L y 50 μ L de Tween 80/L en 0,1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

Esterilización de las semillas

- Enjuagar con agua destilada estéril
- Colocar las semillas en solución de Hipoclorito de Sodio comercial al 3,5 % durante 3 minutos (o NaClO al 5 % durante un minuto), agitar levemente
- Enjuagar con agua destilada estéril 3 veces, 1 minuto cada vez, agitar levemente
- Colocar las semillas en solución de etanol 90 %, 3 minutos, agitar levemente
- Enjuagar con agua destilada estéril
- Dejar secar en aire no contaminado (cámara de flujo laminar o lugar protegido).

Cultivos monospóricos o multiespóricos

Se utilizan esporas individuales o grupos de esporas extraídas de muestras de suelo y esterilizadas como se ha indicado anteriormente.

Para cultivos multiespóricos dependerá de los objetivos de la multiplicación, si se requiere multiplicación de una sola especie de HMA o la misma puede ser multiespecífica. Si se requiere la multiplicación de una sola especie, se deberá tener cuidado de agrupar, coleccionar e inocular esporas de la misma especie. Para ello podrá requerir ayuda de material para la identificación taxonómica a partir de esporas en lupa binocular.

Procedimiento de inoculación con esporas estériles

Plántulas de 5 días de germinación se cubren en su sistema radical con papel de filtro estéril. Antes de cubrir totalmente las raíces con el papel, colocar en el sistema radical la/las espóra/s deseables a ser multiplicadas. Cerrar el papel sin

dañar el sistema radical. Colocar la plántula inoculada en una maceta con sustrato estéril.

☠ El Clorhidrato de Tetraciclina, la Cloramina T y el Tween 20 presentan riesgos para la salud humana por lo que deben manipularse con precauciones (http://www.guinama.com/media/tecnico/93517_FDS%20Tetraciclina%20clorhidrato%20v01.pdf); <http://research-ag.com/hojasdeseguridad/6532.pdf>; <http://www.acofarma.com/admin/uploads/download/2129-dbce82f9d3ed6dc5a08e46f5bc0d10d5b193f1b6/main/files/Tween-20.pdf>, respectivamente)

Condiciones no axénicas

Multiplicación de suelo-inóculo

Puede realizarse la multiplicación de consorcios microbianos contenidos en muestras de suelo.

Procedimiento

- Mezclar 100 mL del suelo nativo a multiplicar con perlita:vermiculita estériles(2:1:1)
- Colocar la mezcla homogénea en una maceta de 250 mL, llenando la misma sin completar los 5 cm superiores. En caso de macetas de volumen diferente, mantener las proporciones de suelo inóculo/sustrato.
- Proceder como se indica en la sub-sección `Mantenimiento y colecta de plantas trampa`.

Multiplicación a partir de raíces micorrizadas

Procedimiento

- Colectar raíces del área de interés a multiplicar los HMA
- Verificar presencia de colonización micorrícica en una submuestra de raíces

- En caso de grado de micorrización superior al 50%, lavar las raíces a efectos de eliminar todo el suelo rizosférico
- Cortar las raíces en segmentos de aproximadamente 1 cm

Multiplicación a partir de esporas

Siguiendo los procedimientos de extracción de esporas indicados anteriormente, estas pueden ser multiplicadas como se indicó para condiciones axénicas omitiendo el paso de esterilización.

Inoculación no axénica con suelo inóculo, raíces micorrizadas o esporas

Procedimiento

- Realizar un pequeño orificio en el sustrato de la maceta que fue llenada como se indicó anteriormente
- Colocar el suelo-inóculo que se haya decidido multiplicar
- Colocar la semilla o la plántula, tapar con sustrato (2 cm aproximadamente)
- Colocar una capa superficial de arena estéril en la superficie de la maceta a efectos de evitar contaminaciones entre macetas.

☞ Para la inoculación a partir únicamente de esporas aisladas se recomienda el procedimiento indicado para la inoculación en condiciones axénicas omitiendo el paso de esterilización.

Ventajas de utilización de raíces micorrizadas como inóculo

La inoculación con raíces presenta ventajas sobre la inoculación con esporas aisladas. El inóculo conformado con raíces presenta, en general, mayor velocidad de colonización que las esporas aisladas, las que en ocasiones pueden estar en estado de dormancia. En ocasiones puede preferirse la inoculación con raíces micorrizadas y no con suelo-inóculo por temor a que microbiota acompañante en el suelo presente cierto riesgo de

patogenicidad para la planta a inocular. El inóculo conformado con raíces presenta además la ventaja sobre el suelo-inóculo en que es mas liviano, por lo que la logística de su transporte será seguramente menos complicada. Por ultimo, otra ventaja es el menor tiempo para la producción de inóculo, mientras que para suelo inóculo se estima un período de multiplicación no menor a 4-6 meses, para inóculo conformado por raíces micorrizadas este tiempo puede ser menor, de aproximadamente 12-14 semanas.

Selección y tratamiento de las plantas trampa

Diferentes plantas pueden ser utilizadas para la multiplicación de HMA: maíz (*Zea mays* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.), cebolla (*Allium cepa* L.), maní (*Arachis hypogaea* L.), leguminosas forrajeras del tipo *Stylosanthes* sp., sorgo (*Sorghum vulgare* L.), ajoporro (*Allium ampeloprasum* L.), lotus (*Melilotus* sp.) y girasol (*Helianthus annuus*) entre otros (<http://invam.wvu.edu/methods/cultures/host-plant-choices>). Se recomienda que la especie de planta trampa de multiplicación del inóculo sea diferente a la del hospedero final.

Mantenimiento y colecta de las plantas trampa

Las plantas trampa de multiplicación de HMA se mantienen en condiciones de laboratorio 12 h luz/12 h oscuridad; 21-23 °C por al menos 4-6 meses. En caso de haber utilizado solo sustrato para la multiplicación (sin suelo), será necesario el adición de solución nutritiva (del tipo Hoagland, <https://amadeus.biosci.arizona.edu/~jdhall/Protocols/PlantNutrientSolution.doc>, cada 15 días, con P 50 %). Para sustrato de multiplicación con suelo, se recomienda al menos dos adiciones de solución nutritiva durante el período de multiplicación de los inóculos.

Aproximadamente un mes antes de la colecta del material, debe procederse a la inducción de períodos de estrés hídrico en las plantas trampa. Quince días antes de la colecta deberá suspenderse todo tipo de irrigación. Esto favorecerá la proliferación de esporas HMA.

Conservación de inóculos de HMA.

Transcurrido 4-6 meses de la multiplicación de los inóculos en plantas trampa, cortar y separar la parte aérea de las raíces y sustrato. Secar el sustrato junto con las raíces a temperatura ambiente y en oscuridad (se recomienda remover periódicamente el sustrato para facilitar el completo secado). Una vez seco, cortar las raíces en segmentos pequeños y homogeneizar todo el material. El inóculo bien seco puede ser conservado en bolsa cerrada durante un tiempo prolongado (al menos 1-2 años).

Producción de propágulos de HMA mediante cultivo hidropónico

Los propágulos de HMA pueden ser producidos hidropónicamente. En este sistema las raíces de las plantas crecen sumergidas en un reservorio con solución nutritiva del tipo Hoagland o Hewitt. El reservorio puede contener solo líquido o sustrato sólido estéril (del tipo arena o perlita 2-3 mm diámetro). Las plantas trampa pueden ser maíz, trigo u otras las cuales se incorporan precolonizadas en el sistema de crecimiento.

El sistema de crecimiento debe estar provisto de aireación constante a la solución y el sistema radical. La solución nutritiva de crecimiento debe ser renovada periódicamente a intervalos de 3 o 4 días juntamente con agua destilada o deionizada.

Entre 9-10 semanas después del trasplante, se procede a cortar la parte aérea de las plantas y las raíces son recuperadas en el reservorio, procesadas o almacenadas para usos posteriores.

Esta técnica presenta mayores costos operativos que los anteriormente descritos así como riesgos de contaminación de la solución de crecimiento que, podrían afectar la multiplicación de los HMA.

Detalles de esta técnica así como de algunas de las descritas en esta sub-sección son reportados por Habte y Osorio (2001).

Aislamiento, cultivo, conservación y multiplicación de hongos del género Trichoderma

Trichoderma (Hypocrea, Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae) es un hongo saprofito que ha sido aislado comúnmente del suelo en diferentes países del mundo, también se ha encontrado sobre la superficie de las raíces de las plantas, sobre cortezas en descomposición, en el interior de troncos, y sobre otros hongos. Para la recolección de muestras de suelo pueden seguirse los pasos enumerados anteriormente para el aislamiento de Hongos formadores de micorrizas.

Algunas especies de *Trichoderma* son ampliamente utilizadas como agentes de control biológico (por ejemplo *T. harzianum*, *T. virens*, *T. viride*, *T. asperellum*, *T. koningii*) en la agricultura contra varios hongos fitopatógenos y nematodos, otras para la producción de enzimas (celulasas, glucanasas, pectinasas, quitinasas).

Aislamiento de *Trichoderma*

Una vez colectadas las muestras de suelo, procesarlas de la siguiente manera:

- Homogeneizar el suelo y separar una submuestra de 10 g,
- Colocar la submuestras en 90 mL de agua destilada estéril
- Agitar durante 20 a 30 min
- Colectar una alícuota de 1 mL y diluirla en un tubo de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril.
- Repetir el procedimiento de dilución al menos 5 veces consecutivas (para detalles procedimientos de dilución ver Figura 5, Sección II).
- Colectar una alícuota de 1 mL de las últimas tres diluciones y depositarla en medio de cultivo selectivo para *Trichoderma* spp.
- Incubar a temperatura de laboratorio (aproximadamente 1 semana) hasta que se observe el desarrollo de colonias fúngicas de color verdoso.

- Transferir (axénicamente) las colonias presentes a medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA), hasta su esporulación, aproximadamente 5-8 días a 22 ± 4 °C.

☞ Otro medio de cultivo utilizado consiste en colocar en cajas de Petri, 1 mL de la suspensión con 1 mL de la solución fungicida con PCNB (Pentacloronitrobenzeno). Posteriormente, se agrega medio de cultivo (TSM) fundido y enfriado a 50 °C. Las cajas se incuban en estufas a 26 °C, durante 5 días.

Composición del medio TSM

- Nitrato de Amonio (NO_3NH_4) 1,00 g
- Fosfato ácido de potasio (K_2HPO_4) 0,90 g
- Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,20 g
- Cloruro de potasio (KCl) 0,15 g
- Cloranfenicol 0,25 g
- Rosa de bengala 0,15 g
- Glucosa 3,00 g
- Agar 20,00 g
- Agua destilada 1,00 L

Solución fungicida

- Agregar 0,2 g de PCNB en 1 L de agua destilada estéril. No se esteriliza ya que éste es un fungicida termolábil.

☞ Para otras prácticas de manejo del hongo, como multiplicación de conidios, se utiliza el Agar Papa Glucosado (APG) al 2% con cloranfenicol 500 mg/L.

☞ El PCNB (Pentacloronitrobenzeno) puede causar irritación si toma contacto con ojos u otras partes del cuerpo. Presenta riesgo para el ambiente y animales acuáticos y terrestres. (<http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/501a600/nspn0531.pdf>).

Obtención de cultivos monospóricos de *Trichoderma*

Para caracterizar morfológicamente los aislamientos de *Trichoderma* spp., se deben obtener cultivos puros generados a partir de una sola espora. La técnica empleada consiste en:

- Tomar un disco de micelio de diámetro uniforme, proveniente de cada aislamiento desarrollado en APG,
- Transferir el micelio a 10 mL de agua destilada estéril
- Agitar en vortex hasta lograr una suspensión homogénea.
- Realizar diluciones en agua destilada estéril hasta obtener una concentración de 1×10^5 de conidios/mL de la cepa.
- Realizar el recuento de esporas con la cámara de Neubauer (ver indicación de su utilización en Figura 4, Sección II).
- Sembrar 200 μ L de la suspensión de conidios obtenida, sobre medio sólido agar-agua previamente preparado.
- Observar la germinación de conidios bajo lupa al término de 24 h.
- Colectar separadamente trozos de medio cultivo de los conidios germinados (cada uno conteniendo el conidio germinado) utilizando una aguja esterilizada sobre llama directa.
- Colocar el trozo de medio con los conidios en cajas de Petri individuales con medio de cultivo APG al 2%.

Técnicas de conservación de las cepas de *Trichoderma*

Para evitar el envejecimiento de las cepas y asegurar la estabilidad de las propiedades morfológicas y fisiológicas es necesario preservarlas adecuadamente y retardar los cambios degenerativos que ocurren en las células.

Entre las diversas técnicas pueden utilizarse las siguientes: 1) en vaselina líquida, 2) en agua destilada estéril 3) en glicerol, 4) en sílica gel y 5) en papel de filtro estéril.

☞ Para las técnicas 1 a 3 se utilizan frascos de vidrio (de 7 cm de alto por 2 cm de diámetro y 10 mL de capacidad), conteniendo agua o vaselina o glicerol en un volumen de 5 mL, estériles y con tapa a rosca.

- Transferir bloques de 1 cm de medio APG con el hongo esporulado que se quiere conservar, a los mencionados envases (López Lastra et al. 2002).
- Mantener en la heladera a 4 °C.

☞ Para la técnica con sílica gel:

- Triturar el material en un mortero hasta obtener un grado de molienda similar a la sal fina.
- Envasar en frascos de vidrio de 10 mL con tapa plástica
- Esterilizar en horno seco a 160 °C, durante 6 hs (López Lastra et al. 2002).

☞ Para preparar la suspensión de conidios de *Trichoderma*:

- Verter agua destilada estéril sobre el cultivo, raspando la superficie con una varilla de vidrio.
- Filtrar la suspensión resultante
- Sembrar 300 µL en el granulado de sílica gel.
- Agitar para lograr una buena distribución de la suspensión en las partículas mencionadas.
- Mantener los frascos sembrados a -20°C.

☞ Para la técnica de papel de filtro:

- Colocar tiras estériles de papel de filtro, dentro de placas de petri con APG donde se encuentra creciendo el hongo.
- Incubar en estufa durante 7 días.
- Una vez que el hongo colonizó el papel de filtro, retirar y secar a temperatura ambiente durante 7 días.
- Conservar las tiras dentro de sobres de papel, protegidas con papel de aluminio a -20°C (Stocco et al. 2014).

Multiplicación y producción de esporas del género *Trichoderma*

Entre los sustratos naturales para la producción de inóculo a partir de *Trichoderma* se encuentran granos de trigo, avena cebada, centeno, arroz, maíz, soja y salvado de trigo. La fermentación en estado sólido no requiere de procedimientos sofisticados de formulación. Los granos o cualquier otro tipo de material sobre el que se desarrolle el hongo pueden ser molidos, secados o aplicados directamente. Una vez seleccionado el sustrato se estima el grado óptimo de humedad.

Cultivo en frascos

La mayor ventaja de este método es el mejor control de la contaminación y de la calidad de los sustratos dado que durante el proceso del autoclavado los granos en los que se multiplicarán los hongos *Trichoderma* no sufren de la gran compactación que ocurre en las bolsas.

Cultivo en bolsas

El cultivo en bolsas tiene varias ventajas:

- Menor ocupación de espacio que el cultivo en frascos para el proceso de autoclavado, e incubación durante el proceso de producción.
- Mayor volumen de producción en un solo lote.
- Posibilidad de remoción del contenido de la bolsa con frecuencia.

- El proceso productivo es más económico que el cultivo en frascos
- La manipulación es más sencilla que el cultivo en frascos.

Proceso de esterilización

Se utiliza calor húmedo en autoclave y es una de las etapas cruciales en la producción masiva. En este proceso se incorporan los sustratos en los envases seleccionados. Para frascos, la humedad debe ser de aproximadamente un 25%. Tanto las bolsas como las botellas deben ser resistentes al proceso de autoclavado. El proceso de esterilización se realiza a una presión de 2 atmósferas, por 45 min a 121 °C.

Inoculación e incubación

El lugar de la inoculación debe estar acondicionado para tal fin y estar totalmente aislado del resto de la instalación lo recomendado es realizar la inoculación en un flujo laminar. Para la inoculación se prepara una suspensión de inóculo a una concentración de 10^8 - 10^{10} conidios/mL. De esta suspensión pueden emplearse 10 ml para inocular cada uno de los frascos o 10 mL cada 100 g de sustrato. Los frascos o bolsas inoculados se incuban a una temperatura de 27 °C por 15 días.

Las bolsas o frascos con el inóculo multiplicado se trasladan para realizar la cosecha, según la formulación seleccionada se realiza el procedimiento de envasado o se seca para la posterior separación de las esporas.

Cosecha y formulación de inóculos de *Trichoderma*

Es la etapa de formulación donde se prepara una combinación de ingredientes de forma que el principio activo se mantenga estable, efectivo y fácil de aplicar. Aquí se mencionan los métodos de separación de propágulos para realizar las formulaciones que varían considerablemente de producto a producto donde los procedimientos que se llevan a cabo

dependerán del uso al que vayan dirigidos estos. Así los propágulos separados pueden mezclarse con aceites vegetales, minerales, kerosene, agua, con aditivos como protectores UV, materiales como arcillas que den volumen y sirvan para hacer un producto más manipulable. En el caso de los conidios, si el uso aconsejado es para plagas del suelo, estos se pueden dejar sobre el sustrato que se obtuvieron y la aplicación hacerse directamente.

En muchos casos, posterior a la cosecha y antes de ser formulados los propágulos, se realiza un proceso de extracción y concentración a partir del sustrato. En este paso es decisivo lograr una humedad del biopreparado menor de 15% y poca particulación del sustrato. Si se necesitan conidios para aplicación a volúmenes ultrabajos se requiere de un fino polvo con partículas uniformes por lo que la extracción debe ser eficiente y selectiva para los conidios. Esto clásicamente se ha logrado con tamices que permitan seleccionar a través de un tamaño de poro crítico la mayor parte de los conidios y separarlos del resto del sustrato. Sin embargo, esto es engorroso, consume mucho tiempo, genera gran cantidad de aerosoles y no garantiza uniformidad en las partículas obtenidas. Aun así esta forma puede ser factible en sistemas de producción de muy bajo costo para almacenar esporas y/o formularlas.

Las mayores ventajas de este modo de formulación es que el período de almacenamiento puede ser superior a los 6 meses sin perder viabilidad de los conidios debido a la humedad. Por otra parte los conidios del hongo al ser aplicados junto al sustrato con el que creció, asegura la disponibilidad de nutrientes manteniendo así la viabilidad de los conidios. Se encuentran portadores inertes que pueden ser utilizados en éstas formulaciones como montmorillonita, caolinita, diatomita y polvos orgánicos.

Control de calidad de la formulación

Para las formulaciones producidas con organismos que serán utilizados como agentes de control biológico y particularmente para las basadas en hongos, se requiere de un

control adecuado de las propiedades biológicas de la formulación. Esto asegurará que el producto sea de máxima eficacia.

Las pruebas más recomendadas para la evaluación son:

- La determinación del grado de antagonismo
- La determinación de la concentración de conidios y la comprobación de su viabilidad
- La pureza de la formulación
- La exposición a la luz solar

Bibliografía

- Barreto de Novais, C., 2007. Coleção de Fungos Micorrízicos Arbusculares.
<http://www.dcs.ufla.br/micorriza/index.html>
- Bécard, G., Fortin, J.A., 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist* 108, 211-218.
- BEG, The International Bank for the Glomeromycota.
<http://www.i-beg.eu/>
- Brundrett, M., 2008. Mycorrhizal associations: The Web Resource. <http://mycorrhizas.info/vam.html#S3>
- Chabau, M., Harrison, M., de Carvalho-Niebel, F., Bécard, G., Barker, D.G., 2006. Inoculation and Growth with Mycorrhizal Fungi *Medicago truncatula* handbook. https://www.noble.org/Global/medicagohandbook/pdf/InoculationGrowth_MycorrhizalFungi.pdf
- Covacevich, F., Castellari, C., Echeverría, H.E., 2014. Métodos físicos y químicos para la eliminación de hongos formadores de micorrizas nativos de muestras de suelo. *Revista Argentina de Microbiología* 46, 1-6.
- Elad, Y. Chet, I., Boyle P., Henis Y., 1993. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology* 73, 85-68.
- Fortin, J.A., Bécard, G., Declerck, S., Dalpé, Y., St-Arnaud, M., Piché, Y., 2002. In Vitro Arbuscular Mycorrhizae on Root Organ Cultures. *Canadian Journal of Botany* 80, 1-20.
- Habte, M, Osorio, N.W. 2001. Arbuscular Mycorrhizas: Producing and Applying Arbuscular Mycorrhizal Inoculum. Disponible en http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/amf_manual.pdf
- Hildebrandt, U, Janetta, K, Bothe, H, 2002. Towards Growth of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Independent of a Plant

- Host. Applied and Environmental Microbiology 68, 1919–1924
- López Lastra, C.C., Hajek, A.E., Humber, R.A., 2002. Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. Canadian Journal of Botany 80, 1126-1130.
- Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas. http://www.minagri.gob.ar/site/desarrollo_rural/forobioinsumos/publicaciones/bioplaguicidas_cuba.pdf.
- Manual de Producción y utilización de cepas de *Trichoderma* spp. 2004. Centro de educación y tecnología Fundación para la innovación Agraria. Chile 25 p. http://educacion.ucv.cl/prontus_formacion/site/artic/20070710/asocfile/ASOCFILE120070710123449.PDF
- Morton, J. INVAM <http://invam.wvu.edu/>
- Mycobank. <http://www.mycobank.org/>
- Mycorrhizae Manual. Procedures INRA. http://www2.dijon.inra.fr/mychintec/Protocole/Workshop_Procedures.html
- Stocco, M. 2014. Control biológico de *Mycosphaerella* graminicola con cepas de *Trichoderma harzianum* caracterizadas por su respuesta morfológica, fisiológica, perfiles moleculares y enzimas relacionadas. Tesis Doctoral 181p.

Sección II

Procesamiento, cuantificación y recuento de Hongos formadores de Micorrizas Arbusculares (HMA) y Trichoderma

Tinción de raíces para la observación de Hongos Micorrízico Arbusculares

Métodos destructivos

Tinciones no vitales

Las tinciones no vitales son los métodos más frecuentemente utilizados para visualizar raíces micorrizadas. Las estructuras producidas por los HMA así como ciertos contenidos celulares de las raíces de las plantas hospedadoras son generalmente bien teñidas con pigmentos colorantes naturales. En general, se requiere un paso previo de clarificación la cual utiliza agentes químicos para remover tanto los contenidos celulares como las paredes celulares. ✎ Si bien estas tinciones permiten observación de la mayoría de los taxa que forman micorrizas, algunas especies de *Acaulospora* y *Paraglomus* no son eficientemente teñidas por estas técnicas, por lo que técnicas moleculares deberían ser utilizadas.

✎ Las tinciones mencionadas previamente se denominan no vitales, dado que no discriminan entre tejido fúngico en activo funcionamiento del que se encuentra muerto o en dormición.

Diferentes protocolos son utilizados para la tinción de raíces. A continuación se detallan los más utilizados. Otras metodologías están descriptas en Vierheilig et al. (2005) y en otras bibliografías específicas.

Tinción con azul tripán

El método de tinción destructivo no vital más utilizado es el propuesto por Phillips y Hayman (1970). Sin embargo, dicha metodología utilizaba fenol en la solución de tinción. Actualmente se utiliza una modificación de la metodología Phillips y Hayman (1970) en la que se ha omitido la utilización de fenol en los reactivos.

Protocolo de tinción

- Lavar las raíces con abundante agua a efectos de eliminar todas las partículas de suelo. Se recomienda utilizar un colador o tamiz a efectos de evitar pérdidas de material radical
- Colocar las raíces en un recipiente con tapa, resistente a la temperatura en el cual las raíces se distribuyan en las soluciones sin estar comprimidas
- Colocar KOH 10% (de modo tal que las raíces estén totalmente cubiertas) durante 30 min, 60 °C (o toda la noche a temperatura ambiente). Puede utilizarse baño María o estufa.
- Retirar las raíces del KOH y lavar con abundante agua cuidando de no perder el material radical
- Acidificar las raíces con (HCl 0,1 N), opcional
- Colocar las raíces nuevamente en el recipiente y agregarles solución de azul tripán (0,05%) en lactoglicerol (ácido láctico, glicerol, agua destilada 1:1:1) (de modo tal que las raíces estén totalmente cubiertas) durante 15 min a 90 °C).
- Las raíces teñidas pueden ser conservadas en la solución de tinción. Otra alternativa es retirar la solución de tinción y agregarles agua destilada (quedará entonces una solución de tinción diluida).

Preparación de las soluciones

- **KOH 10%**= Pesar 100 g de KOH en escamas o perlas y adicionarlos en un frasco de vidrio con 800 mL de agua destilada. Luego de la completa disolución del soluto, completar con agua destilada hasta alcanzar 1 L. Tener

cuidado que la reacción es exotérmica, por lo tanto, la solución aumentará su temperatura.

- **HCl 0,1 N:** colocar 8,3 mL de solución concentrada de HCl (37% en 800 mL de agua destilada, homogeneizar la solución, completar con agua destilada hasta alcanzar 1 L. Para el pipeteado de HCl incorporar una perilla de Pipeteado de seguridad en la pipeta de vidrio (no pipetear con la boca)
- **Azul tripán en lactoglicerol:** preparar una solución de lactoglicerol conformada por ácido láctico, glicerol, agua destilada (1:1:1 V:V:V); homogeneizar la solución. Colocar azul tripán en proporción 0,05 g/100 mL solución. Se recomienda preparar esta solución con anterioridad a la tinción ya que las partículas de azul tripán pueden demorar en disolverse. Puede requerirse mezclado de la solución para una mejor disolución.

☞ Raíces finas y de plántulas de pocos días de emergencia requerirán menos tiempo de clarificación (3-5 minutos).

Raíces viejas y suberizadas de plantas adultas requerirán más tiempo de clarificación.

☞ Si luego de la clarificación con KOH las raíces aún permanecen pigmentadas, es probable que se requiera adicionalmente una clarificación con H₂O₂ al 10% o 20% dependiendo del grado de suberización de las raíces, de aproximadamente 5 minutos. Puede utilizarse también NaOCl de uso doméstico, diluido al 50% o diferentes concentraciones dependiendo de la pigmentación de las raíces. Este procedimiento se realiza luego de la clarificación con KOH y antes de la tinción. Antes y después de la utilización de H₂O₂ o NaOCl las raíces deben ser enjuagadas con agua. La decoloración con H₂O₂ es más lenta que con NaOCl, pero con H₂O₂ hay menos riesgo de destrucción total de los tejidos fúngicos y vegetales.

🕒 Tiempo aproximado de duración del proceso de tinción: 1 hora

👉 Las raíces limpias (lavadas) pueden ser conservadas sumergidas en alcohol 70% (con agua destilada) hasta su uso si no serán procesadas para tinción de manera inmediata luego de la colecta.

👉 La solución de tinción puede ser recuperada (filtrando la solución con un colador cuando son retiradas las raíces) y utilizada hasta 3 veces (una vez original, dos veces recuperadas).

☠ El hidróxido de potasio no está reportado como cancerígeno pero es altamente corrosivo para el ambiente así como para el cuerpo humano (<http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTécnicas/FISQ/Ficheros/301a400/nspn0357.pdf>). Para la preparación de la solución debe tenerse especial cuidado en no verter agua sobre esta sustancia, sino incorporarla lentamente al agua cuando se deba disolver.

☠ El azul de tripán esta reportado como posible carcinógeno (<http://iio.ens.uabc.mx/hojas-seguridad/Azul%20de%20tripan.pdf>) por lo que debe manipularse con los adecuados elementos de seguridad en laboratorio. Otras alternativas para la tinción pueden ser el chlorazol black E o la fucsina ácida, sin embargo, estos también son reportados como posibles carcinógenos.

☠ El glicerol no está reportado como posible carcinógeno, aunque tiene riesgo de inflamabilidad. (<http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTécnicas/FISQ/Ficheros/601a700/nspn0624.pdf>)

☠ El ácido láctico no está reportado como posible carcinógeno, aunque tiene riesgo de inflamabilidad. (<http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTécnicas/FISQ/Ficheros/501a600/nspn0501.pdf>)

✋ Finalizado su uso, la solución de tinción y de clarificación deben ser descartadas en contenedores adecuados para un adecuado tratamiento químico del producto.

Tinción con fucsina ácida

La fucsina ácida es un colorante comúnmente utilizado para teñir tejido fúngico, aunque también tiñe proteínas, colágenos y mitocondrias.

Protocolo de tinción

- Lavar las raíces como fue indicado anteriormente
- Colocar las raíces en recipientes y clarificarlas como fue indicado anteriormente
- Enjuagar las raíces
- Colocar las raíces en solución de fucsina ácida (0,01% w/v) en lactoglicerol (ácido láctico-glicerol-agua en proporciones 14:1:1 (Kormanik y McGraw 1982) o 1:1:1: (Dickson et al. 2003).
- Lavar las raíces con agua destilada
- Las raíces pueden ser montadas directamente en portaobjetos o almacenadas en glicerol 100%

🕒 Tiempo aproximado de duración del proceso de tinción: 12–24 h a temperatura ambiente.

☠ La fucsina acida no está reportada como posible portador de riesgo para la salud humana y el ambiente (<http://www.analytyka.com.mx/spanish/FDS/F/251331.htm>)

Tinción con ácido acético y tinta

Otras metodologías de tinción es la reportada por Vierheilig et al. (1998) en la que utiliza ácido acético y tinta (de lapicera o tinta china).

Protocolo de tinción

- Lavar y clarificar las raíces con KOH como indicado en protocolo anterior
- Acidificar las raíces en ácido acético 5% o vinagre de uso doméstico (de alcohol, al 5% de ácido acético)
- Teñir las raíces con solución de tinta (del tipo utilizadas en las lapiceras con cartuchos, pudiendo ser negra, azul, roja; otra opción es tinta china) al 10% en una solución de ácido acético al 25%, aproximadamente 5 minutos.
- Otro protocolo-proporción de tinción (Chabaud et al. 2006): tinta (como indicada anteriormente) al 5% diluida en vinagre de alcohol 8%, a 95°C durante 3 minutos.
- Lavar el exceso de tinción en agua con unas gotas de ácido acético o con vinagre doméstico puro, aproximadamente 20 minutos

👉 Dependiendo de la combinación de marcas de vinagre doméstico y tinta china, en ocasiones la tinta china puede ser aglomerada y no es posible la disolución en el vinagre

👉 Las estructuras de HMA se habrán teñido de coloración acorde al color de la tinta utilizado

🕒 Tiempo aproximado de duración del proceso de tinción: 50 min a temperatura ambiente.

☠ Los reactivos utilizados en este protocolo presentan baja o nula peligrosidad para la salud humana y el ambiente

Tinciones vitales

Tinción de la Succinato deshidrogenasa

Con este método, todas las estructuras de HMA metabólicamente activas como hifas, esporas, vesículas y arbusculos son teñidas. La Succinato deshidrogenasa (SDH) es una enzima ácida tricarbóxilica en HMA que reacciona con cloruro de nitroazul de tetrazolio (NBT) dando como resultado un *formazan* insoluble que puede ser fácilmente distinguido en las raíces.

Protocolo de tinción

- Lavar las raíces con abundante agua como fue indicado anteriormente
- Puede requerirse o no clarificación de las raíces. En caso de que se realice la clarificación, diferentes variantes de protocolos pueden utilizarse:
 - i.- Las raíces pueden ser sumergidas durante 15 minutos en solución acuosa hidrato de cloral (75%; w/v) de acuerdo a Mac Donald y Lewis (1978). Sin embargo, las raíces podrían permanecer opacas luego de esta clarificación.
 - ii.- Clarificar con KOH como indicado previamente. Sin embargo las raíces pueden volverse oscuras en la tinción lo que puede dificultar su observación (Vierheilig et al. 2005).
 - iii.- Puede realizarse entonces una combinación de técnicas de clarificación indicadas en i y ii, sumergiendo las raíces en solución de hidrato de cloral (75%; w/v) durante 15 minutos, lavadas con agua destilada y mantenidas con KOH 5% toda la noche a 55 °C, luego realizar tres lavados.
 - iv.- Otra opción de clarificación es colocar las raíces durante 2 hs a temperatura ambiente en la siguiente solución: 20 mL 0,05 M Tris/ácido cítrico pH 9,2; 50 mg/mL sorbitol; 15 unidades/mL celulasa (de *Aspergillus niger*); 15 unidades/mL pectinasa (de *Aspergillus niger*).
- Incubar raíces en una solución NBT-succinato (MacDonald y Lewis 1978) a temperatura ambiente toda la noche.

Preparación de solución NBT*-succinato (VF 20 mL):

Químico	Concentración	Volumen (mL)
Tris/HCl (pH 7,4)	0,2 mol/L	5
MgCl ₂	5 mmol/L	2
NBT	4 mg/mL	5
H ₂ O destilada		6
Na-succinato	2,5 mol/L	2

*NBT: el cloruro de nitroazul de tetrazolio, debe ser preparado el mismo día de uso.

Puede adicionarse cianuro de potasio (KCN) a la solución de tinción, sin embargo, se ha reportado (Smith y Gianinazzi Pearson 1990) que su omisión brinda similares resultados.

- Lavar las raíces con agua destilada como fue indicado anteriormente
- Colocar las raíces en recipientes adecuados con solución de NaOCl (3% y 1% Cl activo) durante 5 minutos
- Lavar con agua destilada
- Montar las raíces en portaobjetos, cubrir con cubreobjetos y observar al microscopio

 Tiempo aproximado de duración del proceso de tinción: 24 hs

 El cloruro de nitroazul de tetrazolio no está reportado como carcinógeno, aunque su contacto puede ocasionar irritación en la piel y mucosas

https://es.vwr.com/app/asset?type=hi_res&id=7667566&name=sds_BDHA43859&filename=sds_BDHA43859.pdf

☠ El hidrato de cloral es un reactivo que presenta riesgo para la salud humana (<http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTécnicas/FISQ/Ficheros/201a300/nspn0234.pdf>)

☠ El cianuro de potasio es un reactivo que presenta alto riesgo para la salud humana y ambiental (<http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTécnicas/FISQ/Ficheros/601a700/nspn0671.pdf>)

Tinción con Diaminobenzidina

Algunas estructuras de HMA pueden visualizarse con esta tinción, sin embargo, arbúsculos muy ramificados y colapsados como también algunas vesículas pueden no ser visualizados. La técnica de diaminobenzidina (DAB) detecta la presencia de H_2O_2 , su inducción es un mecanismo de defensa de las plantas contra microorganismos.

Preparación de buffer DAB

- 1 mg/mL DAB en 10 mM Mes-NaOH (pH 5,6) disuelto en solución de 0,5 mM fosfato inorgánico de K y 2 mM KNO_3

Protocolo

- Lavar las raíces como fue indicado anteriormente
- Colocar las raíces en recipientes adecuados e incubarlas en buffer DAB (12 h 22 °C)
- Colocar las raíces en Alcohol etílico (95%v/v) durante 5 minutos
- Colocar las raíces en ácido láctico (40%v/v), de esta manera están listas para su observación microscópica

🕒 Tiempo aproximado de duración del proceso de tinción: 13 hs

☠ La diaminobenzidina está reportada como carcinógena e inflamable

(<http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTécnicas/FISQ/Ficheros/1605a1678/1666.pdf>)

Tinción de la Fosfatasa alcalina

Mediante esta metodología, sitios con actividad fosfatasa alcalina localizados en hifas y arbuscúlos de HMA son teñidos de manera fluorescente (Van Aarle et al. 2001) o no fluorescente (Tisserant et al. 1993). La actividad fosfatasa alcalina está localizada principalmente en compartimentos vacuolares de arbuscúlos e hifas intraradicales. Para la tinción con fluorescencia las raíces deben ser rápidamente colocadas en el medio de reacción. Kit de reacción están disponibles para esta metodología de tinción (del tipo 'ELF-97 Endogenous Phosphatase Detection Kit'; Eugene, OR).

La solución de tinción es una enzima marcada con fluorescencia (Solución A) la cual es diluida en un buffer de detección que puede ser ácido o alcalino (Solución B).

Protocolo para observación con fluorescencia

- Lavar las raíces como fue indicado anteriormente, las que deben ser procesadas inmediatamente luego de la colecta
- Teñir las raíces durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad en solución diluida 1:20 de sustrato fosfatasa fluorogénica (Solución A, enzima marcada con sustrato fluorescente ELF; Molecular Probes, Leiden, the Netherlands): solución buffer (Solución B). El sustrato puede ser buffereado bien con buffer citrato 0,1 M pH 4,4 o bien con Tris 1,5 M; o con buffer de detección alcalino (del tipo ELF-97 Endogenous Phosphatase Detection Kit; Molecular Probes).
- Lavar las raíces en solución Tris buffer (30 mM Tris; 1,5 M NaCl y 0,05% Triton X-100, pH 8,0).
- Colocar las raíces en medio de montaje (del tipo ELF kit pH 8).

- Observar las raíces en microscopio de espifluorescencia con 340–380 nm (luz UV) y 425-nm-long filtro de emisión.

Preparación de la solución de tinción Fast Blue RR

Químico	Concentración	Volumen (mL)
Tris/acido cítrico (pH 9,2)	0,05 mol/L	18 mL
Fosfato ácido naftílico	1 mg/mL	20 mg
Fast Blue RR salt	1 mg/mL	20 mg
MgCl ₂	0,5 mg/mL	1 mL
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,8 mg/mL	1 mL

Protocolo para observación sin fluorescencia

- Colocar las raíces en una solución fría de sorbitol (50 mg/mL) durante una hora, de manera tal que la totalidad de las raíces estén cubiertas por la misma (50 mL)
- Colocar las raíces en la solución de tinción Fast Blue RR durante 3 hs
- Lavar las raíces con agua destilada
- Colocar las raíces en solución de NaOCl (3% y 1% Cl activo) durante 5 minutos
- Lavar con agua destilada
- Montar las raíces en portaobjetos, cubrir con cubreobjetos y observar al microscopio

Métodos para observación de HMA no destructivos

La visualización de estructuras de HMA en raíces vivas mediante métodos no destructivos es posible solo en ciertas condiciones. Los métodos no destructivos no incluyen tinción debido a que en general siempre el paso previo es la clarificación, procedimiento que mata las células. Las raíces se observan o bien con luz visible, o microscopia de epifluorescencia o de escaneo láser confocal. En la mayoría de los casos las estructuras de HMA en las raíces son de difícil observación por estas metodologías y solo pueden visualizarse en raíces transparentes de pocas capas celulares sobre el cilindro central (particularmente raíces muy jóvenes).

Tinción con Rojo Neutro

En caso de proceder a tinción el colorante Rojo Neutro puede ser utilizado colorante para visualizar arbusculos maduros en raíces vivas (Guttenberger 2000). La tinción de los arbusculos maduros se basa en el mecanismo de atrapamiento iónico, el que revela los compartimentos ácidos en el espacio peri-arbuscular. Además de los arbusculos maduros, las vacuolas y la zona cortical de los ápices radicales, así como hifas fúngicas y apresorios pueden también ser distinguidos.

El tiempo requerido para la tinción depende de la penetración completa de colorante en la raíz y varía con el diámetro de la misma (en general el tiempo varía entre 1 y 6 hs). Los arbusculos de plantas estresadas (por sombreo, sequía, etc) son de difícil visualización por esta metodología.

Microscopia de Epifluorescencia en raíces vivas

En las últimas décadas del siglo pasado se determinó autofluorescencia en raíces micorrizadas (Ames et al. 1982). Sin embargo, diferentes opiniones se han mantenido respecto sobre el origen de la autofluorescencia en raíces micorrizadas: i) que es originada por arbusculos metabólicamente activos; ii) que está

presente solo en arbusculos colapsados y no metabólicamente activos (Vierheilig et al. 2001); iii) que otras estructuras propias de la raíz, y no los arbusculos, exhiben fluorescencia. Esto ha incidido en que esta metodología no sea una práctica de rutina.

Dreyer et al. (2006) intentaron dilucidar estas controversias evaluando autofluorescencia de arbusculos y estructuras radicales en raíces de palma.

✎ Estos autores han puntualizado algunas consideraciones para la determinación de la autofluorescencia en raíces micorrizadas:

- La autofluorescencia no es visible en raíces intactas debido al grosor y lignificación de las paredes celulares
- Evaluar la autofluorescencia en cortes longitudinales y transversales de raíces
- Para comparar con la autofluorescencia de arbusculos no metabólicamente activos realizar, en una submuestras, incubación de los cortes de raíz en etanol 70%, 48 hs
- Montar las secciones de raíces en portaobjetos sobre agua destilada (pH 7), cubrir con cubreobjetos
- Observar los cortes de raíz en microscopia de fluorescencia
- Puede realizarse incubación de algunos cortes previa incubación con $\text{NH}_4(\text{OH})$, 0,1 M, pH 10; evidenciando modificación de las propiedades fluorescentes de ácidos y flavonoides

Los resultados obtenidos por Dreyer et al. (2006) indicarían que: i) hifas, arbusculos y vesículas en activo crecimiento evidencian autofluorescencia; ii) el origen de la autofluorescencia radica en el material fúngico o en moléculas de la raíz en íntimo contacto con la pared del HMA; iii) la fuente de la autofluorescencia estaría localizada en la pared del HMA, tanto de hifas como de esporas; iv) en los arbusculos es donde se evidencia la más intensa emisión de la autofluorescencia, lo que interfiere en la exacta localización de su origen; v) la digestión con KOH remueve la autofluorescencia de los arbusculos.

Técnicas de cuantificación de la colonización micorrícica en raíces

Varios métodos son utilizados para estimar la proporción de raíces colonizadas por HMA.

Método de las cuadrículas de Giovanetti y Mosse

Este método es uno de los más utilizados y tiene la ventaja de proporcionar una estimación tanto de la proporción de las raíces colonizadas como del largo total de raíz.

Protocolo de método de la Cuadrícula de Giovanetti y Mosse (1980) (Figura 1)

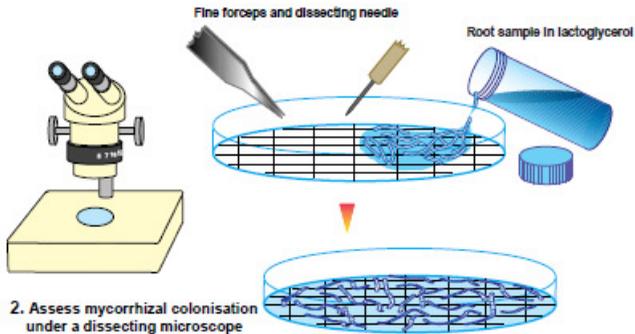
- Cortar las raíces previamente teñidas en segmentos de 1 cm. Distribuir al azar las raíces clarificadas y teñidas en una cuadrícula (puede ser una placa de Petri, una placa de acrílico, etc.) de 1 cm de lado/cuadro, o de una longitud conocida.
- Observar al microscopio toda la cuadrícula a través de sus líneas horizontales y verticales. Registrar en cada intersección línea-raíz la presencia/ausencia de estructuras de HMA.
- Calcular la frecuencia de colonización (F)

$$F = \frac{\text{n}^\circ \text{ segmentos colonizados}}{\text{n}^\circ \text{ segmentos observados}} \times 100$$

 Al cortar las raíces, previo al montado en portaobjetos o placa, realizar el corte de manera transversa. Tener cuidado de no arrancar las células corticales con el corte. Esto es debido a que los HMA colonizan las células corticales y si en el corte esta sección de la raíz es arrancada, no podrá realizar la observación. Puede utilizar hojas de bisturí, pinzas, tijeras de punta fina.

THE GRIDLINE INTERSECTION METHOD

1. Randomly disperse cleared and stained roots in dish with grid lines



3. Follow all **horizontal** and **vertical** lines. Count intersects with roots and mycorrhizas separately

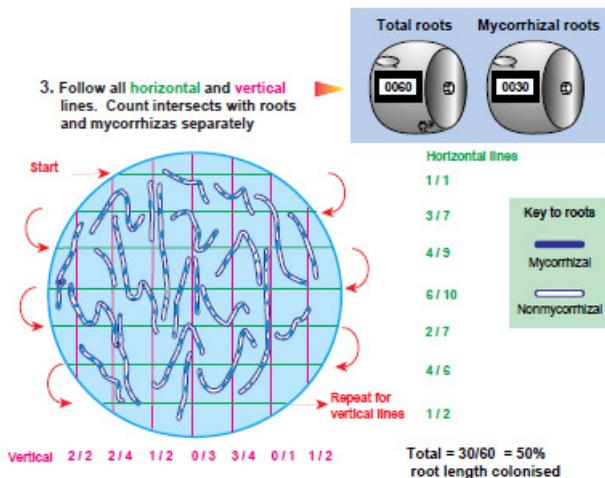


Figura 1. Esquema de cuantificación de colonización micorrícica por la metodología de la cuadrícula (Imagen extraída de <http://mycorrhizas.info/resource.html#methods>)

👉 La metodología original propone la observación bajo lupa binocular. Sin embargo, la difícil observación de arbusculos (estructuras clave de los HMA) bajo lupa hace cuestionable este método. Una variante es la observación bajo microscopio estereoscópico propuesta por Mc Gonigle (1990) el que además indica que deben ser registrados separadamente hifas, arbusculos y vesículas. Para ello, el operador deberá contar con una placa cuadrículada que sea adaptable a su microscopio por lo que deberá colocar cubreobjetos sobre las raíces distribuidas en la placa.

👉 Una desventaja de esta metodología es que consume mucho tiempo tanto para la preparación del material como para la observación, dado que deben ser observadas más de 100 intersecciones línea-raíz para que la metodología sea confiable.

👉 Otra desventaja de esta metodología es que sólo cuantifica la presencia-ausencia de colonización en un punto y no su intensidad. Otras metodologías han sido desarrolladas para cuantificar intensidad de micorrización.

👉 Una ventaja de esta metodología es que permite calcular el largo de raíz total y colonizado (R) de acuerdo a la relación establecida por Tennant (1975)

Para ello se utiliza la siguiente relación:

$$R = N/FC$$

Donde R: largo de raíz (cm)

N: es el número de intersecciones entre líneas-raíces (para el cálculo de raíces colonizadas N será solo el número de intersecciones en las que las raíces estén colonizadas)

FC: factor de conversión, el que será de 0,3928; 0,7857; 1,5714; y 2,35714 para cuadrículas de ½, 1, 2 y 3 cm

👉 Estos cálculos pueden ser de mucha utilidad en los casos en que sea colectado todo el volumen de raíces y que además el desarrollo radical sea uno de los objetivos de estudio.

Una modificación del método de la cuadrícula, a efectos de minimizar los riesgos de subestimación por la observación en lupa binocular ha sido propuesto por McGonigle et al. 1990.

Método de cuantificación de la colonización micorrícica de McGonigle et al.

El método propuesto por McGonigle et al., (1990) es una modificación del descrito por Phillips y Hayman (1970). Para ello, las raíces son montadas en un portaobjetos, el que es cubierto con cubreobjetos y observado en microscopio a (20-40 X como mínimo) y se recorren campos a través de líneas imaginarias (o que pueden ser marcadas en el portaobjetos) en campos consecutivos a lo largo de un segmento de raíz. En la Figura 2 se muestran gráficamente los campos mencionados.

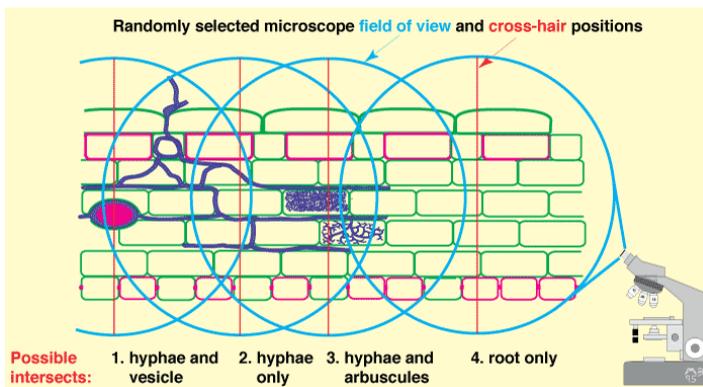


Figura 2. Descripción de secuencia de observación de raíces para la cuantificación de la colonización micorrícica (imagen tomada de <http://mycorrhizas.info/method.html#am1>)

Cada intersección entre la línea imaginaria-raíz es cuantificada y luego se calcula la frecuencia (F) de cada una de las estructuras registradas como se indicó anteriormente. Este método es más preciso que el de Giovanetti y Mosse aunque no distingue niveles de colonización ni tampoco morfotipos.

Estimación de la colonización micorrícica de acuerdo a Trouvelot et al.

La metodología propuesta por Trouvelot et al., (1986), permite además de la estimación de la frecuencia (F), de la estimación del nivel (intensidad) de la colonización micorrícica y de la abundancia de arbusculos.

Procedimiento

- Montar 30 segmentos (de 1 cm de raíces previamente teñidas y cortadas como fue indicado previamente) en un portaobjetos previamente mojado con solución de glicerol:ácido láctico (1:1). También pueden prepararse dos portaobjetos con 15 segmentos cada uno por muestra.
- Observar cada uno de los fragmentos en microscopio óptico (20 x o 40 X por lo menos) clasificando cada segmento de acuerdo a los rangos de clases indicados en la Figura 3

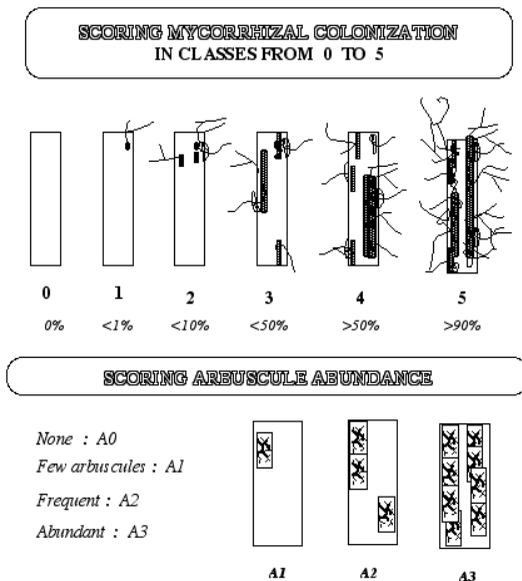


Figura 3. Esquema de clasificación de los segmentos colonizados por HMA de acuerdo a la metodología propuesta por Trouvelot et al. (1986). (Imagen tomada de http://www2.dijon.inra.fr/mychintec/Protocole/Workshop_Procedures.html)

- De esta manera cada segmento tendrá registro de categoría doble. Por ejemplo, un segmento de categoría 3 A₂ hará referencia a un segmento que esta colonizado entre un 10-49% de su longitud, con una intensidad de arbusculos media (es decir se observarán abundantes arbusculos pero no en todas las células corticales del sector micorrizado, sino en aproximadamente el 50% del mismo).
- Con los valores registrados calcular la Frecuencia de colonización (F%); Intensidad de colonización en el sistema radical (M%); Intensidad de colonización en los sectores colonizados (m%); Intensidad de arbusculos en el sistema radical (A%); Intensidad de arbusculos en los

sectores colonizados (a%), de acuerdo a las siguientes relaciones:

- $F\% = (n^\circ \text{ de fragmentos micorrizados} / n^\circ \text{ total}) * 100$
- $M\% = (95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1) / (n^\circ \text{ total})$
donde n_5 = número de fragmentos de la categoría 5; n_4 = número de fragmentos de la categoría 4 etc.
- $m\% = M * (nb \text{ total}) / (nb \text{ myco})$
- $a\% = (100mA_3 + 50mA_2 + 10mA_1) / 100$
donde mA_3 , mA_2 , mA_1 son el m% para las categorías A3, A2, A1, respectivamente, con $mA_3 = ((95n_5A_3 + 70n_4A_3 + 30n_3A_3 + 5n_2A_3 + n_1A_3) / nb \text{ myco}) * 100 / m$, lo mismo para A2 y A1.
- $A\% = a * (M / 100)$

Otra opción es realizar los cálculos de manera *on line*, en el programa 'Mycocalc' disponible en http://www2.dijon.inra.fr/mychintec/Protocole/Workshop_Procedures.html

✎ Si bien esta metodología es bastante precisa y más rápida que las anteriores, se requiere buena destreza en la observación por parte del operador, el que deberá `integrar` la observación a lo largo de cada segmento a efectos de poder asignarle una categoría.

Utilización de morfología de la colonización para identificación taxonómica de HMA

La identificación taxonómica clásica de los HMA utiliza como caracteres taxonómicos estructuras componentes de las esporas de los HMA. Sin embargo, en algunos (pocos) casos, puede lograrse un acercamiento a la identificación taxonómica a nivel género (o en casos solo a nivel familia) de los HMA mediante la morfología de la colonización.

Morfología de la colonización en *Glomus*

Hifas relativamente rectas que se ramifican a lo largo de las células corticales. Es frecuente la ramificación en forma de "H" evidenciando crecimiento simultáneo en 2 direcciones. Arbúsculos en general densos y compactos. Vesículas ovales presentes en general entre las células de la corteza, a veces de paredes engrosadas con varias capas celulares.

Morfología de la colonización en *Scutellospora*

Hifas externas a menudo enrolladas próximas a los puntos de entrada en la raíz. Patrones de colonización similares a *Acaulospora* aunque hifas con paredes más gruesas y oscuras. Hifas más largas y gruesas que en *Glomus*. Arbúsculos tenues debido a hifas largas y curvadas. Patrón de colonización similar a *Gigaspora*. No presentan formación de vesículas.

Morfología de la colonización en *Acaulospora*

Puntos de entrada de las hifas con patrones de ramificación característicos. Las hifas externas generalmente están irregularmente ramificadas o enrolladas, más que lo que ocurre en *Glomus*. Hifas internas de paredes delgadas que a menudo se tiñen débilmente, lo que puede dificultar su visualización. Vesículas presentes con abundantes gotas lipídicas internas. Vesículas de paredes finas, inicialmente rectangulares que luego se vuelven lobuladas de manera irregular debido a su expansión en células adyacentes.

Morfología de la colonización en endófitos finos

Morfologías especiales de colonización han sido identificadas en el HMA *Glomus tenue*, la cual es sustancialmente diferente de otras especies *Glomus*. Hifas muy delgadas (<1 μm de diámetro) que en ocasiones presentan hinchazones (<5 μm) próximos a los puntos de entrada de las

células y que pueden ser análogas a vesículas. Patrón de crecimiento de hifas similar al de las raíces.

Como puede deducirse de la descripción anterior, resulta muy difícil y subjetivo llegar a identificación taxonómica teniendo en cuenta la morfología de la colonización micorrícica. Es por ello que para estudios de taxonomía clásica, se tienen en cuenta caracteres especiales de las esporas, como presencia de hifa de sustentación, presencia de escudo, cantidad y morfología de capas celulares, entre otros (<http://invam.caf.wvu.edu/>).

Sin embargo, la determinación taxonómica de los HMA presenta dificultades operativas, su clasificación siempre está en controversia y sufre modificaciones dado que permanentemente se agregan nuevos taxones a nivel de clases, órdenes y familias (Schüßler y Walker, 2010; Öehl et al. 2011). Esto es debido, en parte porque la producción de esporas y sus características taxonómicas son altamente dependientes de las condiciones fisiológicas de los HMA así como de las condiciones ambientales. Otra limitación de la identificación morfológica es que las esporas colectadas en el campo suelen estar parasitadas o degradadas lo que complica y a veces impide su identificación.

Cuantificación de propágulos micorrícicos en el suelo

Los estudios de campo sobre HMA requieren, en general, estimaciones de la capacidad de los propágulos de HMA de formar simbiosis. Una estimación es aportada por la cuantificación de la colonización micorrícica, que puede ser considerada un estimador de la capacidad micotrófica de los propágulos de HMA. También, pueden realizarse estimaciones a nivel poblacional de los propágulos de HMA. Varias metodologías pueden ser utilizadas como estimadores de los propágulos de HMA en el suelo, tales como: la biomasa del micelio de HMA, recuento de esporas, técnica de potencial de inóculo (PI), recuento de número más probable (NMP) propágulos de HMA, y la técnica de cuantificación de la colonización. En relación al recuento de esporas, hay que

considerar que algunos HMA producen pocas esporas infectivas mientras que otros pueden completar su ciclo de vida sin esporular (Baylis 1969)

Extracción y cuantificación de hifas de HMA

Procedimiento

- Colectar cilindros de suelo (de acuerdo a lo indicado para colecta de muestras de suelo)
- Homogeneizar la muestra y colocar 2 g en un frasco del tipo Beaker de 500 mL
- Suspender el suelo en 250 mL de agua destilada
- Filtrar la suspensión de suelo en un tamiz de 300 μm de malla
- Colectar el material retenido en el tamiz y centrifugar a alta velocidad durante 30 segundos
- Transferir el sobrenadante a un vaso de precipitado, agitar manualmente (puede requerir la ayuda de una varilla de vidrio) y dejar decantar durante 1 minuto
- Pipetear 10 mL (en 2 alícuotas de 5 mL cada una) en un filtro del tipo Millipore (tamaño de poro 1 mm) y filtrar (puede requerir el empleo de vacío para facilitar el filtrado).
- Colocar el filtro en un portaobjetos dejar secar a temperatura ambiente (puede utilizar cámara de flujo laminar para acelerar el secado). Si el filtro es de superficie mayor al campo de observación del portaobjetos, puede recortarlo y colocarlo en tantos portaobjetos como sea necesario.
- Teñir las hifas sobre el filtro en solución de azul tripán en lactoglicerol (0,05 % v/v, protocolo de preparación indicado para tinción de raíces) durante 5 minutos.
- Cubrir con cubreobjetos y observar el filtro teñido a aumento de 200 X
- Examinar 30 campos al azar y estimar el largo de hifas utilizando algunos de los métodos de cuantificación de la

colonización (del tipo cuadrícula o campos) descriptos anteriormente.

- Para la cuantificación se requiere que el observador tenga la habilidad de reconocer las hifas con características de HMA. Para ello se recomienda visitar las páginas de sitios específicos donde se publiquen imágenes de hifas características de HMA (INVAM; BEG, entre otros)

Cálculo del NMP de HMA-Potencial micorrícico

Para la cuantificación del potencial micorrícico (PMA) en el suelo, puede utilizarse la técnica de dilución de suelo (Sieverding 1991). Dicha metodología consiste en la formulación de diluciones seriadas de suelo rizosférico con suelo desinfectado de HMA.

Procedimiento

Realizar un sistema de diluciones seriadas (Sieverding 1991) de suelo compuestas por suelo nativo y suelo estéril. En todos los casos el suelo (esterilizado o no) es mezclado con sustrato estéril (pudiendo ser arena o arena mezclada con perlita o vermiculita en proporción 1:1) a efectos de evitar la compactación del mismo.

 Si bien para la desinfección del suelo pueden utilizarse distintas metodologías, hay que tener especial cuidado en que el proceso de desinfección no afecte la multiplicación de los propágulos de HMA ni el crecimiento de las plantas cuyas raíces serán evaluadas. Entre los métodos disponibles, puede recomendarse la aplicación de 10 μ L formaldehído g/suelo, cuyas consideraciones y detalles de aplicación, así como otras alternativas están reportadas en Covacevich et al. (2014).

Las unidades experimentales pueden consistir en macetas de 100 mL, con 4 repeticiones por dilución, de la siguiente manera:

- Dilución 1:

280 gr de suelo nativo + 120 gr de sustrato

Homogeneizar bien, distribuir en las macetas, reservar una porción para futuras diluciones.

(90 gr en cada maceta+ 40 gr sobrante, ídem para diluciones siguientes)

- Dilución -1:

40 gr de dilución 1 + 360 gr suelo estéril+sustrato (2:1 v:v)

- Dilución -2:

40 gr de dilución -1 + 360 gr suelo estéril+ sustrato (2:1 v:v)

- Dilución -3:

40 gr de dilución -2 + 360 gr suelo estéril+ sustrato (2:1 v:v)

- Dilución -4:

40 gr de dilución -3 + 360 gr suelo estéril+ sustrato (2:1 v:v)

- Dilución -5:

40 gr de dilución -4 + 360 gr suelo estéril+ sustrato (2:1 v:v).

- Sembrar plantas trampa (detalles en Sección III) que serán mantenidas en cámara de crecimiento durante al menos 12 semanas.
- Desmontar las macetas y procesar las raíces para la tinción para HMA por alguna de las metodologías como indicadas en este manual.
- Montar los segmentos en portaobjetos y observar microscópicamente la presencia-ausencia de colonización HMA. Un segmento es considerado colonizado si contiene hifas, arbuscúlos o vesículas, una vez detectada colonización HMA en las raíces, la unidad experimental correspondiente a una repetición, dilución y tratamiento es considerada con colonización '+’.
- Estimar el Potencial Micorrícico es estimado como el número más probable (NMP) de propágulos micorrícicos (PMA) g/suelo el cual puede ser calculado según las

tablas de Alexander, (1982). Dicha estimación se efectúa con una confianza de $P = 0,05$, de acuerdo a Cochran (1950).

La técnica permite el cálculo del número más probable (NMP) de propágulos micorrícicos capaces de desarrollar colonización en las raíces de una planta 'test'. Está basada en la probabilidad de la presencia o ausencia de colonización micorrícica en raíces creciendo en un medio diluido de manera serial. El NMP de propágulos de HMA (NMP-HMA) puede ser calculado por la fórmula de Fisher y Yates, (1970):

$$\text{NMP-HMA} = 10 \log (x * \log a-k)$$

Donde x es la suma de macetas infectadas por repetición, a es el factor de dilución, y k una constante de la tabla VIII2 de los autores.

Otra forma de cálculo es a través de la ecuación de Cochran, (1950):

$$\text{NMP-HMA} = - 1/v \ln (s/n)$$

Donde un número s de n macetas, de un volumen v , permanecen estériles.

Ambas formas de cálculo están disponibles en programas BASIC en el INRA, (Dijón Francia) y son utilizadas para calcular el NMP de propágulos formadores de micorrizas.

 Para realizar el cálculo de PMA/g suelo seco debe conocerse el peso exacto del suelo en cada unidad experimental, el que puede variar en la mezcla suelo:sustrato (2:1 v:v) de acuerdo al sustrato utilizado. También deberá realizarse corrección por la humedad del suelo analizado, la que tendrá que ser cuantificada.

Determinación del número de microorganismos en una muestra

Los siguientes protocolos pueden ser aplicables para el recuento de cualquier microorganismo que pueda ser observado microscópicamente (métodos directos) o a microorganismos cultivables (métodos indirectos). En este sentido no son aplicables a HMA, debido a su carácter biótrofo obligado. Pueden ser divididos en métodos directos e indirectos.

- **Métodos directos:** recuento total - Recuento microscópico directo (cámara de Neubauer)
- **Métodos indirectos:** recuento de microorganismos viables
 - Recuento en placa
 - Número más probable (NMP)

Método directo: Recuento en cámara de Neubauer

Este método se utiliza para contar células de una muestra de cultivo diluida en cámara de volumen pequeño y conocido. Se cuentan células en varios cuadrados de la cámara y se realiza el promedio como se muestra en la Figura 4. Estas cámaras presentan un volumen específico (10-15 μL) y presentan una cuadrícula que consta de un cuadrado central de 1 mm de lado, dividido en 25 cuadrados. Cada uno de ellos a su vez, se encuentran divididos en 16 cuadrados mas pequeños (Figuras 4A y B) para permitir el conteo. La cámara se cubre en su superficie por un cubreobjetos de vidrio. El espacio entre el portaobjetos y el cubreobjetos es de 0,02 mm. La rejilla tiene un área total de 1 mm^2 y un volumen total de 0,02 mm^3 , el promedio de células contenidas en dicho volumen se expresa por mL de muestra.

Procedimiento

- La suspensión de células debe estar limpia y filtrada evitando contaminantes. Luego se debe homogenizar para asegurar una uniforme distribución de las esporas.
- Introducir la suspensión bajo el cubreobjetos, usando una pipeta.
- El material introducido debajo del cubreobjetos debe llenar la cámara (no sobrecargarla y evitar producir burbujas).
- Colocar la cámara en el microscopio óptico para proceder al conteo.
- Dejar la suspensión durante aproximadamente 3 minutos para estabilizarse antes de realizar el conteo.
- Contar las células en los 5 cuadrados grandes: 1, 2, 3, 4 y 5 (Figura 4C) los cuales corresponden a 80 cuadrados pequeños.
- Contar ambas cámaras y usar el promedio de ambos conteos.
- El número de esporas o células por mL es determinado usando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Número total de células contadas} \times 4 \times 10^6}{\text{Número de cuadrados contados}}$$

ó

$$\text{Número total de células contadas en 5 cuadrantes} \times 50.000$$

 Si existen más de 100 células en cada cuadrante grande, se debe diluir la muestra de la suspensión y de ese modo contar la muestra diluida. Si la suspensión fue diluida antes de realizar el conteo, se debe dividir la concentración por el factor de dilución para obtener la concentración en la solución madre.

 Al finalizar, se debe limpiar la cámara y el cubreobjetos con agua destilada y se deja secar evitando el uso de materiales que puedan rayar la superficie de la cámara.

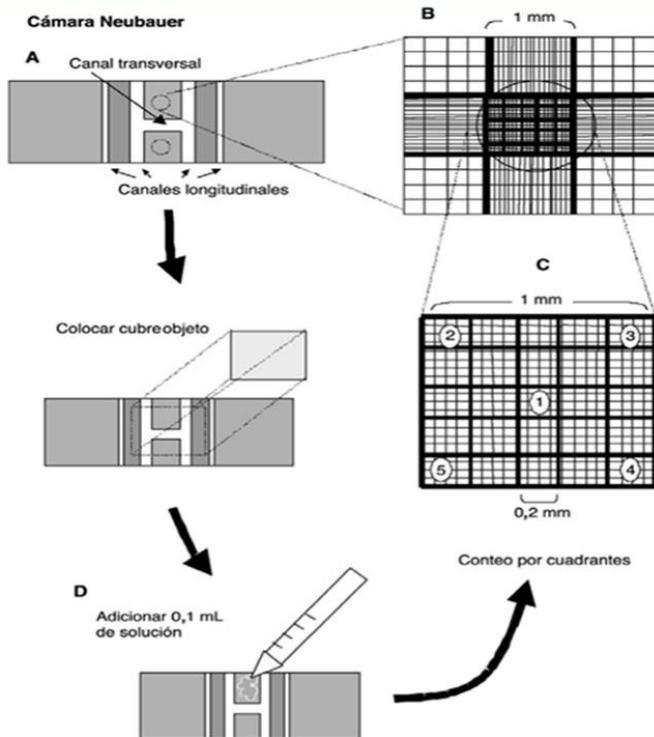


Figura 4. Preparación y recuento de células en cámara de Neubauer

Métodos indirectos: Recuento en placa

A partir de una muestra de suelo homogeneizada:

- Colocar (por duplicado) 10 g de de la muestra a analizar en una botella con 90 mL de solución fisiológica estéril (denominada Dilución 10-1)

- Llevar a agitación (150 rpm en agitador horizontal, 25 min, temperatura ambiente)
- Colectar (con ayuda de pipeta) 1 mL de la solución Dilución 10-1 e incorporarlo en un tubo de ensayo con 9 mL de solución fisiológica estéril (este tubo constituirá la denominada Dilución 10-2)
- Continuar con el procedimiento anterior (como se indica en la Figura 5) hasta llegar a la Dilución 10-6
- Sembrar 0,1 mL de las últimas diluciones (particularmente las que resulten de interés) en placas de Petri conteniendo medios adecuados para los microorganismos que se desean cultivar.
- Incubar a temperatura y tiempo adecuados para los microorganismos que se desean
- Realizar el recuento de microorganismos cultivables totales (solo se consideran las placas que presentan 30-30 colonias/placa)

Cálculo de las UFC/g en una muestra de suelo

Luego de contar las colonias visibles, calcular el número mas probable (NMP) de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) bacterianas aeróbicas totales mediante el siguiente cálculo:

$\text{UFC/g suelo seco} = \frac{(\text{NC} * 1/\text{FD} * 1/ \text{V})}{(\text{P} * \text{FH})}$
--

Donde:

UFC/ g s. s. = unidades formadoras de colonias / g de suelo seco

NC= número de colonias en una placa de Petri

FD = factor de dilución que corresponde a la dilución de donde se tomó la muestra con la que se inoculó la placa de Petri

V= volumen inoculado en la placa de Petri = 0,1 mL

P = peso de la muestra húmeda

FH = factor de corrección de humedad (1-(% humedad / 100)).

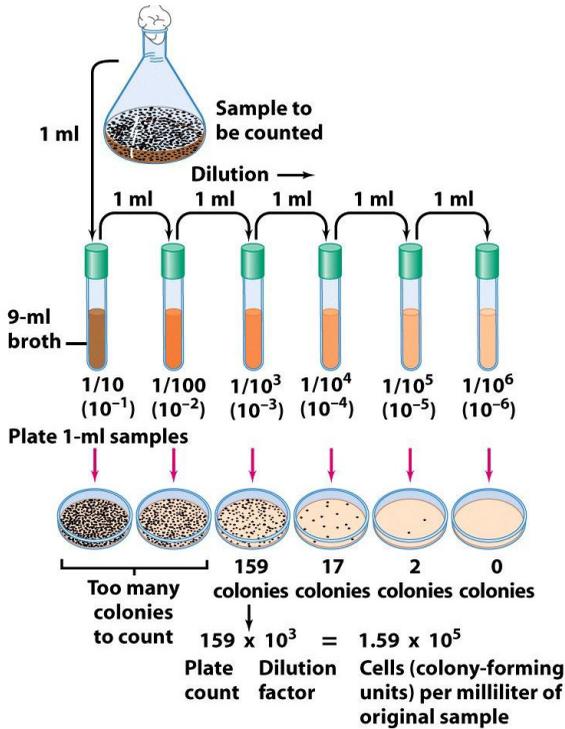


Figure 6-11 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Figura 5. Representación esquemática del procedimiento de diluciones seriadas de muestras de suelo para recuentos indirectos en placa. (Imagen extraída de Brock Biology of Microorganisms, 2006 Pearson Prentice Hall, Inc. Fig. 6-11)

Cuantificación de proteínas relacionadas con la glomalina (GRSP): Glomalina fácilmente extraíble

La glomalina fue identificada a inicios de los años 1990 a partir de hifas de HMA crecidas en condiciones axénicas (http://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE_DOCUMENTS/stelprdb1144429.pdf). Si bien otros microorganismos también pueden secretar glomalina, en general se la asocia a la actividad de los HMA. Esta glicoproteína es insoluble y de elevado peso molecular. La glomalina se ha encontrado en suelos de diversos ecosistemas y con relativa abundancia, teniendo una vida media de 6 a 42 años, lo cual conlleva una lenta velocidad de degradación que depende del suelo de origen.

La estructura química de la glomalina aún se desconoce, aunque se ha informado que está compuesta por un complejo de aminoácidos, carbohidratos y hierro (< 5%). Además, contiene un alto porcentaje de carbono (27,9-43,1 %) llegando incluso a representar hasta un 52 % del carbono total en suelos orgánicos el cual es incorporado directamente al suelo mediante descomposición de los propágulos fúngicos. Sin embargo, la glomalina sería más importante en la retención de carbono por su alta recalcitrancia y capacidad para formar agregados estables. Se ha reportado asociación directa entre el contenido de glomalina y la agregación del suelo (Perez-Brandán et al. 2012; Wu et al. 2014), lo que haría frente a las fuerzas erosivas, con mejor intercambio gaseoso y capacidad de almacenamiento de agua y nutrientes.

Se puede cuantificar niveles de glomalina total (T-GRSP, Total-Glomalin-related soil protein), fracción más recalcitrante de la glicoproteína y glomalina fácilmente extraíble (EE-GRSP, Easily extractable-Glomalin-related soil protein) o fracción más lábil que se encuentra débilmente unida a las partículas del suelo (Wright y Upadhyaya 1996).

Cuantificación de proteínas relacionadas con glomalina (GRSP) fácilmente extraíbles desde suelo*

*Grümberg, B y Vargas Gil, S.

Área Micología y Bacteriología; Instituto de Patología Vegetal (IPAVE); Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP); INTA, Córdoba - CONICET

Fundamento de la reacción

Para la cuantificación de las GRSP se utiliza el método de Bradford que produce una reacción colorimétrica, ya que enlaces peptídicos o ciertos aminoácidos reaccionan permitiendo cuantificar los productos. Este método depende, de la interacción relativamente inespecífica entre un colorante hidrofóbico y las proteínas, por lo que es relativamente sensible a la presencia de contaminantes tales como restos de detergente y líquidos orgánicos como el metanol.

El colorante Azul de Coomassie es un colorante hidrofóbico cuyas disoluciones acuosas en presencia de ácido fosfórico tienen un color pardo y que, al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de una proteína, origina un color azul intenso que se puede medir fácilmente. El colorante se une preferencialmente a los aminoácidos arginina, fenilalanina, triptófano y prolina y cambia de un estado catiónico a uno aniónico. Puede ser detectado libre a 470 nm, mientras que la forma unida a proteínas absorbe a 595 nm..

Equipo y Materiales

Balanza digital

Autoclave

Centrifuga

Espectrofotómetro

Heladera

Micropipetas: 10-100 μ L, 100-1000 μ L, 1-10 mL

Material de uso común en laboratorio

Reactivos

- Azul brillante de Coomasie (BBC G-250)
- Citrato de sodio tribásico dihidratado ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) de PM= 294,10
- Ácido fosfórico al 85% p/v
- BSA: albumina de suero bovino.
- Etanol 95%
- Reactivo extractante: Citrato de sodio tribásico dihidratado ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) de PM= 294,10, 20 mM.
- Citrato de sodio 5,882 g/L, llevar a pH 7.

Preparación del reactivo de Coomasie

- Disolver en oscuridad 100 mg de azul brillante de Coomasie (BBC G-250) en 50 mL de etanol al 95%.
- Agregar a la solución anterior 100 mL de ácido fosfórico al 85% p/v.
- Llevar la solución resultante a un volumen final de 1 L con agua destilada.
- Filtrar con papel Whatman N° 1.

 Almacenar en frasco ámbar a 4 °C máximo 6 meses.

Preparación del reactivo de Bradford

Pesar 0,1 g de BSA y llevarlo a 100 mL con H₂O destilada en un matraz

 Primero enrasar y luego agitar, ya que hace espuma

 El azul brillante de Coomasie es un sólido inflamable que puede presentar riesgo para la salud humana si es incorporado al cuerpo o en contacto con sus superficies (<http://www.inr.gob.mx/Descargas/bioSeguridad/azulDeCoomassie.pdf>)

Procedimiento de extracción y cuantificación de las GRSP

- Dejar secar las muestras de suelo al aire y posteriormente tamizar por malla de 2 mm
- Pesar $1 \pm 0,01$ g de cada muestra en tubos de tapa rosca autoclavables (tipo falcon 50 mL)
- Colocar 8 mL de Citrato de Sodio 20 mM pH 7 en cada tubo
- Autoclavar 30 minutos a 121 °C (para EE-GRSP se autoclava solo una vez)
- Centrifugar 3000-10000 rpm durante 15 minutos
- Remover el sobrenadante, que contiene la proteína, y almacenar a 4 °C (las muestras pueden ser almacenadas de esta manera de 2-4 semanas)
- Cuantificar el contenido de GRSP mediante el método de Bradford

Preparación de la Curva de calibración

- El BSA debe estar previamente preparado como fue indicado
- Preparar los tubos de ensayo de la siguiente manera:

mg/ml	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	Blanco
H ₂ O(d)	135ul	120 ul	90 ul	60 ul	30 ul	0 ul	150 ul
BSA	15 ul	30 ul	60 ul	90 ul	120 ul	150 ul	0 ul
Coomasie	5.0 ml						

- En todos los casos agitar en vórtex
- Trasvasar a la celda
- Leer* en espectrofotómetro a 595 nm

Para las muestras problema:

- Preparar los tubos con 100 µL de muestra + 50 µL de H₂O destilada + 5 mL de azul de Coomassie.
- Agitar en vórtex y leer* en espectrofotómetro

*Las lecturas deben realizarse entre los 5 y 60 minutos (como máximo), de haberse agregado el reactivo de Bradford.

- Realizar los cálculos de acuerdo a las siguientes relaciones
De la curva de calibración da X mg/mL

$$\begin{array}{l} 1000\mu\text{L}-----\text{X mg glomalina} \\ 100 \mu\text{L} ----- = 100 * \text{X} / 1000 (\text{Y}) \end{array}$$

$$\begin{array}{l} 100 \mu\text{L}-----\text{Y mg} \\ 8000 \mu\text{L}----- = 8000 * \text{Y} / 80 \mu\text{L} \end{array}$$

En resumen: La ultima relacion puede hacerse directamente para que quede expresada en mg/mL.

Para ello calcular = 8 * X mg/mL

Se informa el resultado en mg glomalina/g suelo

☞ También se puede consultar el protocolo disponible en <http://invam.wvu.edu/r/download/165765>

Bibliografía

- Alexander, M. 1982. Most probable number method for microbial populations. En Page, A.L. et al. (ed.) *Methods of Soil Analysis*. Part 2. 2nd ed. *Agronomy* 9:815-820.
- Ames, R.N., Ingham, E.R., Reid, C.P.P., 1982. Ultraviolet induced autofluorescence of arbuscular mycorrhizal root infections: an alternative to clearing and staining methods for assessing infections. *Canadian Journal of Microbiology* 28, 351–355.
- Baylis, G.T.S., 1969. Host treatment and spore production by *Endogone*. *New Zealand Journal of Botany* 7, 155-160.
- Brundrett, M.C., Piche´, Y., Peterson, R.L., 1984. A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Canadian Journal of Botany* 62, 2128-2134.
- Brundrett, M.C. 2008. Mycorrhizal associations: The Web Resource. <http://mycorrhizas.info/vam.html#S3>
- Chabau, M., Harrison, M., de Carvalho-Niebel, F., Bécard, G., Barker, D.G., 2006. Inoculation and Growth with Mycorrhizal Fungi *Medicago truncatula* handbook. (https://www.noble.org/Global/medicagohandbook/pdf/InoculationGrowth_MycorrhizalFungi.pdf)
- Cochran, W.G., 1950. Estimation of bacterial densities by means of the ‘most probable number’, *Biometrics* 6, 105– 116.
- Dickson, S., Schweiger, P., Smith, S.A., Soderstrom, B., Smith, S., 2003. Paired arbuscules in the Arum-type arbuscular mycorrhizal symbiosis with *Linum usitatissimum*. *Canadian Journal of Botany* 81, 457–463.
- Dreyer, B., Morte A., Perez-Gilabert, M., Honrubia, M., 2006. Autofluorescence detection of arbuscular mycorrhizal fungal structures in palm roots: an underestimated experimental method *Mycological Research* 110, 887-897
- Fisher, R.A., Yates, F. 1970. *Statistical tables for biological, agricultural and medical research*. 6 ed. Hafner Publication Company, Davien.
- Gerdemann, J.N., Nicolson, T.H. 1963, Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet-sieving and

- decanting. Transactions of British Mycorrhizal Society, Cambridge, 46, 235-244.
- Giovannetti, M., Mosse, B., 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular infection in roots. *New Phytologist* 84, 489-500.
- Guttenberger, M., 2000. A rapid staining procedure for arbuscules of living arbuscular mycorrhizas using neutral red as an acidotrophic dye. *Plant and Soil* 226, 211-218.
- Kormanik, P.P., McGraw, A.C., 1982. Quantification of vesicular arbuscular mycorrhizae in plant roots. En: Schenck, N.C. (ed) *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. The American Phytopathological Society, St. Paul, pp 37-45.
- MacDonald, R.M., Lewis, M., 1978. The occurrences of some acid phosphatases and dehydrogenases in the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *New Phytologist* 80, 135-141.
- McGonigle, T.P., Miller, M.H., Evans, D.G., Fairchild, G.L., Swan, J.A., 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 115, 495-501.
- Morton, J., INVAM <http://invam.wvu.edu/>
- Oehl, F., Silva, G.A., Goto, B.T., Sieverding, E., 2011. Glomeromycota: three new genera and glomoid species reorganized. *Mycotaxon* 116, 365-379.
- Perez-Brandán, C., Arzeno, J.L., Huidobro, J., Grümberg, B., Conforto, C., Hilton, S., Bending, G.D., Meriles J.M., Vargas-Gil, S., 2012. Long-term effect of tillage systems on soil microbiological, chemical and physical parameters and the incidence of charcoal rot by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid in soybean. *Crop Protection* 40, 73-82.
- Phillips, J.M., Hayman, D.S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesiculararbuscular mycorrhizal fungi for rapid

- assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55, 158–161.
- Schüßler, A. Walker, C., 2010. The Glomeromycota. A species list with new families and new genera. Gloucester, UK. 56 p.
http://schuessler.userweb.mwn.de/amphylo/Schuessler&Walker2010_Glomeromycota.pdf
- Sieverding, E., 1991. Vesicular arbuscular mycorrhizal management in tropical agroecosystems. *Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) tropics*. GmbH. Federal Republic of Germany, pp: 371.
- Smith, S.E., Gianinazzi-Pearson, V., 1990. Phosphate uptake and arbuscular activity in mycorrhizal *Allium cepa* L. effects of photon irradiance and phosphate nutrition. *Australian Journal of Plant Physiology* 17, 177–188.
- Stalpers, J., de Cock, A., 2012. The MycoBank engine and related databases. <http://www.mycobank.org>
- Tennant, D., 1975. A test of a modified line intersect method of estimating root length. *Journal of Ecology* 63, 995- 1001.
http://www.britishecologicalsociety.org/100papers/100_Ecological_Papers/100_Influential_Papers_039.pdf
- Tisserant, B., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S., Gollotte, A., 1993. In planta histochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular mycorrhizal infections. *Mycological Research* 97, 245–250.
- Trouvelot, A., Kough, J., Gianinazzi-Pearson, V., 1986. Evaluation of VA infection levels in root systems. Research for estimation methods having a functional significance. En : Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. (eds.), *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*. INRA Press, Paris, France, pp. 217–221.
http://www2.dijon.inra.fr/mychintec/Protocole/Workshop_Procedures.html
- Van Aarle, I.M., Olsson, P.A., Soderstrom, B., 2001. Microscopic detection of phosphatase activity of saprophytic and

- arbuscular mycorrhizal fungi using a fluorogenic substrate. *Mycologia* 93, 17–24.
- Vierheilig, H., Coughlan, A.P., Wyss, U., Piche´, Y., 1998. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Environmental Microbiology* 64, 5004–5007.
- Vierheilig, H., Knoblauch, M., Juergensen, K., van Bel, A., Grundler, M.W., Piche´, Y., 2001. Imaging arbuscular mycorrhizal structures in living roots of *Nicotiana tabacum* by light, epifluorescence and confocal laser scanning microscopy. *Canadian Journal of Botany* 79, 231–237.
- Vierheilig, H., Schweiger, P., Brundrett, M., 2005. An overview of methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in roots. *Physiologia Plantarum* 125, 393–404.
- Wright, S.F., Upadhyaya, A., 1996. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science* 161, 575–586.
- Wu, Q.S., Cao, M.Q., Zou, Y.N., He, X.H., 2014. Direct and indirect effects of glomalin, mycorrhizal hyphae, and roots on aggregate stability in rhizosphere of trifoliate orange. *Journal name: Scientific Reports* 4, 5823 doi:10.1038/srep05823

SECCION III

Lineamientos generales de ensayos de inoculación

Ensayos de inoculación con hongos formadores de micorrizas arbusculares en plantas

Las técnicas de inoculación de plantas con HMA consisten, en general, en las mencionadas para la multiplicación de HMA. Como se mencionó en la Sección II, el inóculo puede consistir en esporas, hifas y/o raíces micorrizadas multiplicados en condiciones axénicas, o en condiciones no axénicas.

La inoculación puede realizarse sobre semillas o sobre plántulas. Si se decide la inoculación en plántulas se recomienda realizar la germinación de las semillas y crecimiento de plántulas en condiciones axénicas. Se recomienda seleccionar las plántulas de crecimiento homogéneo para la siembra (Figuras 1 A-C).



Figura 1. Germinación axénica de semillas y elección de plántulas homogéneas para ensayos de inoculación. **A)** Semillas estériles en sustrato inerte autoclavado. Sistema de aislamiento del exterior. **B)** Mantenimiento de las plántulas hasta su utilización (aprox. 1 semana) **C)** Selección de semillas de crecimiento homogéneo

En caso de decidir colocar directamente las semillas, y si se trabaja en macetas, se recomienda sembrar al menos 1-2 mas semillas que las que se requieren por unidad experimental. Luego

de la germinación (aprox. 1 semana después) se realiza raleo de plántulas a efectos de obtener la densidad deseada plantas/maceta. Sea cual sea la elección, se recomienda colocar el inóculo por debajo de la semilla o raíces de plántulas (Figura 2) a efectos que los HMA y las raíces se encuentren lo mas rápido posible. Esto último es de suma importancia considerando el carácter biótrofo obligado de los HMA.

Para ello es conveniente:

- Realizar un hoyo en la maceta o unidad experimental con la que se trabaja
- Colocar el inóculo
- Colocar la semilla o plántula
- Tapar con sustrato
- Cubrir toda la maceta con una capa fina de arena (para evitar contaminación entre macetas)
- Mantener las plantas en condiciones adecuadas de crecimiento



Figura 2. Inoculación, siembra y mantenimiento de plantas. **A)** Realización de hoyos en sustrato de inoculación y siembra (maceta derecha). **B)** Incorporación de inóculo en los hoyos, semillas o plántulas y tapado de los hoyos. **C)** Plantas de *Brachiaria* inoculadas con HMA (izquierda); no inoculadas (derecha).

Los sustratos en los cuales se realizan los ensayos podrán ser, de acuerdo a los objetivos de la investigación, estériles o no estériles; pudiendo además consistir en suelo, sustrato inerte o

mezcla de ambos. En caso de realizar el ensayo sobre sustrato estéril, se recomienda consultar reporte de métodos de esterilización de suelo para la inoculación con HMA (Covacevich et al. 2014).

En caso de realizar la inoculación con “suelo-inóculo” (ver multiplicación de inóculos de HMA en Sección I), el inóculo consistirá en raíces de la planta trampa de multiplicación utilizada, esporas e hifas de HMA y suelo con las poblaciones microbianas nativas en el cual se multiplicaron.

✎ Antes de utilizar el inóculo se recomienda realizar la cuantificación de la colonización micorrícica en la planta trampa, recuento de esporas de HMA y de microorganismos cultivables totales (ver protocolos en Sección II).

Se recomienda utilizar inóculos con grados de micorrización superiores al 50% y más de 100 esporas/g sustrato.

✎ A efectos de garantizar la efectiva instalación del inóculo, se recomienda que el mismo sea realizado en dos etapas: a la siembra y una semana después de la siembra.

En la inoculación de la siembra, se procede a colocar aproximadamente 20 g del suelo-inóculo en el hoyo (aproximadamente en los 5 cm superiores antes de finalizar el llenado de las macetas), colocar inmediatamente por encima la plántula o semilla y completar el llenado del hoyo con sustrato.

En la inoculación posterior, a la semana después de la primera, se colocan 10 g del suelo-inóculo en cada una de las macetas. Para ello se realiza un pequeño orificio próximo a la planta (con cuidado de no dañarla), se incorpora el “suelo-inóculo”, se tapa con el sustrato y se riega.

✎ Se deben contar con al menos 3 replicas de cada tratamientos y con controles de inoculación (unidades experimentales sin inocular y crecidas en las mismas condiciones que las inoculadas).

✎ A efectos de minimizar los cambios edáficos en el sustrato de cada maceta, que podrían haber sido ocasionados por el agregado del “suelo-inóculo” en los tratamientos inoculados; se recomienda adicionar en los tratamientos no inoculados la misma cantidad y momentos de la inoculación “suelo-inóculo” previamente esterilizado (Covacevich et al. 2014).

✎ A efectos de minimizar los cambios bacteriológicos en el sustrato de cada maceta, los cuales podrían haber sido ocasionados por el agregado del “suelo-inóculo” en los tratamientos inoculados (Schroeder y Janos 2004); se recomienda adicionar a los tratamientos no inoculados un filtrado microbiano de aproximadamente 20 mL (para una maceta de 2 kg) con exclusión de los propágulos de HMA. Dicho filtrado se obtiene luego de realizar una suspensión de la misma cantidad de “suelo-inóculo” utilizado, el cual es suspendido en 30 mL de agua destilada estéril llevando a agitación (100 rpm en agitador horizontal, 15 min, temperatura ambiente). Posteriormente la suspensión es filtrada a través de mallas de 125, 53 y 36 μm y finalmente por un filtro estéril Whatman No. 4.

✎ Se recomienda realizar el recuento microbiano en el sustrato antes y después de la inoculación (a inicios del ensayo, y al final del ensayo, con el relevamiento de las unidades experimentales), el recuento en la suspensión de filtrado de “suelo-inóculo”, así como en el inóculo con HMA utilizado.

*Ensayos de inoculación con hongos Trichoderma**

* Stocco M., Mónaco C. y Cordo C.

CIDEFI Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales Universidad Nacional de La Plata-CIC

Peleteado de semillas con aislamientos de *Trichoderma* spp.

La técnica de peleteado consiste en recubrir la semilla con micelio y conidios del antagonista. Se realiza agitando la semilla por 30 minutos en una suspensión preparada con 90 ml de agar-agua al 2 %, a la que se le adiciona 10 ml de una suspensión de conidios de *Trichoderma* spp. y una gota de tensioactivo (Figura 3A). Una vez finalizado el tiempo de agitación, se deja secar a las semillas a temperatura ambiente por 24h sobre papel absorbente (Figura 3B).

Suspensión de conidios de *Trichoderma* spp.

Para la obtención de la suspensión de conidios de *Trichoderma* spp. se deben partir de colonias uniformemente desarrolladas. Cada aislamiento se siembra en APG 2% (agar papa glucosado) con antibiótico y se incuba a 25 °C durante 7 días. Una vez obtenida la colonia se cubren las cajas de Petri con agua destilada estéril y se raspan suavemente con una varilla de vidrio estéril. Luego, se filtra con una gasa estéril y se realiza el recuento de las esporas con un hematocitómetro. La concentración de la suspensión se ajusta a 1×10^8 conidios por mL.

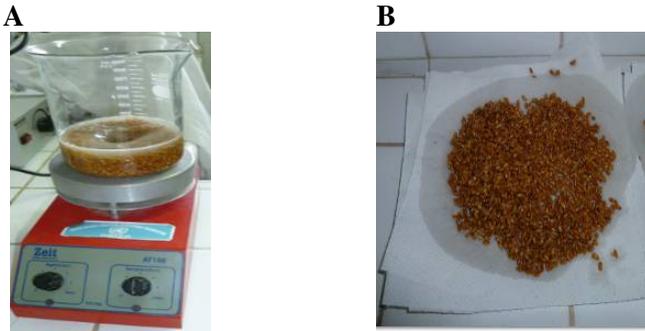


Figura 3. Proceso de peleteado de la semilla de trigo con *Trichoderma*. **A.** Peleteado de la semilla de trigo con cepas de *Trichoderma* spp., **B.** Secado de la semilla de trigo, luego del peleteado.

Bioensayos de plantas de trigo en invernáculo para determinar la actividad antagonista frente a *Septoria tritici*

Los ensayos en plantas de trigo se realizan mediante inoculaciones artificiales de *Septoria tritici*, en invernáculo. Se determina la actividad biocontroladora de los aislamientos de *Trichoderma* en un cultivar de trigo susceptible a *S. tritici*. Se siembran las semillas peleteadas con cada cepa de *Trichoderma* spp. en bandejas de (16 cm x 10 cm x 5 cm) en tres repeticiones por bloque. En el caso del testigo se siembran semillas sin el peleteado del antagonista.

Producción de inóculo de *Septoria tritici*

Los aislamientos de *S. tritici* se obtienen a partir de fragmentos de tejido infectado de hojas de trigo o por

transferencia de esporas desde un picnidio. Las réplicas de cada aislamiento se cultivan en APG e incuban durante 21 días en condiciones de laboratorio (temperatura media de 20 °C y luz difusa). Para la producción de inóculo se utiliza una mezcla de 2 aislamientos virulentos de *S. tritici*. Con el fin de lograr una cuantiosa esporulación, los aislamientos se cultivaron en cajas de Petri con el medio de cultivo agar malta (30 g/L de extracto de malta, 5 g/L de peptona, 2 g/L de extracto de levadura y 20 g/L de agar en agua destilada). La suspensión de conidios se realiza inundando las cajas con aproximadamente 5 mL de agua destilada; luego se raspa la superficie de la colonia con un ansa estéril. Por último, la suspensión resultante se filtra con una malla tramada. La concentración de la suspensión se ajusta a 1×10^6 esporas/mL, con un hematocitómetro.

Inoculación del patógeno

La inoculación con el patógeno se realiza cuando las plantas de trigo poseen la primera hoja totalmente desarrollada. La pulverización se debe realizar hasta “chorreo” (Figura 4A). Una vez inoculadas las plantas se cubren con bolsas de polietileno formando una cámara húmeda por 48h, de esta forma se facilita la penetración del patógeno a la planta (Figura 4B).

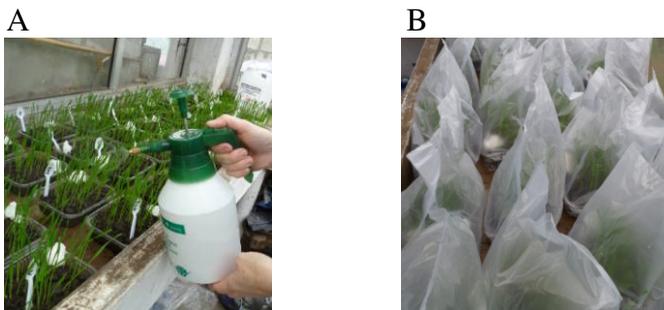


Figura 4. Inoculación de plantas de trigo con *Septoria tritici*. **A.** Inoculación de plantas de trigo con *S. tritici*. **B.** Cámara húmeda en invernáculo luego de la inoculación con *S. tritici*.

Las bandejas se mantienen en durante la duración del ensayo. El período de tiempo puede variar entre 35 y 43 días, dependiendo de la influencia de la temperatura. Diariamente se deben registrar las temperaturas máximas, mínimas y la humedad ambiental máximas y mínimas. De esta manera se controla que las condiciones ambientales sean las adecuadas para el desarrollo de la enfermedad. En el caso de *S. tritici* la temperatura óptima varía entre 20 °C y 25 °C, con una humedad mayor al 90%.

Se evalúa el potencial antagonista de las cepas ensayadas estimando la reducción del área necrosada y de la superficie cubierta con picnidios, ambas para la primera y la segunda hojas, cuando las plantas se inocularon con una mezcla de las dos cepas virulentas de *S. tritici*. Esto se compara con un testigo sin antagonistas y con una única aplicación del patógeno. De esta forma se mide la capacidad de cada aislamiento de *Trichoderma* spp. de restringir el progreso de la Mancha de la hoja de trigo, 21 días posteriores a la inoculación (Figura 5).



Figura 5. Aparición de síntomas y signos de la Mancha de la hoja del trigo, después de 24 días desde la inoculación

Todos los datos del porcentaje de necrosis y de la cobertura picnidial, se analizan por ANOVA. Se comparan sus medias con el test de LSD para un nivel de significancia del 5% ($P < 0,05$).

Ensayos de inoculación a campo con HMA, Trichoderma u otros microorganismos

Las indicaciones de procedimientos a seguir para evaluaciones de inoculación presentadas en esta sección están orientadas principalmente a inoculaciones en condiciones controladas (macetas o similar, sustratos estériles, etc.). Sin embargo, a la hora de trasladar los resultados a posibles situaciones productivas, en la mayoría de las ocasiones los resultados obtenidos en condiciones controladas no se conciben con los obtenidos en condiciones de producción agrícola (suelo con poblaciones microbianas nativas, exposición a las condiciones climáticas y ambientales naturales, etc.). En este sentido, las evaluaciones presentadas podrían adaptarse a condiciones de cultivos intensivos (producción de plantines o cultivos en invernáculo).

La inoculación extensiva a campo presenta, para el caso de los HMA complicaciones operativas. Esto es debido a que si los inóculos son utilizados como “suelo-inóculo” la incorporación de los mismos puede presentar complicaciones logísticas. Para inoculaciones con *Trichoderma*, la dificultad operativa es menor ya que se recurrirá al peleteado de las semillas con la cepa a inocular, tal como se ha detallado anteriormente, y se procederá a la siembra.

Además de las posibles complicaciones logísticas ocasionadas por la introducción del inóculo en el sistema, hay que considerar que en condiciones de campo los microorganismos a ser incorporados en la inoculación interactuarán con los nativos. En ocasiones estas interacciones pueden ser sinérgicas, antagónicas o neutras. Por esta razón, en ensayos a campo en ocasiones no es fácil separar los efectos producidos por los microorganismos inoculados de las interacciones establecidas en el ambiente edáfico.

Aun así, hay que destacar que los resultados de las inoculaciones a campo lo constituye el interés principal de los

posibles usuarios de los inoculantes destinados a la producción agrícola extensiva. En caso de realizar ensayos de inoculación a campo, hay que evitar que las parcelas inoculadas se encuentren en contacto directo con las no inoculadas y en ocasiones puede requerirse además la incorporación individual de los inóculos en cada línea de las parcelas (Figura 6).



Figura 6. Inoculación individual en cada línea dentro de la parcela (utilizando caño de PVC cortado longitudinalmente).

Cálculo de respuesta a la inoculación con HMA, Trichoderma u otros microorganismos

En los ensayos de inoculación (tanto con HMA, *Trichoderma* u otros microorganismos), puede calcularse la respuesta de la planta en crecimiento o absorción de nutrientes. Para ello, puede utilizarse las relaciones establecidas por Cavagnaro et al. (2003). Si bien el autor estableció estas relaciones para la evaluación de la respuesta a la inoculación con HMA, estas pueden adaptarse para otros ensayos de inoculación.

A modo de ejemplo se describe la respuesta a la inoculación (RI) para el parámetro producción de materia seca aérea (MSA), el que debe ser previamente cuantificado independientemente para cada unidad experimental antes de calcular la RI.

En la siguiente ecuación se presenta la RI para la producción de MSA (RI_{MSA}):

$$RI_{MSA} = \frac{MSA (I) - \text{media MSA(NI)}}{\text{media MSA(NI)}} \times 100$$

Donde MSA (I) corresponde al parámetro individual del peso seco de las plantas inoculadas, y media MSA (TNI) corresponde al peso seco promedio de las plantas no inoculadas.

☞ Los demás parámetros determinados pueden ser utilizados para calcular sus respectivas RI

☞ En caso de haber utilizado más de un inóculo, se calculará la RI individualmente para cada inóculo (Ej. RI_{MSA}^{IA} ; RI_{MSA}^{IB} = corresponden a las RI en producción de MSA para los inóculos A y B, respectivamente. Para ello son calculadas las relaciones usando los parámetros individuales de MSA ocasionada por el inóculo A o B, mientras que el valor medio del testigo no inoculado (TNI) será el mismo para las dos relaciones.

☞ Si el objetivo de la investigación pretende analizar la respuesta a la inoculación ante condiciones diferenciales de disponibilidad de nutrientes (u otra disponibilidad), puede calcularse la RI separadamente para las condiciones testeadas.

☞ En la relación `desaparecerá` el TNI ya que los cálculos se realizan en referencia a dicho tratamiento y los resultados son

expresados en el porcentaje por el cual cierto tratamiento de inoculación superó (o no supero en caso de ser negativo) al TNI.

Bibliografía

- Cavagnaro, T.R., Smith, F.A., Ayling, S.M, Smith, S.E., 2003. Growth and phosphorous nutrition of a Paris-type arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 157, 127-134.
- Covacevich, F., Castellari, C., Echeverría, H.E., 2014. Métodos físicos y químicos para la eliminación de hongos formadores de micorrizas nativos de muestras de suelo. *Revista Argentina de Microbiología* 46, 1-6.
- Schroeder, M.S., Janos, D.P., 2004. Phosphorus and intraspecific density alter plant responses to arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil* 264, 335–348.

SECCION IV

Utilización de herramientas moleculares para el estudio de Hongos formadores de micorrizas y Trichoderma

Para los HMA aún no se ha reconocido reproducción sexual, ni formación de estructuras reproductivas, lo que limita su determinación taxonómica. La ubicación taxonómica y sistemática tradicional de los HMA se basa principalmente en los caracteres morfológicos de las esporas y esporocarpos (Brundrett 2008). Sin embargo, su producción y maduración está condicionada por distintos factores ambientales como la temperatura, humedad, pH, estación del año y características del hospedante, que pueden modificar el número de paredes, su espesor, su coloración, entre otros. Además, algunos HMA son dimórficos, ya que pueden producir dos tipos diferentes de esporas asexuales: unas similares a las representantes del género *Acaulospora* (acaulosporoides), a *Gigaspora* (gigasporoides) y otras a *Glomus* (glomoides) (www.amf-phylogeny.com; Goto y Maia 2006; Krüger et al. 2011). Por otra parte, las esporas recolectadas directamente de los ambientes naturales pueden estar degradadas o parasitadas por otros microorganismos alterando así su morfo-anatomía.

Históricamente, la taxonomía y sistemática de los HMA atravesó cuatro períodos. El último o filogenético desde el 2001 se ha auxiliado de herramientas moleculares y es caracterizado por el análisis filogenético de las secuencias de genes del ADNr (Stümer 2012). Actualmente, los pertenecen a un filum propio denominado Glomeromycota (Schüßler et al. 2001; Redeker et al. 2013) representado por aproximadamente 230 especies. Los resultados de estudios moleculares indicarían que las especies descritas hasta el momento, representan una escasa fracción de la diversidad existente de los HMA (Öpik et al. 2008).

Para el caso de los hongos pertenecientes al género *Trichoderma*, las determinaciones de taxonomía clásica consideran principalmente los caracteres morfológicos de sus conidios y células conidióforas (Jaklitsch et al. 2006). Aún así también existen permanentes controversias con la clasificación de estos hongos.

En ambos casos, los aportes de la biología molecular complementan a los estudios morfológicos y podrían permitir describir más profunda y precisa de la diversidad de los de los grupos blanco de estudios.

Extracción de DNA de HMA

La extracción de ácidos nucleicos (DNA), es una etapa fundamental para la aplicación de los métodos moleculares por lo que es importante extraer DNA de alta calidad que pueda ser utilizado para subsiguientes estudios. En general, los estudios implican la amplificación de genes o regiones del DNA ribosomal por medio de la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR, que será descrita mas adelante). Sin embargo, si durante la rutina de extracción de DNA las trazas de humus del suelo, del cual los HMA o los hongos *Trichoderma* son colectados, no son eficientemente removidas, la actividad de la enzima Polimerasa puede ser inhibida y la reacción de amplificación podría no funcionar.

Una estrategia para evitar la extracción conjunta de DNA con impurezas, es el uso de kits comerciales de extracción de DNA de suelo (o de raíces para estudios de HMA colonizando raíces). En caso de utilización de kits comerciales, se deben seguir los pasos indicados por el fabricante del kit a utilizar. Para estudios de HMA en ocasiones se requiere la extracción de DNA de un grupo blanco de estudio en particular y no de todo el material genómico de la muestra. En ese caso, la estrategia puede consistir en la extracción de DNA a partir de esporas de HMA. Para el detalle del protocolo de extracción de DNA de esporas de HMA, se describirá separadamente el protocolo para la extracción de 1-10 esporas y para más de 10 esporas de HMA.

Materiales

- Microcentrífuga (10000-12000 rpm)
- Micropistilos (autoclavados)
- Baño-Maria o termomix a 95 °C
- Agitador de tubos (Vortex)
- Pipetas de 10, 200 y 1000 µL,
- Tubos tipo Eppendorf

Soluciones

- TE – Tris EDTA (10:1)
- Tris-HCl 10 mM; pH 8,0
- EDTA 1 mM pH 8,0
- Resina Chelex 100 (Bio-Rad) a 20% en agua ultra-pura (milli Q autoclavada o bidestilada autoclavada); preparada en tubos tipo Eppendorf (1,5 mL) autoclavados.
- Enzima RNAsa 10 mg/mL (previamente preparada), se recomienda su utilización solo para la extracción de DNA de más de 10 esporas.
- Agua ultra-pura autoclavada (50-100 mL)
- N₂ líquido

👉 La solución de Resina Chelex puede ser almacenada a -20°C durante varios meses.

☠ La Resina Chelex no tiene reportado riesgos para la salud humana (<http://babec.org/files/MSDS/chelex.pdf>)

Preparación de las esporas

- Extraer las esporas por tamizado en húmedo y centrifugación en sacarosa como fue indicado en la Sección II.
- Seleccionar esporas sanas mediante observación en lupa binocular
- Someter las esporas a cuatro sesiones de ultrasonido durante 15 segundos, cada una intercalada por lavados con agua destilada estéril para eliminar partículas de

suelo y posibles microorganismos adheridos superficialmente.

- Transferir las esporas limpias y sanas (previo chequeo por observación en lupa binocular) a tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL separándolos en grupos de una o más esporas (en función de los objetivos del estudio).
- En caso de no utilizar inmediatamente, almacenar los tubos con esporas a -20°C .

Extracción de DNA a partir de 1-10 esporas HMA

- Retirar los tubos del Freezer -20°C ; dejar descongelar
- Centrifugar los tubos brevemente a alta velocidad para que la/s espora/s se ubiquen en el fondo del tubo
- Quebrar la/s espora/s con un micro-pistilo.
- Adicionar inmediatamente 40 μL de TE (10:1 mM) pH 8,0; y homogeneizar con el micro-pistilo
- Adicionar 10 μL de Resina Chelex 100 a 20% (agitando previamente la solución antes de usar) y mezclar cuidadosamente con una pipeta
- Congelar en N_2 líquido
- Retirar los tubos del N_2 líquido y colocarlos en baño-María o termomixer a 65°C durante 1 minuto con agitación a 300 rpm.
- Repetir los choques térmicos (N_2 - 65°C) hasta completar un total de 4 series, finalizando con los tubos en N_2 líquido
- Retirar los tubos del N_2 líquido y dejar descongelar a temperatura ambiente
- Colocar los tubos en baño-Maria o termomix a 95°C durante 10 minutos
- Colocar los tubos en hielo durante 2 minutos
- Centrifugar a 10000 g por 1 minuto
- Pipetear el sobrenadante (aproximadamente 35 μL) y transferirlo para un tubo nuevo y estéril
- Conservar a -20°C hasta su uso.

Extracción de DNA en más de 10 esporas HMA

- Repetir los pasos de centrifugación y quebrado de esporas, adicionando luego 80 μL de TE (10:1 mM) y 40 μL de Resina Chelex 100 a 20%.
- Repetir los pasos indicados para menos de 10 esporas hasta el centrifugado posterior a los choques térmicos e incubación a 95 °C.
- Al pipetear el sobrenadante, se recuperarán aproximadamente 70 μL
- Adicionar 5 μL de RNAsa (10 mg/mL previamente preparada)
- Incubar los tubos a 37 °C durante 10 minutos;
- Diluir el DNA de 1/100 hasta 1/500 dependiendo de la naturaleza de la especie analizada (para esporas de gran tamaño, del tipo *Gigaspora*, la dilución será del rango mayor)
- Almacenar a -20°C hasta el uso



Observaciones importantes:

- Al retirar los tubos del N₂ líquido es importante abrirlos para que estos no estallen;
- Al pipetear los sobrenadantes verificar que no se está pipeteando la Resina Chelex 100. En caso de pipetear resina, volver toda la suspensión al tubo, centrifugar nuevamente y repetir la operación
- Los micropistilos pueden ser reutilizados luego de incubación durante algunas horas (*over night*) en 0.1 N NaOH a efectos de que el DNA adherido en la punta sea digerido. Luego enjuagar varias veces con agua destilada y autoclavar antes del uso.

Extracción de DNA y reconocimiento de hongos Trichoderma

Procesamiento del micelio

De cada cepa crecida sobre medio de cultivo APG al 2% se toma un trozo de micelio de aproximadamente 1 cm x 1 cm del

micelio y se lo coloca en medio líquido (por ejemplo PDB) se incuba a temperatura ambiente en agitación continua (150 rpm) durante 4-5 días.

El micelio puede cosecharse utilizando un disco de papel Whatmann en vacío, utilizando un embudo tipo Buchner. El micelio deshidratado puede liofilizarse y macerarse con una espátula hasta lograr un polvo fino.

Extracción de DNA genómico a partir de micelio

Si bien existen numerosos protocolos y kits para la extracción de DNA genómico a partir de hongos uno de los más utilizados es el método del CTAB (Murray y Thompson 1980) el cual consiste en tomar aproximadamente 100 mg de micelio liofilizado, y se procede de la siguiente manera:

Materiales

- CTAB 2X (bromuro de cetiltrimetilamonio)
- β -2-Mercaptoetanol
- Acetato de Potasio 3M pH 4,8
- Fenol
- Cloroformo:alcohol isoamílico 24:1
- Etanol 70 %
- Isopropanol
- Buffer TE pH 8 (10 mM Tris, llevar a pH 8.0 con HCl, 1 mM EDTA)

☠ El cloroformo debe manipularse en cámara de extracción con guantes

☠ El mercaptoetanol es combustible y altamente tóxico si es absorbido por la piel, (<http://iio.ens.uabc.mx/hojas-seguridad/mercaptano%20ethanol.pdf>)

☠ El CTAB puede presentar riesgos para la salud humana y el ambiente
(<http://www.analytyka.com.mx/spanish/FDS/C/122054.htm>)

Procedimiento

- Colocar el micelio en tubos tipo Eppendorf estériles de 1,5 μL (la cantidad de micelio no debe exceder los 500 μL)
- Agregar a cada tubo conteniendo el micelio 750 μL de buffer CTAB 2X de modo que el polvo quede completamente resuspendido y con movilidad.
- Agregar 15 μL de 2-mercaptoetanol y mezclar suavemente mediante inversión.
- Calentar 30 minutos a 65° C. Cada 8 minutos homogenizar la mezcla invirtiendo los tubos.
- Agregar 300 μL de Acetato de Potasio 3 M pH 4,8 y mezclar suavemente por inversión.
- Incubar 15 minutos en hielo.
- Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos o más, hasta que el sobrenadante quede transparente.
- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo de 1,5 mL cuidando de no remover el precipitado.
- Agregar 200 μL de fenol y 200 μL de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1.
- Homogeneizar y centrifugar 5 minutos a 14.000 rpm o hasta que la fase superior quede transparente.
- Transferir la fase superior a un nuevo tubo y agregar 500 μL de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1, agitar suavemente y centrifugar 5 minutos a 14.000 rpm o hasta que la fase superior quede transparente.
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo y agregar igual volumen de isopropanol frío (colocado en freezer - 20 °C al menos media hora antes).
- Incubar 10 minutos en hielo.
- Centrifugar 5 minutos a 14.000 rpm a 4° C en una microcentrífuga para precipitar el DNA.

- Descartar el sobrenadante cuidadosamente y lavar dos veces con 500 μ L de etanol 70 % frío. En cada lavado desprender con el vortex la pastilla de DNA.
- Centrifugar 5 minutos a 14.000 rpm a 4° C en una microcentrífuga.
- Descartar el etanol y colocar los tubos invertidos sobre un papel absorbente durante 5 minutos, dejar secar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- Resuspender el DNA precipitado en 30 a 50 μ L de buffer TE estéril.

 En todos los casos de extracción de DNA evaluar su cantidad y calidad espectrofotométricamente en base a la relación A260nm/A280nm o por electroforesis en gel de agarosa con buffer TBE o TE al 0,8-1 % p/v teñido con GelRed®. También puede cuantificarse el contenido de DNA en las muestras y la relación DNA/proteínas con el equipo destinados a tal fin.

 El fenol es altamente tóxico, causa quemaduras severas e intoxicación por inhalación. Siempre debe trabajarse en cámara de extracción, usar guantes y evitar el contacto con la piel. (<http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/0a100/nspn0070.pdf>)

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica *in vitro* que imita la habilidad natural de la célula de duplicar el DNA. Se trata de una técnica usada para crear un gran número de copias de un segmento de DNA, que utiliza ciclos de desnaturalización, apareamiento con cebadores (denominados *primers*) y extensión por una enzima DNA polimerasa termoresistente.

Hasta la década de 1980, el único método para obtener grandes cantidades de un fragmento de DNA era clonándolo en vectores adecuados e introduciéndolo y multiplicándolo en bacterias. En el año 1985, un investigador norteamericano, Kary Mullis (acreedor del Premio Nobel en Química 1993 por este aporte), desarrolló un método que permite, a partir de una muestra muy pequeña de DNA, obtener millones de copias de DNA *in vitro*, en unas pocas horas y sin necesidad de usar células vivas. Esta técnica, llamada reacción en cadena de la polimerasa (PCR), requiere conocer la secuencia de nucleótidos de los extremos del fragmento que se quiere amplificar. Estas secuencias se usan para diseñar dos oligonucleótidos sintéticos de DNA complementarios a una porción de cada una de las dos cadenas de la doble hélice, de acuerdo a los siguientes fundamentos básicos (Figura 1):

1. La mezcla de reacción contiene la secuencia de DNA que se quiere amplificar, dos oligonucleótidos sintéticos que servirán como cebadores, una DNA polimerasa termoestable (Taq) y los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato –dATP, dGTP, dCTP y dTTP–.

2. Proceso: la mezcla de reacción se somete a ciclos sucesivos, cada uno correspondiente a una fase de desnaturalización, una de hibridación o alineación y una de elongación.

- A) Durante la desnaturalización, que se realiza por calentamiento de la mezcla a 95° C, se separan las dos cadenas del DNA molde.

B) Durante la hibridación, la temperatura de incubación se reduce para permitir el apareamiento de las bases de ambos cebadores en el sitio donde encuentran una secuencia complementaria.

C-E) Durante la fase de elongación, la mezcla se lleva a 72° C y la enzima Taq DNA polimerasa se encarga de replicar las hebras de DNA. La Taq polimerasa comienza el proceso de extensión de la cadena complementaria a partir del extremo 3' de los cebadores. Al finalizar cada ciclo, la cantidad de DNA molde disponible para el ciclo siguiente aumenta al doble.

Entre muchas de las aplicaciones de la reacción de PCR se encuentran: diagnóstico de patógenos, identificación de organismos, test de paternidad, clonación de genes, mutagénesis, análisis de DNA fósil, detección de mutaciones específicas y la obtención de cantidades de DNA para su posterior utilización en técnicas de biología molecular.

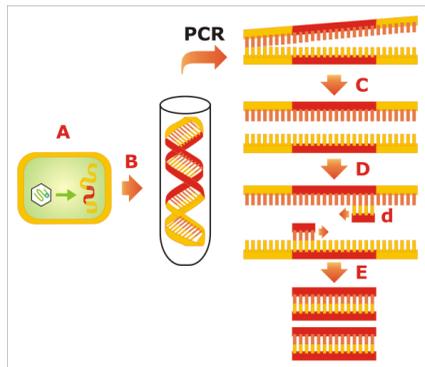


Figura 1. Representación esquemática del proceso de PCR.

Imagen extraída de http://www.ninlab.es/reaccion_en_cadena_de_la_polimerasa.html

En particular, los genes de la unidad pequeña del RNA (16S en procariontes ó 18S en eucariontes) se usan

extensivamente para comparar organismos vivos, tan diversos como bacterias, hongos y humanos. La secuenciación de la región espaciadora interna transcrita (ITS) y de la subunidad grande (LSU o 28S) del DNA ribosomal (DNAr) nuclear también son frecuentemente utilizados en la caracterización molecular de hongos a nivel de género y de especie.

En los hongos filamentosos y levaduras, el rDNA está organizado como unidades que se repiten una detrás de la otra, es decir en tándem. Cada unidad incluye tres genes de rRNA, el que codifica para el 18S rRNA, el gen para el 5.8S rRNA y el gen para el 28S rRNA (Figura 2).

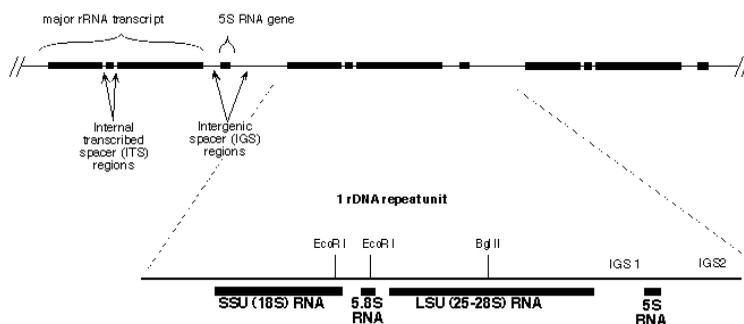


Figura 2. Esquema de la subunidad ribosomal pequeña (SSU) y la subunidad ribosomal grande (LSU) del ribosoma. (Imagen tomada de <http://sites.biology.device.ed/fungi/mycolab/cebadores.htm>).

En cada unidad, los genes están separados por dos secuencias espaciadoras internas que se transcriben junto a los genes de rRNA, denominados ITS1 e ITS2 (Internal Transcribed Spacer) aunque se transcriben juntos, no son codificantes. El tamaño de los ITS es de entre 200 y 400 pares de bases. Además, estas unidades de rDNA se encuentran separadas por un

espaciador intergénico IGS (Inter Genic Spacer). El gen más pequeño, el 5S rRNA puede estar o no incluido en la unidad de rDNA (Figura 3)

Las zonas no codificantes del rDNA nuclear (ITS1, ITS2 e IGS) son las más susceptibles de acumular mutaciones y por lo tanto tienen gran interés en el estudio de la identificación y tipificación de especies fúngicas (Gardes y Bruns 1993). Existen numerosos trabajos que utilizan los ITS para determinar y tipificar especies del género *Trichoderma* y así como otros géneros de hongos superiores (Grondona et al. 1997)

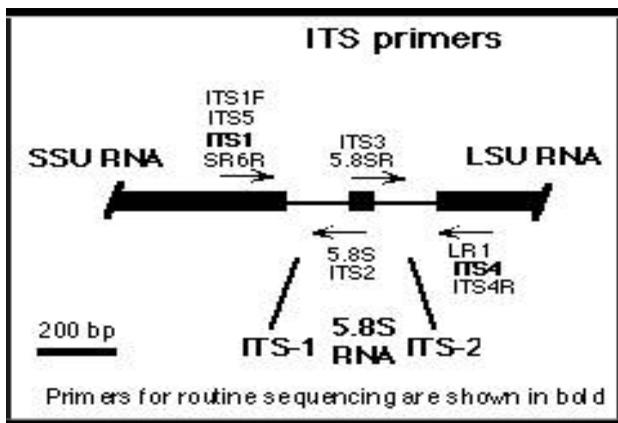


Figura 3. Esquema de los espacios transcritos internos (ITS). (Imagen tomada de <http://sites.biology.devoice.ed/fungi/mycolab/cebadores.htm>).

Los ITS han sido de gran utilidad para la sistemática molecular a nivel de especies, e incluso dentro de las especies ya que han servido, por ejemplo, para identificar razas geográficas. Debido a su mayor grado de variación que otras regiones génicas de DNA recombinante, la variación entre los distintos rDNA se repite a veces y se observa en ambas regiones ITS y IGS. Además, la mayoría de los laboratorios utilizan los cebadores

ITS1 e ITS4, como cebadores específicos que permiten la amplificación selectiva de secuencias de hongos.

Técnicas moleculares para la identificación y caracterización de HMA

La región ribosomal 18S rDNA es la más utilizada para estudios filogenéticos. Sin embargo, debido a la elevada variabilidad intraespecífica de esta región, la región ribosomal mayor 25S rDNA así como la región ITS son también utilizadas para estudios de diversidad de los HMA. Schüßler et al. (2001) reportó que la región 18S rDNA presenta baja variabilidad entre aislamientos de HMA y que también la subunidad 25S rDNA presenta dos dominios polimórficos que pueden ser utilizados para detectar diferencias entre especies. Mientras que Jansa et al. (2002) indicó que la elevada variabilidad en la región ITS puede ser utilizada para identificar especies o filotipos de Glomeromycota. Renker et al. (2003) reportó que dicha región no sería adecuada para la separación taxonómica de este filum. Por su parte, Redecker (2002) indicó que la topología de la región 5.8S puede permitir la separación de los principales grupos taxonómicos de los Glomeromycota.

Las bases de acceso a las secuencias de genes que han sido secuenciadas hasta el momento del tipo NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) pueden permitir el análisis in silico de las diferentes regiones de los HMA y el diseño de cebadores para estudios taxonómicos.

Listas de cebadores han sido reportadas y esa información se encuentra recopilada, en parte, por Covacevich (2010). Sin embargo, permanentemente nuevos reportes de cebadores son publicados. Por dicha razón, se recomienda la revisión actualizada de los mismos para estudios genéticos de HMA.

Técnicas moleculares para la identificación y caracterización de cepas de Trichoderma

Las especies del género *Trichoderma* comprenden un gran número de cepas fúngicas de importancia económica, principalmente como agentes de control biológico. Desde hace muchos años, se ha discutido los diferentes caracteres morfológicos que son utilizados para caracterizar y diferenciar las especies de *Trichoderma* (Rifai 1969, Samuels 2006). Diversos autores han hecho hincapié en las dificultades inherentes a la definición de las especies basadas en la identificación taxonómica. Por lo general se debe al estrecho rango de la variación morfológica de *Trichoderma*, o porque los términos descriptos para determinar, por ejemplo, el color o su patrón de variaciones no son lo suficientemente precisos para definir las diferencias entre especies.

El incremento en el número de aislamientos, la variabilidad fenotípica y su proximidad con *Hypocrea* y *Gliocladium* han dificultado la identificación por taxonomía clásica por lo que las tecnologías basadas en ácidos nucleicos triplicaron la cantidad de especies descritas de *Trichoderma*.

Varios métodos han sido empleados para la identificación molecular entre los que se encuentran la secuenciación a través de los ITS de los 5 intrones, del gen de la proteína que codifica para el factor de traducción de elongación *alfa1 (tef 1)* del gen que codifica para actina (*act*) ya que es una región codificante bastante conservada, la calmodulina (*cal42*) y un exón parcial del gen *ch2* para quitinasa.

Para la correcta identificación de especies del género *Trichoderma* el grupo de Druzhininia et al. (2005) desarrolló un sistema *on line*-eficiente para la identificación de géneros y especies de *Hypocrea* y *Trichoderma* denominado Barcode, el cual está basado en un código de barras de oligonucleótidos: es decir una combinación de diagnóstico de varios oligonucleótidos (distintivos) asignados específicamente dentro del espaciador transcrito interno 1 y 2 (ITS1 y 2) las secuencias de la repetición DNAr. La base de datos específica para el género *Hypocrea/*

Trichoderma, “Trichokey” de ISTH (del inglés *International Subcomission on Trichoderma and Hypocrea Taxonomy*) es una herramienta para la identificación molecular a nivel de especie (www.isth.info) También se utiliza la comparación con las secuencias depositadas en el NCBI a través del método BLAST, en el que se identifican las especies comparando las secuencias con las ya reportadas según el mejor hit o grado de identidad es mayor al 98 %.

Para la determinación de especie se han desarrollado cebadores específicos de PCR para detectar en particular cepas de *T. harzianum*. Rubio et al. (2005) desarrollaron dos oligonucleótidos (Q2413f y Q2413r) para detectar la cepa biocontroladora de *T. harzianum* 2413 en el suelo. El par de cebadores fue diseñado para el fragmento de 1,5 kb amplificado de *T. harzianum* 2413. El inconveniente de estos cebadores es que sólo es aplicable a la cepa *T. harzianum* 2413 en particular. Miyazaki et al. (2009) estudiaron como detectar directamente *T. harzianum* de cultivos de hongos comestibles infectados. Con este fin desarrollaron dos cebadores específicos, THITS-R3 y THITS-F2, para la detección por PCR de una amplia gama de cepas *T. harzianum* sobre la base de la secuencia de la región ITS.

A continuación se ejemplifican los marcadores que deben ser utilizados para el reconocimiento de especies de *Trichoderma* (tomado de la página http://www.isth.info/content.php?page_id=94)

Caso	<u>Marcador filogenético</u> (locus)	Herramientas a utilizar
<p>Ensayos de la biodiversidad a gran escala con un gran número de cepas de <i>Trichoderma</i> aisladas de varios lugares con cierto gradiente de condiciones;</p> <p>La identificación de las cepas individuales</p> <p>Control de identidad de la especie para aislamientos industriales</p> <p>La detección de ciertas especies <i>Hypocrea/Trichoderma</i> se distinguen por ITS1 y 2</p>	<p>ITS1 y 2 grupo de genes rRNA transcrito interno un marcador universal para hongos</p>	<p>Trico CLAVE Programa de oligonucleótidos de ADN</p>  <p>Ventajas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • da resultado la identificación absoluta • reconoce múltiples secuencias en formato FASTA • identifica el 95% de especies conocidas de <i>Hypocrea / Trichoderma</i> • amplificación por PCR de ITS1 y 2 • distingue potencialmente nuevas especies o alelos <p>Desventajas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • depende de la calidad de la secuencia y de lo completa que esté (ITS1 – 5.8S rRNA – ITS2) • no discrimina especies dentro de los complejos <i>konigii</i> y <i>Rufa</i> y no distingue

		<p><i>T. longibrachiatum</i> <i>H. orientalis</i> <i>T. tomentosum</i> <i>T. cerinum</i></p>
<p>La identificación de las cepas que no fueron identificados por <i>Tricho CLAVE</i> de especies de <i>Trichoderma</i> Sección <i>Trichoderma</i> Detección de nuevas especies</p>	<p><i>TEF1</i> Factor de elongación de traducción del gen que codifica la alfa-1</p>	 <p>Secuencia de herramientas de búsqueda de similitud <i>Tricho MARCA</i> y <i>Tricho BLAST</i></p> <p><i>Tricho MARCA</i>. El programa recupera los fragmentos más diagnósticos para la búsqueda de similitud posterior lo que aumenta significativamente la precisión de la búsqueda de similitud en <i>Tricho BLAST-NCBI BLAST</i> o <i>Tricho BLAST-</i> es un alineamiento local multiloci donde cada herramienta contra la base de datos verificada de <i>Hypocrea / Trichoderma</i> secuencias que incluye tres loci dentro del gen <i>TEF1</i> , ITS1 y 2 y <i>RPB2</i></p>

<p>La detección de una nueva especie</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>RPB2</i> <p>ARN polimerasa</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>TEF1</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>cal1</i> <p><i>calmodulina</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>chi18-5</i> <p>endoquitinasa 18-5 (ex <i>ech42</i>)</p>	<div data-bbox="548 199 845 406" style="text-align: center;"> <p>www.ISTH.info</p> <p>Multiloci database of phylogenetic markers</p> </div> <p>Análisis filogenético multiloci con secuencias de las especies más relacionadas permite</p> <ul style="list-style-type: none"> -Detectar vecinos próximos utilizando <i>Tricho</i> BLAST -Recuperar secuencias de secuencias correspondientes usando ISTH multiloci Base de datos de marcadores filogenéticos <p>Esta base de datos contiene sólo secuencias de todas las especies caracterizadas molecularmente de <i>Hypocrea/ Trichoderma</i>.</p> <p>En la base de datos se puede buscar por especie o nombre de locus, las secuencias pueden ser recuperadas en el formato FASTA es cual es adecuado para la posterior alineación y el análisis filogenético</p>
--	---	---

Uso de Marcadores moleculares utilizados para caracterizar la variabilidad genética intraespecífica

Un marcador molecular es cualquier característica que permita distinguir diferencias (denominados polimorfismos) en las secuencias de DNA. Los marcadores moleculares son cualquier fenotipo molecular oriundo de un gen expresado (ejemplo isoenzimas) o un segmento específico de DNA correspondientes a regiones expresadas o no del genoma.

Para determinar polimorfismo entre especies, en los últimos años se han generado numerosos protocolos basados en las reacciones de PCR. Muchas de ellas son sencillas y utilizan solo una pequeña cantidad de DNA. Las más ampliamente utilizadas son: la RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*), SSRs o microsatélite (*Simple Sequence Repeats*) y AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphic*) (Bornet y Branchard 2001). Los marcadores RAPDs son rápidos y fáciles de desarrollar; sin embargo son de difícil por ser una técnica muy sensible a las alteraciones de protocolo. El protocolo con AFLP es de mediana reproducibilidad, pero requiere una labor operacional intensiva y el desarrollo es de un costo medio. La técnica con microsatélites es específica y de alto polimorfismo, pero ellas requieren el conocimiento de las secuencias genómicas para diseñar los cebadores específicos.

La selección de la técnica de marcadores moleculares depende de su simplicidad y que sea reproducible. En 1994 se desarrolló una técnica llamada ISSR (*Inter simple sequence repeat*). Los ISSRs son marcadores semiarbitrarios, amplificados por PCR a partir de la presencia de un primer de alrededor de 15 bases complementarias a un microsatélite, diseñados para unirse a las repeticiones en tándem de di y trinucleótidos (Bornet y Branchard 2001). Los ISSRs evidencian los niveles de variación en las regiones microsatélite que se encuentran dispersas en varios genomas, particularmente el nuclear. Cada banda obtenida corresponde a secuencias de DNA delimitadas por 2

microsatélites invertidos. Presentan las ventajas de los marcadores RAPDs ya que son fáciles de utilizar y rápidos. Y además tienen la ventaja, de poseer una alta reproducibilidad, esto nos permite que los resultados obtenidos en distintos laboratorios sean comparables. La técnica ISSR se utiliza para estudios de diversidad genética, estudios taxonómicos (relaciones fenéticas), elaboración de mapas genéticos y mapeo de genes.

Estudios de diversidad genética de HMA y de Trichoderma

Un carácter que puede ser utilizado para distinguir entre especies es la variación entre secuencias de DNA de genes homólogos o regiones ribosomales. Una estrategia para estudios de diversidad genética, que puede ser aplicable a los HMA así como a otros microorganismos, es la denominada polimorfismo conformación de cadenas simples `PCR-SSCP` (del inglés *Single-strand conformation polymorphism*). En esta estrategia cadenas simples (desnaturalizadas) de amplicones de DNA (del mismo tamaño) se separan por una electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante. Los fragmentos se separarán en su corrida en el gel de acuerdo a diferencias en sus conformaciones espaciales, asociados a cambios en sus secuencias de DNA. En este sentido, los patrones obtenidos por la estrategia PCR-SSCP son el resultado de pequeños cambios en las secuencias de bases de las cadenas. Teóricamente, cada producto de PCR con diferente secuencia será representada por dos bandas correspondientes a las dos cadenas del segmento amplificado, en algunos casos puede realizarse una previa digestión de una de las cadenas.

La estrategia permite distinguir cambios conformacionales en amplificados (que pueden provenir de DNA de una o varias especies) de aproximadamente 100-300 pares de bases. Los estudios de Simon et al. (1993) fueron pioneros en demostrar cómo el uso de PCR acoplado a SSCP puede ser útil para detectar diferentes HMA en raíces. Luego Kjølner y

Rosendahl (2000) diseñaron primers específicos que permiten la detección de HMA (particularmente del género *Glomus*) en raíces micorrizadas mediante aplicación de la técnica PCR-SSCP. En general la subunidad ribosomal mayor (28 S rDNA) es la porción del genoma elegida como blanco para este tipo de estudios dado que este gen presenta variaciones que permiten distinguir entre especies de HMA (Sharmah et al. 2010).

Otra técnica ampliamente utilizada para el estudio de diversidad de HMA, *Trichoderma* así como de otros microorganismos, muchos de ellos no cultivables, es la denominada DGGE (del inglés *Denaturing gradient gel electrophoresis*) la cual fue inicialmente desarrollada para estudios de mutaciones en el área de la medicina. La separación de fragmentos de doble cadena de DNA amplificados (de una o varias especies) por la reacción de PCR se basa en la disminución de la movilidad de los mismos a través de gradientes crecientes de desnaturalizantes del gel de poliacrilamida. De Souza et al. (2004) utilizaron la técnica de DGGE para evaluar la diversidad de representantes de HMA del genero *Gigaspora*.

Otra estrategia utilizada para estudios de diversidad es la denominada T-RFLP (del inglés *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*). Esta técnica se fundamenta en la amplificación por PCR utilizando cebadores marcados con fluorescencia, los que ocasionaran amplicones marcados. Subsecuentes digestiones de los amplificados por enzimas de restricción pueden permitir el análisis de variación de secuencias tanto en muestras de DNA de una o varias especies (Dickie y Fitzjohn 2007).

Lineamientos generales para la realización de estudios de diversidad genética de HMA y Trichoderma por la estrategia SSCP

Para realizar estudios de diversidad genética por SSCP debe realizarse la amplificación por la cadena de la polimerasa. Para los HMA (tanto para estudios de SSCP como de DGGE), en

general se utiliza la estrategia de PCR anidada (o denominada en inglés *nested PCR*) (Sharmah et al. 2010).

Reacciones de PCR: se utilizan los reactivos y concentraciones de los mismos indicadas por el fabricante de la enzima utilizada. En la primera reacción de PCR, se utiliza como templado el DNA extraído oportunamente. En general, la primera reacción utiliza cebadores que amplifican parte de las regiones ribosomales de Hongos generales aunque en algunos casos se amplifican regiones de Eucariotas. En la segunda reacción se utiliza como templado parte del producto de PCR de la primera reacción, el que en general es diluido en agua (bidestilada o milliQ, autoclavada) en proporciones 1:10, 1:50; 1:100 de acuerdo a la intensidad de la banda obtenida en el gel de agarosa de verificación de la amplificación de la primera reacción de PCR (a mayor intensidad de banda, mayor dilución del amplificado). Los cebadores que se utilizan para la segunda reacción serán específicos del grupo sobre el cual se quieran hacer los estudios de diversidad. Para HMA pueden utilizarse cebadores y condiciones reportadas por van Tuinen et al. (1998); Kjølner y Rosendahl (2000) y Stukenbrock y Rosendahl (2005), entre otros. Para estudios de *Trichoderma* por SSCP pueden utilizarse cebadores y condiciones reportadas por White et al. (1990) y por Hagn et al. (2007). Las condiciones de la reacción de PCR serán diferentes de acuerdo a los cebadores y enzima polimerasa utilizados, por lo cual no se puede generalizar al respecto.

Para estudios por la estrategia DGGE, los fundamentos generales son los mismos y se recomienda consultar trabajos específicos para decidir los cebadores a utilizar y sus condiciones de amplificación. Sin embargo, cabe aclarar que debido a que el gel utilizado en la estrategia DGGE requiere del `anclado` de los amplificados desnaturalizados en el gel, los cebadores de la segunda reacción de PCR tendrán además de la secuencia específica deseada, una extensión de oligonucleótidos de aproximadamente 40 pares de bases GC (http://www.geocities.ws/jaleo0/9_electro6.htm).

Preparación de los geles SSCP y condiciones de corrida

Las corridas de los geles SSCP y DGGE se realizan de manera vertical. El equipamiento puede obtenerse de forma comercial o pueden adaptarse equipos para electroforesis vertical preexistente

Soluciones para gel SSCP

TBE 10X (1L):

Tris (hidroximetil) aminometano 108 g

Ácido bórico 55 g

Na₂EDTA 0,5M 40 mL

Procedimiento

- Disolver los reactivos en agua deionizada. Si no se disuelve bien, calentar la mezcla ligeramente.
- Ajustar a pH 8 con NaOH.
- Completar el volumen a 1L.
- Autoclavar. Conservar a temperatura ambiente.

Stock de persulfato amónico (APS) al 10%:

Disolver 10g de persulfato amónico en un volumen final de 100 ml de H₂O.

👉 Esta solución normalmente se prepara en el momento, pero también puede almacenarse en pequeñas alícuotas (1 mL) a -20°C.

TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina).

Preparación de los vidrios y montado del gel SSCP

Una de las placas de cristal es rectangular, mientras que la otra es un rectángulo más pequeño con dos salientes de vidrio que superponerse en el vidrio más grande. Antes de cargar el gel:

- Limpiar concienzudamente las placas de cristal, espaciadores, peine y aparato para hacer gradientes con

un detergente fuerte. Enjuagar los cristales con etanol y secar cuidadosamente.

- Para facilitar la adhesión del gel a una de las caras, el vidrio grande se trató con una solución hidrofílica mientras que la placa de vidrio chico se trata con solución hidrofóbica.
- Alinear los separadores (de 0,4 mm de espesor) sobre los extremos del vidrio grande y se montó sobre este el vidrio chico, con una superposición de unos 10 cm.

Preparación del gel MDE (del inglés *Mutation detection Enhanced* 0,5X; Cambrex, Rockland ME, USA)



El volumen a preparar dependerá del tamaño de los vidrios del sistema utilizado. Las proporciones que se indican son para vidrios de 32 x 45 cm.

Para un volumen final de 60 mL

- 15 mL MDE
- 3,6 mL TBE 10X
- 24 µL de Temed
- 240 µL APS

Llevar a un volumen final de 60 mL utilizando agua ultra pura

Montado del gel, sembrado de muestras y corrida electroforética

- Vertir el gel en el espacio entre los vidrios y colocar un peine invertido de manera que sus orificios queden al ras del vidrio pequeño. La forma de carga dependerá de como sea el sistema de carga (horizontal o vertical),
- Asegurar los vidrios con prensas (esto se hace luego de la carga en sistemas horizontales, mientras que antes en sistemas de carga verticales) y dejar polimerizar por al menos 2 horas.
- Colocar los vidrios con el gel polimerizado en la cámara de electroforesis

- Quitar el peine y colocarlo de manera tal que los `dientes` se inserten ligeramente en el gel.
- Se sembraron las muestras
- Antes de la siembra las muestras deben ser acondicionadas en un buffer de formamida (95% formamida; 0,05% azul bromo fenol; 0,05% xylene cyanol FF; y 20 mM EDTA) y desnaturalizadas a 94°C, durante 3 minutos. Mantener las muestras en frío desde la desnaturalización hasta la siembra.
- Realizar la corrida del gel en TBE 1X como buffer de corrida del gel, a 8W de potencia y a 300V durante 4hs
- Finalizada la corrida, retirar el sistema, separar los vidrios y teñir el gel adherido a la placa de vidrio. La tinción puede realizarse con plata de acuerdo a Benbouza et al. (2006).
- Los patrones de bandas de los geles pueden ser fotografiados y analizados utilizando softwares específicos.
- Las bandas de interés pueden ser cortadas del gel, el DNA extraído y reamplificado. El reamplificado purificado puede secuenciarse y se pueden comparar las secuencias obtenidas con bases públicas de datos (www.ncbi)

 Las condiciones de corrida pueden variar de acuerdo a la región del DNA que es estudiada, tipo de organismos en estudio, etc.

 El MDE presenta riesgos para la salud humana por lo que para su manipulación siempre debe trabajarse en cámara de extracción, usar guantes y evitar el contacto con la piel.
https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/msds/2012/S7585_MTR-NALT_MS.pdf

Consideraciones para estudios mediante DGGE

Para la realización de corridas electroforéticas utilizando la estrategia DGGE, varios de los fundamentos son comunes a los descriptos para SSCP. Sin embargo debe considerarse que el gel se prepara formando un gradiente de urea y formamida los que funcionarían como desnaturalizantes de los amplificadores durante la corrida electroforética. Además, la electroforesis por DGGE se realiza a temperatura constante de 60 °C.

Para detalles de realización de protocolo para geles de DGGE pueden consultarse las referencias específicas (http://www.geocities.ws/jaleo0/9_electro6.htm; <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/dgge.pdf>; entre otros).

Bibliografía

- Benbouza, H., Jacquemin, J.M., Baudoin, J.P., Mergeai, G., 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnology, Agronomy and Society Environment* 10, 77–81.
- Bornet, B., Bramchard, M., 2001. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19, 209–215.
- Brundrett, M.C. 2008. Mycorrhizal associations: The Web Resource. <http://mycorrhizas.info/vam.html#S3>
- Covacevich, F., 2010. Molecular tools for biodiversity and phylogenetic studies in mycorrhizas: The use of primers to detect arbuscular mycorrhizal fungi. *En: Perspectives in Mycorrhizal Research*. Ed. Thangadurai, E., Hijri, M., Busso, C.A. Bioscience Publications (ISBN 81-85589-07-0). Chapter13, 186-202.
- de Souza, F.A., Kowalchuk, G.A., Leeflang, P., van Venn JA Smith, E., 2004. PCR Denaturing Gradient Gel Electrophoresis profiling of inter- and intraspecies 18S

- rRNA gene sequence heterogeneity is an accurate and sensitive method to assess species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi of the genus *Gigaspora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1413-1424.
- Dickie, I.A., Fitzjohn, R.G., 2007. Using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) to identify mycorrhizal fungi: a methods review. *Mycorrhiza*, 17, 259-270.
- Druzhinina I.S., Kopchinskiy A.G., Komoń M., Bissett J., Szakacs G., Kubicek C.P., 2005 An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genet. Biol.* 42, 813–928
- Gardes, M., Bruns T.D., 1993. ITS cebadores with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2, 113-111.
- Goto, B.T., Maia, L.C., 2006. Glomerospores: a new denomination for the spores of Glomeromycota, a group molecularly distinct from the Zygomycota. *Mycotaxon* 96, 129–132.
- Grondona I., Hermosa MR., Tejada M., Gomis MD., Mateos PF., Bridge PD., Monte E., Garcia-Acha I. 1997. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soil borne fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3189–3198.
- Hagn, A., Wallisch, W., Radl, V., Munch, J.C., Schloter, M.A., 2007. A new cultivation independent approach to detect and monitor common *Trichoderma* species in soils. 2007. *Journal of Microbiological Methods* 69, 86-92.
- Jaklitsch, W.M., Samuels, G.J., Dodd, S.L., Lu, B.S., Druzhinina, I.S., 2006. *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. *Studies in Mycology* 55, 135–177.

- Kjøller, R., Rosendahl, S., 2000. Detection of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales) in roots by nested PCR and SSCP (single stranded conformation polymorphism). *Plant Soil* 226, 189–196.
- Krüger, M., Krüger, C., Walker, C., Stockinger, H., Schüßler, A., 2011. Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytologist*. doi:10.1111/j.1469-8137.2011.03962.x
- Miyazaki, K., Tsuchiya, Y., Okuda, T., 2009 Specific PCR assays for the detection of *Trichoderma harzianum* causing green mold disease during mushroom cultivation. *Mycoscience* 50, 94–99.
- Murray, M.G., Thompson WF., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA *Nucleic Acids Res.* 8, 4321–5.
- Öpik M, Moora M, Zobel M, Saks Ü, Wheatley R, et al. (2008) High diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreal, herb rich, coniferous forest. *New Phytologist* 179, 867–876. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02515.x
- Redecker, D., A. Schüßler, H. Stockinger, S. Stürmer, J. Morton, and C. Walker. 2013. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). *Mycorrhiza* doi:10.1007/s00572-013-0486-y.
- Renker, C., Heinrichs, J., Kaldorf, M., Buscot, F., 2003. Combining nested PCR and restriction digest of the internal transcribed spacer region to characterize arbuscular mycorrhizal fungi on roots from the field. *Mycorrhiza* 13, 191–198.
- Rifai, MA. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*. 116, 1-56.
- Rubio, MB., Hermosa, MR., Keck, E. Monte, E., 2005. Specific PCR assays for the detection and quantification of DNA from the biocontrol strain *Trichoderma harzianum* 2413 in soil. *Microbial Ecology* 49, 25–33

- Samuels, G. J. 2006. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology* 96, 195-206.
- Schüßler, A., Schwarzott, W.C., 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*. 105, 1413-1421.
- Sharmah, D., Jha DK., Pandey RR., 2010. Molecular approaches in arbuscular mycorrhizal research: a review. *Journal of Phytology* 2, 75-90.
- Simon, L., Levesque R.C., Lalonde, M. 1993. Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent single-stranded conformation polymorphism-polymerase chain reaction. *Applied Environmental Microbiology* 59, 4211-4215.
- Stukenbrock E.H., Rosendahl H., 2005. Clonal diversity and population genetic structure of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus* spp.) studied by multilocus genotyping of single spores *Molecular Ecology* 14, 743–752.
- Stürmer, S.L., 2012. A history of the taxonomy and systematics of arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the phylum Glomeromycota. *Mycorrhiza* 22, 247–258.
- van Tuinen, D., Zhao, B. Gianinazzi-Pearson, V. 1998 PCR instudies of AM fungi: from primer to application. In *Mycorrhiza Manual* (A. Varma, ed.): 387–399. Springer Verlag, Heidelberg.
- White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor J., 1990. Analysis of phylogenetic relationship by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press: New York, pp 315–322.

Consideraciones finales

En las últimas décadas se han abierto nuevas perspectivas en el empleo de productos biológicos para el manejo integrado de la agricultura, sobre todo en la protección de cultivos (biocontrol) y como fertilizantes (biofertilizantes). Sin embargo, en ocasiones, se desconocen los integrantes biológicos del sistema edáfico que podrían contribuir a la productividad vegetal y medioambiente, así como su potencialidad y funcionamiento. El estudio detallado de la biota edáfica podrá contribuir a entender cómo funcionan los sistemas biológicos integrados con el ambiente edáfico. En tal sentido, es imprescindible entender el rol que cumplen los microorganismos del suelo y en la compleja interacción planta-microorganismo que establecen. La integración de técnicas de estudio de la microbiología tradicional, junto con metodologías moleculares y genómicas, contribuirá a un mejor conocimiento del funcionamiento de las comunidades microbianas del suelo con el consiguiente potencial de aplicación biotecnológica.

En nuestro país, el estudio de microorganismos edáficos potenciales promotores de crecimiento vegetal con un enfoque biotecnológico está incrementando. Nuevos grupos de investigación están centrando sus objetivos de estudio en poblaciones microbianas que podrían ser utilizadas como bioinoculantes. Sin embargo, en ocasiones la disparidad en las técnicas utilizadas impiden la adecuada comparación de los resultados obtenidos.

Este Manual de Protocolos representa el compilado de distintas metodologías abordadas para el estudio de dos grupos de microorganismos reconocidos como promotores de crecimiento vegetal y sostenedores del equilibrio edáfico: los Hongos Micorrízico Arbusculares y *Trichoderma*. El fin del mismo ha sido facilitar el reconocimiento, estudio y el manejo de estos organismos impulsando su conocimiento. De esta manera esperamos contribuir a incentivar e incrementar el entendimiento y uso de estos microorganismos con fines biotecnológicos en el marco de un manejo sustentable.



 PANTONE 396 C  PANTONE 375 C  PANTONE 306 C  PANTONE 7693 C

EmbioTec®
Empresa de Bio Tecnología

