



Manual de procedimientos microbiológicos para la evaluación de inoculantes

Publicación de la Red Nacional de Control de Calidad de
Inoculantes de la División Agrícola y Ambiental de la
Asociación Argentina de Microbiología

Ada S. Albanesi, Silvia Benintende,
Fabricio Cassán y Alejandro Peticari
[Editores]

ISBN 978-987-26716-4-8



Asociación Argentina de Microbiología

ISSN 978-987-26716-4-8

Manual de procedimientos microbiológicos para la evaluación de inoculantes

Ada S. Albanesi, Silvia Benintende,
Fabricio Cassán y Alejandro Peticari
[Editores]

Publicación de la Red Nacional de Control de Calidad de
Inoculantes de la División Agrícola y Ambiental de la
Asociación Argentina de Microbiología



Ciudad Autónoma de Buenos Aires. República Argentina



ÍNDICE DE CONTENIDOS

Presentación

Comisión Coordinadora REDCAI

Prólogo

Yaacov Okon

| | |
|---|-----------|
| CONTROL DE CALIDAD DE INOCULANTES | 1 |
| Toresani Silvia; Lina Lett; Fabricio Cassán; Carlos Bonfiglio; Alejandro Peticari; Silvia Benintende; Ada Albanesi; María Fernanda González Fiqueni; Claudio Penna; Alejandro Rossi | |
| LA EXPERIENCIA INTERLAB-REDCAI | 7 |
| Lett Lina; Silvia Toresani | |
| INOCULANTES PARA LEGUMINOSAS FORMULADOS CON RIZOBIOS | 15 |
| Albanesi Ada; Silvia Benintende; Carlos Bonfiglio; Fabricio Cassan; María Fernanda Gonzalez Fiqueni; Lina Lett; Claudio Penna; Alejandro Peticari; Alejandro Rossi; Silvia Toresani | |
| INOCULANTES FORMULADOS CON <i>Azospirillum spp.</i> | 25 |
| Cassán Fabricio; Claudio Penna; Cecilia Creus; Débora Radovancich; Emilia Monteleone; Inés García de Salamone; Luciana Di Salvo; Isabel Mentel; Julia García; María del Carmen Mayans Pasarello; Lina Lett; Mariana Puente; Olga Correa; Karina Punschke Valerio; Rosana Massa; Melina Catafesta; Alejandro Rossi; Marisa Díaz; Silvia Righes; Susana Carletti; Enrique Rodríguez Cáceres | |
| INOCULANTES FORMULADOS CON <i>Pseudomonas spp.</i> DE USO AGRÍCOLA | 33 |
| Rossi Alejandro; Claudio Valverde; Susana Rosas; Carolina Pasluosta; Marisa Díaz; Esteban Rubio; Diego Sauka; Marcela Montecchia; Olga Correa; Elsa Leonor Ulla; María Fernanda Gonzalez Fiqueni; Ada Albanesi; Lina Lett; Daniela Bruzzese; Lucrecia Pobliti; Carolina Castaño; Ana Lía Ronchi; Liliana Galián; Alejandra Pereyra; Cecilia Creus; Patricia García | |
| CONTROL DE CALIDAD DE INOCULANTES FORMULADOS CON HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (HMA) | 45 |
| Cabello Marta; Ada Albanesi (ex aequo); Celia Brandán | |

RECuento DE RIZOBios VIABLES SOBRe SEMILLA 55

Penna Claudio; Silvia Benintende; Jorge Chiavelini; Ada Albanesi; Fabricio Cassan;
María Fernanda Gonzalez Fiqueni; Lina Lett; Alejandro Peticari; Alejandro Rossi;
Silvia Toresani; Rosana Massa

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE INOCULANTES
FORMULADOS EN BASE A RIZOBios EN LEGUMINOSAS MÉTODo DEL
PROMEDIO DE PLANTAS NODULADAS [PPN] O BURTON MODIFICADO 61**

Peticari Alejandro; Silvia Benintende; Silvia Toresani; Lina Lett; Fabricio Cassán;
Ada Albanesi; María Fernanda González Fiqueni; Claudio Penna; Alejandro Rossi

ANEXO I. LEGISLACIÓN 71

Toresani Silvia; Alejandro Rossi

CONTROL DE CALIDAD DE INOCULANTES FORMULADOS CON HONGOS MICORRÍDICOS ARBUSCULARES (HMA)

Cabello Marta; Ada Albanesi (ex aequo); Celia Brandán

Resumen

Existen diferentes inoculantes de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) en el mercado que generan la necesidad de establecer estándares ampliamente aceptados para el control de calidad. Ello es relevante porque son organismos biotrofos, endosimbiontes obligados, pertenecientes al phylum Glomeromycota. Se requieren protocolos básicos normalizados para determinar la eficiencia del inoculante a base de HMA, y por ello se detallan las metodologías necesarias, consensuadas y adaptadas para el aislamiento, producción y análisis de eficiencia de inoculantes a base de hongos arbusculares. La determinación de la abundancia de esporas por la técnica del gradiente de sacarosa y la tinción vital de las esporas para registrar el estado fisiológico del hongo, la detección de la presencia de las estructuras fúngicas, como arbusculos, hifas, circunvoluciones de hifas, vesículas en el interior de las raíces, la viabilidad de las hifas, la verificación de sustancias de reserva y la cuantificación del efecto del hongo micorrízico en el crecimiento y desarrollo vegetal son tópicos que se abordan y cuyas metodologías se detallan.

Palabras clave: Glomeromycota, micorrizas, control de calidad, biotecnología.

1. Introducción

El desarrollo de inoculantes micorrízicos es un proceso que implica procedimientos complejos de desarrollo biotecnológico y el cumplimiento de múltiples requisitos legales, éticos, de transferencia, educación y comerciales (Von Alten et al., 2002; Tarbell y Koske, 2007).

El desarrollo de esta incipiente industria biotecnológica se debe a que: "i) los HMA son beneficiosos en el desarrollo y la salud de las plantas, en la recuperación de los suelos y en la bioremediación; ii) hay mayor conciencia sobre temas tales como la

diversidad biológica, incluida la del suelo y mayor aceptación de estos recursos naturales a ser usados en tecnologías alternativas a los agroquímicos y iii) la sociedad está demandando producciones sustentables" (Gianinazzi y Vosatka, 2004).

Actualmente, los inoculantes a base de hongos micorrízicos arbusculares se producen en parcelas inoculadas, en contenedores con diferentes sustratos y plantas, sistemas hidropónicos o in vitro (Jarstfer y Sylvia, 1994). Básicamente, el desarrollo de la formulación consiste en colocar propágulos fúngicos (fragmentos de raíces colonizadas con HMA, fragmentos de mi-

celio fúngico y/o esporas) en un soporte como perlita, turba, arcilla inorgánica, zeolita, vermiculita, arena) (Estaún et al., 2002).

Existen diferentes productos en el mercado que generan la necesidad de establecer estándares ampliamente aceptados para el control de calidad (Honrubia et al., 1992; Colozzi Filho, 2004; García Garrido et al., 2004; Rubio et al., 2006). Particularmente, esto es de suma importancia con los hongos MA, que son endosimbiontes obligados pertenecientes al phylum Glomeromycota, porque el cumplimiento de los requisitos de calidad está estrechamente relacionado con el método de producción de inóculo.

El inoculante que contiene propágulos de HMA debe ser evaluado y debe ser probada su eficiencia agronómica. Por ello, el manejo de estos microorganismos y la producción de inoculantes requiere conocimientos técnicos y metodologías normalizadas.

Muchos de los protocolos de determinación de parámetros de eficiencia son similares, independientemente del tipo de microorganismo inoculado y de la planta cultivada, pero con los HMA se demandan procedimientos particulares por las características intrínsecas de estos microorganismos.

Se requieren protocolos básicos normalizados para determinar la eficiencia del inoculante a base de HMA, y por ello se detallan las metodologías básicas necesarias consensuadas y adaptadas para el aislamiento, producción y análisis de eficiencia de inoculantes a base de hongos arbusculares.

2. Fundamento de la metodología

La densidad de esporas del phylum Glomeromycota de inoculantes o de suelos, determinada por la técnica del gradiente de sacarosa por ej. (punto 3.1) da indicios de la abundancia (Figuras 1, 2, 3 y 4) (Sieverding, 1983; Cabello, 2008) y permite inferir la factibilidad de la interacción hongo-planta.

Luego, es conveniente realizar la tinción vital (punto 3.2) que indica el estado fisiológico del hongo (An y Hendrix, 1988) y permite distinguir rasgos morfológicos (Figuras 5, 6 y 7).

De todas maneras, la prueba más contundente de que el hongo está fisiológicamente activo es la detección de la presencia de las

estructuras fúngicas, como arbusculos, hifas, circunvoluciones de hifas, vesículas (Figuras 8, 9, 10 y 11), en el interior de las raíces (Cabello, 2008) y la visualización del efecto del hongo micorrízico en el crecimiento y desarrollo vegetal (puntos 3.4.2 y 3.3, respectivamente).

La presencia de estructuras fúngicas en el



Figura 1. Espora de *Scutellospora fulgida*.
Foto: M. Cabello



Figura 2. Esporas de *Pascepura*. Foto: M. Cabello.



Figura 3. *Glomus intraradices* (esporas en fascículo).
Foto: M. Cabello.

interior de las raíces se realiza por tinciones no vitales (punto 3.4.2) (Phyllips y Hayman, 1970; Giovanetti y Mosse, 1980).

La actividad succinato deshidrogenasa determina la viabilidad de las hifas de hongos micorrícicos arbusculares (An et al., 1998; Kough y Gianinazzi-Pearson, 1986; Kough et al., 1987). Se utiliza para evaluar efectos de tóxicos sobre estos hongos (punto 3.4.1).



Figura 4. *Glomus fuegianum* (esporocarpio).
Foto: M. Cabello.



Figura 5. Esporas, previo a la tinción vital.
Foto: M. Cabello.

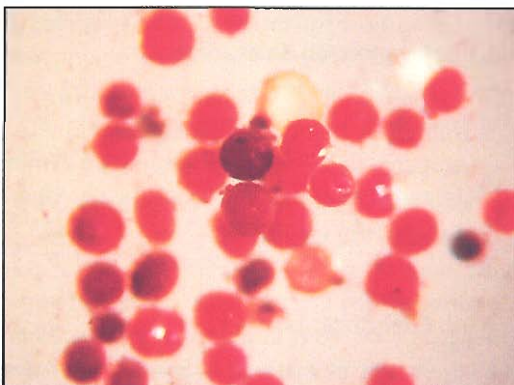


Figura 6. Esporas con tinción vital. Foto: M. Cabello.



Figura 7. Rasgos morfológicos en esporas.
Foto: M. Cabello.

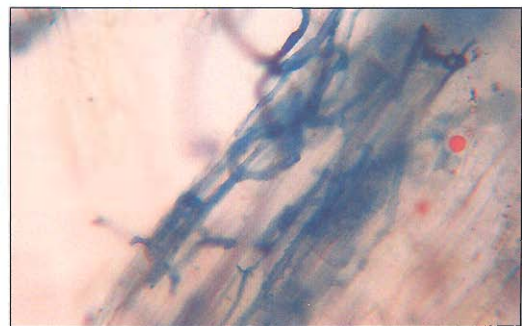


Figura 8. Hifas y circunvoluciones en raíz.
Foto: M. Cabello.

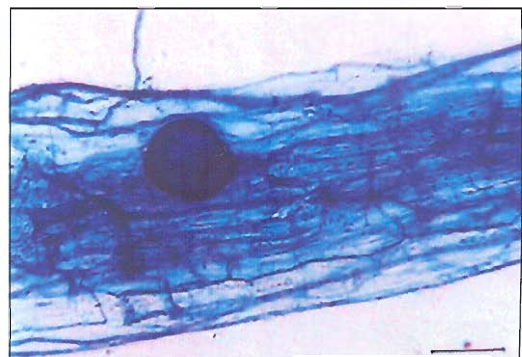


Figura 9. Vesículas e hifas en raíz. Foto: M. Cabello.

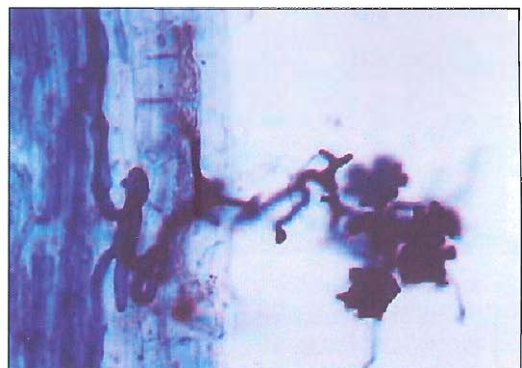


Figura 10. Punto de entrada donde las hifas se han originado desde células auxiliares. Foto: M. Cabello.

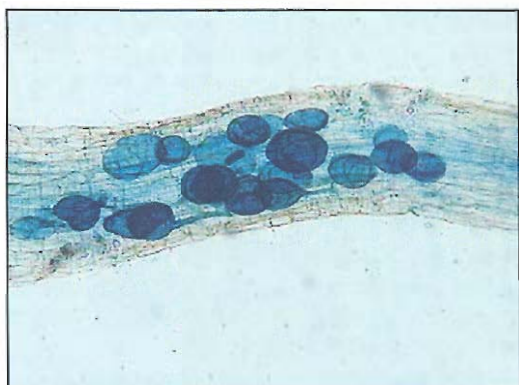


Figura 11. Vesículas en raíz. Foto: M. Cabello.

Con la tinción de raíces micorrizadas y verificación de lípidos (punto 3.4.3) se confirma la presencia de lípidos en el micelio (Figura 12) y estructuras arbusculares intraradicales (Figura 13).

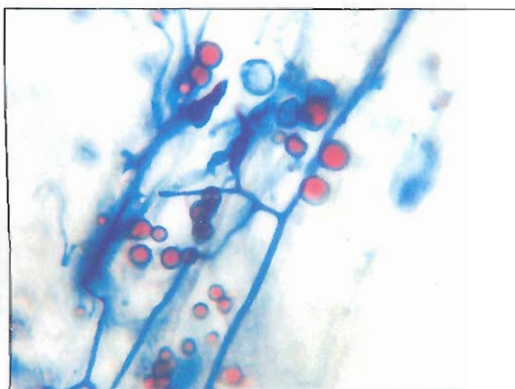


Figura 12. Lípidos en vesículas dentro de raíz.
Foto: M. Cabello.



Figura 13. Arbúsculos en el interior de células de raíz de *Erythronium americanum*. Tomado de Mycorrhizal Associations- The Web Resource. Mark Brundett, 2008.

Disponible en <http://mycorrhizas.info/resource.html>

Para cuantificar la micorrización se realiza el recuento en placa reticulada (punto 3.5.1) y para cuantificar las estructuras fúngicas se realiza el recuento de segmentos de raíz en microscopio (punto 3.5.2).

3. Metodología

3.1. Extracción y cuantificación de esporas de HMA (desde el suelo o desde inoculantes sólidos). Técnica del gradiente de sacarosa. Procedimiento

3.1.1. Muestra y Tamizado

Pesar 50 - 100 g de suelo rizosférico (o de inoculante) y diluirlo en 1 litro de agua, pasar por tamices de 300 μm , 150 μm y 50 μm .

3.1.2. Recolección del material

Arrastrar los contenidos de tamices de 300 μm , 150 μm y 50 μm con ayuda de una piqueta a tubos de centrifuga de 50 mL.

3.1.3. Interfase

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 acuosa de sacarosa pura al 60 % (puede emplearse azúcar de mesa de primera marca al 80 %) con una jeringa desde el fondo del tubo para formar un gradiente.

3.1.4. Centrifugado

Centrifugar durante 2 minutos a 1500-2000 rpm.

3.1.5. Recolección de esporas

Extraer la fase inferior (de sacarosa) del tubo, volcar sobre un tamiz (50 μm) y lavar con abundante agua corriente para eliminar la sacarosa y evitar la ruptura de esporas por presión osmótica.

3.1.6. Cuantificación

Transferir el material a una placa de Petri con una cuadrícula de 1cm dibujada en la

parte inferior para contabilizar el número de esporas HMA bajo lupa estereoscópica. Se cuentan en la cápsula con líneas dibujadas y se refieren a peso seco de suelo o inoculante (yo lo entiendo pero me quedan dudas si todos lo entienden?).

Referir el número total de esporas HMA a 100 g ml⁻¹ de inoculante (hablamos solo de inoculante, me parece). Para ello, para de cada una de las muestras se toma una alícuota de inoculante que se seca en estufa durante 5 horas a 105°C determinándose el grado de humedad del mismo.

3.1.7. Preparación de material de herbario de las esporas de *Glomeromycota*.

El tamizado de suelo centrifugado sólo contiene esporas o pequeños esporocarpos. Los esporocarpos se levantan fácilmente de la muestra con la ayuda de pinzas de punta fina. Las esporas se aíslan con pipetas Pasteur cuya punta ha sido afinada sobre la llama. 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 espора, para posterior manipulación de los grupos individuales se transfieren en agua a vidrios de reloj).

Existen 2 métodos comunes para la preparación de material de herbario de las esporas. Uno de ellos es transfiriendo las esporas a pequeños viales conteniendo 5 % de formalina. El segundo método es transferir esporas con poca agua en portaobjetos, después de la evaporación del agua se agregan unas gotas de PVL (Polivinil alcohol lactofenol) en el sitio donde están las esporas antes de colocar el cubre. El PVL es un medio de montaje permanente y endurece entre 1 y 2 días. Es conveniente secar el preparado durante 12 h en estufa a 60°C; de esta manera se clarifica y se pueden visualizar bien las paredes de las esporas.

Las preparaciones permanentes de esporas se observan en microscopio compuesto con 100-1000x de aumento. Es imprescindible para medir las esporas que el ocular esté provisto de reglilla. Cuando la espора muestra claramente la conexión hifal puede determinarse el género del hongo del que se trata.

3.2. Viabilidad de esporas de *Glomeromycota* determinada con tinción vital (An et al. 1998). Se utilizan las esporas obtenidas en el punto 3.

3.2.1. Solución incubadora

Preparar una solución stock que contenga 0.5 mg MTT mL⁻¹ (MTT [(3-(4, 5-dimetil-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] con agua deionizada. La solución stock puede almacenarse por varios meses a 4°C en la oscuridad.

3.2.2. Procedimiento

Igual volumen de la solución stock y una solución acuosa con suspensión de esporas de HMA se mezclan en un tubo eppendorf y se incuban a temperatura ambiente por 40 h. Luego se remueven las esporas y se las observa con microscopio estereoscópico. Las esporas vitales se tiñen de rojo brillante. Las no vitales permanecen del color original. Pasadas las 40 h de incubación todas las esporas se tornan azules.

Observaciones: manejar el MTT con precaución ya que es un agente mutagénico.

3.3. Validación de la viabilidad de inoculantes

3.3.1. Ensayo en planta

3.3.2. Preparación del material

Mantener el inoculante en un lugar fresco y seco, no exponer directamente a los rayos del sol.

Preparar 10 vasos de 180 mL de capacidad, aproximadamente, conteniendo vermiculita estéril con humedad correspondiente a capacidad de campo. Los vasos deben tener dos perforaciones en el fondo de, aproximadamente, 2 mm de diámetro.

3.3.3. Inoculación

Colocar cinco semillas esterilizadas de alfalfa (*Medicago sativa*) por recipiente, efectuando previamente un orificio a una profundidad no mayor a 2 veces el tamaño de la semilla. Utilizar semillas de buena calidad con buena energía germinativa, y sin fungicidas.

Nota: se pueden usar otras especies vegetales micotróficas.

Luego cubrir con vermiculita y compactar ligeramente.

Inocular de acuerdo al marbete del producto.

Definir el tamaño de las bandejas en donde se colocan los vasos en función del espacio.

3.3.4. Ensayo

Colocar los vasos en oscuridad hasta iniciada la germinación. A partir de emergencia, mantener 1 cm de la base de las bandejas con agua destilada, cuidando que el estrato superior de la vermiculita permanezca húmedo.

En emergencia plena, dejar sólo una planta por vaso.

El riego se realiza con agua destilada por capilaridad. Como la siembra se realiza en vasos a capacidad de campo, evitar el riego hasta la emergencia (evita que se pudran las semillas, en caso de necesidad agregar 10 mL por vaso), luego se mantiene 1 cm en la bandeja de la base con agua destilada, cuidando que el estrato superior de la vermiculita permanezca húmedo.

Nota: El agua destilada debe ser de buena calidad de pH 7 (no menor a 6). Si el pH es menor, hervirla para la eliminación del dióxido de carbono disuelto y así corregir pH. Si no se corrige de esta manera revisar provisión de agua destilada.

Llevar a cámara de cultivo, las condiciones se dan en el anexo.

3.3.5. Evaluación

A 30 días a partir de la emergencia, se descalzan las plantas y se realiza la tinción no vital con azul de tripano o azul de algodón (Philyps y Hayman, 1970) y la posterior cuantificación por recuento en placa reticulada.

Se recomienda utilizar azul de algodón en lugar de azul de tripano que es cancerígeno. (acá si es una alternativa buena!!!)

3.3.6. Evaluación y presentación de resultados

Los resultados se expresan como porcentaje de raíz colonizada.

3.4. Tinción de la micorrización

3.4.1. Tinción vital de estructuras fúngicas. Determinación de la actividad succinato deshidrogenasa. Procedimiento

3.4.1.1. Preparación de raíces

Tras lavar las raíces, se cortan en trozos de 0,5 a 1 cm de longitud.

3.4.1.2. Incubación

Colocar 2 mL de solución incubadora (ver anexo) y llevar a estufa a 25°C durante 16-18 h.

Eliminar la solución incubadora, añadir solución acuosa de hidrato de cloral al 75 % y colocar en ebullición a baño María durante 15 minutos.

3.4.1.3. Contratinción

Eliminar el hidrato de cloral, cubrir las raíces con fucsina ácida al 0,01% en ácido láctico a baño María durante 10 minutos.

Montar los trozos de raíz y observar al microscopio. Las zonas donde actuó la succinato deshidrogenasa se visualizan de color azul-violáceo y las áreas de micelio no activo o muerto se tiñen de fucsia.

3.4.2. Tinción no vital de estructuras fúngicas

3.4.2.1. Tinción de raíces micorrizadas con azul de tripano

3.4.2.2. Tratamiento de las raíces

Lavar las raíces con abundante agua y eliminar los restos de material sólido adherido a ellas.

Trocear y sumergir en una solución de KOH al 10 %. Las raíces se calientan (90-100°C) durante 30 minutos.

3.4.2.3. Lavado

Eliminar el KOH y lavar las raíces con abundante agua.

Para raíces leñosas pasarlas por peróxido de hidrogeno (= agua oxigenada, H²O²) al 10 % durante 5 minutos.

3.4.2.4. Neutralización

Sumergir las raíces en HCl 0,1 N durante 2 minutos.

3.4.2.5. Coloración propiamente dicha

Eliminar el HCl y añadir azul de tripano al 0,05 % en ácido láctico. Calentar a 90°C durante 5 minutos.

Eliminar el colorante y añadir ácido láctico para su conservación.

3.4.2.6. Observación al microscopio estereoscópico (lupa) y/o microscopio óptico

3.4.3. Tinción de raíces micorrizadas y verificación de lípidos

3.4.3.1. Tratamiento de las raíces

Colocar las muestras de raíz, previamente lavadas, en vasos de precipitado, cubrir con KOH al 10 % y calentar a baño María durante 20 minutos a 1 hora (dependiendo de la estructura radical) a 90°C.

3.4.3.2. Lavado

Eliminar el KOH y lavar las raíces 3 veces con agua.

3.4.3.3. Neutralización

Añadir HCl 0,1 N manteniéndolo 3 minutos a temperatura ambiente.

3.4.3.4. Coloración propiamente dicha

Eliminar el HCl y añadir azul de Tripano o azul de algodón + Sudam III (ver anexo).

Colocar en el baño María a ebullición durante 5 minutos.

Eliminar el colorante, colocar las raíces en agua.

3.4.3.5. Observación: al microscopio estereoscópico (lupa) y/o microscopio óptico

Las estructuras de hifas presentan vacuolas con lípidos las cuales se tiñen de rojo con el Sudam III mientras que la restante colonización (sin lípidos) se tiñe de azul.

3.5. Cuantificación de la micorrización

3.5.1. Recuento en placa reticulada

Los segmentos de raíces teñidas (1 cm) se distribuyen al azar en una placa reticulada. Se observan bajo estereomicroscopio (40x) las intersecciones de las raíces con el retículo, distinguiendo los puntos de raíz micorrizados de los que no lo están. El porcentaje de micorrización viene dado por el cociente entre los puntos de raíz micorrizadas y el número total de intersecciones observadas (un mínimo de 100).

3.5.2. Recuento de segmentos de raíz en microscopio

Montar segmentos de raíz de 1 cm de longitud en un portaobjetos (Figura 13) y sobre ellos se hace un recuento específico de estructuras fúngicas en el microscopio: número de puntos de entrada cm⁻¹ de raíz, número de vesículas cm⁻¹ de raíz o el porcentaje de la longitud ocupada por arbusculos.

Las líneas de la Figura 13 punteadas (3) son imaginarias y sobre ellas se debe desplazar el campo del microscopio. Cuando se cruza una raíz (10 líneas en rojo) se registra lo que se observa: hifa, arbusculo, circunvolución ó vesícula, o bien nada.

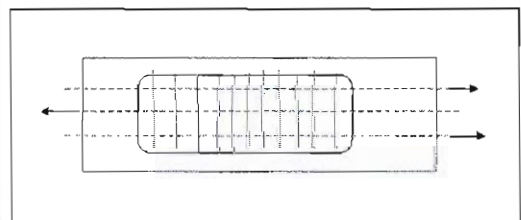


Figura 13. Esquema de portaobjetos y raíces.

Esta operación se realiza en, al menos, 50 segmentos (=5 preparados) por muestra (total 3 líneas en cada preparado=150 intersecciones X 5 preparados= 750 lecturas por muestra). Se debe considerar las repeticiones (McGonigle et al., 1990).

4. Bibliografía

- An, Z.Q., J.W. Hendrix.. 1988. Determining viability of endogonaceous spores with a vital stain. *Mycologia* 80: 259-261.
- An, Z.Q., Guo, B.Z.,Hendrix,J.W. 1998. Viability of soil borne spores of Glomalean mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* 30: 1133-1136
- Cabello, M. 2008. Curso de hongos formadores de micorrizas arbusculares. Instituto Spegazzini, Univ. Nac. de La Plata, Argentina.
- Colozzi Filho, A. 2004. Protocolo para el análisis da qualidade e da eficiencia agronomica de inoculantes contendo fungos micorrizicos arbusculares. Rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbiológicos de interesse agrícola (RELARE). 18 pág.
- Estaún, V., A. Camprubí, E.J. Joner. 2002. Selecting arbuscular mycorrhizal fungi for field application. In *Mycor rhizal technology in agriculture*. Edited by S. Gianinazzi, H Schüep, J.M. Barea, and K. Haselwandter. Birkhäuser Verlag Basel. pp. 249–260.
- García Garrido, JM, A. Colozzi Filho, A. Godeas. 2004. Micorrizas Arbusculares. Taller Iberoamericano sobre normalización de metodologías para el análisis de eficiencia de microorganismos coon uso potencial como biofertilizantes en agricultura. BIOFAG (organizador). CYTED (patrocinador). Londrina, Brasil. 31 pág.
- Gianinazzi, S., M. Vosatka. 2004. Inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi for production systems: science meets business. *Can. J. Bot.* 82: 1264–1271.
- Giovanetti, M., B. Mosse. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizae infection in roots. *New Phytol.* 84: 489-500.
- Honrubia, M., P. Torres, G. Diaz, A. Cano. 1992. Manual para micorrizar plantas em viveros forestales. Dpto. De Biología Vegetal. Fac. de Biología. Campus Universitario de Espinardo. Universidad de Murcia. España. 44 pág.
- Jarstfer, A.G., D.M. Sylvia. 1994. Aeroponic culture of VAM fungi. In *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology*. Edited by A.K. Varma and B. Hock. Springer- Verlag, Berlin. pp. 427–441.
- Kough, J.L., V. Gianinazzi-Pearson. 1986. Physiological aspects of VA mycorrhizal hyphae in root tissue and soil. En: *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae* (Ed. V. Gianinazzi-Pearson & S. Gianinazzi) INRA Publications, Paris, pp. 223-226.
- Kough, J.L.; V. Gianinazzi-Pearson, S. Gianinazzi. 1987. Depressed metabolic activity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after fungicide applications. *New Phytologist* 106: 707-715.
- McGonigle, TP, M.H. Miller, D.G. Evans, D.G. Fairchild, J.A. Swann. 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 115:495-501
- Phillips, S J.M., Hayman D.S. 1970. Improved procesures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- Rubio, R., B. Borie; C. Castillo. 2006. Protocolos Laboratorio de Microbiología y Bioquímica de Suelos. Grupo Micorrizas. Departamento de Ciencias Químicas. Facultad de Ingeniería, Ciencias y Administración. Universidad de la Frontera. Chile. 29 pág.
- Sieverding, E. 1983. Manual de métodos para la investigación de la micorriza vesiculo – arbuscular en el laboratorio. Centro Internacional de Agricultura Tropical. CIAT. Proyecto Micorriza. Cali, Colombia. 98 pág.
- Tarbell, T.J., R.E. Koske. 2007. Evaluation of commercial arbuscular mycorrhizal inocula in a sand/peat medium. *Mycorrhiza.* 18:51-56.
- Von Alten, H., B. Blal B., J.C. Dood, F. Feldman, M. Vosatka. 2002. Quality control of arbuscular mycorrhizal fungi inoculum in Europe.

Agradecimientos

A las Universidades Nacionales de La Plata, Santiago del Estero y Tucumán.

ANEXO

Técnica del gradiente de sacarosa

Preparación de PVL

15 g de polivinil alcohol (75 % hidrolizado) se disuelven en 100 mL de agua a baño de María a 80°C, esta solución básica debe almacenarse en la oscuridad y frasco bien tapado. Para preparar PVL 56 g de esta solución básica se mezclan con 22 g de fenol y 22 g de ácido láctico.

Condiciones de la cámara

Fuentes de luz: 6-7 tubos Growth-lux por m² y tubos de luz día en una relación 2/1 (o posible reemplazo con lámpara de sodio o alternativas con led).

Densidad: aproximadamente 21 tubos por metro lineal (1 lámpara).

Altura: 40 cm al borde de los vasos (1 m de los vasos).

Luminosidad: aproximadamente 4.600 lux .

Fotoperíodo: 16/8 para alfalfa.

Temperatura máxima 25°C; temperatura mínima 15°C.

Humedad relativa: mínima del 65%.

Vermiculita.

Preferentemente utilizar vermiculita INTER-SUM, mediana (o Bertinat fina).

Acondicionar en bandejas y tyndalizar en autoclave a 100°C (con espita abierta) por 60 minutos durante tres días consecutivos.

Distribuir en los vasitos y lavar con agua destilada o de lluvia tres veces consecutivas o hasta pH 7 (Medir pH en agua de percolación).

Si fuera necesario se puede recurrir a utilizar solución buffer (K₂PO₄H 0,5 g; KPO₄H₂ 0,7 g; Agua Destilada 1000 mL).

Tinción vital.

Hidrato de cloral al 75% en agua.

Fucsina acida al 0,01% en ácido láctico.

Solución incubadora de la tinción vital.

1 mL de succinato disódico (2,5 M).

2,5 mL de azul de tetrazolio (4 mg mL⁻¹).

2,5 mL Tris-ClH (0,2 M, pH 7).

1 mL Cl₂Mg (5 mM).

3 mL agua destilada.

Tinción no vital.

Azul de algodón o Azul de tripano al 0,05 % en ácido láctico + 0,1 % de Sudan III.