



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

**Facultad de ingeniería en mecánica y ciencias de la
producción**

Micorrizas arbusculares en la agricultura

INFORME DE PASANTIAS

CIBE-ESPOL AREA DE AGRICULTURA ORGANICA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

Previo la obtención del título de:

TECNOLOGO EN AGRICULTURA

Presentada por:
Jaime Gabriel Vargas Caicedo

GUAYAQUIL-ECUADOR

Año: 2005

AGRADECIMIENTO



Al Programa de Maestría en
Biotecnología Agrícola. Por
haberme permitido obtener
conocimiento de todos los trabajos
realizados en este y al director.
Ing. Alberto Ortega Urrutia

DEDICATORIA

Con mucho cariño a mis hermanos

Dr. Galo, Isabel y Alexandra.

A mi Señora Madre Isabel Caicedo

Barzola y a la memoria de mi

Padre Sr. Galo Vargas Pérez

TRIBUNAL DE GRADUACION



Ing. Eduardo Rivadeneira P.
DECANO DE LA FIMCP



Ing. Marcelo Espinosa L.
Coord. Del PROTAG



ING. MARIO BALON M.
PROFESOR DELEGADO
PROTAG

DECLARACION EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de este informe de practicas, me corresponde exclusivamente y el Patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL”

Jaime Vargas Caicedo
Jaime Vargas Caicedo

RESUMEN

El presente informe tiene la finalidad de dar a conocer los trabajos realizados durante estancia del autor, En el PMBA, área de agricultura orgánica y particularmente en el laboratorio de microbiología donde se ejecutaron estudios de las micorrizas además una compilación sobre estos hongos, citados por su gran importancia en la agricultura, una de las principales características es la simbiosis existente entre el hongo y la raíz de la planta. Esta interacción determina un mayor crecimiento así como una mejor respuesta de la planta ante las distintas condiciones de estrés producidas por la influencia del ecosistema donde se implanta. Su investigación, aislamiento y uso como bio-abono abre nuevos horizontes en el campo de la agricultura, la reforestación, el cultivo de plantas ornamentales, etc. En una sociedad en la que cada día se tiene en cuenta más la conservación del medio ambiente, la introducción de manera controlada de esta simbiosis contribuye además a la conservación y establecimiento de los sistemas agrícolas sostenibles; puesto que contribuye al control de enfermedades de la planta; basada en el antagonismo entre microorganismos, determinando el menor uso de productos químicos, nocivos para la salud y el medio ambiente

INDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	VI
INDICE GENERAL.....	VII
INDICE DE LAS FIGURAS.....	IX
INTRODUCCION.....	X

CAPITULO 1

LAS MICORRIZAS ASPECTOS GENERALES.....	12
1.1. Descripción.....	15
1.2. Tipo y características.	15
1.2.1. Descripción de las ectomicorrizas.....	18
1.2.2. Descripción de las endomicorrizas.....	20
1.2.3. Otros Tipos de Micorrizas.....	22
1.2.4. Principales Géneros en los Hongos Micorrizicos.....	24
1.3 Morfología y desarrollo de la simbiosis M.A.....	24

CAPITULO 2

INTERACCIÓN ENTRE LAS MICORRIZAS Y LA MICROBIOTA DEL

SUELO.....	28
2.1.metodología para la inoculación de plantas.....	30
2.2. Forma de colonización.....	32

2.3. especificad en la formación de micorrizas.....	37
---	----

CAPITULO 3

EFFECTOS DE LAS M.A. EN LAS PLANTAS.....	39
---	-----------

3.1. Importancia del Fósforo en las Plantas.....	44
--	----

CAPITULO 4

APLICACIÓN DE M.A. EN LA AGRICULTURA.....	46
--	-----------

4.1 Importancia del uso y Aplicación de M.A.....	47
--	----

4.2 Beneficios por la Aplicación de M.A.....	49
--	----

CAPITULO 5

METODOLOGIAS EMPLEADAS PARA EL ESTUDIO DE M.A.....	52
---	-----------

5.1 Aislamiento y Conteo de Esporas.....	53
--	----

5.1.1. Proceso de aislamiento de esporas.....	54
---	----

5.2. Proceso de tinción de raíces.	56
---	----

CONCLUSIONES.....	59
-------------------	----

RECOMENDACIONES.....	60
----------------------	----

BIBLIOGRAFIA.....	62
-------------------	----

INDICE DE FIGURAS

Figura. 1.1. Ectomicorrizas forma en que el Micelio invade en La Raíz.	16
Figura. 1.2. Vista externa de Mycorrizas producidas por <i>Glomus sp.</i>	17
Figura. 1.3. Vista interna de Mycorrizas producidas por <i>Glomus sp.</i>	17
Figura. 1.4. Raíces modificadas por ectomicorrizas.	19
Figura. 1.5. Vesículas de micorriza en una raíz de banano.	21
Figura. 1.6. Arbusculos de <i>Glomus mosseae</i> en la corteza de una raíz.....	21
Figura. 1.7. Representación esquemática de los tipos de micorriza.	23
Figura. 1.8. Micorrizas vesiculoarbusculares (VAM)......	25
<i>Figura. 1.9. Fragmento de raíz colonizado.</i>	27
Figura. 2.1. Efecto de la inoculación temprana con micorrizas.	31
Figura. 2.2. Proceso de infección de las raíces con micorrizas.	33
Figura. 2.3. Estructuras morfológicas de las micorrizas.....	34
Figura. 3.1. Efecto de la inoculación temprana con micorrizas.....	40
Figura. 5.1. Muestreo en campo.....	53
Figura. 5.2. Tamices utilizados para el aislamiento de esporas.....	55
Figura. 5.3. Vista al microscopio a 40x en el conteo de esporas.....	55
Figura. 5.4. Proceso de tinción de raíces.....	58
Figura. 5.2. Proceso de tinción de raíces.....	58
Figura. 5.3. Efecto de la tinción en raíz de banano.....	63

INTRODUCCIÓN

El mayor significado agronómico de las micorrizas es el aumentar el volumen de suelo explorado por las raíces para tomar elementos de lenta difusión tales como fósforo, zinc y cobre, principalmente. El hongo por su parte recibe de la planta azúcares provenientes de la fotosíntesis. La dependencia de las plantas a las micorrizas para tomar P del suelo estaría relacionada a las características de la raíz de la planta (Baylis 1975, St John 1980), es decir, especies con raíces gruesas y sin pelos radiculares son más dependientes a las micorrizas ya que el micelio del hongo cumpliría la función de tomar el P y otros nutrimentos del suelo.

Los estudios más recientes, muestran los efectos benéficos de las Micorrizas Arbusculares (MA) en el mejoramiento de la aclimatación de plantas, en la reducción de la mortalidad de plantas ornamentales y frutales, al crecer en sustratos con bajos contenidos de fósforo y buena aireación, que se reflejan en un incremento del peso seco de hojas y raíces, así como una floración significativamente más precoz utilizando micorrizas (*mosseae*, *intraradices* y *viscosum*) que en plantas no micorrizadas, (Olivares y Barea, 1991; Fortuna, et al., 1996).

Existen miles de especies de hongos micorrícicos que forman esta simbiosis con los árboles. La mayoría de las familias de plantas superiores de la Tierra

forman micorrizas. En el ámbito mundial, se reportan múltiples experiencias acerca de los beneficios de las micorrizas arbusculares (MA) sobre especies frutales, donde frecuentemente se compara el crecimiento de plantas micorrizadas con no micorrizadas, estas diferencias son atribuibles a una mayor absorción de nutrientes, mayores niveles en la producción de hormonas y mayores contenidos de clorofila (Godar, Awasthi y Kaith, 1996; Lovelock, kyllo, et al., 1997).



CAPITULO 1

LAS MICORRIZAS ASPECTOS GENERALES

Nombre que hace referencia a la simbiosis hongo-raíz ("myces-rhiza"). Esta simbiosis es un fenómeno general en los vegetales.

Las micorrizas fueron descubiertas por el botánico alemán Frank en 1885, en las raíces de algunos árboles forestales; recién en 1900 el francés Bernard puso de manifiesto su importancia estudiando las orquídeas. Las micorrizas eran consideradas excepciones, pero ahora se sabe que casi la totalidad de las plantas verdes, con algunas excepciones, viven en simbiosis con hongos. Y esto es así para musgos, helechos y Fanerogamas. Las primeras que despertaron interés fueron las micorrizas de los árboles forestales, y aunque las de las plantas cultivadas comenzaron a estudiarse en 1910, es recién después de los trabajos de Mosse en Inglaterra, 1955, cuando se empieza a reconocer la importancia y la generalidad de esta simbiosis.

Se conoce con el nombre de micorriza a la asociación mutualista establecida entre las raíces de la mayoría de las plantas (tanto cultivadas como silvestres) y ciertos hongos del suelo. Se trata de una simbiosis prácticamente universal, no sólo porque casi todas las especies vegetales son susceptibles de ser micorrizadas sino también porque puede estar presente en la mayoría de los hábitats naturales. Las micorrizas son tan antiguas como las propias plantas y se conoce su existencia desde hace más de cien años; estimándose que aproximadamente el 95% de las especies vegetales conocidas establecen de forma natural y constante este tipo de simbiosis con hongos del suelo. El mutualismo supone una relación beneficiosa para los dos organismos implicados, y tanto el hongo como la planta se ven favorecidos por la asociación: el hongo coloniza la raíz de la planta y le proporciona nutrientes minerales y agua, que extrae del suelo por medio de su red externa de hifas, mientras que la planta suministra al hongo sustratos energéticos y carbohidratos que elabora a través de la fotosíntesis. Existen siete tipos de micorrizas que se han clasificado, siguiendo criterios estructurales, funcionales y taxonómicos, en: Ectomicorrizas, Endomicorrizas o Micorrizas Arbusculares (MA), Ectendomicorrizas, Arbutoides, Monotropoides, Ericoides y Orquidioides. En cuanto a las estructuras formadas, al tipo de colonización y a la cantidad de especies vegetales fúngicas implicadas, se puede decir que las micorrizas arbusculares son las



de mayor importancia y las que más ampliamente se encuentran distribuidas (tanto a nivel geográfico como dentro del Reino Vegetal).

Los estudios más recientes, muestran los efectos benéficos de las Micorrizas Arbusculares (MA) en el mejoramiento de la aclimatación de plantas micropropagadas (manzana, durazno), en la reducción de la mortalidad de plantas ornamentales y frutales, al crecer en sustratos con bajos contenidos de fósforo y buena aireación, que se reflejan en un incremento del peso seco de hojas y raíces, así como una floración significativamente más precoz utilizando micorrizas del género *Glomus* (*mosseae*, *intraradices* y *viscosum*) que en plantas no micorrizadas, (Olivares y Barea, 1991; Fortuna, et al., 1996).

Estas diferencias se han observado en especies tropicales como *Mora Excelsa*, *Prioria copaifera* en Caribe (Trinidad y Tobago y Panamá), y en múltiples árboles tropicales de la familia Fabacea, dicotiledóneas y angiosperma (Torti, et al., 1997). Otros autores reportan beneficios en especies como Chirimoya (Azcón y Barea, 1997), en *Tamarindus indica*, *Parkia biglobosa*, *Sclerocaria birrea*, *Balanites aegypticae*, *Adansonia digitata*, *Codyla pinnatta*, *Saba senegalensis*, *Landolfia heudelotti*, *Dialium Guineensis*, *Anacardium occidentale*, *Afsellia africana*, y *Aphala seneganensis*. (Ba Amadou, 1998).

1.1. DESCRIPCION

Nombre que hace referencia a la simbiosis hongo-raíz ("myces-rhiza"). Esta simbiosis es un fenómeno general en los vegetales. El término micorriza describe globalmente toda una serie de estructuras formadas por las asociaciones que se establecen entre varios géneros de hongos de suelo y las raíces de la mayoría de las plantas vasculares (Frank, 1.885), e incluso se han descrito sobre plantas no vasculares. Al ser un fenómeno tan extendido el término «micorrizas» se ha convertido a nivel de usuarios en el nombre con el que se designan a los hongos implicados en su formación, aunque tal denominación no sea muy correcta, esas mismas rutinas coloquiales han llevado a acuñar términos como «micorrizar»: poner en contacto los hongos micorrícicos con plantas y «micorrización»: para indicar el establecimiento de la simbiosis.

1.2. TIPO Y CARACTERISTICAS

Aproximadamente unas 5.000 especies de hongos con carpóforos (principalmente Basidiomycetes) están asociadas a árboles forestales en regiones boreales y templadas, estableciendo un tipo de micorrizas. Las raíces de los árboles de las selvas tropicales, de los árboles frutales, y de casi la totalidad de las demás plantas verdes están asociadas a hongos inferiores, la mayoría microscópicos y que no producen carpóforos típicos. Estos hongos, aunque presentes en casi

todo el planeta, asociados con casi todas las plantas verdes, establecen otro tipo de micorrizas y no pertenecen más que a 6 géneros y alrededor de un centenar de especies.

Generalmente se clasifican en dos grandes grupos ectomicorrizas (Fig.1.1.), que viven en el exterior de la raíz formando una capa que las envuelve (manto) y endomicorrizas (Fig. 1.2. y 1.3.), que viven en el interior de las raíces.

Estas últimas se han dividido en varios grupos de los que el mas importante es el de las llamadas vesículoarbusculares (VA), que se han encontrado en todos los continentes (excepto la Antártida) y que colonizan a una gran cantidad de especies vegetales. La característica de estos hongos y de donde procede su nombre son los arbusculos y las vesículas



Figura. 1.1. En las ectomicorrizas el micelio invade la raíz sin entrar en el interior de las células, de aquí el nombre de ectomicorrizas.



Figura. 1.2. Vista externa de Mycorrizas producidas por *Glomus sp.*

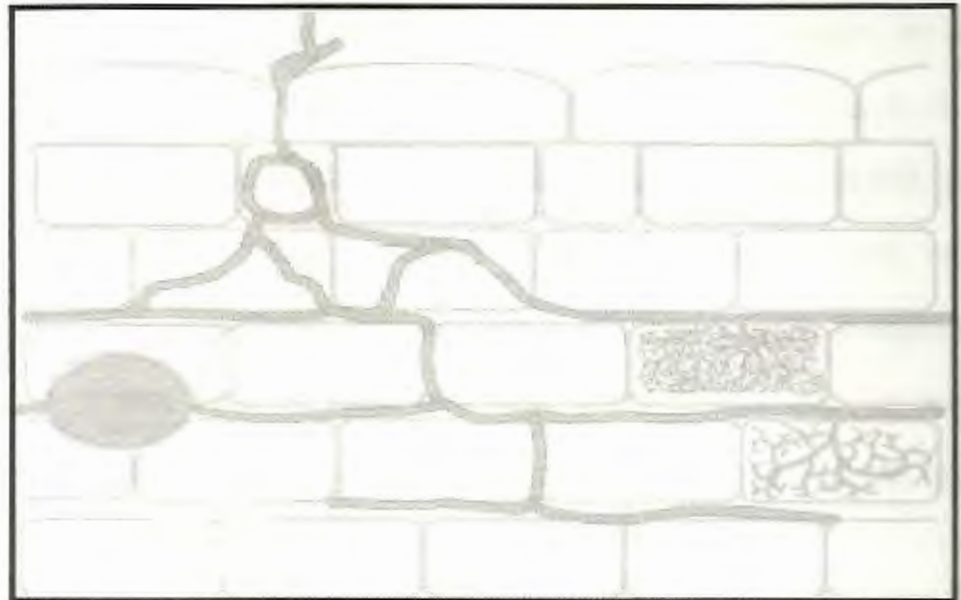


Figura. 1.3. Vista interna de Mycorrizas producidas por *Glomus sp.*

En las endomicorizas el micelio invade la raíz, inicialmente es intercelular, pero luego penetra en el interior de las células radicales, desde la rizodermis hasta las células corticales.

1.2.1. Descripción de las Ectomicorrizas

Las ectomicorrizas Como ya se ha dicho, crecen en el exterior de las raíces formando una auténtica capa que envuelve a aquellas y que se llama el manto creciendo hacia el interior entre las células formando retícula que recibe el nombre de "red de Harting" (Fig. 1.4.)

en general son bastante específicas, lo que quiere decir que una especie de hongo solo puede vivir con una o unas pocas especies de plantas. Si bien un gran número de plantas pueden formar tanto endo como ecto micorrizas, estas últimas son características de: Pinaceae, Betulaceae y Fagaceae. en general sobreviven solo durante cortos períodos de tiempo si no están sobre una raíz viva y además aunque sus esporas pueden germinar (con dificultad), sin contacto con una raíz, su crecimiento es muy limitado y si no encuentra enseguida una raíz, mueren. Para simplificar supondremos que: La micorriza solo sobrevive en raíces o trozos de raíz cortados, por períodos muy cortos de tiempo (2 a 10 días).

Las esporas sólo germinan en contacto con una raíz y las esporas sin germinar tienen un período de viabilidad también corto. Además los hongos de este grupo son además específicos

a la planta, en general específicos al medio (suelo, clima, etc.) y en general mucho más sensibles a las agresiones externas que las endomicorrizas.

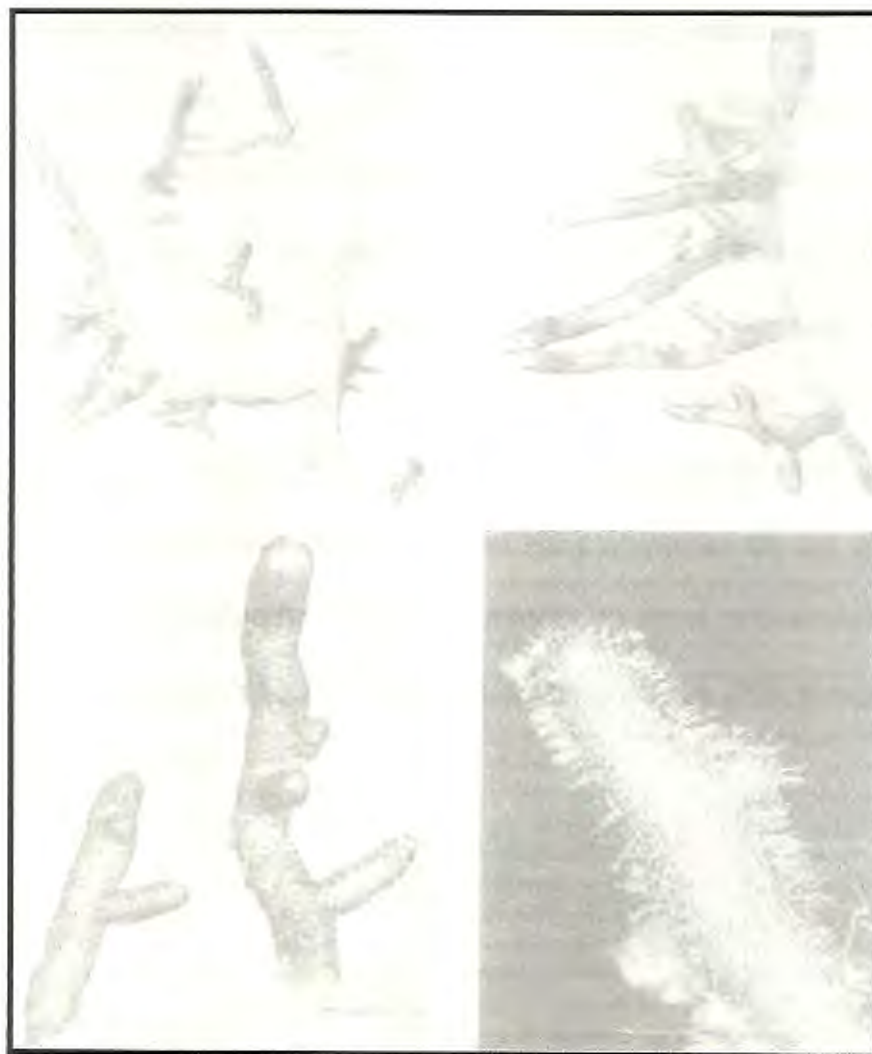


Figura. 1.4. Racíces modificadas en la ectomicorriza formada por un hongo desconocido sobre *Fagus sylvatica*.

1.2.2. Descripción de Las Endomicorrizas

Son poco específicas, lo que quiere decir que una especie puede infectar a un gran número de especies vegetales. Son mucho menos sensibles a las agresiones externas que las ectomicorrizas, sus esporas germinan con facilidad alejadas de raíces vivas y pueden crecer considerablemente sin contacto con ninguna raíz, lo que les permite localizar a éstas y pueden sobrevivir durante dilatados períodos de tiempo (meses) sobre trozos de raíz si otras condiciones no son adversas (Fig. 1.5.). Como su nombre indica viven en el interior de la raíz, en los espacios intercelulares y si emiten hifas al interior de las células que se subdividen formando estructuras en árbol (arbúsculo) (Fig. 1.6) dan origen al grupo de hongos mycorrícicos más abundante que se conoce.

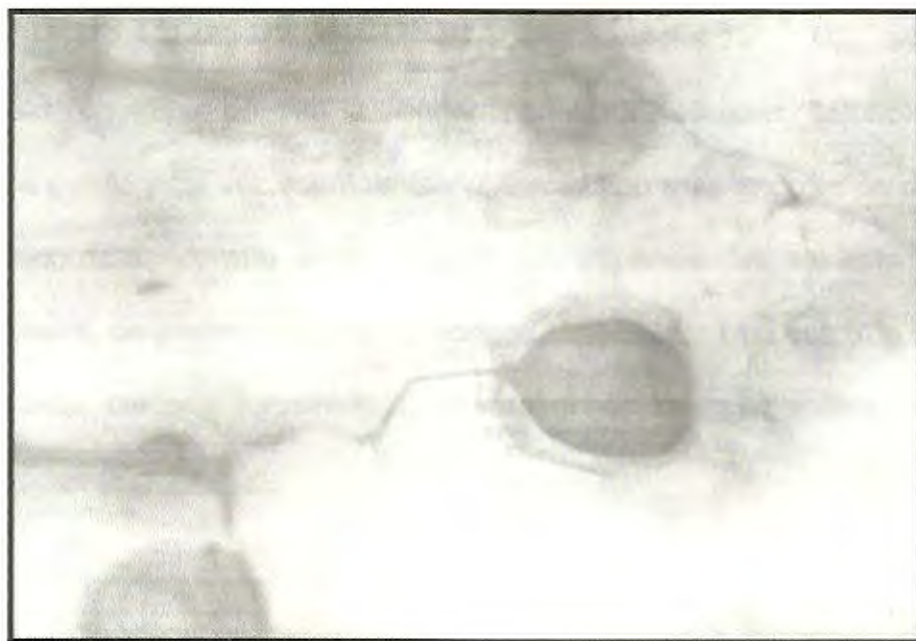


Figura 1.5. Vesículas de micorriza en una raíz de banano foto tomada del programa de biotecnología en agricultura



Figura. 1.6. Arbusculos de *Glomus mosseae* en la corteza de una raíz de *Allium porrum*.

1.2.3. OTROS TIPOS DE MICORRIZAS

Las orquídeas poseen las endomicorizas orquidioides, llamadas de oville, y tal vez representan el tercer tipo mas importante de micorrizas, ya que estas plantas son dependientes en estado juvenil, de protocorno, de su hongos simbioses. Una vez que la planta crece y fotosintetiza, generalmente se independiza del hongo (Fig.1.7.).

- Ectendomicorizas, donde se puede apreciar la formación de un manto, junto con la penetración de hifas a las células.
- Ericoides, son las más sencillas, con raíces muy simples e hifas penetrando en las células para formar ovillos.
- Arbutoides, donde también tenemos un manto externo junto con hifas que penetran a las células para formar rulos
- Monotropoides, diferenciada apenas por la forma de penetración de las hifas a las células radicales.



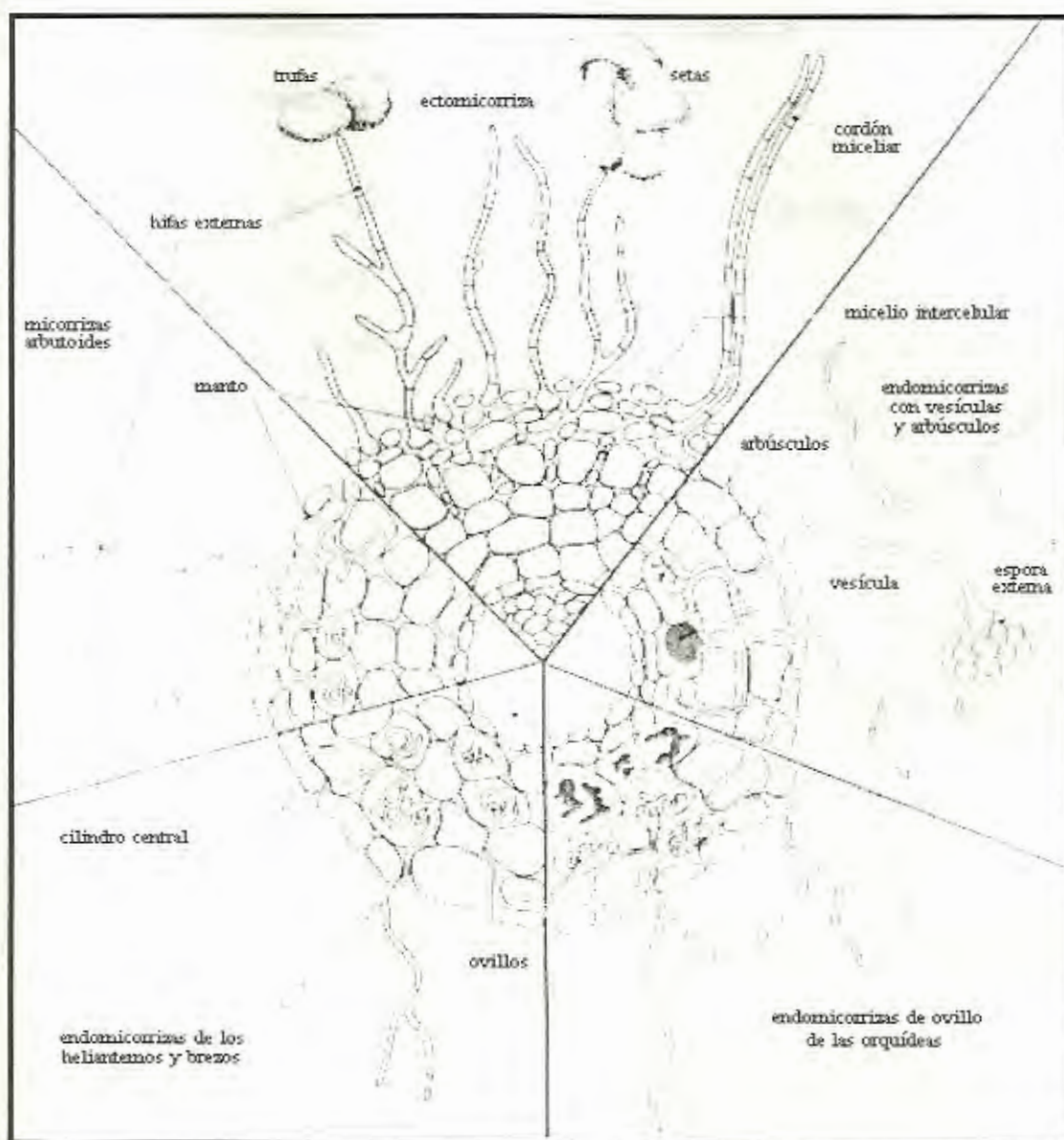


Figura. 1.7. Representación esquemática de los distintos tipos de micorriza y las estructuras típicas formadas

1.2.4. PRINCIPALES GENEROS EN LOS HONGOS

MICORRICOS

- En las ectomicorrizas: *Suillus*, *Cortinarius*, *Rhizopogon*, *Cenococcuym*, *Telefona*, *Pisolithus*.
- En las orquideomicorrizas: *Armillariella*, *Gymnopilus*, *Marasmius*, *Fomes*, *Xerotus*, *Ceratobasidium*, *Corticium*, *Sebacina*, *Tulasnella*.
- En las ericomorrizas: *Pezizella*.
- En las micorrizas arbusculares: *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Sclerocystis* y *Scutellospora*.
- En las ectendomicorrizas: *Endogone*.

1.3. Morfología y desarrollo de la simbiosis MA

La colonización del hongo se extiende por la epidermis y el parénquima cortical, nunca penetra en la endodermis ni en los tejidos vasculares y meristemáticos (Harley y Smith, 1983); estableciendo una marcada diferencia con las infecciones radicales de hongos patógenos que sí penetran en los haces conductores y meristemas.

El proceso de formación de la simbiosis comienza con la germinación de las esporas de resistencia en el suelo, cuando las condiciones ambientales de temperatura y humedad son favorables (Bolan y Abbott, 1983). Tras la emisión del tubo o tubos germinativos, el micelio del

hongo crece hasta encontrar una raíz hospedadora, donde forma entonces una estructura similar a un apresorio y penetra entre las células epidérmicas o a través de los pelos radicales. Después de la penetración comienza la colonización del tejido parenquimático de la raíz (Fig. 1.8.). En la capa interna de este tejido se forman los arbusculos, producidos por una ramificación masiva de la hifa después de penetrar la pared celular.

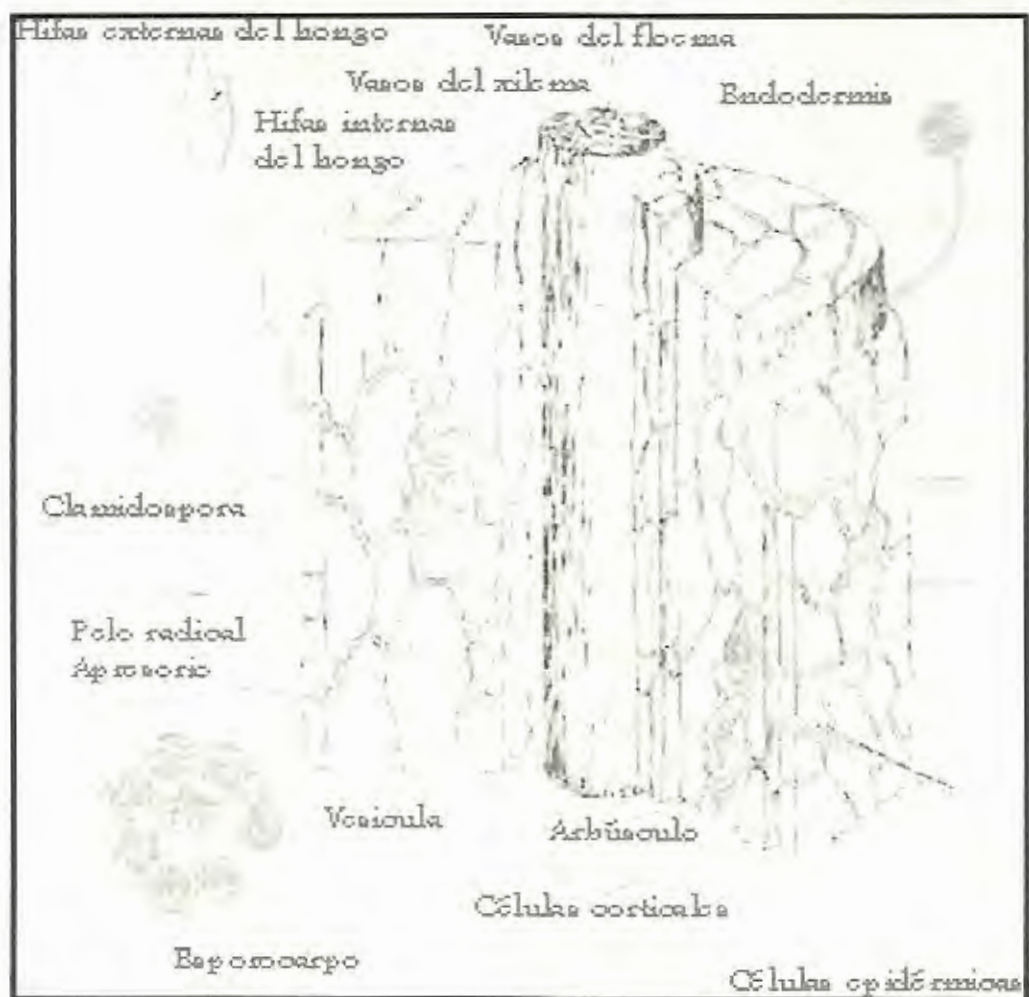


Figura. 1.8. Micorrizas vesículoarbusculares (VAM).

La hifa ramificada se encuentra rodeada por la membrana plasmática de las células del parénquima cortical, siendo el espacio apoplástico producido entre la membrana plasmática y el hongo la zona de intercambio de nutrientes. La vida de los arbuscúlos es muy corta, inferior a 15 días (David, 1994). Las vesículas se forman generalmente en los extremos de las hifas del hongo y pueden producirse a lo largo de todo el parénquima cortical colonizado; suelen aparecer más tarde que los arbuscúlos y son consideradas órganos de reserva, principalmente de lípidos (Beilby y Kidby, 1980; Cooper y Lösel, 1978).

La colonización del hongo puede extenderse también mediante hifas exteriores (runners) por la superficie de la raíz y penetrar en ésta a intervalos irregulares (Sieverding, 1991).

Cuando la infección interna está bien establecida, las hifas del hongo pueden crecer externamente desde la raíz de la planta hacia el suelo (micelio externo) y explorar un volumen de suelo inaccesible a las raíces (Fig. 1.9.); con ello la planta aumenta considerablemente su superficie de absorción, de 100 a 1000 veces (Gil, 1995), y por tanto su capacidad de captación de nutrientes y de agua.

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares producen, normalmente, esporas a partir del micelio externo, y también en algunos casos, las forman en el interior de la raíz a partir de micelio interno. Las

esporas de resistencia pueden permanecer inalteradas en el suelo por mucho tiempo, mientras que las hifas del hongo se colapsan tras una permanencia en suelo de 2 a 4 semanas si no encuentran una raíz hospedadora, (Bolan y Abbott, 1983).



Figura. 1.9. Vista al microscopio óptico de un fragmento de raíz colonizado por el hongo formador de micorrizas arbusculares *Glomus* sp. .foto tomada del Programa de Maestría en Biotecnología Agrícola





CAPITULO 2

INTERACCIONES ENTRE LAS MICORRIZAS Y LA MICROBIÓTICA DEL SUELO

La existencia de estos hongos en el suelo hace que se produzcan una serie de interacciones con otros microorganismos que viven también en ese hábitat. La micorrizosfera es la rizosfera de una planta micorrizada, y es en ella donde se producen las interacciones que se pueden resumir como: Interacciones con microorganismos beneficiosos y con funciones específicas, e Interacciones con patógenos. Entre los microorganismos beneficiosos podemos citar a las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), a las bacterias fijadoras de nitrógeno (tanto libres como simbiotes), a los actinomicetos y a algunos hongos saprofitos que actúan como antagonistas de patógenos del suelo y que pueden ser empleados para el control biológico. En muchos casos las interacciones establecidas son de tipo positivo, llegándose a registrar un efecto de sinergismo, donde la presencia de la MA y del otro microorganismo produce un incremento del crecimiento,

vigor y protección de la planta. Se han propuesto una serie de mecanismos a través de los cuales ocurre la interacción micorrizas/patógenos, ya que no se ha demostrado nunca que los hongos MA actúen directamente sobre éstos, ya sea por antagonismo, antibiosis, o por depredación, sino que su efecto es indirecto. Los mecanismos son los siguientes (Azcón-Aguilar y Barea (1996):

- Cambios en la nutrición de la planta hospedadora
- Alteraciones en la exudación radicular. Un mejor estado nutricional de la planta puede variar sus exudados y alterar así las poblaciones de microorganismos, ya sea por alteraciones en la germinación de esporas de hongos patógenos y su penetración, que en la mayoría de los casos se produce por estímulos de las propias exudaciones radiculares.

- puede cambiar la atracción quimiostática de los nematodos hacia la raíz.
- Activación de los mecanismos de defensa de las plantas mediante la inducción de la producción de determinados metabolitos secundarios en las raíces como ligninas, fenoles, fitoalexinas, etileno, quitinasa y peroxidas (Gianinazzi- Pearson et al., 1994; Morandi, 1996).

- Competencia por los sitios de infección en la raíz.
- Competencia por los fotosintatos del hospedador.

Con respecto a estos dos mecanismos, podemos decir que la inoculación temprana de las plantas puede garantizar una menor penetración de

patógenos radiculares. Incremento de la tolerancia de las plantas a patógenos del suelo. Esta puede estar dada por una compensación de los daños ocasionados por los mismos.

2.1. Metodología para la inoculación de plantas

La metodología más comúnmente utilizada en la inoculación de hongos formadores de micorriza arbuscular es la de depositar una determinada cantidad de inóculo debajo del sistema radical de la planta que se quiere micorrizar (las cantidades de inóculo dependerán del tamaño y edad de la planta, y del sitio donde éstas crecerán; además de la rapidez con que interese llegar a la formación de la simbiosis). También es factible mezclar el inóculo con el sustrato de cultivo, a pesar de que las cantidades de inóculo requeridas siempre resultarán mayores.

El contacto directo del sistema radicular de la planta con los propágulos del hongo permite una más rápida colonización de la raíz. A manera de resumen se puede plantear que los beneficios de la inoculación temprana con hongos formadores de micorriza arbuscular repercuten en una reducción del aporte de fertilizantes y fitosanitarios, un ahorro del suministro del agua, un mayor crecimiento y producción de las plantas, una mayor supervivencia a las condiciones de estrés y un mejor aprovechamiento de los suelos (Fig. 2.1.).



Figura. 2.1. Efecto de la inoculación temprana con micorrizas sobre el crecimiento de bananos. Plantas trampas para micorrizas sin fertilización. Foto tomada de trabajo de tesis del maestrante David pacheco

2.2. FORMA DE COLONIZACION

La colonización del hongo a la raíz de la planta puede ser originada por el micelio precedido por la germinación de esporas de resistencia que permanecen en el suelo. Las clamidiosporas que resisten condiciones adversas en el suelo, germinan frecuentemente a circunstancias favorables, emitiendo un tubo germinal, tubo que muere a no ser que encuentre y penetre con éxito en una raíz (Fig. 2.2.). La presencia de un sistema micelial, integrado por dos fases, un micelio externo, el cual coloniza el suelo, cuya extensión puede ser considerable, sin embargo esta característica varía, y un micelio interno que se ubica dentro de la corteza de las raíces micorrizadas (Harley, 1983; Smith, 1988).

La presencia de micelio externo constituye uno de los principales pilares de la asociación, ya que estas hifas se desarrollan más allá del suelo que circunda la raíz, trascienden la rizósfera y transportan nutrimentos directamente a la planta. Se presentan dos tipos de hifas extramatriciales: las hifas de avance "runner" en el suelo y las hifas absorbentes (Harley, 1983).

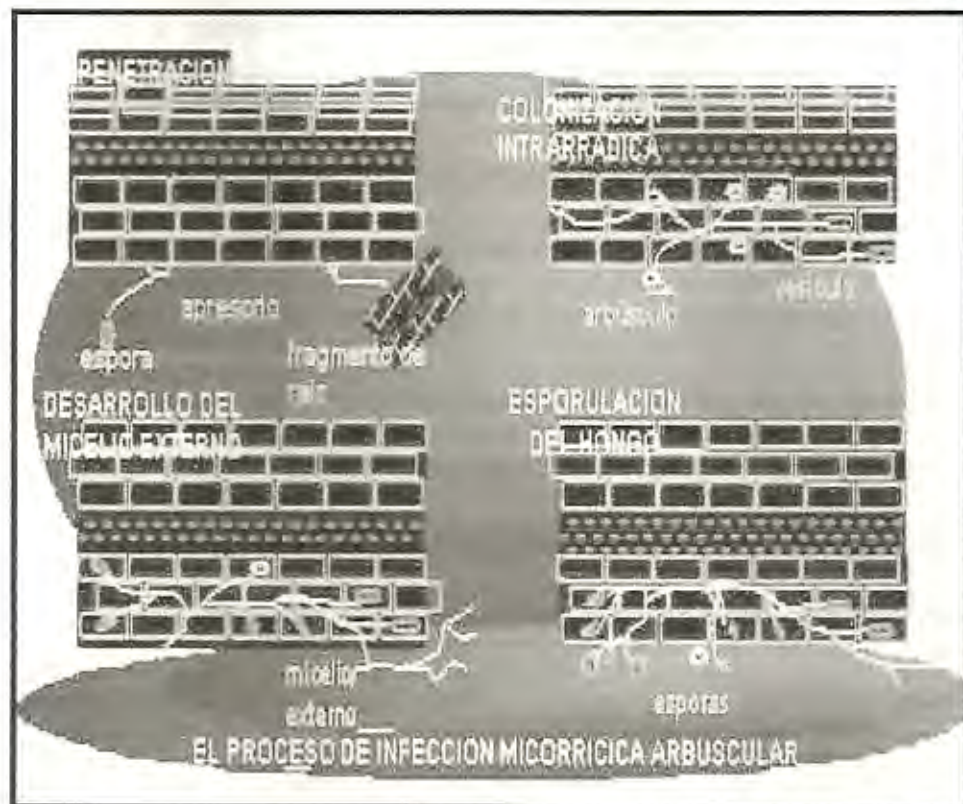


Figura. 2.2. Proceso de infección de las raíces con micorrizas vesiculo arbusculares.

Las primeras son de paredes gruesas, grandes, con proyecciones angulares muy definidas, las cuales siguen la trayectoria de las raíces en el suelo, o en algunos casos, simplemente crecen a través del suelo en busca de ellas; estas aunque absorben nutrientes, su función primordial aparentemente, es de soporte y base permanente de la red micelial. Las hifas que penetran las raíces se inician a partir de estas hifas de avance. Las hifas absorbentes de paredes más finas, se

desarrollan a partir de las de avance y se dividen dicotómicamente extendiéndose en el suelo, son las componentes del hongo que absorben los nutrimentos para transportarlos al hospedero. Su escaso diámetro les permite explorar los poros más finos del suelo, especialmente cuando estos tienen altos contenidos de arcillas y materia orgánica. No se conoce aún la distancia a la cual puede extenderse. Dada la alta relación área/volumen que genera su presencia, el micelio externo de la endomicorriza arbuscular permite que la planta pueda explorar intensamente un gran volumen de suelo (Baon, 1992).

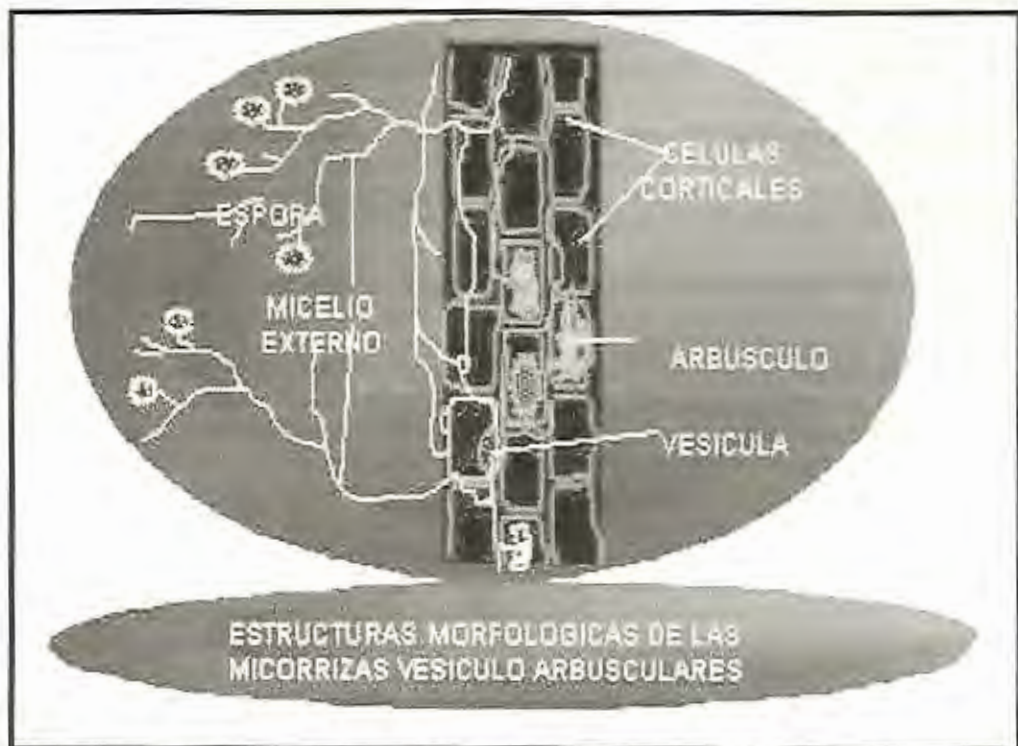


Figura 2.3. Estructuras morfológicas de las micorrizas vesículo arbuscular

A partir del micelio externo del hongo se pueden formar células auxiliares aisladas o agrupadas, cuya función no se ha determinado totalmente y grandes esporas de resistencia de paredes gruesas, las cuales pueden sobrevivir por años y cuya germinación inicia un nuevo ciclo de la simbiosis. El desarrollo de micelio interno se inicia cuando una clamidospora entra en contacto con la raíz, forman un apresorio, penetra la epidermis desarrollando hifas que crecen intra e intercelularmente. Forman enrollamientos al interior de algunas células del hospedero, extendiendo la infección longitudinalmente en la raíz, penetran a las células más internas de la corteza (Baon,1992). En este lugar, a partir de hifas intercelulares, se forman ramificaciones laterales que trascienden las paredes de las células del hospedero, cuyo plasmalema se invagina y rodea totalmente la estructura fungosa, la cual una vez en el interior de la célula, se ramifica en forma dicotómica repetidamente, dando lugar a una estructura tridimensional arborescente que se ha denominado arbúsculo. En la zona de contacto hospedero-arbúsculo se forma una matriz interfacial, en donde se ha comprobado ocurre la mayor transferencia de nutrimentos entre los asociados.

Algunos géneros de micorrizas arbusculares producen vesículas, las cuales consisten en ensanchamientos de hifas, que se disponen inter o intracelularmente, ocupando posiciones terminales o intermedias en las

hifas. Las vesículas se desarrollan posterior a los arbusculos, en las regiones más antiguas de la infección y contienen material lipídico, por lo cual se las ha aceptado comúnmente como órganos de almacenamiento de algunos de los hongos micorrizógenos arbusculares. Estas estructuras poseen una pared fina, que puede espesarse en algunas ocasiones, transformándose en clamidiospora. El hecho de encontrarlas asociadas con raíces viejas o muertas, sugiere que también desempeñan un papel como órganos de reposo o de propagación del hongo. Esta estructura la forman todos los hongos micorrizógenos arbusculares, con excepción de los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora* (Harley, 1983; Smith, 1988). La asociación simbiótica beneficia a la planta con un incremento en la altura, vigor, área foliar y mejora el estado nutricional en la parte aérea. En la raíz ocurren cambios anatómicos y citológicos. La asociación ocasiona cambios en la organización celular del meristemo apical y cilindro vascular de las raíces, en ellas se detiene la actividad meristemática, haciendo decrecer el índice mitótico medio y la síntesis de ADN Y ARN Formándose un tejido parenquimatoso en los ápices radicales. En contraste, los núcleos de las células corticales activados por el hongo están totalmente diferenciados e involucrados directamente con la cromatina en comparación con las células no infectadas (Baon, 1992).



En las células corticales colonizadas se realizan alteraciones en su organización que varían de acuerdo a su localización, lo que condiciona también al hongo. En conjunto, se ha encontrado que la forma y el tamaño de los núcleos se ven influenciados por la simbiosis, registrándose que se torna de mayor tamaño que los de los controles no micorrizados, sin que esto sea el resultado de una endorreducción del ADN, igualmente se rodean durante periodos de máxima actividad del hongo y se localiza centralmente.

2.3. Especificidad en la formación de micorrizas

Las asociaciones micorrícicas se producen sobre casi todas las plantas vasculares con algunas excepciones como las familias Crucíferas, Quenopodiáceas, Ciperáceas, Cariofiláceas y Juncáceas (Azcón-Aguilar y Barea, 1997) y también se establecen en Briofitas y Pteridofitas, aunque existe poca información sobre estas simbiosis con plantas no vasculares (Moser y Haselwandter, 1983). Entre las plantas vasculares colonizadas por «micorrizas» se encuentran todas las especies leñosas de interés forestal (Fagáceas, Betuláceas, Pináceas, etc.), todas las especies de interés hortícola (Solanáceas, Gramíneas, etc.) y muchas familias de importancia ornamental (Orquidiáceas, Rosáceas...). Esto da una clara idea de la

importancia ecológica y económica de las micorrizas. Si bien las asociaciones micorrícicas se consideran en general no específicas, es decir que cualquier hongo simbiote puede colonizar cualquier planta receptiva, existen sin embargo «preferencias» o una mejor afinidad-compatibilidad entre determinadas parejas hongo/planta. En contraste existen también casos como en *Eucaliptus*, *Malus*, *Arbutus* (Meyer, 1973) en que la total inespecificidad asociativa hace que estas y otras especies estén colonizadas al mismo tiempo por formaciones tan distintas como ectomicorrizas y endomicorrizas.



CAPITULO 3

EFFECTOS DE LAS M.A. SOBRE EL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS

El efecto más importante que producen las MA en las plantas es un incremento en la absorción de nutrientes minerales del suelo (Fig. 3.1.), que se traduce en un mayor crecimiento y desarrollo de las mismas. La expansión del micelio externo del hongo por el suelo rizosférico es la causa principal de este efecto, permitiendo la captación de los nutrientes más allá de la zona de agotamiento que se crea alrededor de las raíces, por la propia absorción de la planta (Jakobsen, 1992; Sanders y Tinker, 1973).



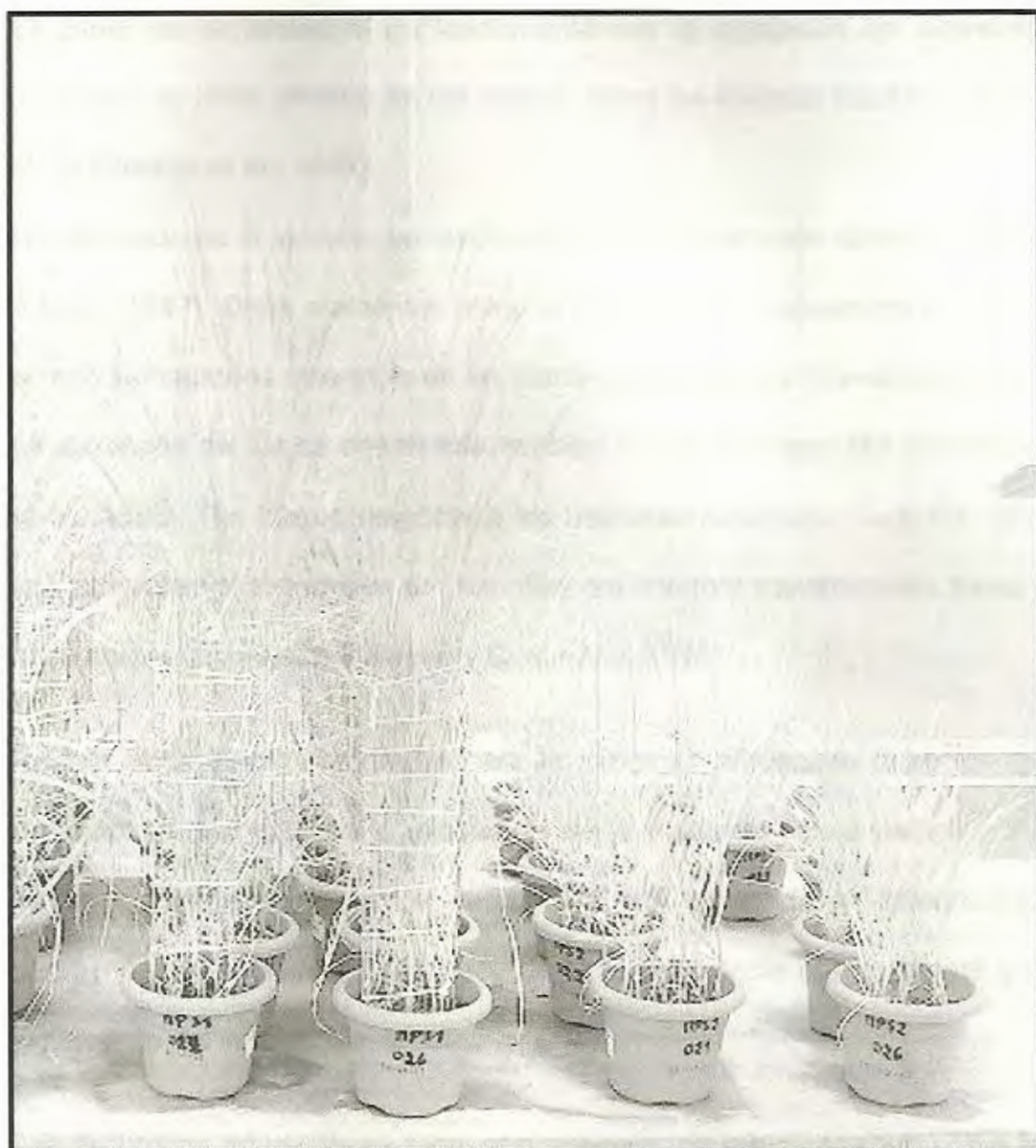


Figura. 3.1. Efecto de la inoculación temprana con micorrizas sobre el crecimiento de bananos. Plantas trampa para micorrizas sin fertilización. Foto tomada de trabajo de tesis del maestrante David pacheco

El papel de la simbiosis es fundamental en la captación de elementos minerales de lenta difusión en los suelos, como los fosfatos solubles, el Zn y el Cu (George et al., 1992).

La absorción de N también se favorece con la micorrización (Barea y Azcón-Aguilar, 1987). Otros elementos como el K y el Mg se encuentran a menudo en concentraciones más altas en las plantas micorrizadas (Sieverding, 1991). La absorción del Ca es estimulada también con la simbiosis MA (Plenchette et al., 1983). Por lo que respecta a los microelementos Zn, Cu y Bo, éstos son activamente absorbidos por las hifas del hongo y transportados hasta el hospedador (Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1983).

Existen otros efectos producidos por la micorriza arbuscular entre los que destacan un aumento de la resistencia de la planta al estrés hídrico y a la salinidad, un aumento de la resistencia y/o tolerancia a determinados patógenos del suelo, un incremento de la supervivencia al transplante y un incremento del volumen de la raíz.

Las micorrizas arbusculares producen, además, un efecto positivo sobre las características edáficas. Una planta micorrizada que crece en suelos arenosos es capaz de agregar más partículas de suelo en sus raíces por unidad de masa que una planta no micorrizada (Sieverding, 1991). La formación de agregados del suelo puede ser un factor importante para disminuir su erosión. Otra condición limitante del suelo es el exceso de

caliza, que contribuye a la fijación de oligoelementos, especialmente el hierro (Fe), cuya deficiencia causa la clorosis férrica.

En relación a esta sintomatología, se ha podido observar que plantas de ciruelo micorrizadas acumulan más hierro en sus tejidos foliares que plantas no micorrizadas (Pinochet et al., 1998 a).

Barea y Azcón-Aguilar (1982) demostraron que es capaz de producir compuestos de naturaleza hormonal, aunque se desconoce si estos compuestos son absorbidos por la planta hospedadora. Las MA alteran el nivel de sustancias reguladoras del crecimiento en los tejidos de las plantas (Allen et al., 1982) y su transporte de unos tejidos a otros (Dixon et al., 1988). En árboles frutales se ha observado un adelanto en la ruptura de la latencia en los brotes de estacas micorrizadas. En la mayoría de los casos parece existir un efecto hormonal, pero resulta extremadamente difícil diferenciar los efectos producidos por las hormonas del hongo, los producidos por las hormonas vegetales y los producidos indirectamente por el estado nutricional de las plantas como consecuencia de la micorrización.

La citoquinina, además de promover la síntesis de proteínas (especialmente en los retoños), la división y la expansión celular (Van Staden y Davey, 1979),

puede desempeñar un papel importante como mediador de la correlación entre las concentraciones de fósforo y las funciones de la planta como pueden ser: el desarrollo vegetativo, la fotosíntesis y el almacenamiento de almidón. Se dice que estas fitohormonas son las mediadoras más importantes de la infección con Endomicorrizas por ser sintetizadas primariamente en los meristemas radicales. Un aumento en el número y actividad de los primordios, puede inducir un aumento en la producción de citoquinina. La micorrización, al igual que la aplicación de fósforo al suelo, produce un aumento del crecimiento de la planta y de la raíz, y por tanto del número de extremos o primordios radicales. Se plantea que los niveles de etileno que estimulan la formación y desarrollo de las MA pueden estar relacionados con la resistencia de la planta hospedadora a factores de estrés del suelo (Ishii y Kadoya, 1994). Bajos niveles de etileno producidos por estrés en la planta, parecen inhibir temporalmente el crecimiento de las raíces, pero al mismo tiempo se promueve la actividad del hongo micorrícico en la rizosfera, con lo que se minimiza el efecto estresante sobre la planta. La consecuencia de la acción del hongo es una alteración positiva del equilibrio hormonal de la planta que favorece su estado fisiológico y nutricional.



3.1. IMPORTANCIA DEL FOSFORO (p) EN LA PLANTA

El fósforo es esencial para el crecimiento de las plantas y es absorbido casi enteramente en forma inorgánica. No existe otro nutriente que pueda sustituirlo. Es uno de los tres nutrientes principales, (N, K). Aunque de los elementos primarios es el requerido en menor cantidad, la disponibilidad de este, en la mayor parte de los suelos agrícolas del trópico, es limitada (Bhat, 1973). El fósforo es constituyente de ácidos nucleicos, fosfolípidos, vitaminas, es indispensable en procesos donde hay transporte, almacenamiento y transformación de energía; actúa también en la fotosíntesis, respiración, división y elongación celular. Otras de sus funciones son las de estimular la formación temprana y el crecimiento de las raíces, intervenir en la formación de los órganos de reproducción de las plantas; es vital para la formación de semillas; acelera la maduración de los frutos en los cuales generalmente se almacena en altas concentraciones (Guerrero, 1991; Brokes, 1984).

El primer síntoma por falta de fósforo es el de una planta atrofiada, las hojas pueden deformarse, con deficiencias severas, se pueden producir áreas necróticas en las hojas, frutos y tallos, los síntomas generales son: germinación y crecimiento lentos, el crecimiento de la parte aérea y de las raíces se reduce. Tallos cortos y delgados, pérdida del color verde del follaje y desarrollo de una coloración verde azulosa, color

púrpura en el follaje, al margen, posteriormente estos pueden secarse y morir, las hojas son pequeñas, la defoliación prematura comienza por las más viejas. Las deficiencias de fósforo traen como consecuencia una baja producción, del cultivo (Sánchez, 1981).

El origen tanto orgánico como mineral del fósforo en el suelo, supone que los procesos responsables del suministro a la planta sea de naturaleza química y biológica. Esto supone que la cuantificación de la disponibilidad de fósforo para la planta sea particularmente difícil. El predominio de una y otra forma en la solución del suelo depende del pH; bajo condiciones ácidas predomina $H_2P_04^-$ y en condiciones alcalinas HP_4^- existiendo un equilibrio entre las dos formas, cuando el pH está cercano a la neutralidad. Ambas formas son igualmente disponibles a las plantas, pero su concentración en el suelo es muy pequeña (Guerrero, 1996; Fassbender, 1989).



CAPITULO 4

APLICACIÓN DE M.A. EN LA AGRICULTURA



La dependencia de la micorrización es el grado hasta el cual una planta depende de la condición de estar micorrizada para obtener un crecimiento óptimo a un determinado nivel de fertilidad de suelo (Gerdemann, 1975).

Se han realizado numerosos estudios en los que se demuestra que la inoculación artificial con hongos MA a especies de interés agrícola, incrementa la nutrición y el crecimiento de la planta, y le permite a su vez superar situaciones de estrés biótico y abiótico (Calvet y Camprubi 1996 a; Francl, 1993; Perrin, 1991).

Los efectos beneficiosos de la introducción artificial de inóculo micorrícico resultan más evidentes en suelos donde las poblaciones de hongos MA nativos no existen, o han sido eliminadas por empleo de prácticas agrícolas desfavorables para su desarrollo como la fumigación del suelo y el cultivo

intensivo. La micorrización temprana de las plantas puede ser también interesante en situaciones en que la cantidad de inóculo MA en el suelo agrícola sea muy baja o por la existencia de un cultivo anterior no hospedador, y/o donde las poblaciones autóctonas no sean lo suficientemente agresivas y eficaces (Rhodes, 1984; Sieverding, 1991).

Se ha demostrado un efecto beneficioso de la inoculación temprana para la mayoría de los cultivos hortícolas y para los cítricos (Camprubí et al., 1995, 1994; Grandison y Cooper, 1986; MacGuidwin, 1985; O'Bannon et al., 1979; Smith y Kaplan, 1988).

Los beneficios económicos se derivan de una mayor y más uniforme producción, una mayor rapidez de crecimiento y entrada en producción de las plantas, una mejor calidad de la cosecha y un ahorro en fertilizantes, riego y productos fitosanitarios.

4.1. IMPORTANCIA DEL USO Y APLICACIÓN DE M.A.

El uso de tecnologías apropiadas facilita que este enorme potencial pueda ser aprovechado para la producción competitiva y sostenible de las regiones. En la actualidad, la producción comercial para el consumo en fresco o para la agroindustria requiere superar múltiples limitantes, que se manifiestan a lo largo de toda la cadena productiva, desde la



selección de materiales genéticos adaptados a condiciones agroecológicas específicas, en el manejo de plantas propagadas a partir de vivero o por técnicas de micropropagación al ser transplantadas a condiciones de campo, debido al desconocimiento de los mecanismos de adaptabilidad o aclimatación de estas especies, que se refleja en pérdidas en la producción, uso excesivo de insumos fertilizantes y pesticidas, que aumentan los costos de producción y afectan la competitividad de estas especies, hasta la cosecha y poscosecha que incluye procesos agroindustriales.

Adicionalmente, la mayoría de las tecnologías existentes corresponden a especies de plantas adaptadas a condiciones de zona templada y subtropical, como a zonas mediterráneas. Las especies tropicales en su mayoría cuentan con escaso conocimiento y poco desarrollo de tecnologías apropiadas, la mayoría de las cuales han sido desarrollada a partir del conocimiento empírico de los productores y que debe ser revisado y validado por la ciencia y la tecnología.

Aparte de su interés científico: estudios de tipo fisiológico en plantas, en microbiología, aplicaciones a la biotecnología en la producción comercial hortofrutícola y ornamental, son de destacar su aplicación a procesos de reforestación-revegetación (Salamanca et al., 1992) y de recuperación de zonas áridas y de suelos Degradados (Daft et al.,



1975). Otra de las aplicaciones punteras es fácil de deducir de todo lo dicho, su aplicación en el control biológico contra agentes patógenos de la rizosfera. Pero el mejor motivo para trabajar con ellas y la mayor satisfacción que ofrecen a sus manipuladores es la obtención de plantas VÍgorosas y sanas.

4.2. Beneficios por Aplicación de Micorrizas.

Las micorrizas son asociaciones entre la mayoría de las plantas existentes, con hongos benéficos, que permiten incrementar el volumen de la raíz y por tanto permiten una mayor exploración de la rizósfera y son consideradas los componentes más activos de los órganos de absorción de nutrientes de la planta, la que a su vez provee al hongo simbiote, de nutrientes orgánicos y de un nicho protector.

Las asociaciones simbióticas establecidas por las plantas y los hongos pertenecientes a los Zigomicetos, orden de los Glomales, más conocidas como micorrizas arbusculares, son consideradas en la actualidad a nivel mundial como biofertilizantes, bioprotectores y bioreguladores para la mayoría de cultivos y ya hacen parte del manejo integrado de suelos y de plagas, así como del manejo de los materiales micropropagados en el área de la biotecnología vegetal (Azcón y Barea, 1.997).



Es ampliamente conocida la multitud de ventajas que tiene una planta micorrizada con respecto a una que no lo esté.

Entre éstas ventajas, se encuentran:

- Contribución a la nutrición mineral de la planta, en especial a su aporte de fósforo, por absorción, translocación y transferencia; en la nutrición nitrogenada de la planta, y en la adquisición de otros nutrientes como zinc y cobre, y se considera que probablemente, podrían translocar potasio, calcio, magnesio y azufre.
- Control biológico para algunos patógenos provenientes de suelo, e incremento de la tolerancia de la planta a patógenos.
- Efecto positivo sobre el desarrollo y distribución de biomasa. Mejoramiento de la tolerancia a condiciones de estrés hídrico y salinidad.
- Influencia sobre la fotosíntesis de la planta hospedera.
- Producción de hormonas estimulantes o reguladoras de crecimiento vegetal
- Incremento en la relación parte aérea/raíz de la planta micorrizada
- Aportes en recuperación de suelos por ser formadores de agregados del suelo



- Uso potencial en suelos degradados o áridos en programas de revegetación
- Mayor absorción de agua. Los hongos con su micelio externo ocupa una superficie de suelo que llega a ser 100 veces el de las raíces, mejorando notablemente la cantidad de agua que se pone a disposición de las plantas.
- Resistencia a la desecación. Las raíces micorrizadas demás resisten mucho mejor la desecación que aquellas que no lo están.
- Interacción positiva con fijadores libres y simbióticos de nitrógeno y otros microorganismos de la rizósfera (Olivares y Barea, 1.991)

La simbiosis de endomicorriza arbuscular debe ser considerada como un elemento esencial para promover sanidad y productividad en los cultivos de importancia económica como el que ocupa éste proyecto. Beneficios máximos serán obtenidos si se inocula con hongos micorrizógenos eficientes y si se hace una selección de combinaciones compatibles de hongo - planta - suelo. En general, cuanto más temprano se establezca la simbiosis, mayor el beneficio. (Azcón y Barea, 1.997)



CAPITULO 5

METODOLOGÍAS EMPLEADAS PARA EL ESTUDIO DE MICORRIZAS ARBUSCULARES

Para la evaluación de Hongos Micorrízicos arbusculares (HMA) se han desarrollado diversas metodologías tendientes al entendimiento de la ecología y funcionamiento de esta asociación simbiótica.

Estas incluyen el aislamiento de esporas a partir de suelo, la tinción diferencial de raíces para evidenciar la colonización y metodologías moleculares para la identificación y taxonomía.



5.1. AISLAMIENTO Y CONTEO DE ESPORAS

Para una buena evaluación, es básico realizar un muestreo que sea representativo. El muestreo debe hacerse a una profundidad entre 0 y 20 cm. en forma de "X" o "W" (Fig. 5.1.). Las muestras realizadas en los diferentes puntos de muestreo seleccionados se deben mezclar y homogenizar completamente.

La muestra debe secarse a temperatura ambiente hasta obtener el mínimo de humedad. Se toman entre 10 y 100 gramos de suelo, según las necesidades del estudio y se realiza el aislamiento de las esporas se realiza siguiendo la metodología de sedimentación decantación y tamizaje



figura. 5.1. Muestreo en campo

5.1.1. PROCESO DE AISLAMIENTO DE ESPORAS

1. Tomar de 1 a 10 gramos de suelo seco y colocarlos en un recipiente de 4lt, adicionando aproximadamente 2000 ml de agua.
2. Agitar con la mano por 3 minutos. Después de transcurrido este tiempo, dejar sedimentar o hasta que el agua este quieta luego se decanta el agua vertiéndola sobre los tamices previamente ubicados (500 μ m, 250 μ m y 38 μ m) debajo de un recipiente de 4lt
3. pasar el agua recolectada en el recipiente inferior para lavar el contenido del tamiz superior, y nuevamente recolectar el agua este paso debe repetirse por tres veces
4. Del tamiz de 38 m recoger con cuidado la interfase y verter en un tubo de centrifuga de 50ml con 10 a 20ml de agua.
5. se procede al conteo de las esporas con la ayuda de un estereoscopio a 40X y 100x para su identificación





Figura. 5.2. Tamices utilizados para el aislamiento de esporas
foto tomada del programa de Mestria en biotecnología agrícola

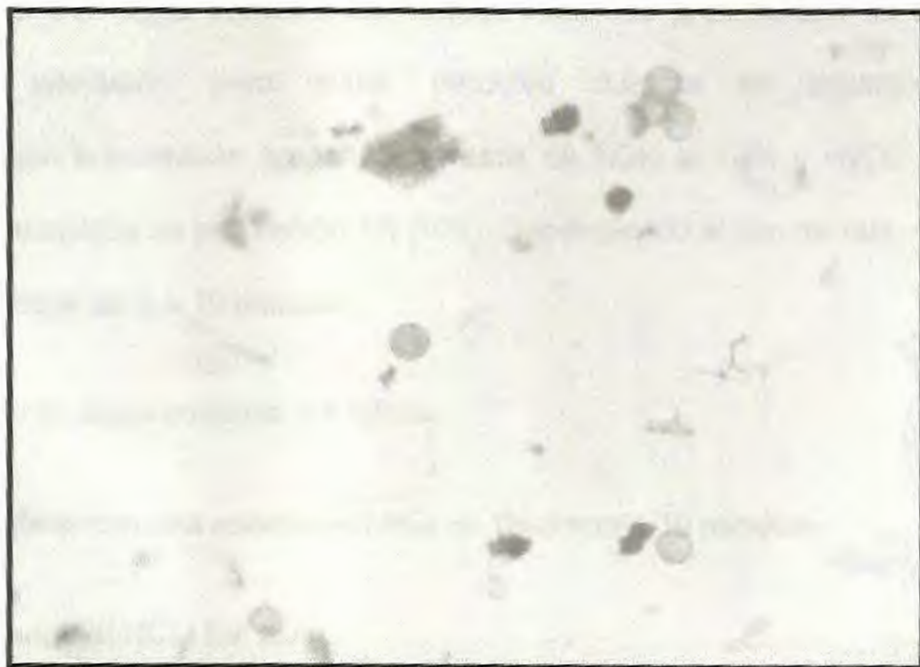


Figura.5.3. Vista al microscopio a 40x en el conteo de esporas
foto tomada del trabajo de tesis del maestrante licd. David
pacheco

5.2. PROCESO DE TINCION DE RAICES

El método utilizado para la tinción de raíces micorrizadas es el de tinción con Azul de Tripan, descrito por Phillips y Hayman (1970) y que el procedimiento es el siguiente:

1. Lavar las raíces con abundante agua corriente.
2. Cubrir las raíces con solución de KOH al 10%.
3. En esta solución, colocarlas al baño de María (90°C) durante 10 a 15 minutos.
4. Lavar con agua corriente las raíces, utilizando preferiblemente un tamiz adecuado para evitar perdidas durante el enjuague.
5. Lavado e inmersión en solución fresca de KOH al 10% y H₂O₂ al 10% mezclados en proporción 1:1 (V/V). Dependiendo el tipo de raiz, se deben dejar de 5 a 10 minutos.
6. Lavar en agua corriente las raíces.
7. Acidificar con una solución de HCL al 1N durante 10 minutos.
8. Decantar el HCL. Sin lavar.
9. Adicionar el Azul de Tripan al 0.05% y colocar las raíces al baño de María por 10 minutos.



10. Retirar el colorante y guardarlo en un recipiente.
11. Lavar las raíces en agua destilada y dejarlas en ácido láctico 12 horas para eliminar el exceso de colorante.
12. Montar en lamina y laminilla, 10 raíces de más o menos 1 cm. de largo cada una.
13. Observar al microscopio

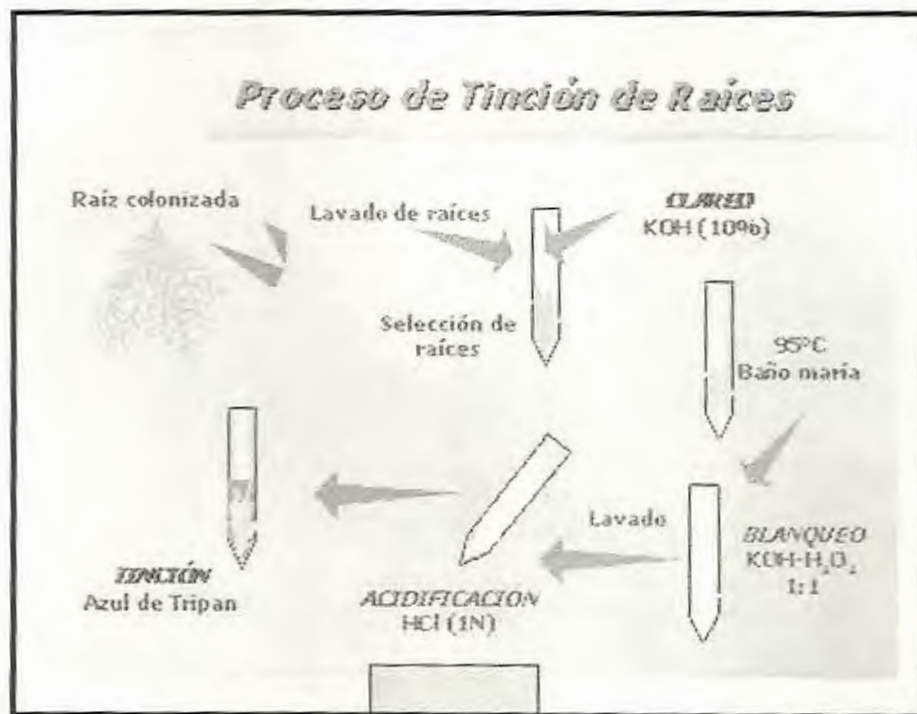


figura.5.4.

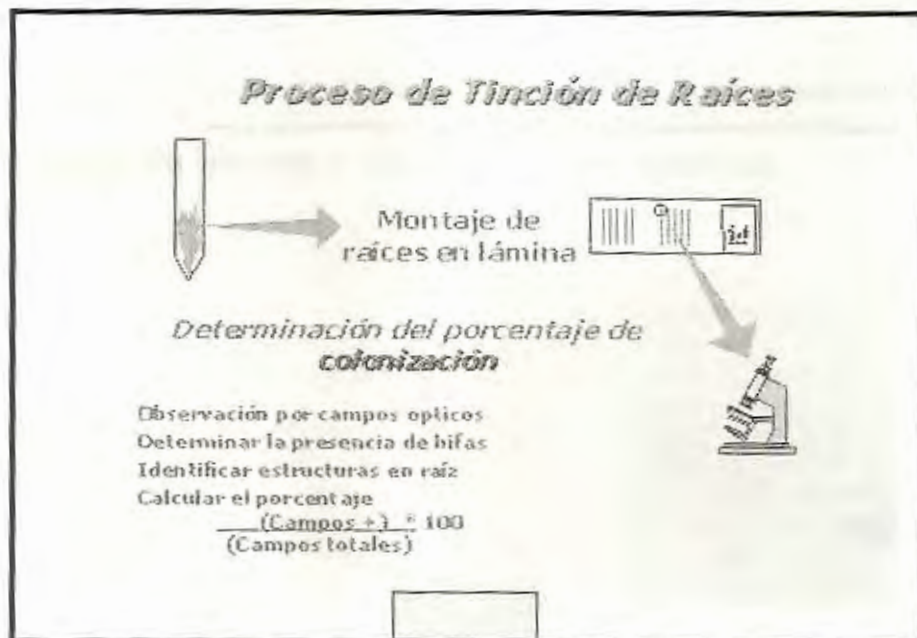


Figura. 5.5.

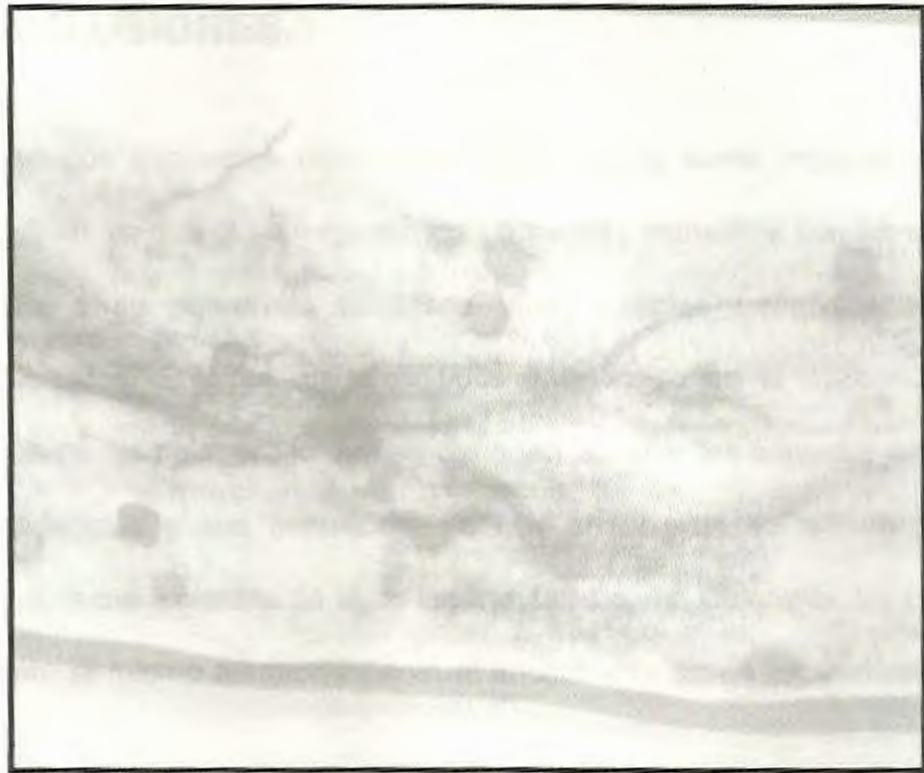


Figura 5.6. Efecto de la tinción en raíz de banano para determinar la infección de micelios y vesículas de hogos micorrizicos.



CONCLUSIONES.

Los hongos micorrizos demuestran que son de suma importancia en la agricultura, ya que al ser organismos simbioses mutualista con las plantas la ayudan a su desarrollo temprano y a múltiples beneficios antes ya mencionados. Este es un tema poco investigado en la aplicación de la agricultura del país, pro lo que se deberían estudiar las especies nativas de las micorrizas y sus beneficios, ya que en el país se utilizan especies micorrizas provenientes de otros lugares tales como Colombia, las cuales no tendrán el mismo comportamiento al encontrarse en un habitat diferente al propio.



RECOMENDACIONES.

Las siguientes recomendaciones están dirigidas al análisis del conteo de esporas y a la tinción de raíces:

En el momento de agitar la muestra de suelo en el agua se debe hacer con mucho cuidado a fin de que no haya pérdida de esporas ya que esto altera los resultados.

Siempre usar guantes para agitar las muestra y lavarse después de terminare de agitar para que no se peguen las esporas a la mano y dejando que el agua quede en el mismo recipiente

Al momento de coleccionar las esporas de de los tamices se debe recolectar con mucha precaución de no salpicar pues se pueden perder esporas.

Para la identificación de las estructuras de las esporas de micorrizas se debe analizar al microscopio con un lente de 100x para evitar confusiones con otras estructuras parecidas.

Las esporas pueden ser almacenadas a cuatro °C durante un mes en agua.

En la tinción de raíces después de las 12 horas de decoración en ácido láctico es necesario sacar las raíces y dejarlas en agua para que no se decoloren las hifas y vesículas de las micorrizas.



BIBLIOGRAFIA.

1. Centro de Estudios Ecológicos Argentino. Las Mycorrizas.
<http://la-pagina.com/cdeea>.
2. Corredor H. Gloria. Mycorrizas Arbusculares para el manejo sostenible de los agrosistemas. Centro de Investigaciones Turipana.
3. Kasuya. M. Modulo de Agricultura Orgánica y Microbiología de Suelo. ESPOL- PMBA. 2003.
4. López E. Carlos. Sobre Mycorrizas. Estación Experimental La Mayorga.
5. Reino Fungí: Mycorrizas. webmaster@cedarcreek.umn.edu.