



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

Facultad de Ciencias

Técnicas de microscopía de fluorescencia y análisis de imágenes  
aplicadas al estudio de hongos micorrízicos.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A

Lorena Segura Morán

DIRECTOR DE TESIS: Dra. María del Pilar Ortega Larrocea

Agosto 2008





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Hoja de Datos del Jurado

### 1. Datos del alumno

Segura

Morán

Lorena

56580608

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

404016865

### 2. Datos del tutor

Doctora

María del Pilar

Ortega

Larrocea

### 3. Datos del sinodal 1

M. en C.

Alejandro

Martínez

Mena

### 4. Datos del sinodal 2

M. en C.

Guadalupe

Vidal

Gaona

5. Datos del sinodal 3

M. en C.

Frédérique

Reverchon

6. Datos del sinodal 4

M. en C.

Oswaldo

Nuñez

Castillo

7. Datos del trabajo escrito

Microscopía de fluorescencia y análisis de imágenes digitales aplicadas  
al estudio de hongos micorrízicos

166 p

2008

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis contó con el apoyo del proyecto CONACYT-*Jóvenes a la Investigación* 45243 dentro del cual recibí una beca de asistente de proyecto que me permitió realizar este trabajo.

Al Instituto de Geología de la UNAM por la experiencia de ser estudiante en el marco de las disciplinas en Ciencias de la Tierra.

A la Dra. Ma. Pilar Ortega Larrocea por su dirección, su tiempo, su invaluable apoyo en mi formación teórica y en el trabajo del laboratorio, especialmente por su paciencia y dedicación, por ser amiga y tutora a la vez.

A los integrantes del Jurado: al M. en C. Alejandro Martínez Mena, a la M. en C. Guadalupe Vidal Gaona, a la M. en C. Frédérique Reverchon y al M. en C. Oswaldo Núñez Castillo, por su tiempo y comprensión así como por sus acertados comentarios para mejorar este trabajo.

A mi familia, en especial a mis padres, mi hermana, mis tíos y mis abuelas que me apoyan en todo momento y que compartimos mucha felicidad.

A Fer por todas las experiencias de la vida que hemos pasado juntos, la confianza, ayuda y cariño que me brinda siempre.

A mis compañeros del Laboratorio Microcosmos Bioedáfico del Departamento de Edafología que me apoyaron con su colaboración, consejos y amistad para disfrutar tanto mi estancia ahí.

A la M. en C. Mónica Rangel Villafranco por su invaluable apoyo en el laboratorio, invernadero, la asesoría y corrección de las Presops y por convertirse en mi gran amiga.

A mis amigos incondicionales: Marco, Vicky, Naye, Nadia, Elisa, Olga, Julia, Angélica y Anaid.

A la familia Samaniego: Concha, Federico, Banan, Forest y Chucu que me han dado tanto cariño.

A Andrea Campuzano por la colaboración con reactivos en las técnicas de tinción y por ser tan buena amiga.

A las personas y/o Instituciones que proporcionaron las muestras: Frédérique Reverchon (ápices de ectomicorrizas); Laboratorio Mycologie Végétale de la Universidad Paul Sabatier (Toulouse, Francia) (cultivo monoxénico *in vitro* de *Glomus intraradices* asociado a raíces T-DNA de zanahoria *Daucus carota* L.); al Dr. Pavel Krasilnikov (muestras de suelo de campo para la observación de micorriza arbuscular); los bancos de germoplasma del Laboratorio Microcosmos Bioedáfico del Departamento de Edafología del Instituto de Geología de la UNAM (semillas de *Dichromantus aurantiacus* y aislado de *Ceratorhiza* sp.).

A Rosario Flores Ramos y Francisco Montaña Cuahuilaz por el apoyo en el servicio técnico del equipo de cómputo y en la impresión de las imágenes.

A la M. en C. Kumiko Shimada Miyasaka por su apoyo en la elaboración de soluciones.

Al Dr. Sergey Sedov por las facilidades prestadas para el uso del microscopio.

Al laboratorio de Microcine por asesorarme con gusto en el uso de sus microscopios y técnicas de edición de imágenes.

Al M. en C. Israel Cárdenas por sus comentarios para mejorar este trabajo.

A todas aquellas personas que no tengo que mencionar pero que saben que les agradezco su apoyo y las considero muy importantes en mi vida.

# INDICE

RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	III
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Micorrizas.....	3
2.1.1 Micorrizas arbusculares (MA).....	4
2.1.2 Ectomicorrizas (ECM).....	5
2.1.3 Micorrizas de orquídeas (MO).....	8
2.2 Herramientas para el estudio microestructural de las micorrizas: Microscopía de Fluorescencia.....	11
2.2.1 Microscopia de Epifluorescencia.....	13
2.2.2 Autofluorescencia.....	14
2.2.3 Fluorocromos.....	14
2.2.4 Fluorocromos seleccionados utilizados en estudios en micorrizas.....	15
2.2.5 Captura y análisis de imágenes.....	16
3 ANTECEDENTES.....	18
3.1. Autofluorescencia en micorrizas.....	18
3.2 Fluorocromos utilizados en estudios en micorrizas.....	19
3.3 Colorantes seleccionados para las pruebas con micorrizas.....	20
4 HIPOTESIS.....	26
5 OBJETIVOS.....	27
5.1 Objetivo general.....	27
5.2 Objetivos particulares.....	27
6 METODOS.....	28
6.1 Preparación de las muestras para observación en fluorescencia.....	28
6.1.1 Origen de las muestras para observación de micorrizas arbusculares (MA).....	29
6.1.2 Origen de las muestras para observación en ectomicorrizas (ECM).....	29
6.1.3 Origen de las muestras para la observación de micorrizas orquideoides (MO) a partir de un cultivo <i>in vitro</i> .....	29
6.2 Observación de las estructuras micorrízicas por autofluorescencia.....	30

6.3 Selección de fluorocromos y colorantes para la observación de estructuras micorrízicas..	30
6.3.1 Tinción clásica con azul de Tripán.....	30
6.3.2 Tinción con blanco de Calcofluorina (CFW).....	31
6.3.3 Tinción combinada con Calcofluorina y Ácido 8-Anilino-1-Naftalensulfónico (CFW-ANS).....	31
6.3.4 Tinción de micorrizas con Diacetato de Fluoresceína (FDA).....	31
6.3.5 Tinción de núcleos de micorrizas con 4'-6-Diamino-2-fenilindole (DAPI).....	32
6.3.6 Tinción de micorrizas con yoduro de propidio (PI).....	32
6.4 Diseño de un protocolo de medición semi-automática de biomasa de micorriza arbuscular activa teñida con FDA.....	32
7 RESULTADOS.....	33
7.1 Tinción control en MA.....	33
7.2 Resultados autofluorescencia en todas las micorrizas.....	33
7.3 Resultados de la tinción con CFW.....	37
7.4 Resultados de la tinción combinada CFW y ANS.....	37
7.5 Resultados de la tinción con FDA.....	38
7.6 Resultados de la tinción con DAPI y PI.....	39
SECCION DE LÁMINAS.....	43
8 DISCUSIÓN.....	65
9 CONCLUSIONES.....	76
10 RECOMENDACIONES .....	78
11.11 ANEXO 1.1.....	81
11.12 ANEXO 1.2.....	88
11.13 ANEXO 1.3.....	92
11.14 ANEXO 1.4.....	97
11.15 ANEXO 1.5.....	101
11.16 ANEXO 1.6.....	106
11.21 ANEXO 2.1.....	112
11.22 ANEXO 2.2.....	118
11.23 ANEXO 2.3.....	125
11.24 ANEXO 2.4.....	132

11.25 ANEXO 2.5.....	138
11.31 ANEXO 3.1.....	143
11.32 ANEXO 3.2.....	150
11.33 ANEXO 3.3.....	154
12 LITERATURA CITADA.....	158

## RESUMEN

La presente tesis tuvo como finalidad aplicar varios métodos de tinción y observación bajo microscopía de fluorescencia en tres grupos de micorrizas: micorriza arbuscular (MA), ectomicorriza (ECM) y micorriza orquideoide (MO).

Los tres tipos de micorrizas presentaron autofluorescencia bajo luces ultravioleta, azul y verde (330-385, 450-480 y 510-550 nm respectivamente), debido a la excitación de los componentes de pared celular fúngicos, principalmente quitina paralelamente a la autofluorescencia de otros compuestos de la raíz de las plantas. La autofluorescencia favoreció la observación de muestras sin tinción, principalmente de vesículas e hifas en MA; de la epidermis, la zona de la red de Hartig y las células de la estela central y córtex en ECM y de las hifas en cultivo formadoras de MO.

Los colorantes elegidos para inducir fluorescencia fueron Calcofluorina M2R (CFW), CFW combinado con *8-anilino-1-naftalensulfónico* (ANS), diacetato de fluoresceína (FDA), 4', 6-Diamino-2-fenilindole (DAPI) y yoduro de propidio (PI). La tinción con CFW permitió observar con alta definición paredes celulares en todas las estructuras micorrízicas, aunque con más claridad en aquellas más jóvenes. Este colorante tiene una alta afinidad a las paredes celulares vegetales, lo que interfirió con la visualización de estructuras fúngicas endomicorrízicas en proceso de degradación.

La tinción con CFW + ANS mejoró el contraste para la observación de micelio externo de MA, del manto y red de Hartig en ECM, así como el de las hifas y pelotones de MO en protocormos. También mostró tinciones diferenciales entre los componentes de las células vegetales y fúngicas en las micorrizas debido a que el ANS tiene afinidad por lípidos de membrana y produce distintas tonalidades dependiendo de los componentes de cada célula.

El FDA marcó células vivas en los tres tipos de micorriza debido a la acción enzimática de esterases. En ECM particularmente, la fluorescencia se observó en varias intensidades entre los tejidos dependiendo de su actividad y funcionalidad de las asociaciones.

El DAPI permitió observar núcleos con gran claridad en los tres tipos de micorrizas: micelio externo y esporas extramatriciales en MA, en las hifas del manto en ECM como en las de un cultivo de *Ceratorhiza* sp. (MO). Finalmente, el PI tiñó núcleos y moléculas de reserva

dentro del citoplasma de MA y de MO, además mostró fuerte afinidad por paredes y núcleos vegetales en ECM.

Por otro lado, la aplicación del análisis de imágenes mediante software especializado, permitió facilitar la cuantificación de la longitud de micelio externo total y viable de hongos micorrízicos comparado con otros métodos microscópicos de estimación realizados en membranas.

## ABSTRACT

The present thesis intended to apply several staining techniques using fluorescent microscopy in three groups of mycorrhizas: arbuscular mycorrhiza (AM), ectomycorrhizas (ECM) and orchid mycorrhizas (OM).

The three types of mycorrhizas had autofluorescence properties under ultraviolet, blue and green lights (330-385, 450-480 and 510-550 nm), due to the excitation of the fungal cell wall components, mainly chitin, as well as the autofluorescence of other root compounds.

The autofluorescence improved the observation of some samples without staining, mainly the vesicles and the hyphae in AM; the epidermis, the Hartig Net as well as the central stele and the cortex in ECM and the hyphae in an OM culture.

The dyes chosen to induce fluorescence were Calcofluor white M2R (CFW), CFW mixed with 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid (ANS), Fluorescein Diacetate (FDA), 4',6-Diamino-2-phenylindole (DAPI) and Propidium Iodide (PI). The staining with CFW allowed the observation of cell walls with high resolution in all of the mycorrhizal structures, even more clearly in the youngest ones. This fluorochrome has a high affinity to the vegetal cell walls, which interferes with the visualization of endomycorrhizal components in senescence or degradation processes.

The staining with CFW + ANS improved the contrast in the observation of extraradical mycelium of AM, the mantle and Hartig net of ECM, as well as in hyphae and coils in protocorms of OM. It showed also differential staining between the plant and the fungal cell walls in mycorrhizas, because ANS has a high affinity for membrane lipids and produces different tonalities according to the particular components from each cell.

The FDA accentuated active cells in the three kinds of mycorrhizas as a result of the enzymatic action of the esterases. Particularly in ECM, the fluorescence was observed in different intensities between the tissues depending on their activity and on the functionality of the associations.

The DAPI allowed a clear observation of nuclei in the three types of mycorrhizas: extramatrical mycelia and intramatrical spores in AM, mantle hyphae in ECM as well as in the hyphae from a *Ceratorhiza* sp. culture (OM). Finally, the PI dyed nuclei and storage molecules

inside the cytoplasm; in addition, it showed strong affinity for walls and vegetal nuclei in ECM.

On the other hand, the application of imaging analysis with a specialized software facilitated the quantification of total and viable external mycelium of mycorrhizal fungi length compared with other microscopic methods of estimation performed in membranes.

# 1 INTRODUCCIÓN

La amplia gama y diversidad de organismos que habitan el suelo juegan papeles importantes en los ciclos biogeoquímicos (Brundrett *et al.*, 1996). Los hongos están involucrados en la descomposición de la materia orgánica, son elementos centrales en el ciclaje de nutrientes, en la producción primaria, vía la provisión de minerales a las plantas. Estos pueden estar asociados al tejido vegetal subterráneo como las micorrizas, definidas como la asociación simbiótica entre algunos de ellos y las raíces de la mayoría de las plantas. Sin embargo, es extremadamente difícil determinar con precisión el tamaño de la comunidad de hongos en un ambiente; esto es porque manifiestan una gran variedad morfológica y fisiológica y es complicado distinguir cada individuo en el suelo (Smith y Read, 1997).

El estudio con hongos micorrízicos requiere métodos que distingan los diferentes estados de desarrollo de las estructuras de éstos en las raíces de las plantas y en el suelo, lo cual está intrínsecamente relacionado con la productividad vegetal. Dentro de estos métodos, la microscopía de fluorescencia es una herramienta fundamental debido a la escala de observación de la mayoría de las micorrizas. Esta ofrece una combinación de sensibilidad, resolución espacial y temporal, así como compatibilidad con la microscopía óptica para percibir eventos biológicos en el tiempo constituyendo una herramienta muy poderosa en el estudio de micorrizas. Permite la observación de hifas y otras estructuras intra y extrarradicales, así como la identificación de las etapas de vida de los organismos y el estado de la simbiosis (Cudlín *et al.*, 1996).

Se han desarrollado diferentes métodos utilizados como herramientas para medir y evaluar distintos parámetros de poblaciones o comunidades de hongos en el suelo. La cuantificación de productos de la respiración para apreciar la contribución relativa de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> producido por bacterias y hongos es uno de ellos (Anderson y Domsch, 1973; Mukerji *et al.*, 2002); sin embargo, éste no indica la cantidad de biomasa de ambos organismos *per se*. Anteriormente, se realizaron estudios de cuantificación de ADN, ATP y proteínas para estimar la biomasa total (Holm-Hansen, 1973; Parkinson, 1982; Morgan *et al.*, 1991) pero estas técnicas no pueden diferenciar entre el origen bacteriano y fúngico. Las determinaciones de quitina y ergosterol en suelo son más específicas para cuantificar biomasa fúngica; sin embargo, para realizar estas pruebas se debe primero establecer curvas de calibración en

monocultivos y posteriormente aplicarlos a estudios de poblaciones naturales (Ekblad *et al.*, 1998). Cabe mencionar que las evaluaciones de quitina en muestras de suelo son complicadas además por la presencia de exoesqueletos quitinosos de la microfauna (Cudlín *et al.*, 1996).

Los métodos anteriores realizan mediciones indirectas; entre las mediciones directas se encuentran las técnicas visuales, las cuales han sido preferidas para la detección del desarrollo de las diferentes etapas de las estructuras micorrízicas y con ello documentar el estado que guarda la simbiosis. Contrariamente, las técnicas visuales son indirectas para medir su biomasa en el suelo (Frankland *et al.*, 1978).

## 2 MARCO TEORICO

### 2.1 Micorrizas

Los hongos forman frecuentemente del 75 al 95 % de la biomasa microbiana del suelo y junto con las bacterias, son responsables de alrededor del 90 % del flujo de energía de la materia orgánica durante el proceso de descomposición y asimilación de las plantas (Campbell, 1987). A su vez, el 80 % de las plantas terrestres y semiacuáticas establecen simbiosis micorrízicas (Brundrett *et al.*, 2008).

La asociación micorrízica es bien conocida por la relación mutua entre dos organismos, los hongos y las raíces de las plantas, en donde los hongos reciben carbohidratos de la planta hospedera y mobilizan elementos como el fósforo y otros nutrientes hacia las raíces. Se han reconocido siete tipos de micorrizas basados en el grupo de hongos involucrados y su especificidad por ciertas de plantas, así como en caracteres morfológicos, resultando en complejas interacciones (Melville *et al.*, 1998): arbusculares, ectomicorrizas, ectendomicorrizas, micorrizas arbutoides, monotropoides, ericoides y orquideoides (Mukerji *et al.*, 2002). Las plantas micorrizadas van desde las hepáticas hasta las monocotiledóneas: sus hongos simbioses pueden pertenecer a los phyla Glomeromycota, Ascomycota, Zigomycota y Basidiomycota (Schüssler *et al.*, 2001). Las micorrizas han tenido éxito colonizando ambientes que van desde las zonas alpinas y boreales hasta las praderas y zonas tropicales (Smith y Read, 1997).

La complejidad estructural y funcional en las asociaciones micorrízicas puede estudiarse desde el nivel celular hasta el ecosistémico. Todas las micorrizas son un intrincado sistema de interconexión entre células que pertenecen a los dos organismos eucariontes diferentes y que mantienen una comunicación prolongada e intercambio bidireccional de nutrientes (Smith y Read, 1997).

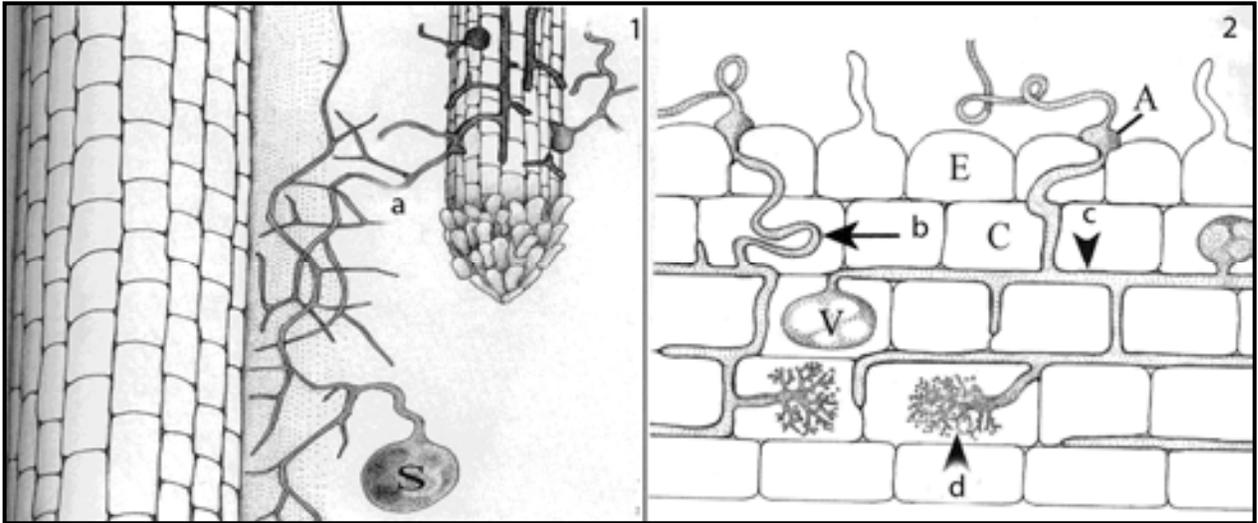
Los mecanismos comunes reconocidos en las asociaciones micorrízicas son los eventos morfogénicos por el incremento en la superficie de contacto entre los dos organismos debido a los procesos en las membranas plasmáticas del fotobionte (planta) y las progresivas modificaciones de las superficies de intercambio pertinentes a la permeabilidad celular

(Bonfante-Fasolo y Scannerini, 1992). Cabe mencionar que las paredes vegetales no son matrices extracelulares pasivas que sólo mantienen la forma y rigidez de las membranas, sino también son reguladoras de la dinámica estructural y comunicación celular involucradas en procesos de reconocimiento (Bolwell, 1988).

### **2.1.1 Micorrizas arbusculares (MA)**

Las MA son las asociaciones micorrízicas más frecuentemente encontradas en la naturaleza, están ampliamente distribuidas geográficamente y en las especies vegetales (Harley y Smith, 1983). Las MA han sido estudiadas ampliamente porque se asocian al 80 % de las plantas, aproximadamente a 250 000 especies (Smith y Read, 1997) entre las que se encuentran especies vegetales comestibles de importancia económica y ornamentales (Peterson *et al.*, 2004). Las MA representan una simbiosis obligada para los hongos. Se forman por hongos aseptados del Phylum Glomeromycota y plantas que pueden ser angiospermas, gimnospermas, pteridofitas y hepáticas.

En esta simbiosis el hongo recibe los azúcares de la planta mientras le facilita la ingesta de fósforo y otros nutrimentos de baja movilidad en suelo (Gaspar *et al.*, 2001). Los hongos MA son componentes importantes de la fertilidad del suelo y juegan un papel crucial en la protección de las raíces contra enfermedades tanto como en la agregación, estabilidad y regulación de la actividad biológica del mismo. El nombre *arbuscular* se deriva de la principal estructura de intercambio formada en la micorriza llamada *arbúsculo*, el cual se presenta en las células corticales de las raíces siendo esencial para el intercambio de nutrimentos. Las MA tienen tres componentes importantes: la raíz; las estructuras del hongo intrarradicales como son esporas, vesículas, micelio intramatricial y arbúsculos y el micelio extrarradical y las esporas externas formadas en éste (Smith y Read, 1997) (Fig. 1).



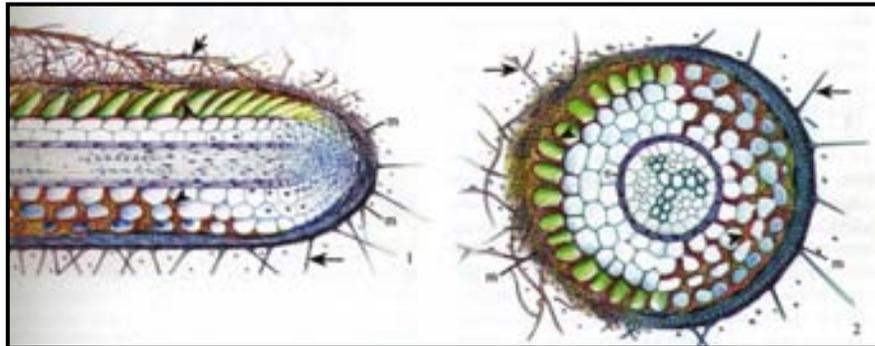
**Figura 1.** (1) Colonización de una raíz por una hifa proveniente de una espora en germinación (S) o de una hifa de otra raíz ya colonizada (a). (2) Colonización intrarradical: (A) apresorio, (E) epidermis, (C) córtex, (b) ovillo, (c) espacio intercelular, (V) vesículas y (d) arbusculos (modificado de Peterson *et al.*, 2004).

### 2.1.2 Ectomicorrizas (ECM)

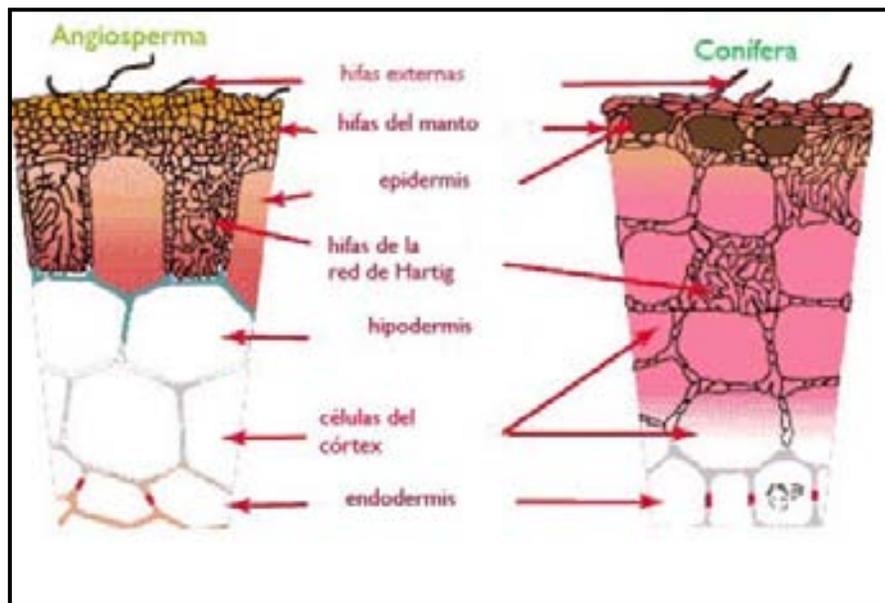
Las ECM se encuentran generalmente en especies arbóreas, sin embargo algunos arbustos y hierbas también forman esta asociación. Se pueden observar a simple vista y predominan entre los árboles de zonas templadas, siendo especialmente características en géneros de coníferas como *Pinus*, *Larix*, *Pseudotsuga*, *Picea* y en angiospermas como *Alnus*, *Betula*, *Fagus*, *Quercus* y *Eucalyptus* (Peterson *et al.*, 2004).

Las ECM se caracterizan porque las hifas de los hongos no penetran en el interior de las paredes vegetales, sino que se ubican sobre y entre las separaciones de éstas. Las ECM tienen tres estructuras involucradas en la absorción y transporte de nutrientes: a) el manto, un tejido plectenquimatoso hacia el interior y pseudoparenquimatoso hacia el exterior del ápice (Agerer, 1991) que se presenta como una interfase entre la raíz y el suelo y que participa en el almacenamiento, movimiento de agua y de minerales de la solución del suelo a la raíz; b) la red de Hartig, un laberinto de hifas que crecen hacia el interior de la raíz y se sitúan entre las células de la epidermis y las corticales y c) el micelio externo, el cual es un sistema de crecimiento de hifas que sirve para aumentar el área de absorción de nutrientes en el suelo (Kottke y Oberwinkler, 1987 en Qian *et al.*, 1998a).

La principal diferencia entre las ECM formadas con angiospermas y gimnospermas es que en las primeras la red de Hartig se confina únicamente a la epidermis, mientras en gimnospermas se forman en células epidérmicas y corticales (Brundrett *et al.*, 1996) (Fig. 2 y Fig. 3).



**Figura 2.** Secciones longitudinal (1) y transversal (2) de ectomicorrizas en las angiospermas (mitad superior longitudinal y lado izquierdo en transversal) y gimnospermas (mitad inferior longitudinal y lado derecho en transversal); (m) manto (modificado de Peterson *et al.*, 2004).

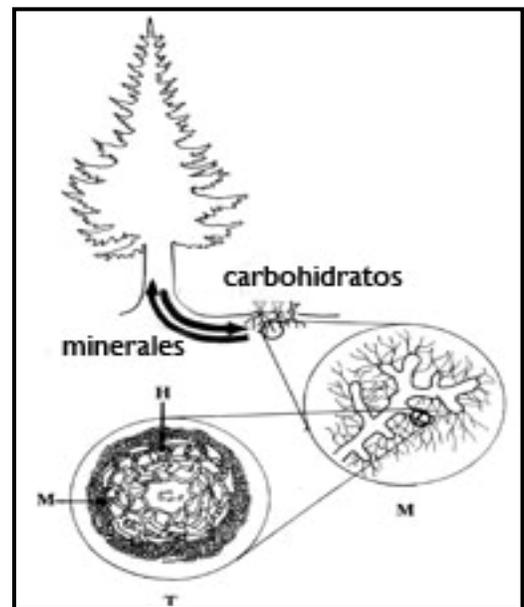


**Figura 3.** Principales componentes de ectomicorrizas en una sección transversal de raíz (modificado de Peterson *et al.*, 2004).

La formación de una ECM está caracterizada por los cambios en la morfología de la raíz, tanto a nivel macroscópico como microscópico. El primero está representado por la reducción en la ramificación de los ápices, debido a que el manto impide que las raíces crezcan, generándose bifurcaciones cortas en los ápices. A nivel micromorfológico, el más notable es la red de Hartig, en la cual la longitud de las hifas aumenta al crecer intrincadamente a través de espacios intercelulares limitados formando ramificaciones irregulares que envuelven a las mencionadas células vegetales (Kottke y Oberwinkler, 1987 en Qian *et al.*, 1998a).

De los caracteres mencionados anteriormente, existen algunos que al evaluarse microscópicamente son útiles para la clasificación taxonómica de ECM. Entre ellos, están el grosor y arreglo de las hifas en diferentes zonas del manto: hacia el exterior del ápice las hifas son reconocibles como estructuras individuales (tejido plectenquimatoso), y al interior pierden su identidad y forman una red compleja (tejido pseudoparenquimatoso) (Agerer, 1991). Además del tipo celular está el número de células corticales que abarca la red de Hartig y el grosor mismo de la red (Mukerji *et al.*, 2002).

El sistema radical de los árboles en los bosques es dinámico y cambia conforme éstos van envejeciendo y regenerándose. La eficiencia del sistema de ECM se puede medir con respecto a la toma de nutrientes *vs.* la demanda de carbohidratos, lo cual es una función de la actividad fisiológica de las micorrizas y su tasa de recambio (Qian *et al.*, 1998a). Se ha encontrado que para algunas ECM, la actividad y el tiempo de vida de ápices individuales en un sitio del bosque están influenciados por la calidad del sitio (Al-Brass *et al.*, 1988). Para estudios ecológicos resulta importante reconocer los niveles de actividad de los tipos predominantes de ectomicorrizas y su relación con el suelo (Al-Brass *et al.*, 1988) (Fig. 4).

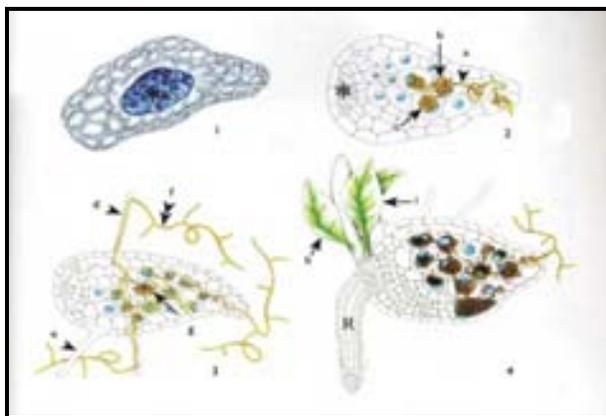


**Figura 4.** Esquema interescala de un corte transversal de un ápice (T) de ectomicorriza de conífera. (M) manto, (H) red de Hartig (Danell *et al.*, 1994) .

### 2.1.3 Micorrizas de orquídeas (MO)

Las MO son un tipo especial de endomicorrizas que sólo se presentan en la familia Orchidaceae, una de las más grandes entre las angiospermas formadas con hongos del Phylum Basidiomycota y posiblemente del Ascomycota (Schüssler *et al.*, 2001; Dearlaney, 2007). En esta asociación la mayoría de las semillas de las orquídeas dependen de la energía y nutrientes que les proporcionan los hongos micorrízicos para germinar y desarrollarse; es decir, atraviesan por una fase micoheterótrofa antes de llegar a ser autótrofas (Rasmussen, 1995; Smith y Read, 1997; Peterson *et al.*, 2004).

La germinación de las orquídeas marca la transición del estado de embrión latente a una forma metabólicamente activa. El proceso inicia con la imbibición de la semilla y con ello la ruptura de la testa. A partir de este evento comienza la división celular, formándose el protocormo (Arditti, 1992). Las hifas del hongo atraviesan las células del suspensor, llegando hasta las células del embrión donde se introducen y comienzan a formar los pelotones o estructuras en forma de ovillos similares a las formadas en las células subepidérmicas del córtex. Con estos eventos se inicia la colonización o simbiosis donde el embrión comienza la digestión de las hifas que forman los pelotones, obteniendo con ello carbohidratos y nutrientes para aumentar de tamaño hasta formarse el protocormo (Rasmussen, 1995; Peterson *et al.*, 2004). El protocormo simbiótico se polariza en la región del meristemo apical y basal; es decir, la parte apical dará formación al ápice foliar y la basal a la raíz. Los pelotones se distribuyen en la parte basal y algunas hifas pueden salir del protocormo a través de estructuras llamadas rizoides (Fig. 5).



**Figura 5.** Eventos de germinación de la semilla de orquídea formando un protocormo. 1) Embrión indiferenciado (\*). 2) Colonización por hifas (a y b), formación de pelotones (c) y la polarización formando un meristemo apical (\*). 3) Protocormo con rizoides (d) y (e), hifas (f) en el sustrato, pelotones (g). 4) Plántula con primordios foliares (h) e (i) y la primera raíz adventicia (R) (modificado de Peterson *et al.*, 2004).

En las plantas adultas, el hongo entra en la raíz a través de los pelos radicales y/o las células del epiblema o velamen (Rasmussen, 1995). Las zonas de colonización en las raíces de las orquídeas son variadas y algunas de ellas se pueden distinguir por una coloración amarillenta en la epidermis (Mitchel, 1989) (Fig. 6).



**Figura 6.** Diagrama de una raíz de orquídea mostrando la típica colonización: las hifas entran en la raíz a través de la epidermis (a) y (b), y forman los pelotones en las células del cortex (c) que se digestan (e).

Los hongos que forman asociaciones con orquídeas son llamados Rhizoctonias. La determinación taxonómica del género-forma *Rhizoctonia* en su fase anamórfica se basa principalmente en características morfológicas del micelio creciendo *in vitro* incluyendo las siguientes: 1) color de la colonia generalmente hialina a marrón, 2) hifas septadas, 3) bifurcación a 90° cerca del *septum* distal en hifas jóvenes, 4) formación de células monilioides (propágulos asexuales), 5) doliporo septado (observable sólo con microscopía electrónica), 6) hifas binucleadas o multinucleadas. Además estos hongos no presentan fíbulas, esclerocios, conidias y rizomorfos (Moore, 1987; Sneh *et al.*, 1991).

La sistemática de micorrizas de orquídeas ha sido estudiada utilizando caracteres morfológicos (Warcup y Talbot, 1996) y moleculares (Taylor y Bruns, 1996). El género-forma

*Rhizoctonia* incluye los géneros anamórficos (asexuales) *Ceratorhiza*, *Epulorhiza*, *Moniliopsis* (Moore, 1987) y una variedad de teleomorfos (fase sexual) *Ceratobasidium*, *Thanatephorus*, *Tulasnella* y *Sebacina* (Warcup y Talbot, 1996). La determinación taxonómica en la mayoría de los casos debe realizarse basándose en las características de la fase anamorfa ya descritas y a las que se adicionan otros caracteres fisiológicos del cultivo. Estas se resumen en: pigmentación, dimensión y bifurcación de las hifas, estructura del poro septal, número de núcleos, tamaño y forma de las células moniloides, tasa de crecimiento y apariencia del crecimiento en cultivo (Sneh *et al.*, 1991).

Existen especies del género *Rhizoctonia* binucleadas y multinucleadas. Las multinucleadas pueden tener entre 3 y 28 núcleos en células jóvenes, donde el número menor puede estar en las células viejas, probablemente por la formación de septos secundarios. El número de núcleos en las células moniloides es similar al de las células jóvenes (Sneh *et al.*, 1991). Las *Rhizoctonias* que forman asociaciones con orquídeas son generalmente *Ceratorhiza* y *Epulorhiza* que pueden distinguirse entre otras características por sus hifas binucleadas (Sneh *et al.*, 1991).

En resumen, se sintetiza en el Cuadro 1 las características morfológicas más relevantes que sirven para diferenciar entre los tres tipos de micorrizas estudiadas en este trabajo.

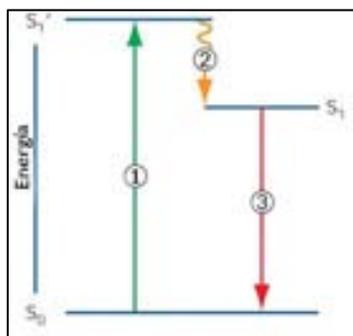
**Cuadro 1.** Principales caracteres distintivos entre micorrizas arbusculares, ectomicorrizas y micorrizas orquideoides donde + significa presencia y – ausencia (modificado de Smith y Read, 1997).

Característica	Tipo de micorriza		
	<i>Arbuscular</i>	<i>Ectomicorriza</i>	<i>Orquideoide</i>
Micelio septado	-	+	+
Micelio aseptado	+	-	-
Colonización intracelular	+	-	+
Manto	-	+	-
Red de Hartig	-	+	-
Vesículas y arbusculos	+ ó -	-	-
ovillos	+	-	+
Taxón del hongo	Glomeromycota	Basidiomycota/ Ascomycota Zigomycota	Basidiomycota
Taxón de la planta	Briofitas Pteridofitas Gimnospermas Angiospermas	Gimnospermas Angiospermas	Orquídeas

## 2.2 Herramientas para el estudio microestructural de las micorrizas: Microscopía de Fluorescencia

La microscopía de fluorescencia se basa en el siguiente principio: un átomo en un estado excitado puede perder energía y regresar a su estado base de diferentes formas y al hacerlo emitir luz de longitudes de onda más grandes pero en menor intensidad que las absorbidas anteriormente y que lo estimulan (Herman, 1998). Cuando los átomos absorben la luz, los electrones de los mismos realizan una transición hacia niveles más altos de energía. La energía

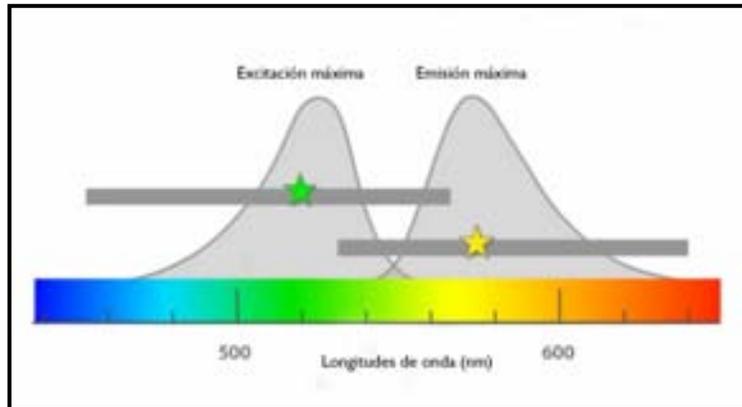
de los fotones absorbidos es inversamente proporcional a la longitud de onda de la luz e igual a la diferencia entre el nivel menor de energía (estado base) y el estado al que llegó el electrón cuando se excitó. La diferencia entre la energía del estado base y el más alto depende de la estructura del átomo y corresponde a su espectro de absorción (Cudlín *et al.*, 1996; Beiser, 2003) (Fig. 7).



**Figura 7.** Diagrama del fenómeno de la fluorescencia. Excitación (1) y vibración de un electrón (2) seguida por la absorción óptica (S<sub>1</sub>) y la subsecuente emisión de luz (fluorescencia) (3) a regresar a su estado basal (S<sub>0</sub>) y de nuevo a su estado excitado superior al ser excitado (tomado de [www4.gelifesciences.com](http://www4.gelifesciences.com)).

El espectro de excitación o absorción puede conocerse a través del estudio de las longitudes de onda de absorción a emisiones establecidas. Similarmente, el espectro de emisión puede conocerse cuando la longitud de onda de excitación es constante y las longitudes de onda de emisión han sido medidas. En el paso de los electrones del estado excitado al estado estable se pierde energía. Como resultado, el espectro de emisión de un fluoróforo o molécula que emite fluorescencia cuando es excitada, se corre hacia una longitud de onda mayor en relación al espectro de excitación (Abramowitz y Davidson, 2003).

Algunas moléculas emiten fluorescencia por sus componentes intrínsecos cuando son excitadas, este fenómeno es llamado autofluorescencia o fluorescencia primaria. La fluorescencia secundaria consiste en la emisión producida posterior a la combinación con una molécula con fluorescencia primaria llamada colorante o fluorocromo (Altemüller y van Vliet-Lanoë, 1990; Li *et al.*, 2004) (Fig. 8)



**Figura 8.** Esquema de los espectros de excitación y emisión y su desplazamiento (Nava, 2008).

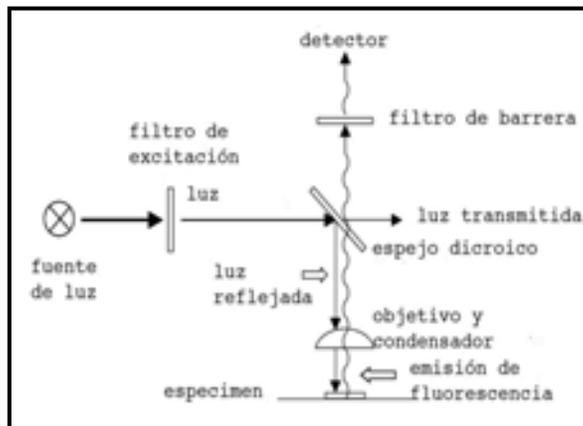
### 2.2.1 Microscopio de epifluorescencia

Los componentes esenciales de un microscopio de epifluorescencia incluyen una fuente de luz de excitación, filtros para la selección de longitudes de ondas específicas (cubos), objetivos específicos y detectores. En este tipo de microscopios el condensador también funciona como objetivo, la luz de emisión sólo tiene una dirección desde la fuente hacia el detector. La fuente de luz (tungsteno, mercurio a alta presión, xenón o una combinación entre mercurio/xenón) emite energía de excitación de diferentes longitudes de onda. La excitación máxima de la molécula ocurre cuando los picos de longitud de onda de la luz se acercan al pico de absorción de la molécula fluorescente (Herman, 1998; Li *et al.*, 2004).

En una lámpara de epifluorescencia se tiene una mezcla de vapor de mercurio y de un gas inerte como el argón dentro de un tubo de vidrio que produce radiación ultravioleta cuando se transmite corriente eléctrica a través de él. El interior del tubo está cubierto con una sustancia fluorescente de fósforo que emite luz visible cuando es excitado por luz ultravioleta (Beiser, 2003).

La excitación máxima puede producirse utilizando un filtro de excitación que sólo transmita luz bajo longitudes de onda inferiores a la correspondiente a la máxima absorbancia de la molécula. El filtro de excitación reduce la intensidad de la luz del fondo, que tiene el mismo intervalo de longitudes de onda que la luz fluorescente emitida (Herman, 1998).

Un segundo filtro llamado espejo dicroico está diseñado para reflejar luz de longitudes de onda menores mientras transmite luz de longitudes mayores. La excitación de la molécula es reflejada por el espejo dicroico y condensada por el objetivo antes de llegar al espécimen. En teoría, sólo la fluorescencia emitida por el espécimen pasa a través de él y llega al detector (oculares o cámara instalada en el microscopio) (Li *et al.*, 2004) (Fig. 9).



**Figura 9.** Esquema del funcionamiento de un microscopio de epifluorescencia (modificado de Li *et al.*, 2004).

### 2.2.2 Autofluorescencia

La autofluorescencia también llamada fluorescencia intrínseca, es aquella natural del espécimen. Esta es comúnmente encontrada en paredes celulares, cloroplastos y vacuolas. En general, cuando se examinan secciones de plantas superiores bajo luz ultravioleta (UV), las paredes celulares (lignificadas o suberizadas) muestran una fluorescencia azul brillante o blanco-azulada, los cloroplastos aparecen en rojo y la cutícula azul. Las paredes celulares vegetales emiten luz azul bajo excitación UV debido a la presencia de lignina, cutina, suberina y otros ácidos fenólicos como el ácido ferrúlico. Por otro lado, algunos hongos fluorescen bajo luz UV y luz azul debido a la quitina, principal componente de sus paredes celulares (Rost, 1995). Mediante el aislamiento de estructuras de micorrizas, se ha demostrado la autofluorescencia de las moléculas propias de los hongos y la que se produce por la interacción con las células de la planta (Dreyer *et al.*, 2006).

### 2.2.3 Fluorocromos

Los fluorocromos son sustancias que tienen la propiedad de emitir un fotón de una longitud de onda determinada cuando son excitados por otro fotón de una longitud de onda característica. La parte de la molécula que emite la fluorescencia se denomina fluoróforo. Las moléculas de

fluorocromo se utilizan para marcar ciertas estructuras celulares destacándolas del resto de los elementos que componen la célula. Esto permite identificar distintas moléculas o conjuntos de moléculas (Li *et al.*, 2004).

Un efecto conocido como fotodestrucción o fotoblanqueamiento resulta de la reactividad química de los fluorocromos a lo largo del tiempo de excitación. Se parte desde que el estado excitado es generalmente mucho más químicamente reactivo que el estado base, así el fluoróforo excitado puede participar en reacciones químicas que alteren la estructura molecular del fluorocromo y con ello reduzcan su fluorescencia. La velocidad de esta reacción depende de la sensibilidad de un fluorocromo particular al blanqueamiento, a la química del ambiente (pH), a la intensidad de luz y tiempo de excitación y al número de ciclos de excitación dados a la muestra (Abramowitz y Davidson, 2003; Li *et al.*, 2004).

Por lo tanto, la fluorescencia depende de las propiedades físico-químicas de moléculas fluorescentes o fluorocromos. En particular, la polaridad, pH y/o contenido iónico y viscosidad del medio, así como la capacidad de los fluorocromos para formar enlaces covalentes con moléculas vecinas pueden influir en la emisión de la fluorescencia. Así, los colorantes fluorescentes orgánicos han sido utilizados ampliamente como herramientas para estudios biológicos de complejidad variable que van desde biomoléculas aisladas de membranas celulares y organelos, hasta cultivos celulares o incluso tejidos (Cudlín *et al.*, 1996).

Los fluorocromos se pueden dividir en dos grupos de acuerdo a sus características funcionales. El primer grupo lo conforman aquellos que tiñen componentes celulares específicos como ácidos nucleicos, proteínas, lípidos o membranas celulares. El segundo grupo incluye a los fluorocromos que no fluorescen por ellos mismos, pero pueden fluorescer como resultado de un proceso metabólico (Li *et al.*, 2004).

#### **2.2.4 Fluorocromos seleccionados utilizados en estudios en micorrizas.**

A continuación, se presentan los fluorocromos más utilizados en la literatura para el estudio estructural y de actividad bajo fluorescencia en las simbiosis micorrízicas.

El blanco de calcofluorina M2R (CFW) es un fluorocromo ampliamente utilizado en hongos para teñir paredes celulares de levaduras e hifas; se utiliza normalmente a concentraciones típicamente mayores a 25  $\mu\text{M}$  que interfieren con la síntesis de quitina y el

crecimiento celular (Roncero y Duran, 1985). La CFW se une a las paredes celulares de hongos al intercalarse en cadenas nuevas de quitina, previniendo el ensamblaje de otras microfibras de quitina (Elorza *et al.*, 1983; Roncero y Duran, 1985; Hoch *et al.*, 2005).

El diacetato de fluoresceína (FDA) se utiliza para evaluar viabilidad debido a que es hidrolizado por numerosas enzimas diferentes, como proteasas, lipasas y esterases (Guibault y Kramer, 1964; Rotman y Papermaster, 1996); el producto de esta conversión enzimática es la fluoresceína, la cual puede ser visualizada en color verde-amarillo dentro de las células por microscopía de fluorescencia y cuantificada por fluorometría o espectrofotometría para determinar la cantidad de biomasa microbiana activa en suelo (Söderström, 1977; Swisher y Carroll, 1980; Moore, 1987; Morgan *et al.*, 1991; Morris *et al.*, 1997).

El 4',6-Diamino-2-fenilindole (DAPI) es un compuesto que forma complejos fluorescentes con cadenas de ADN, ya que muestra alta especificidad por los pares de bases A-T. Esto permite llevar a cabo la observación de material genético en un tejido, preferentemente visualizado como núcleos en eucariontes (Martin, 1987).

Finalmente, el yoduro de propidio (PI) también es un fluorocromo afín al ADN. El PI se adhiere al ADN por intercalación entre las bases con pequeña o nula preferencia por conjuntos de 4-5 pares de bases de DNA (Hickey *et al.*, 2004). También se adhiere al ARN, pero se requiere un tratamiento con nucleasas para distinguir entre ARN y ADN (Bago *et al.*, 1998).

## **2.2.5 Captura y análisis de imágenes**

Los métodos de captura son importantes en la microscopía de fluorescencia, los componentes físicos (microscopio de fluorescencia, computadora, monitor, cámara, software de análisis de imágenes) de un sistema de análisis de imágenes son necesarios para poder optimizar los tiempos de exposición y obtener instantáneamente una imagen de alta calidad y resolución que el ojo humano no podría percibir por la simple observación directa (Caldwell *et al.*, 1989; Glasbey y Horgan, 1995).

De este modo, los dispositivos de captura de imágenes deben ser cámaras de gran sensibilidad. Las cámaras CCD (Charge Coupled Device) pueden convertir la energía de los fotones de la luz fluorescente emitida en energía eléctrica y así producir una señal medible

proporcional al número de fotones detectados, posteriormente la señal análoga es convertida a una señal digital (Drent, 2008).

La resolución digital se define como la habilidad de distinguir dos señales con intensidades similares. Esta es dependiente del número de píxeles (unidades mínimas homogéneas en color que forma parte de una imagen digital). La resolución espacial mejora conforme el tamaño de los píxeles se reduce. Los sistemas con alta resolución espacial pueden no sólo detectar objetos pequeños, sino discriminar mejor las diferencias de objetos precisos (Drent, 2008).

La digitalización de un video o una imagen electrónica capturada a través de un microscopio óptico resulta una excelente opción para manipular las imágenes para adaptarlas a la forma adecuada que permita extraer información útil a partir de ellas. Los objetos biológicos tienden a ser irregulares y variables y por tanto, presentan un reto para realizar interpretaciones automáticas. La aplicación de análisis de imágenes digitales en las ciencias biológicas consiste en sistemas semi-automáticos, en los cuales con ayuda de la computadora se reducen aspectos tediosos para la cuantificación humana de la imagen (Glasbey y Horgan, 1995).

## 3 ANTECEDENTES

### 3.1 Autofluorescencia en micorrizas

La microscopía de fluorescencia ha sido muy utilizada en estudios de la simbiosis micorrízica desde los años sesenta. La autofluorescencia de los hongos ha sido de gran utilidad para la investigación en micorrizas, algunos autores sugieren que esta propiedad se debe a las moléculas de quitina (Jabaji-Hare *et al.*, 1984; Dreyer *et al.*, 2006), a la interacción entre la quitina y la interfase entre la pared celular y el plasmalema (Ames *et al.*, 1982) o a la síntesis de los compuestos fenólicos por la planta en respuesta a la micorrización (Vierheilig *et al.*, 2001).

La autofluorescencia se ha utilizado en MA como herramienta para evaluar la colonización del hongo dentro de las raíces (Jabaji-Hare *et al.*, 1984; Vierheilig *et al.*, 2001; Dreyer *et al.*, 2006). Los arbusculos metabólicamente activos autofluorescen, lo que significa que esta propiedad puede asistir la evaluación de la colonización micorrízica activa. Sin embargo, según Dreyer *et al.* (2006) esto sólo es adecuado posterior a un tratamiento con hidróxido de amonio y no es tan efectivo para observar otras estructuras fúngicas debido a la autofluorescencia de la pared celular de la planta, la cual enmascara la de los hongos. También se ha aplicado para observar estructuras externas: las esporas jóvenes fluorescen en verde cuando son excitadas por luz en la longitud de onda del azul (450-480 nm), mientras que las maduras muestran emisión adicional color naranja rojizo cuando se les excita en las mismas longitudes de onda (Dreyer *et al.*, 2006).

Ames *et al.* (1982) probaron la autofluorescencia de los hongos MA en cinco diferentes especies de plantas y descubrieron que la especie hospedera no afecta esta propiedad. El estudio de Gange *et al.* (1999) también confirma que la autofluorescencia de hongos MA puede ser un fenómeno ampliamente extendido en éstos, encontrando el mismo patrón de intensidad, espectros de excitación y emisión en diez especies de plantas colonizadas por hongos nativos. Así, la autofluorescencia de las distintas estructuras de hongos MA puede utilizarse para caracterizar sus componentes químicos basados en sus propiedades ópticas. Las diferencias entre la emisión de las diferentes estructuras coinciden también con los diferentes

estados de desarrollo (p. ej. la emisión adicional de luz roja coincide con la etapa de maduración de las esporas) (Dreyer *et al.*, 2006).

Cabe mencionar que existen menos estudios que documenten el empleo de la autofluorescencia en ECM o en MO limitándose en esta última al estudio del género-forma *Rhizoctonia* no micorrízico.

### **3.2 Fluorocromos utilizados en estudios de micorrizas.**

Las principales técnicas de microscopía de fluorescencia en micorrizas utilizando fluorocromos han sido con marcadores fluorescentes de enzimas y núcleos. Las enzimas fluorescentes han sido utilizadas como marcadores de quitina utilizando lisamina-rodamina o isotiocianato de fluoresceína (Benjaminson, 1969). La viabilidad de hongos del suelo y levaduras ha sido estimada con diacetato de fluoresceína, naranja de acridina, anilina azul, blanco de calcofluorina o rodamina B (Auger *et al.*, 1979; West, 1988). Entre estas pruebas, la de viabilidad de micorrizas utilizando FDA es particularmente importante debido a que da resultados acertados comparables con los obtenidos por los métodos tradicionales no fluorescentes (Söderström, 1977 en Cudlín *et al.*, 1996) y además se han llevado a cabo numerosos estudios histoquímicos en raíces con este colorante. Otros colorantes como la berberina fueron utilizados para la visualización de suberina, lignina y calosa; el amarillo fluorol 088 se ha utilizado para la tinción de lípidos (Brundrett *et al.*, 1991).

El gran potencial de la microscopía de fluorescencia en estudios con micorrizas consiste en la sinergia entre la detección optoelectrónica, el procesamiento de imágenes digitales y la disponibilidad de un amplio número de pruebas y marcadores los cuales generan suficiente contraste para hacer visibles varias estructuras de interés (Haugland, 1996).

Los fluorocromos más utilizados en el estudio con micorrizas se han dividido en: 1) aquellos que permiten mejorar el contraste para observar ciertas estructuras con detalle (ej.: para observar el manto o la red de Hartig) tales como, rodamina B y anilina azul (Evans y Hoyne, 1982); 2) los que permiten evaluar viabilidad de las células y/o otros parámetros fisiológicos como el bromuro de etidio, púrpura de bromocresol y rodamina B (Kurzweilova y Sigler, 1993). Para mejorar la diferenciación entre células vivas y muertas, se han realizado pruebas de exclusión combinadas con la técnica conocida como fluorocromasia. Se utilizan

fluorocromos como el diacetato de fluoresceína, que se acumulan en las células y posteriormente son hidrolizados enzimáticamente en compuestos fluorescentes cuando las células están vivas (Söderström, 1977 en Cudlín *et al.*, 1996). En otros estudios de fisiología celular con micorrizas se han investigado aspectos de pH intracelular y potencial de membrana o de actividad mitocondrial para lo cual se utilizan otros colorantes (Haugland, 1996).

### **3.3 Colorantes seleccionados para las pruebas con micorrizas**

En estudios de suelo la CFW se ha utilizado ampliamente para teñir paredes celulares de bacterias y hongos (Davey y Kell, 1997) y plantas (Roncero y Duran, 1985; Li *et al.*, 2004). También se ha utilizado para estudiar micelio externo de MA (Morgan *et al.*, 1991), e hifas del manto y rizomorfos de ECM (Schweiger *et al.*, 2002); así como micelio de Rhizoctonias (Harris *et al.*, 2002).

El ANS se ha utilizado para cuantificar bacterias y hongos activos debido a su afinidad por ácidos grasos de membrana, produciendo un excelente contraste con las partículas de suelo (Mayfield, 1975). También se ha probado en evaluación de viabilidad de MA en suelo (Morgan *et al.*, 1991).

El FDA ha sido utilizado para determinar actividad de microorganismos de suelo como bacterias, protistas y hongos (Brunius, 1980; Lundgreen, 1981; Sieracki *et al.*, 1985; Getliff y Fry, 1989). En ECM se ha aplicado comúnmente para investigar las poblaciones micorrízicas en bosques de *Pinus*, estudiando las diferencias en la actividad de la fluorescencia de varias asociaciones ectomicorrízicas, esto refleja la funcionalidad de las micorrizas lo cual es ecológicamente importante para conocer su desempeño en el ecosistema (Al-Brass *et al.*, 1988). Ritter (1990) citado por Qian *et al.*, (1998a) observó que los tipos de ectomicorrizas difieren en la actividad de sus enzimas hidrolíticas por tejido y por especie.

La evaluación de actividad de tejidos de ECM con FDA se ha llevado a cabo visualmente y se ha establecido cualitativamente lo siguiente: un color verde brillante corresponde a los tejidos más activos (+++); en los siguientes, un verde menos intenso (++) y verde-azul en los restantes (+). La menor intensidad de fluorescencia verde del FDA se debe a la autofluorescencia azul de la suberina o lignina de los tejidos viejos de la raíz o de las hifas. El estado próximo a la muerte (+/-) se muestra en colores café verdosos y los tejidos muertos

(-) se observan color café (Qian *et al.*, 1998a).

El FDA también se ha utilizado como indicador de viabilidad en semillas de orquídeas, pues la fluorescencia en las semillas teñidas se observa fácilmente sin necesidad de remover la testa, lo cual es una labor complicada que se realiza forzosamente en la prueba de viabilidad con cloruro de tetrazolio (Huyn y Coates, 1999).

Las técnicas visuales se han preferido sobre las químicas para la determinación de la biomasa fúngica activa en el suelo (Frankland *et al.*, 1978). La cantidad de hongos vivos se ha medido como el total de la longitud de las hifas fluorescentes teñidas con FDA por unidad de suelo y multiplicando por un factor de conversión apropiado, se puede estimar el biovolumen o biomasa. Las técnicas de tinción utilizan comúnmente membranas, en las cuales quedan adheridas las hifas y se pueden utilizar varios colorantes para ser observadas en un plano bajo el microscopio (Bååth y Söderström, 1980; West, 1988).

Otro fluorocromo ampliamente usado es el DAPI que permite observar núcleos y paredes celulares. En ECM por ejemplo se ha cuantificado con esta tinción las esporas heterocarióticas de los basidiomicetos (Horton, 2006). Conocer el número de núcleos por septo resulta muy útil para realizar identificación taxonómica de hongos del complejo *Rhizoctonia* (Shan *et al.*, 2002).

En MA el número de núcleos se puede correlacionar con la proliferación de la ramificación de las hifas debido al crecimiento celular (Buée *et al.*, 2000). La tinción con DAPI también se ha utilizado para documentar los núcleos en las hifas durante la formación de anastomosis a los 7-14 días posteriores a la germinación de esporas, pues la anastomosis involucra la migración de núcleos vía la formación de fíbulas (Giovannetti *et al.*, 1999; Bago *et al.*, 1998).

El PI se ha utilizado para diferenciar el ARN y ADN, lo cual requiere un tratamiento posterior con nucleasas para distinguir estas moléculas (Bago *et al.*, 1998). También permite discernir entre el simbionte vegetal del fúngico dado que se usa comúnmente en biología vegetal para teñir paredes celulares, permitiendo detectar el espacio de la planta delimitado por la pared celular donde se encuentra el hongo micorrízico (Olivain *et al.*, 2006).

En el cuadro 2, se completan y resumen los estudios previos en hongos y micorrizas con estos cuatro fluorocromos.

**Cuadro 2.** Estudios previos de las micorrizas con los fluorocromos FDA, CFW, ANS, DAPI y PI.

<b>Organismos</b>	<b>FDA</b>	<b>CFW</b>	<b>ANS</b>	<b>DAPI</b>	<b>PI</b>
Varios	Rotman y Papermaster (1996) demostraron la absorción e hidrólisis enzimática del FDA en células animales. Se ha utilizado como estimador de viabilidad celular en protistas (Sieracki <i>et al.</i> , 1985; Brunius, 1980; Getliff y Fry, 1989; Lundgreen, 1981).	Se ha utilizado en la tinción de bacterias del suelo (Jensen <i>et al.</i> , 1998), algas y plantas (Roncero y Duran, 1985).	Mayfield (1975) lo utilizó para evaluar viabilidad de bacterias en suelo.	Se ha utilizado para teñir ácidos nucleicos y secuencias ricas en AT en bacterias, protistas, hongos, plantas y animales (Haugland, 1996).	Jones y Senft (1985) lo proponen en doble tinción (FDA y PI) para determinar viabilidad en células de ratón.
Hongos	Se ha utilizado para evaluar viabilidad en hongos filamentosos (Hickey <i>et al.</i> , 2004).	Se aplica para estudiar la quitina en hongos en general (Elorza <i>et al.</i> , 1983; Roncero y Duran, 1985). Estimador de	Mayfield (1975) lo utilizó para conocer viabilidad de hongos del suelo.	En <i>Rhizoctonia solani</i> se ha utilizado para observar núcleos (Martin, 1987).	Junto con FDA en estudios de viabilidad de esporas de <i>Myxobolus</i> (Yokohama <i>et</i>

		viabilidad celular en hongos filamentosos (Hickey <i>et al.</i> , 2004).			<i>al.</i> , 1997).
Micorriza Arbuscular	Pruebas de viabilidad de células fúngicas vivas (Söderström, 1977; Ziegler <i>et al.</i> , 1975). Indicador de actividad metabólica en suelos y hojarasca; posterior a la extracción de micelio del suelo, se estudió el proceso de senescencia con FDA a través del tiempo (Shnürer y Rosswall, 1982). Indicador de fertilidad de suelos sometidos a reforestación (Silva <i>et al.</i> , 2004).	Utilizado para medir biomasa fúngica total (Morgan <i>et al.</i> , 1991). Barnicki <i>et al.</i> (1994) encontraron que la CFW junto con el rojo congo son poderosos inhibidores de la quitina sintetasa.	Morgan <i>et al.</i> , (1991) realizaron pruebas de viabilidad en micelio externo.	Se ha correlacionado el aumento de núcleos y el crecimiento de hifas (Buée <i>et al.</i> , 2000). Estudios de la dinámica de núcleos en la anastomosis (Bago <i>et al.</i> , 1998; Giovanetti <i>et al.</i> , 1999; Giovanetti <i>et al.</i> , 2003). Se ha utilizado	Se ha utilizado para teñir núcleos (Bago <i>et al.</i> , 1998).

				para teñir núcleos en esporas (Hildebrandt <i>et al.</i> , 2002).	
Ectomicorriza	La tinción se ha utilizado para estimar actividad de tejidos de ectomicorriza, correlacionándose con la intensidad de la emisión (Qian <i>et al.</i> , 1998a). Ritter (1990) evalúa las diferencias en actividad enzimática de tejidos entre las distintas asociaciones ectomicorrízicas para analizar su productividad en el ecosistema.	Se ha utilizado para estudiar la estructura de rizomorfos y células del manto (Schweiger <i>et al.</i> , 2002).	No se encontró.	Estimador del número de núcleos en basidiosporas de esporocarpos aumentando su multiplicación la capacidad metabólica para realizar la germinación (Horton, 2006).	No se encontró.

Micorriza orquideoide	Se ha utilizado como indicador de viabilidad en semillas de orquídea (Huyn y Coates, 1999).	Se ha utilizado para observar el crecimiento de <i>Rhizoctonia solani</i> en suelo (Harris <i>et al.</i> , 2002).	No se encontró.	Determinación del número de núcleos para identificación taxonómica (Sneh <i>et al.</i> , 1991).	Estudios de núcleos de micorrizas orquideoides (Jones <i>et al.</i> , 1998).
-----------------------	---	---	-----------------	---	--

## **4 HIPOTESIS**

La diversidad en los componentes de paredes celulares de los hongos y plantas presentan afinidades específicas a diversos colorantes y por tanto denotan distintas propiedades fluorescentes cuando son excitados a longitudes de onda particulares. La aplicación de los mismos colorantes en distintos tipos de hongos micorrízicos en consecuencia tendrá distintas respuestas en la fluorescencia dependiendo de los componentes de paredes de cada hongo micorrízico, de los hospederos respectivos, así como del estado de madurez de la simbiosis.

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general:**

Aplicar métodos de microscopía de fluorescencia para la identificación de diferentes estructuras de diversos hongos micorrízicos (arbusculares, ectomicorrízicos y orquideoides).

### **5.2 Objetivos particulares:**

1. Evaluar algunos métodos de montaje de muestras de hongos micorrízicos para observar autofluorescencia y realizar las tinciones con los diferentes fluorocromos.
2. Estandarizar las técnicas de tinción con distintos fluorocromos utilizados en el estudio de hongos filamentosos y algunos hongos micorrízicos, para observar distintas partes constitutivas de hongos arbusculares, ectomicorrízicos y orquideoides, así como propiedades fisiológicas.
3. Evaluar técnicas de tinción que se proponen para el análisis de estructuras de hongos micorrízicos arbusculares, ectomicorrízicos y orquideoides.
4. Proponer un método de análisis de imágenes para evaluar biomasa fúngica activa de hongos micorrízicos arbusculares.

## 6 MÉTODOS

### 6.1 Preparación de las muestras para observación en fluorescencia

Las pruebas de fluorescencia se realizaron en diferentes asociaciones micorrízicas: micorrizas arbusculares, ectomicorrizas y micorrizas orquideoides. Se definen a continuación los protocolos establecidos para cada una de ellas.

#### 6.1.1 Origen de las muestras de micorrizas arbusculares (MA)

Las MA se obtuvieron a partir de un cultivo monoxénico *in vitro* de *Glomus intraradices* asociado a raíces T-DNA de zanahoria *Daucus carota* L., proporcionado por el laboratorio Mycologie Végétale de la Universidad Paul Sabatier (Toulouse, Francia). Las raíces simbióticas se subcultivaron en medio mínimo siguiendo el método de transferencia de segmentos colonizados de Declerck *et al.* (1996) (Anexo 1.2).

Para observar el micelio externo se tomó una pieza de medio de cultivo solidificado en Phytigel® de una caja de cultivo en donde se observaron abundantes hifas y/o esporas; se realizaron preparaciones con secciones delgadas cortadas con bisturí o en membranas de nitrocelulosa previamente solubilizado el gelificante (Anexo 1.3), ambas montadas en portaobjetos.

Para conocer el efecto de los colorantes en una muestra de suelo se extrajo una muestra de raíces de *Medicago sativa* L. proveniente de un suelo agrícola del Valle del Mezquital, Hidalgo para observar su colonización interna. También se extrajo micelio a partir de una muestra de micelio externo de suelos de bosque mesófilo de montaña de Oaxaca proporcionada por el Dr. P. Krasilnikov (Laboratorio de Edafología de la Facultad de Ciencias, UNAM), se montó en una membrana por el método de filtrado de Phillips y Hayman (1970).

### **6.1.2 Origen de las muestras para observación en ectomicorrizas (ECM)**

Los ápices de ECM se obtuvieron de un microcosmos con plántulas de *Pinus leiophylla* inoculados con suelo de un bosque natural que se mantenía en propagación en el invernadero del Instituto de Geología de la UNAM durante 2 años y de ápices de ECM de plántulas de *Pinus montezumae* del volcán El Pelado ubicado en el corredor biológico Chichinautzin, México, proporcionadas por la M. en C. Frédérique Reverchon.

Los ápices se limpiaron cuidadosamente bajo un microscopio estereoscópico con ayuda de un pincel fino y se realizaron cortes transversales de los mismos montados en un cubo de unicel utilizando navajas de doble filo (Anexo 1.4). Con esto se obtuvieron secciones transversales finas que permitieron llevar a cabo la tinción para observar las hifas internas y externas del manto y la red de Hartig.

### **6.1.3 Origen de las muestras para la observación de micorrizas orquideoides (MO) a partir de un cultivo *in vitro***

Se realizaron cultivos *in vitro* de semillas de una orquídea terrestre (*Dicromanthus aurantiacus*) (germoplasma MCBOQ27 del Banco de germoplasma de hongos micorrízicos orquideoides del Laboratorio Microcosmos Bioedáfico del Departamento de Edafología del Instituto de Geología de la UNAM) en simbiosis con un hongo micorrízico *Ceratorhiza* sp. determinado molecularmente por Rangel (2006) como *Ceratobasidium* sp. (aislado MCCBHQ11 del mismo Banco de germoplasma) por el método de germinación simbiótica (Rangel, 2006) (Anexos 1.5 y 1.6). Las tinciones se hicieron en cortes de protocormos micorrizados a los 10 días de cultivo *in vitro* para observar los pelotones intracelulares.

También se realizaron cultivos líquidos de la misma *Ceratorhiza* sp. en medio líquido de papa dextrosa (PDB) para analizar hifas del micelio externo de reciente crecimiento que garantizara un cultivo vivo y vigoroso para las pruebas de viabilidad con los fluorocromos. Las hifas se montaron en membranas de nitrocelulosa por filtración a vacío en un equipo Manihold (Millipore®) o directamente en portaobjetos.

## **6.2 Observación de las estructuras micorrízicas por autofluorescencia**

Todas las observaciones de fluorescencia (primaria y secundaria) se realizaron en un microscopio de epifluorescencia y luz polarizada Olympus BX51 equipado con los filtros que corresponden a luz ultravioleta WU (excitación UV 330-385 nm/emisión violeta 420 nm), azul WB (excitación azul 450-480 nm/emisión verde 520 nm), de luz azul-roja WIB (específico para la tinción con FDA) (excitación azul-rojo 460-490 nm/emisión verde 520 nm) y luz verde WG (excitación verde 510-550 nm/emisión rojo 590 nm).

Se observó la autofluorescencia del micelio interno y externo de los tres tipos de micorrizas bajo el microscopio de epifluorescencia utilizando los filtros básicos WU, WB, WG (Anexo 3.1) generales para estudios de fluorescencia. Se hizo además la observación en el filtro WIB que es especializado para la observación precisa de algunos fluorocromos en una longitud de onda más selectiva.

## **6.3 Selección de fluorocromos y colorantes para la observación de estructuras micorrízicas**

Con base en la revisión bibliográfica sobre las distintas metodologías de microscopía de fluorescencia aplicadas para investigar parámetros estructurales y fisiológicos en los diversos grupos formadores de hongos micorrízicos u hongos en general (Cuadro 2), se seleccionaron varios colorantes usados. Los protocolos fueron ajustados con base a ensayo y error de cada caso particular como se describe a continuación.

### **6.3.1 Tinción control con azul de Tripán.**

Se tiñeron con azul de Tripán 0.05 % en lactoglicerol según Phillips y Hayman (1970) las

raíces transformadas de zanahoria aclaradas previamente con KOH al 10 % y las membranas que contenían el micelio externo obtenido de los cultivos *in vitro* o de suelo de MA; esta tinción se hizo como control de la micorrización y para comparar con los resultados obtenidos con los métodos de fluorescencia, dado que algunos segmentos de raíces pueden no presentar colonización.

### **6.3.2 Tinción con blanco de calcofluorina (CFW).**

La CFW se utilizó para teñir las estructuras internas y externas de las tres micorrizas excitadas bajo luz UV (Anexo 2.1). Esto se hizo aplicando el colorante en las raíces de zanahoria (MA), raíces de *Medicago sativa* (MA), membranas de micelio externo de suelos de bosque mesófilo de montaña de Oaxaca (MA), los protocormos micorrizados (MO), ápices de raíces micorrizadas de pino y rizomorfos (ECM) y en micelio externo de *Ceratorrhiza* sp. (MO) montado en las membranas.

### **6.3.3 Tinción combinada con CFW y ácido 8-anilino-1-naftalensulfónico (CFW-ANS)**

Se combinó la tinción de CFW con ANS para mejorar la apreciación de hifas y esporas ya que el segundo colorante mejora el contraste y tiñe paredes celulares en proceso de senescencia (Mayfield, 1975) y en el suelo es importante poder identificar a los organismos en esta etapa. El protocolo de tinción se establece en el Anexo 2.2. La tinción se observan bajo emisión de luz UV.

### **6.3.4 Tinción con diacetato de fluoresceína (FDA)**

El FDA se utilizó para observar las estructuras del micelio viable (Söderström, 1977 en Cudlín *et al.*, 1996) en las muestras de micelio externo de MA y MO (montadas en las piezas de agar y en membranas de nitrocelulosa respectivamente); en los cortes de ápices y rizomorfos en ECM, así como en protocormos micorrizados (MO). El protocolo de tinción se

establece en el Anexo 2.3 y se observa bajo luz azul-roja del filtro especial (460-490 nm).

### **6.3.5 Tinción de núcleos de micorrizas 4'-6-Diamino-2-fenilindole (DAPI)**

Se utilizó el DAPI para teñir núcleos en las muestras de los tres tipos de micorrizas (Giovannetti *et al.*, 1999) (Anexo 2.4). Este colorante es excitado bajo longitud de onda UV.

### **6.3.6 Tinción con yoduro de propidio (PI)**

Las tinciones con PI se utilizaron para reconocer la tinción de núcleos. El protocolo de tinción se establece en el Anexo 2.5 y este colorante se excita bajo luz verde.

## **6.4 Diseño de un protocolo de medición semi-automática de biomasa de micelio externo de MA activo teñido con FDA**

Con el programa de análisis de imágenes digitales Image Pro-Plus 5.0® se diseñó un protocolo de medición de biomasa fúngica activa de micorriza arbuscular del cultivo *in vitro* de *Glomus intraradices*. El protocolo se describe en el Anexo 3.3.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Tinción control en MA

Como se aclaró en la metodología, la tinción tradicional con azul de Tripán de las micorrizas arbusculares permitió verificar que las raíces seleccionadas estuvieran colonizadas para poder aplicar las tinciones con fluorocromos (Lámina 1). Se pudieron observar todos los constituyentes internos que caracterizan a este tipo de micorriza con este hongo particular como arbusculos, hifas intracelulares, vesículas y esporas intrarradicales.

### 7.2 Resultados de autofluorescencia en todas las micorrizas

Todas las observaciones en fluorescencia fueron realizadas y capturadas en microscopía de campo claro previa documentación con fluorescencia. Todas las estructuras de hongos micorrízicos mostraron autofluorescencia cuando fueron excitadas con luces ultravioleta, azul y verde (Láminas 2, 3, 4 y 5). La intensidad de su autofluorescencia fue notablemente diferente entre las estructuras de los tres tipos de micorriza.

Las hifas extramatriciales de *G. intraradices* fueron más visibles en las tres bandas de excitación generales de autofluorescencia; las luces azul y UV indujeron fluorescencia que se mostró en color azul en hifas (Láminas 2D-2F), mientras que la luz verde propició una intensa fluorescencia con emisión en color rojo en vesículas e hifas (Lámina 2L). Las esporas mostraron emisión adicional color naranja con esta luz (Lámina 3C).

En las ECM se presentó fluorescencia azul intenso bajo excitación UV por parte de las paredes celulares de la planta, debido a la presencia de lignina, cutina, suberina y otros ácidos fenólicos (Rost, 1995) (Lámina 4B); sin embargo, la fluorescencia por parte del material fúngico fue de baja intensidad. Las hifas mostraron fluorescencia de menor intensidad o nula en el estrato celular que corresponde exclusivamente a la epidermis de la raíz bajo el manto, debido al alto porcentaje de taninos (Ling-Lee *et al.*, 1977) (Láminas 4B, 4C, 4D). Sin embargo, las células del manto y la red de Hartig emitieron mayor intensidad de fluorescencia

bajo luz azul (Lámina 4C) que bajo luz verde, la que provocó emisión en las hifas de la epidermis subyacentes al manto y mucho menos intensa en las células vegetales especialmente en la estela central (Lámina 4D).

Finalmente, las paredes de las hifas de *Ceratorhiza* sp. mostraron autofluorescencia de mediana intensidad bajo luz azul en sus paredes celulares (Lámina 5C), mientras que los contenidos citoplasmáticos se observaron mejor bajo luz UV (Lámina 5B). En luz verde (Lámina 5D) la fluorescencia fue muy débil. En el Cuadro 3 se resumen estas observaciones.

**Cuadro 3.** Resumen de la autofluorescencia en micorrizas arbusculares (MA), ectomicorrizas (ECM) y micorrizas orquideoides (MO) en varias longitudes de excitación.

Luz	Longitud de onda de excitación (nm)	MA	ECM	MO
UV	330-385	Autofluorescencia de intensidad media en las hifas de micelio externo, hifas, vesículas y esporas intramatriciales.	Mayor fluorescencia por parte de los compuestos de las paredes vegetales. Nula fluorescencia en las células de la epidermis con alto contenido de taninos.	Fluorescencia de mediana intensidad en las hifas de <i>Ceratorhiza</i> sp.
azul	450-480	Autofluorescencia de intensidad media en las hifas de micelio interno y externo.	Alta definición de hifas del manto. Fluorescencia de alta intensidad de algunas zonas de la red de Hartig. Nula fluorescencia en las células de la epidermis con alto contenido de taninos.	Fluorescencia de mediana intensidad en las hifas de <i>Ceratorhiza</i> sp.
verde	510-550	Autofluorescencia de intensidad media en las hifas de micelio interno y externo. Alta intensidad de	Fluorescencia de baja intensidad de las células del manto. Nula fluorescencia	Fluorescencia de baja intensidad en las hifas de <i>Ceratorhiza</i> sp.

		autofluorescencia en vesículas y esporas.	en las células de la epidermis con alto contenido de taninos.	
--	--	---	---	--

### 7.3 Resultados de la tinción con CFW

La tinción con calcofluorina permitió observar paredes celulares fúngicas y vegetales con alto contraste en Phytigel® proveniente de los cultivos *in vitro* (MA), muestras de suelo (MA) y estructuras aisladas en los cortes de ápices de ECM generando mayor emisión en las estructuras de tejidos inmaduros o jóvenes de los hongos.

En MA la tinción mostró diferentes resultados en micelio interno y externo. En el micelio interno de *G. intraradices*, las estructuras de la raíz emitieron mayor fluorescencia que las de los hongos (Lámina 6).

Las muestras de raíces de *Medicago sativa* obtenidas de suelo y recuperadas en una membrana de nitrocelulosa presentaron alta fluorescencia por parte de los hongos que las colonizaron, algunos de ellos MA (Lámina 7). Ambos medios de montaje (Phytigel® y membranas de nitrocelulosa) permitieron distinguir claramente las estructuras de micelio externo.

En ECM, la tinción con CFW permitió observar con detalle la microestructura y tejido de las hifas del manto interno con gran claridad (Lámina 9B y 9F), así como las paredes celulares del córtex (Lámina 9D). También permitió observar en detalle el acomodo de las hifas externas en rizomorfos (Lámina 9H).

En MO, la CFW resultó ser una buena herramienta para observar los límites de las células vegetales en los que se circunscriben los pelotones ya que éstos son más evidentes en microscopía de campo claro (Láminas 10A-10F) y las hifas del cultivo de *Ceratorhiza sp* (Lámina 10H).

### 7.4 Resultados de la tinción combinada CFW y ANS

El combinar CFW y ANS permitió mejorar el contraste de la tinción en las estructuras externas de las micorrizas ya sea obtenidas de suelo o en medios gelificados. La combinación permitió además observar fluorescencia más intensa y prolongada en las estructuras fúngicas (Láminas 11, 12 y 13).

La doble tinción en MA permitió un mejor contraste del contenido citoplasmático de las

hifas extrarradicales (Láminas 11C-D). Las esporas mostraron una tonalidad azul índigo, debido a las características de su pared, las hifas presentaban una tonalidad verde-azul en el contenido citoplasmático (lípidos) (Láminas 11B, 11D) a diferencia de aquellas cuyo interior estaba casi vacío (Láminas 11E—11F).

En ECM, la doble tinción permitió distinguir caracteres microscópicos útiles como el grosor de la red de Hartig y el número de células corticales que abarca, que facilitan la determinación taxonómica; al igual que el grosor del manto y de la epidermis con abundancia de taninos (Láminas 12D, 12G).

En MO, las estructuras vegetales tomaron una coloración azul intenso y la mayoría de las estructuras fúngicas verde-azul o azul claro (Láminas 13B, 13F y 13H). Al realizar la doble tinción se realzaron las estructuras fúngicas, siendo inclusive más definidas sobre los compuestos vegetales de la testa que las sobreponen (Láminas 13E-F).

## **7.5 Resultados de la tinción con FDA**

La biomasa fúngica activa en suelo se evaluó mediante la tinción con FDA, la cual permitió diferenciar fácilmente el material vivo del muerto con la alta fluorescencia verde-amarilla emitida cuando se identificaba actividad enzimática de esterases en citoplasma, muy diferente a la producida sólo por el fenómeno de autofluorescencia de las paredes celulares (Láminas 2, 3, 4 y 5). En los aumentos mayores a  $40\times$  se pudo distinguir cómo el colorante se acumulaba en citoplasma (Láminas 14E-F, 16G-H, 17G-H).

En MA el FDA tiñó adecuadamente el citoplasma de las células vivas y se pudo relacionar con las observaciones en campo claro. Las hifas muertas, reconocibles por los septos irregulares y la ausencia de citoplasma, no mostraron fluorescencia con la tinción; en comparación con las vivas, cenocíticas con contenidos citoplasmáticos (Láminas 14D, 14E, 15). La fluorescencia emitida por la acción del FDA resulta mucho más intensa y bien distinguible de la autofluorescencia (Lámina 2).

Por otro lado, la extracción, tinción y automatización del análisis de imágenes desarrollado permitió cuantificar el área y longitud total de las hifas MA montadas en una membrana de nitrocelulosa (Lámina 15). Los resultados de las mediciones semi-automáticas

con el programa mencionado siguiendo el protocolo especificado en el Anexo 3.3 se resumen en el Cuadro 4.

**Cuadro 4.** Mediciones semi-automáticas con análisis de imágenes de área y longitud de micelio activo (teñido con FDA) de *Glomus intraradices*.

Lámina	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Longitud total ( $\mu\text{m}$ )
12A-B	$1.518 \times 10^4$	$1.682 \times 10^3$
12C-D	$3.379 \times 10^3$	$1.381 \times 10^3$
12E-F	$1.2884 \times 10^4$	1817.64

La tinción con FDA de tejidos de ECM mostró diferencias en fluorescencia en las diversas regiones del ápice. Se ilustra en la Lámina 16 que la capa externa del manto varía en su actividad de fluorescencia a lo largo de un mismo ápice: las diferencias observadas en la emisión de los dos cortes transversales C y D consisten en que en la primera, la emisión es mayor en el manto, mientras que en D es mayor en las células corticales. Ambos cortes pertenecen a regiones distintas en la posición en el ápice, resultando el corte de las Láminas 16D y 16F con aparentemente más hifas activas en la red de Hartig. En las ECM de *Pinus montezumae* la red de Hartig fue el tejido con mayor actividad (++) del ápice (Lámina 16).

En MO, las células vegetales y fúngicas del protocormo; así como las hifas de *Ceratorhiza* provenientes del cultivo líquido presentaron intensa fluorescencia debido al estado juvenil de ambos simbiontes (Lámina 17).

## 7.6 Resultados de la tinción con DAPI y PI

La tinción con DAPI en MA permitió que se observaran claramente los núcleos dentro de las hifas y esporas. En las primeras, éstos midieron entre 1.5 y 1.8  $\mu\text{m}$ ; se encontraban relativamente equidistantes en el micelio cenocítico (Lámina 18E) o en reciente división celular (Láminas 18E, 18F, 18G).

En ECM con el DAPI se observaron con alta definición las paredes celulares de las hifas del manto y los núcleos en su interior (Láminas 19D, 19E, 19F), así como en la red de Hartig (Láminas 19G, 19H).

El reconocimiento de hifas binucleadas se logró fácilmente con la tinción con DAPI en MO (Lámina 20). El abundante micelio externo de estos hongos, dificultó la eliminación de restos de colorante produciendo interferencias fuertes (Láminas 20C-20D), sobre todo en los dobleces de las hifas que produjeron una emisión intensa. Cuando se buscaron campos con menos micelio y por ende en donde hubiera menos interferencia de hifas sobrepuestas (Lámina 20E) la observación fue perfecta.

Finalmente, la tinción con PI hizo resaltar núcleos y otras estructuras no identificadas de tamaño y arreglo diferente a los núcleos obtenidos con el método de DAPI en MA (Lámina 21) y MO (Lámina 23).

En ECM, el PI tiñó paredes celulares (Láminas 22C y 22D) y núcleos de la planta (Lámina 22C y 22D). Se observó claramente la red de Hartig en naranja mientras que las células de la planta en el córtex se observan verdes (22C).

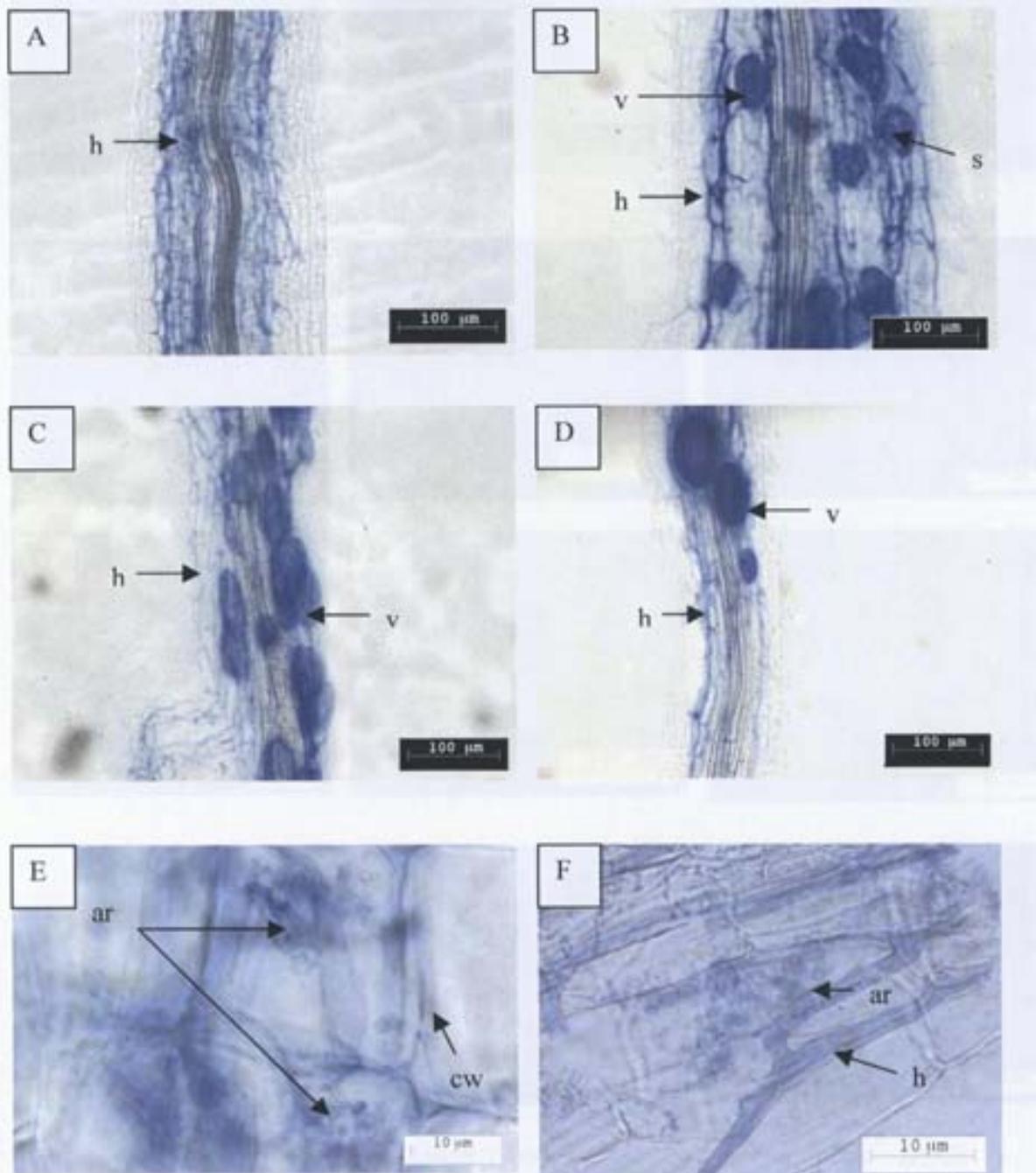
Finalmente, todos los resultados de los colorantes en los tres tipos de micorrizas, se resumen comparativamente en el Cuadro 5.

**Cuadro 5.** Actividad de los fluorocromos Calcofluorina M2R (CFW), diacetato de fluoresceína (FDA), ácido 8-anilino-1-naftalensulfónico (ANS), DAPI y yoduro de propidio (PI) en las estructuras de hongos micorrízicos arbusculares (MA), ectomicorrizas (ECM) y micorrizas orquideoides (MO).

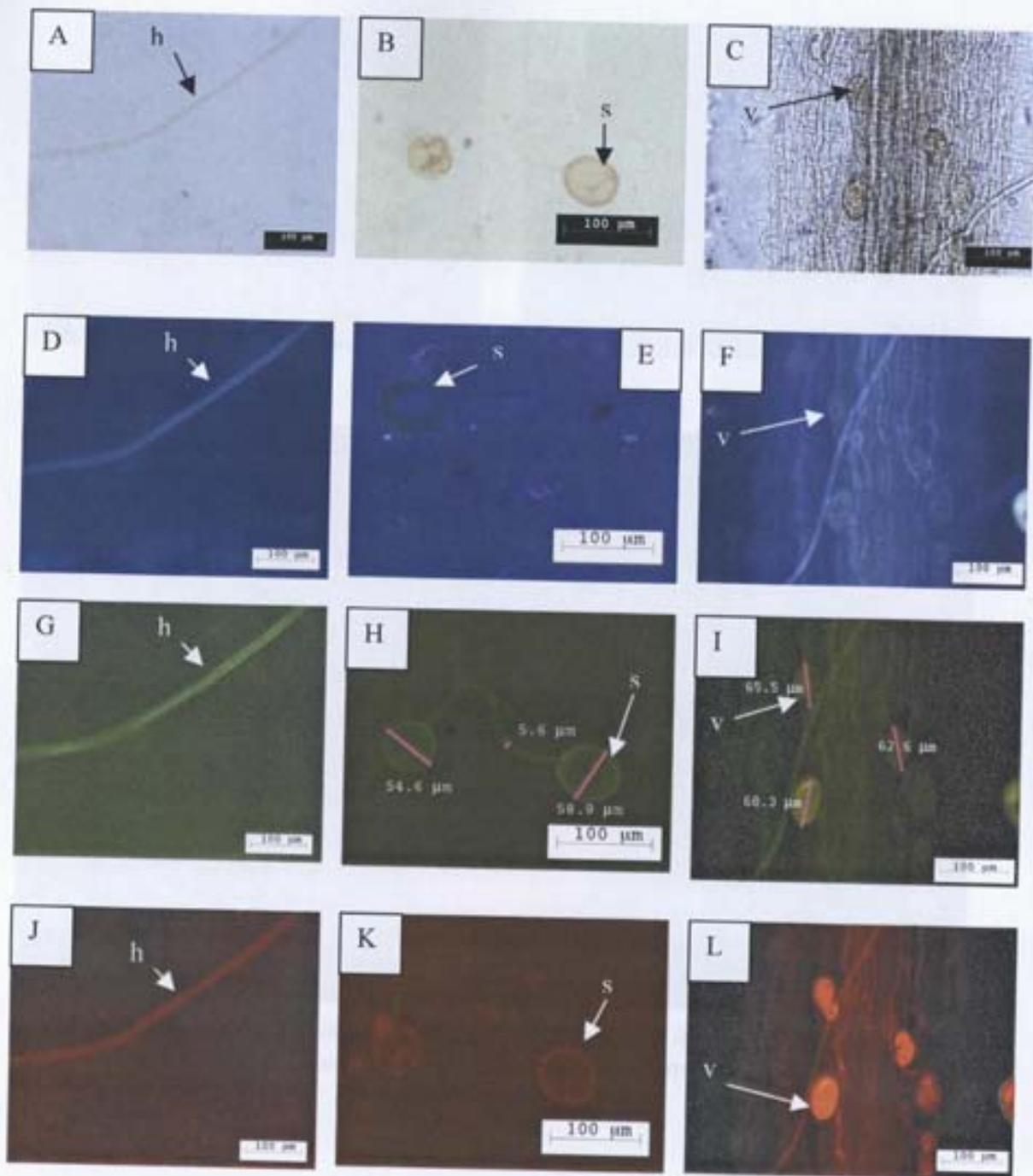
Fluorocromo	Selectividad	Longitud de onda de excitación (nm)	MA	ECM	MO
CFW	Paredes celulares fúngicas y vegetales.	405	Alta definición de micelio externo. Baja definición en estructuras intraradical. Mayor fluorescencia en tejidos inmaduros o jóvenes de hongos.	Alta definición en células del manto (exterior, intermedio e interior) y red de Hartig. Alta definición en rizomorfos.	Alta definición en hifas de <i>Ceratophiza</i> sp. Mayor fluorescencia de paredes vegetales que enmascaran la fluorescencia de pelotones digeridos en protocormos.
CFW + ANS	Paredes celulares	405	Alta afinidad por contenido citoplasmático del micelio externo. Tinción diferencial entre esporas debido a la composición de paredes	Alta definición de hifas del manto, epidermis y la red de Hartig.	Alta definición en pelotones no digeridos de protocormo. Tinción diferencial entre estructuras vegetales de paredes complejas (testa)

			celulares. tiñéndose de azul marino y las hifas azul-verde.		en azul marino e hifas vigorosas (azul-verde).
FDA	Células vivas	488	Alta afinidad por células vivas en color verde-amarillo brillante del micelio externo que permite suficiente resolución para realizar cuantificaciones de biomasa activa por análisis de imágenes digitales.	Tinción diferencial en intensidad de fluorescencia por tejidos que reflejan actividad fisiológica distinta en ápices de ectomicorriza.	Alta fluorescencia del citoplasma de células vivas de hifas de <i>Ceratorhiza</i> sp.
DAPI	Ácidos nucleicos	372	Alta definición de núcleos en hifas y esporas. Tinción de paredes celulares de hifas y esporas.	Alta definición de núcleos en manto y red de Hartig y de paredes celulares.	Alta definición de núcleos en hifas de <i>Ceratorhiza</i> sp.
PI	ADN, ARN y paredes vegetales.	530	Tinción de núcleos y gránulos de polifosfato en el interior del citoplasma de las hifas.	Tinción de paredes celulares vegetales y de núcleos del hospedero.	Tinción de núcleos y compuestos de reserva en el interior del citoplasma.

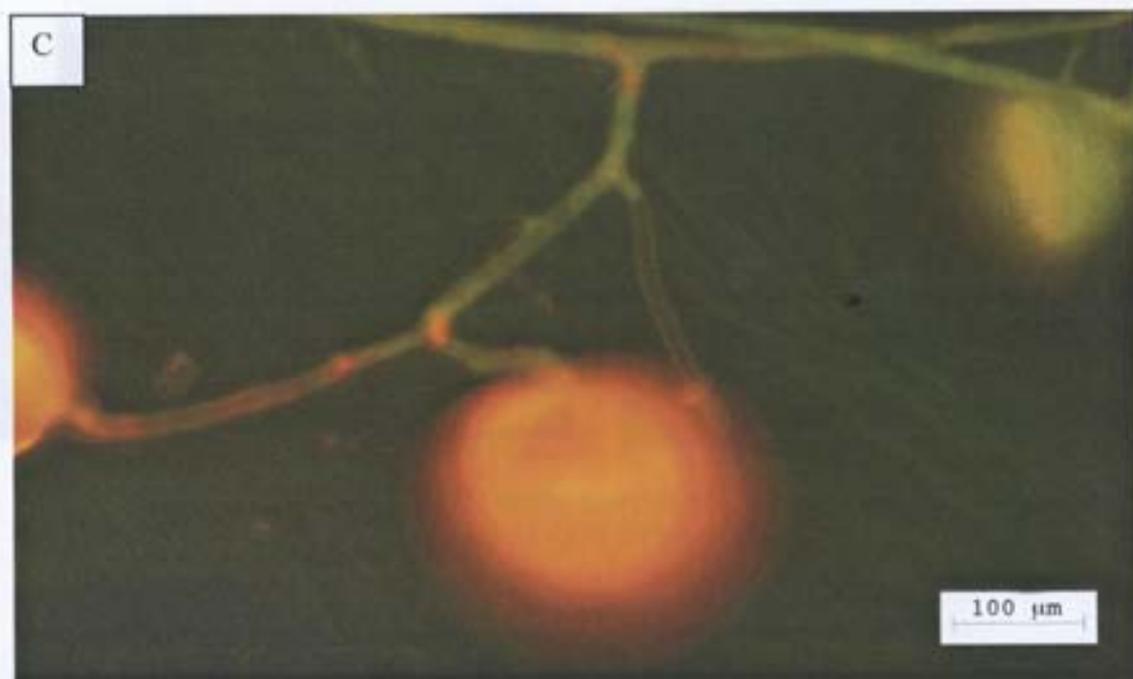
## SECCIÓN DE LÁMINAS



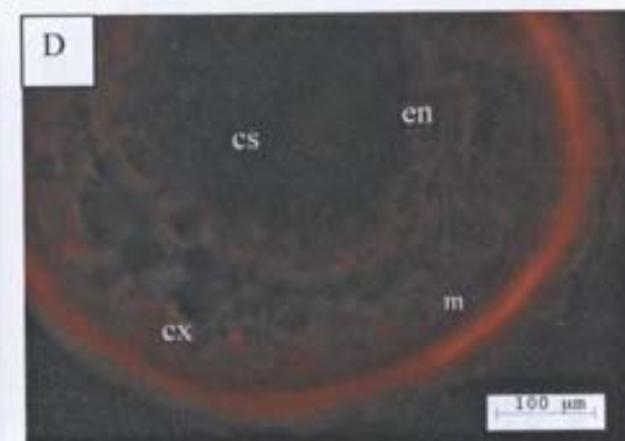
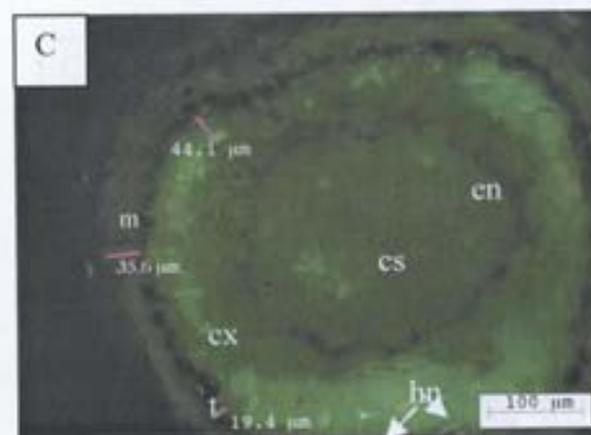
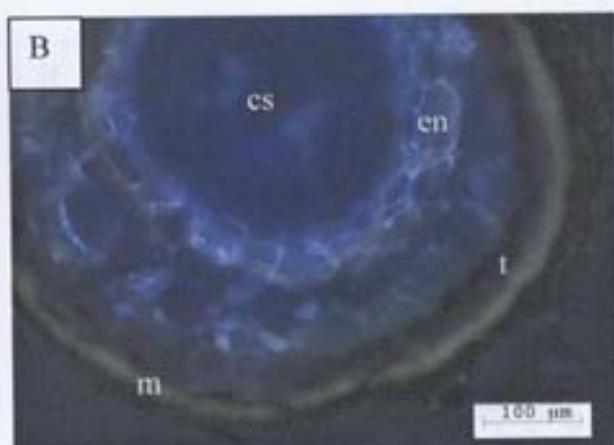
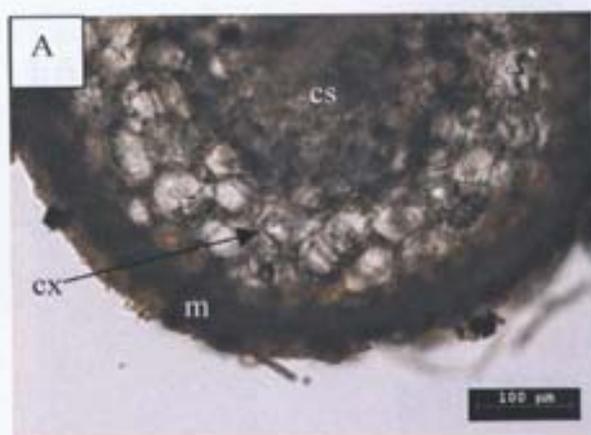
**Lámina 1.** Estructuras intrarradicales de *Glomus intraradices* en *Daucus carota* L. tRNA teñidas con azul de Tripán: (A) colonización formada sólo por hifas; (B-D) raíces colonizadas por esporas, vesículas e hifas, (E-F) arbusculos. (h) hifas, (v) vesículas, (ar) arbusculos, (s) esporas y (cw) pared celular vegetal.



**Lámina 2.** Estructuras de *Glomus intraradices* en campo claro (A-C) y autofluorescencia bajo luz ultravioleta (330-385 nm) (D-F), luz azul (450-480 nm) (G-I) y verde (510-550 nm) (J-L). (h) hifa extramatricial, (s) esporas extrarradicales; (v) vesículas intrarradicales.

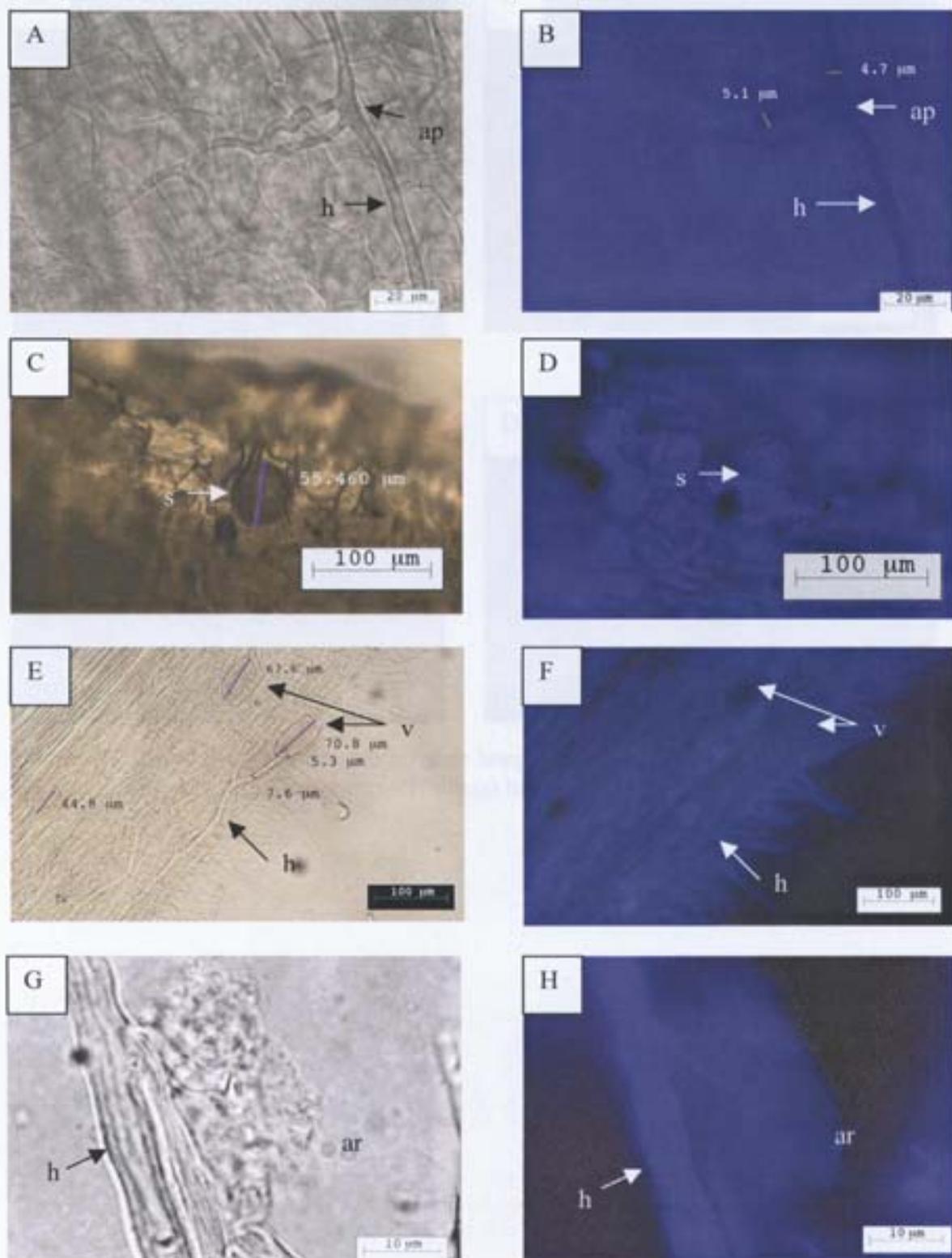


**Lámina 3.** Esporas del hongo micorrízico arbuscular *Glomus intraradices*. (A-B) esporas extramatriciales en campo claro, (C) espora extramatricial observada bajo luz azul (450-480 nm).

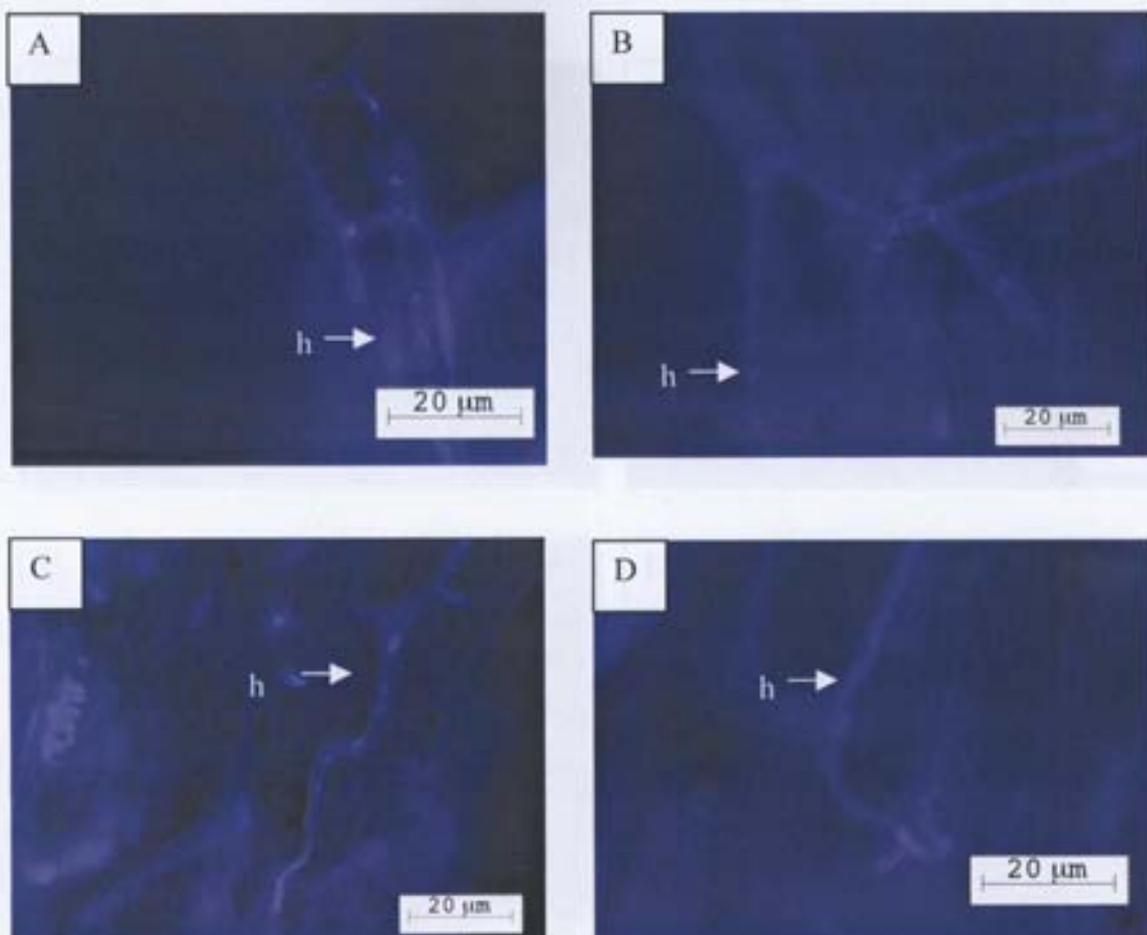


**Lámina 4.** Estructuras de ápices de ectomicorriza en *Pinus leiophylla* en campo claro (A) y autofluorescencia bajo ultravioleta (330-385 nm) (B); luz azul (450-480 nm) (C) y luz verde (510-550 nm) (D). (m) manto, (cx) células corticales, (hn) red de Hartig, (t) estrato celular rico en taninos, (en) endodermis, (cs) estela central.



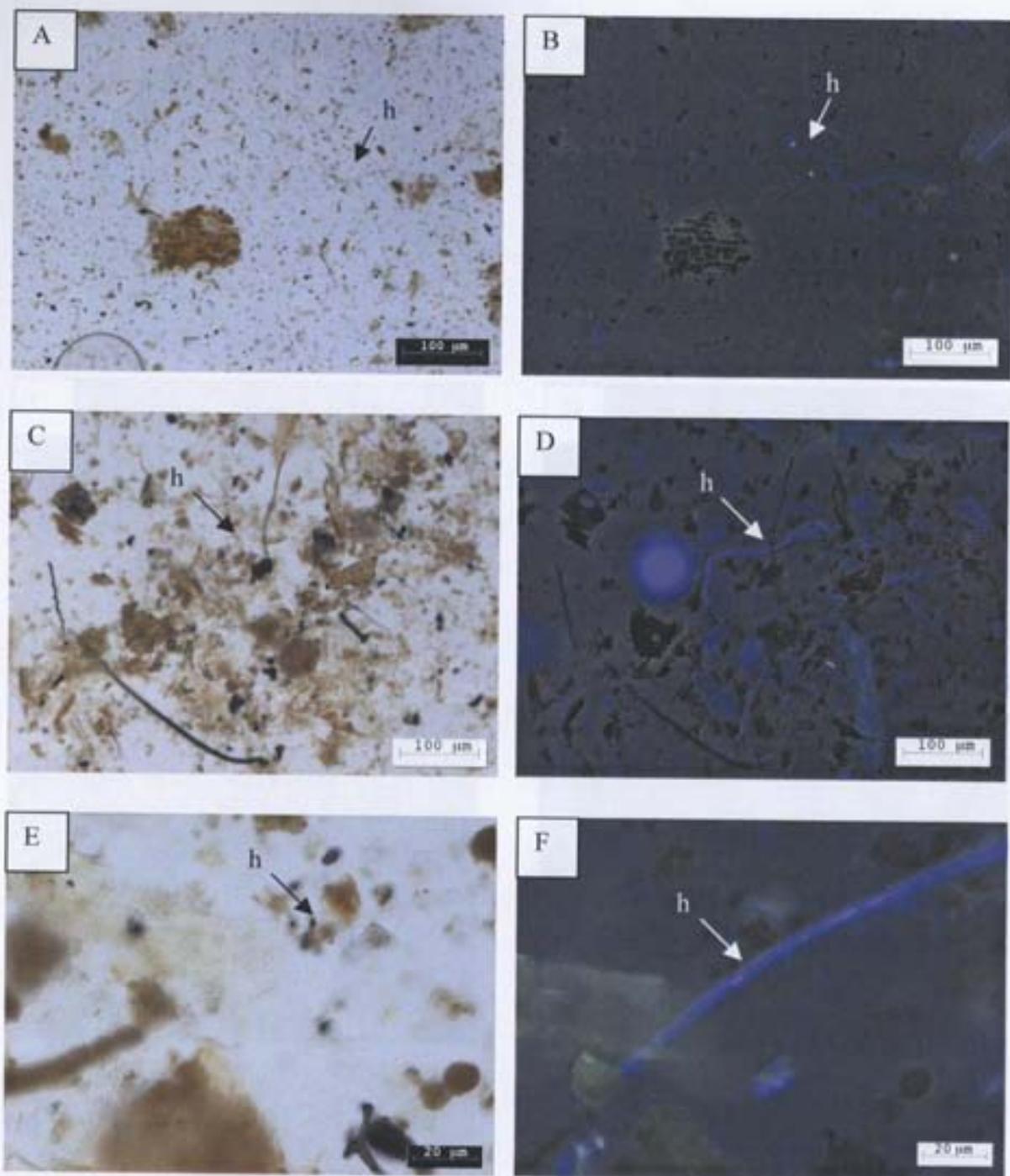


**Lámina 6.** Estructuras intrarradicales del hongo micorrizico arbuscular *Glomus intraradices* en campo claro (A, C, E, G) y teñidas con CFW observadas bajo luz ultravioleta (330-385 nm) (B, D, F, H). (ap) apresorio; (s) espóra intrarradical; (v) vesículas intrarradicales, (h) hifa y (ar) arbusculo que salió de la célula al presionar la preparación.



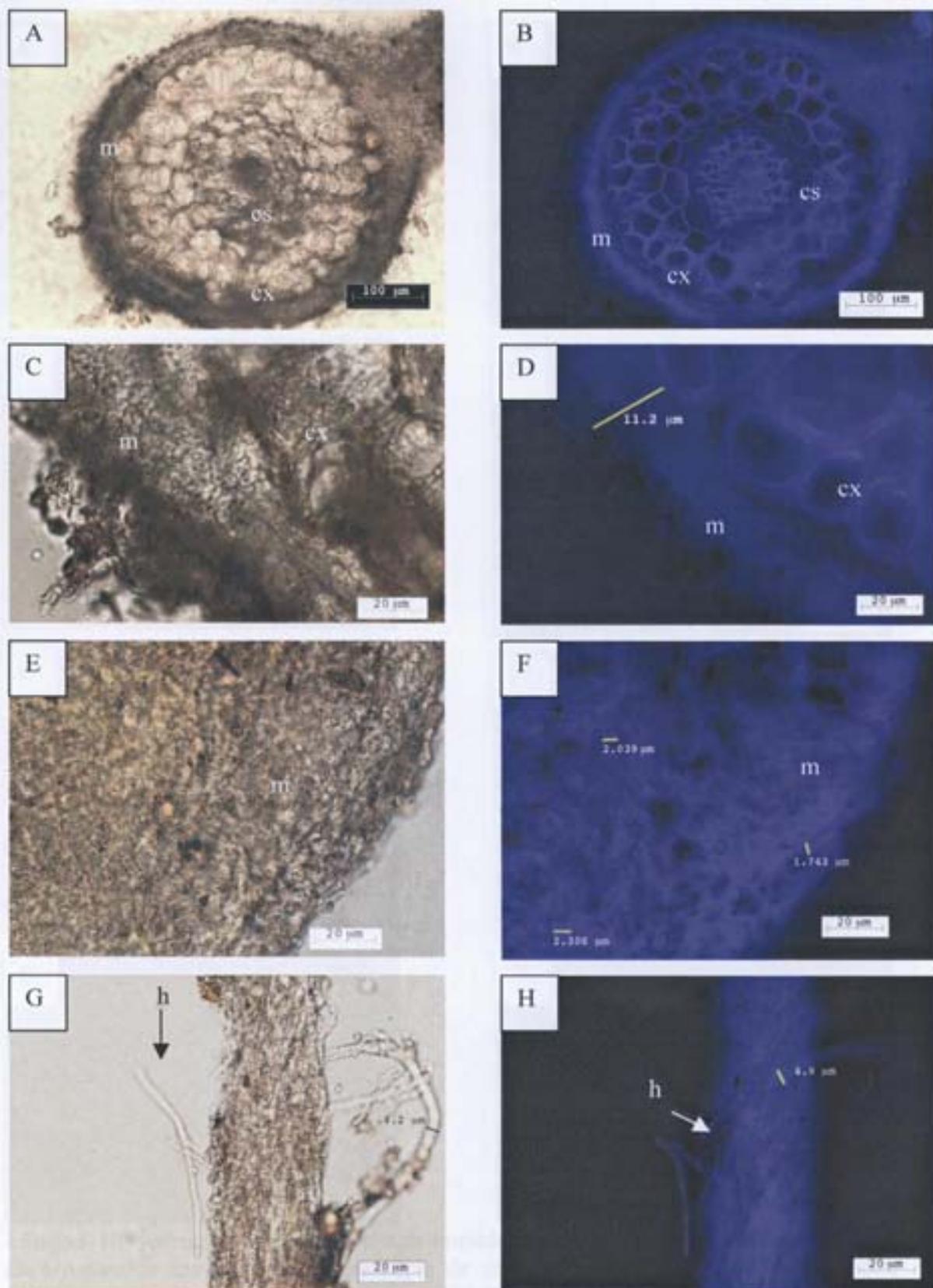
**Lámina 7.** Endofitos posiblemente hifas de hongos arbusculares (h) en raíces de *Medicago sativa* L. con tinción con CFW bajo luz UV (330-385 nm).

Figura 7. Microfotografías de fluorescencia de raíces de alfalfa (A, B, C, D) con tinción con CFW y luz UV. Se puede observar la presencia de hifas de hongos arbusculares (h) en las raíces de alfalfa.

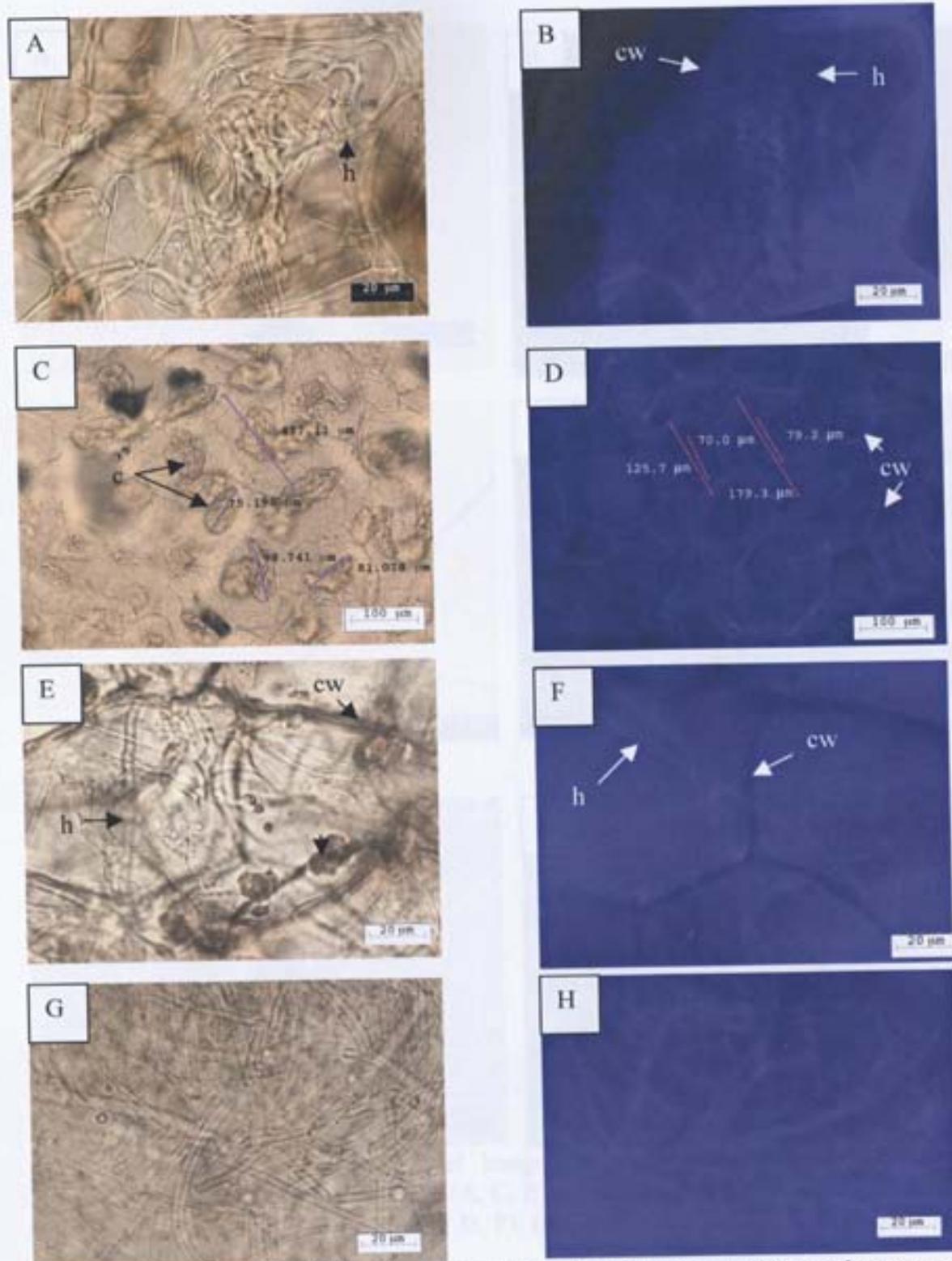


**Lámina 8.** Micelio externo de hongos en campo claro (A, C, E) y teñido con CFW (B, D, F) en una muestra de suelo de bosque mesófilo. En las muestras teñidas se observan algunas hifas (h) difíciles de apreciar en campo claro.

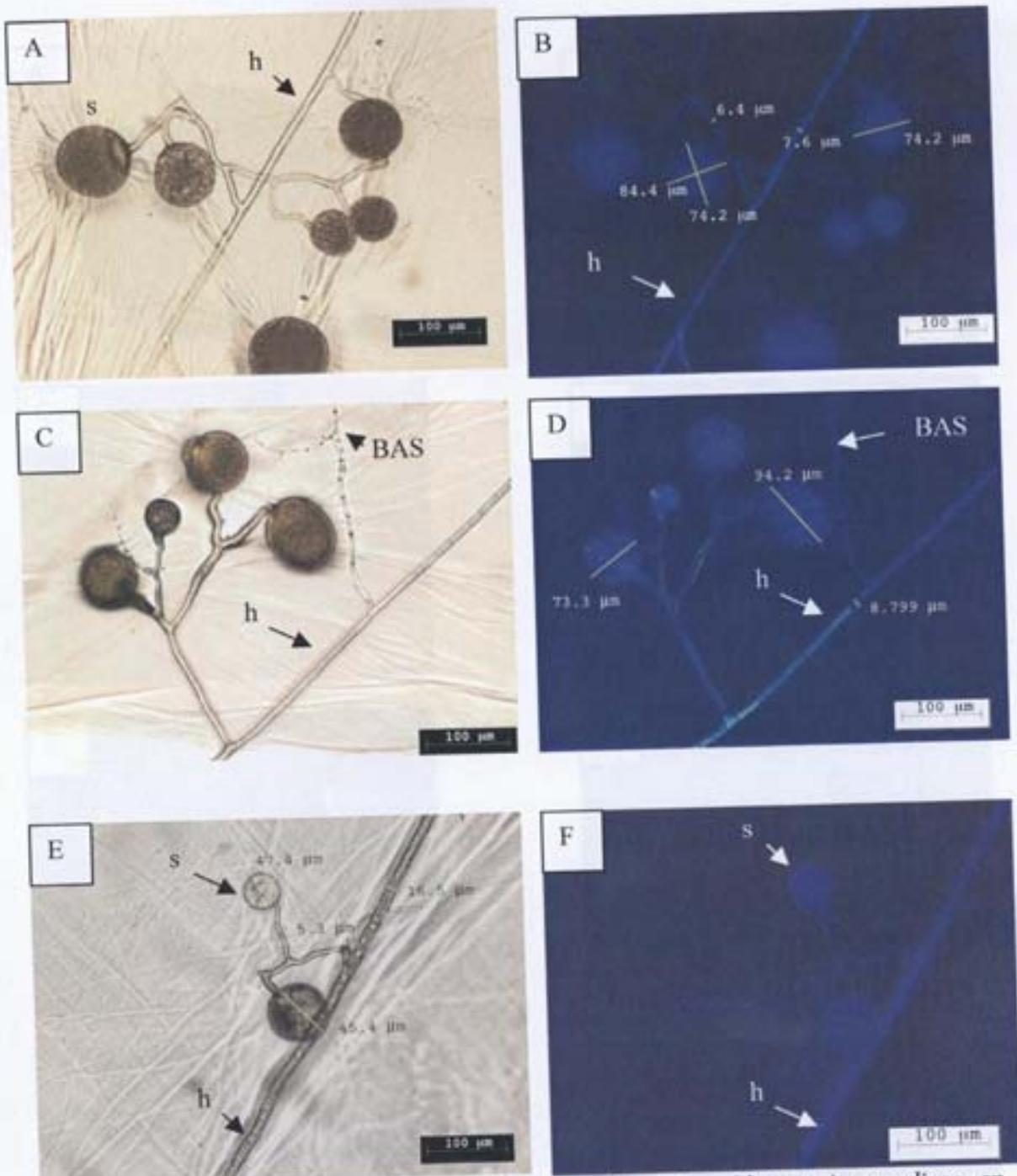
Lámina 8. Micelio externo de hongos en campo claro (A, C, E) y teñido con CFW (B, D, F) en una muestra de suelo de bosque mesófilo. En las muestras teñidas se observan algunas hifas (h) difíciles de apreciar en campo claro.



**Lámina 9.** Cortes transversales de ápices de la ectomicorriza en *Pinus leiophylla* en microscopía de campo claro (A, C, E, G) y fluorescencia teñidas con CFW y observadas bajo luz ultravioleta (330-385 nm) (B, D, F, H); detalle de las hifas del manto (C- F); rizomorfo (G, H). (m) manto, (cx) córtex, (cs) estela central, (h) hifa.

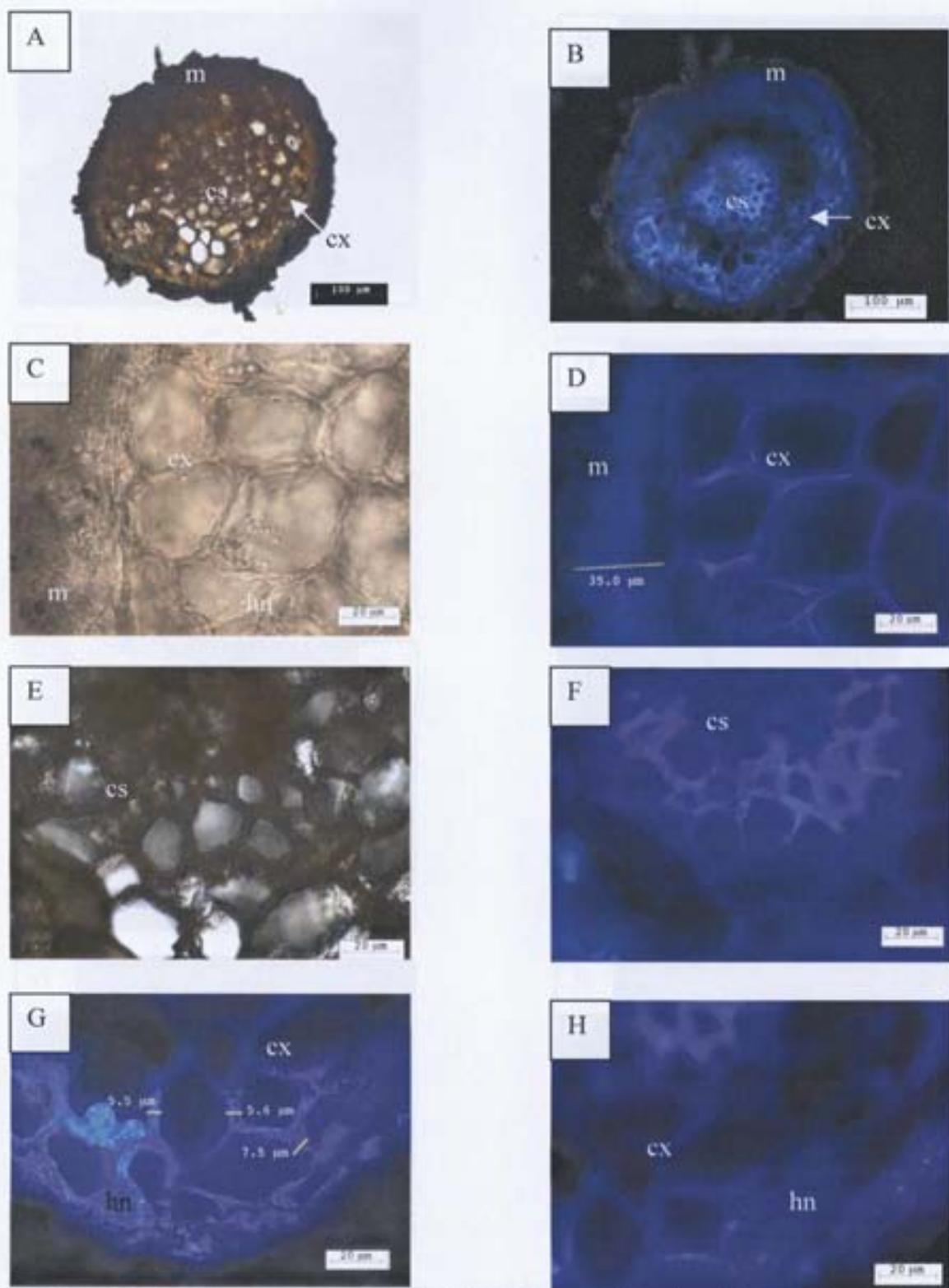


**Lámina 10.** Estructuras de la micorriza orquideoide formada con *Ceratorhiza* sp. en *Dichromanthus aurantiacus*. Microscopía de campo claro (A, C, E, G); teñidas con CFW y observadas bajo luz ultravioleta (330-385 nm) (B, D, F, H); pelotón u ovillo laxo, en vías de degradación (A, B); pelotones degradados (colapsados) en el interior central de la célula vegetal (C-D); hifas en el interior (E, F) y en la superficie del protocormo (G, H). (h) hifas, (c) pelotones, (cw) pared celular vegetal.

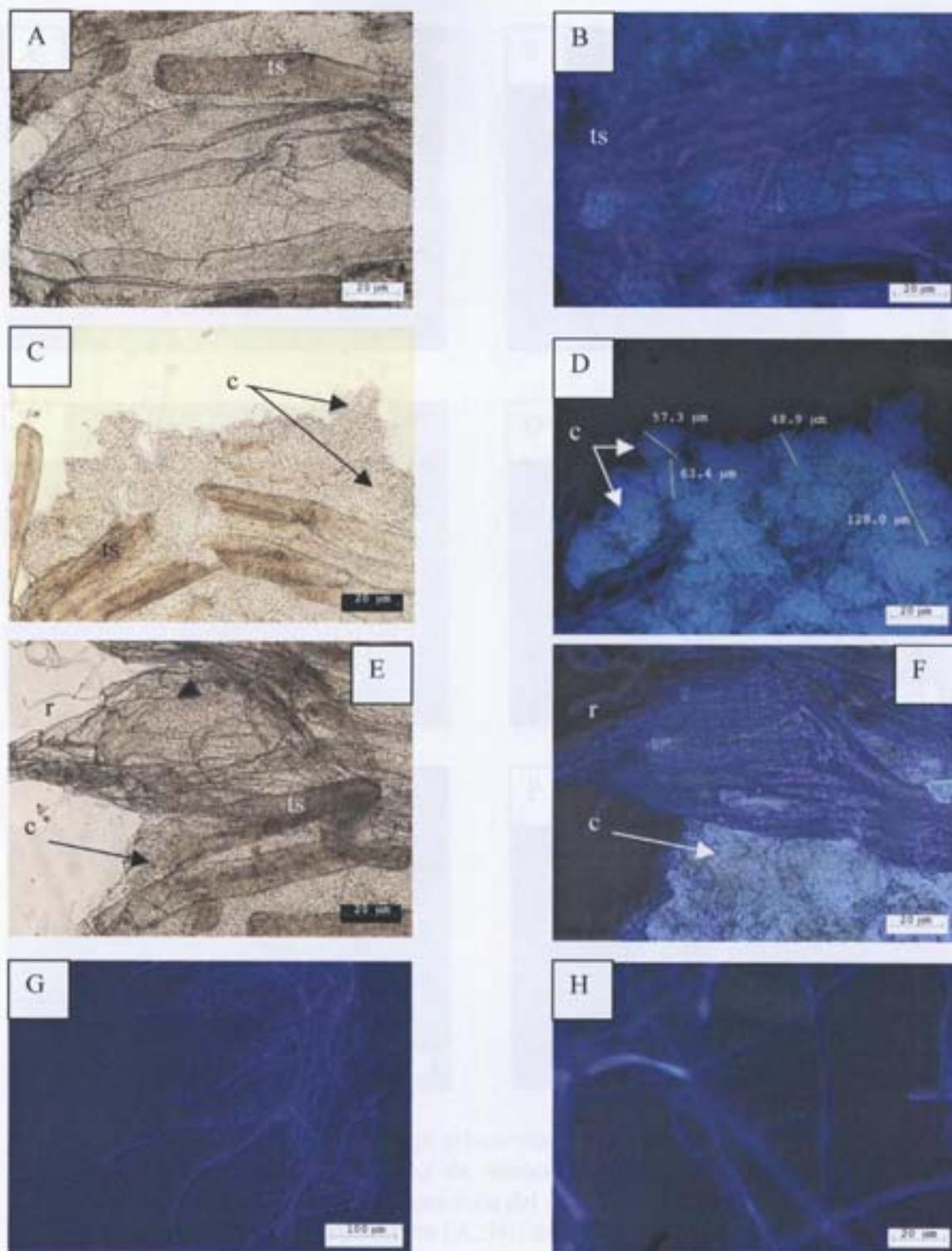


**Lámina 11.** Estructuras externas del hongo arbuscular *Glomus intraradices* en Phytigel® observadas en campo claro (A, C, E) y tinción con CFW y ANS observadas bajo luz ultravioleta (330-385 nm) (B, D, F). (s) esporas, (h) hifas, (BAS) "branching absorbing structures".

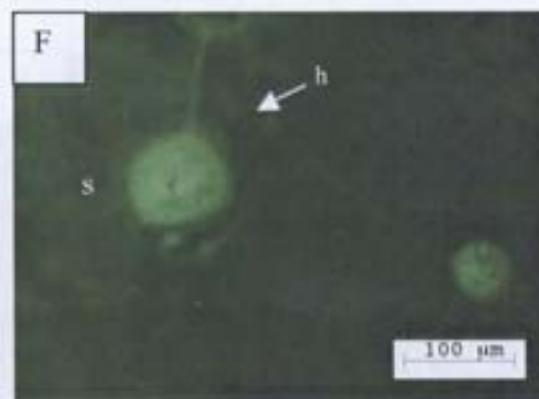
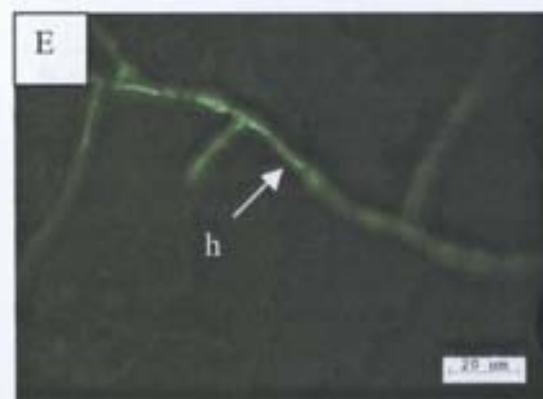
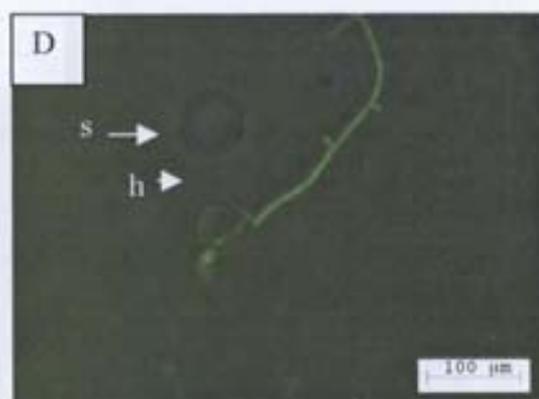
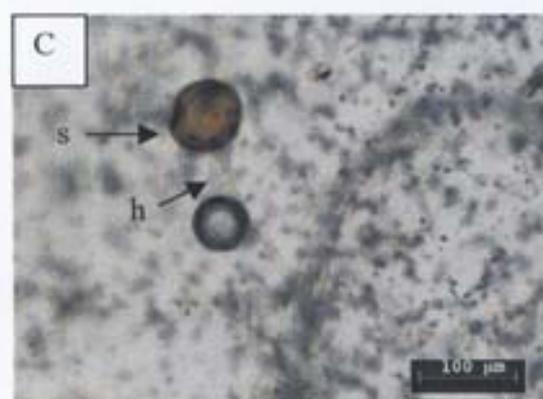
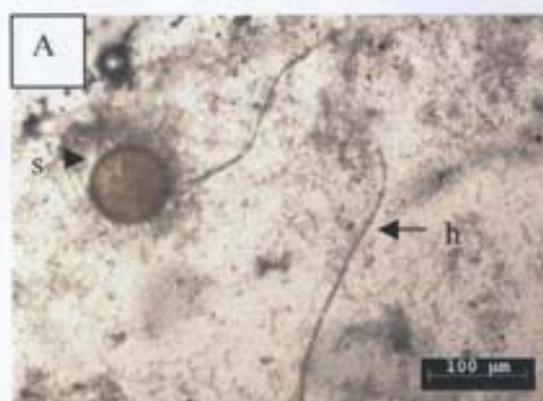
Lámina 11. Estructuras externas del hongo arbuscular *Glomus intraradices* en Phytigel® observadas en campo claro (A, C, E) y tinción con CFW y ANS observadas bajo luz ultravioleta (330-385 nm) (B, D, F). (s) esporas, (h) hifas, (BAS) "branching absorbing structures".



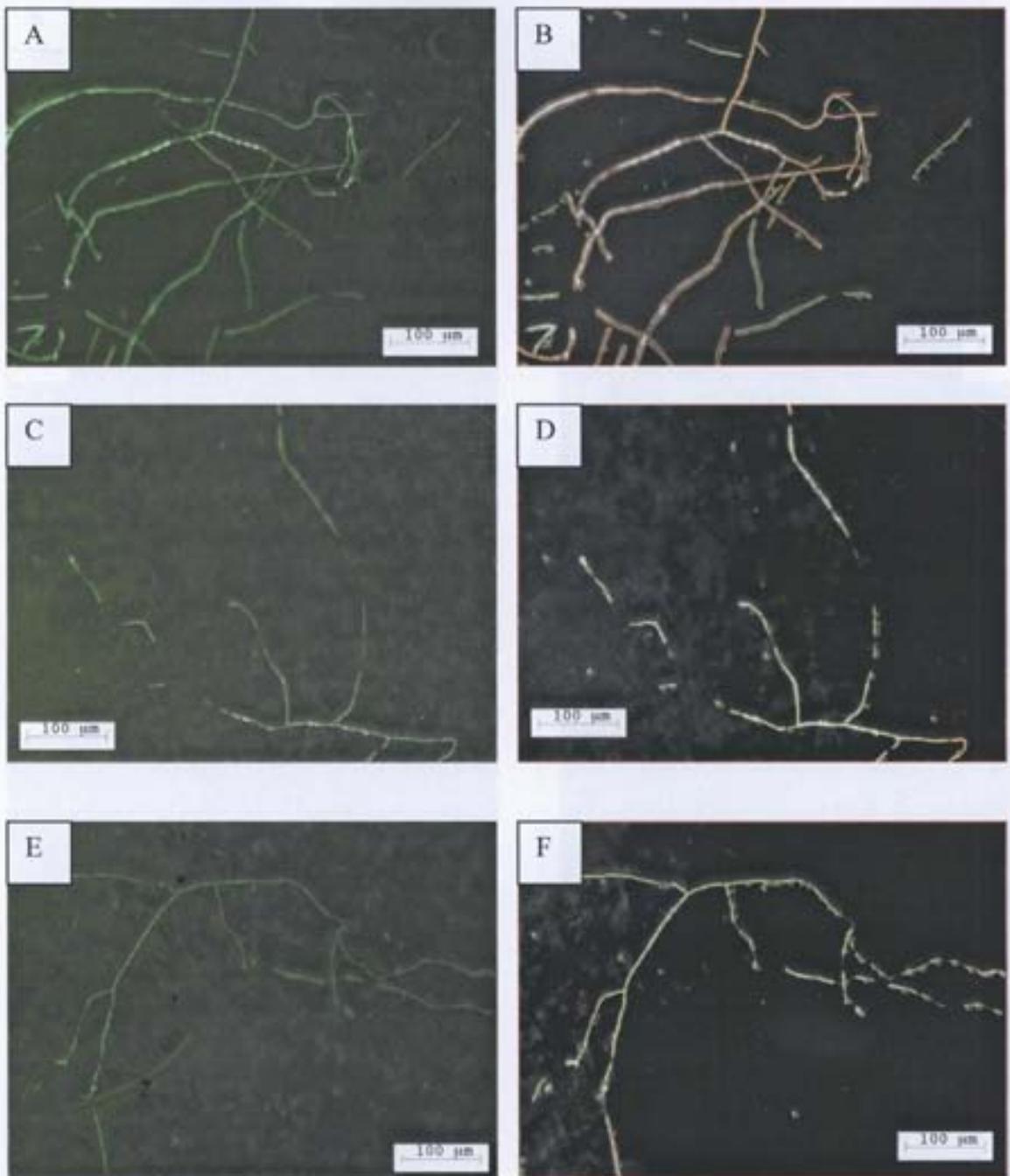
**Lámina 12.** Secciones transversales de ápices de ectomicorriza de *Pinus leiophylla* en microscopia de campo claro (A, C, E) y teñidas con CFW y ANS y observadas bajo luz ultravioleta (330-385 nm) (B, D, F, G, H); extremo lateral del corte superior (C, D); estela central (E, F); hifas de la red de Hartig y del manto (G, H). (m) manto, (hn) red de Hartig, (cx) córtex.



**Lámina 13.** Estructuras de micorriza orquideoide, protocormo de *Dichromanthus aurantiacus* asociado a *Ceratorrhiza* sp. en microscopía de campo claro (A, C, E) y teñidas con CFW y ANS y observadas bajo luz ultravioleta (330-385 nm) (B, D, F, G, H). Protocormo micorrizado de orquídea con residuos de la testa de la semilla (A-F) y abundantes pelotones e hifas de *Ceratorrhiza* sp. (G, H). (h) hifas, (ts) células de la testa, (c) pelotón, (r) enrollamiento hifal extracelular.

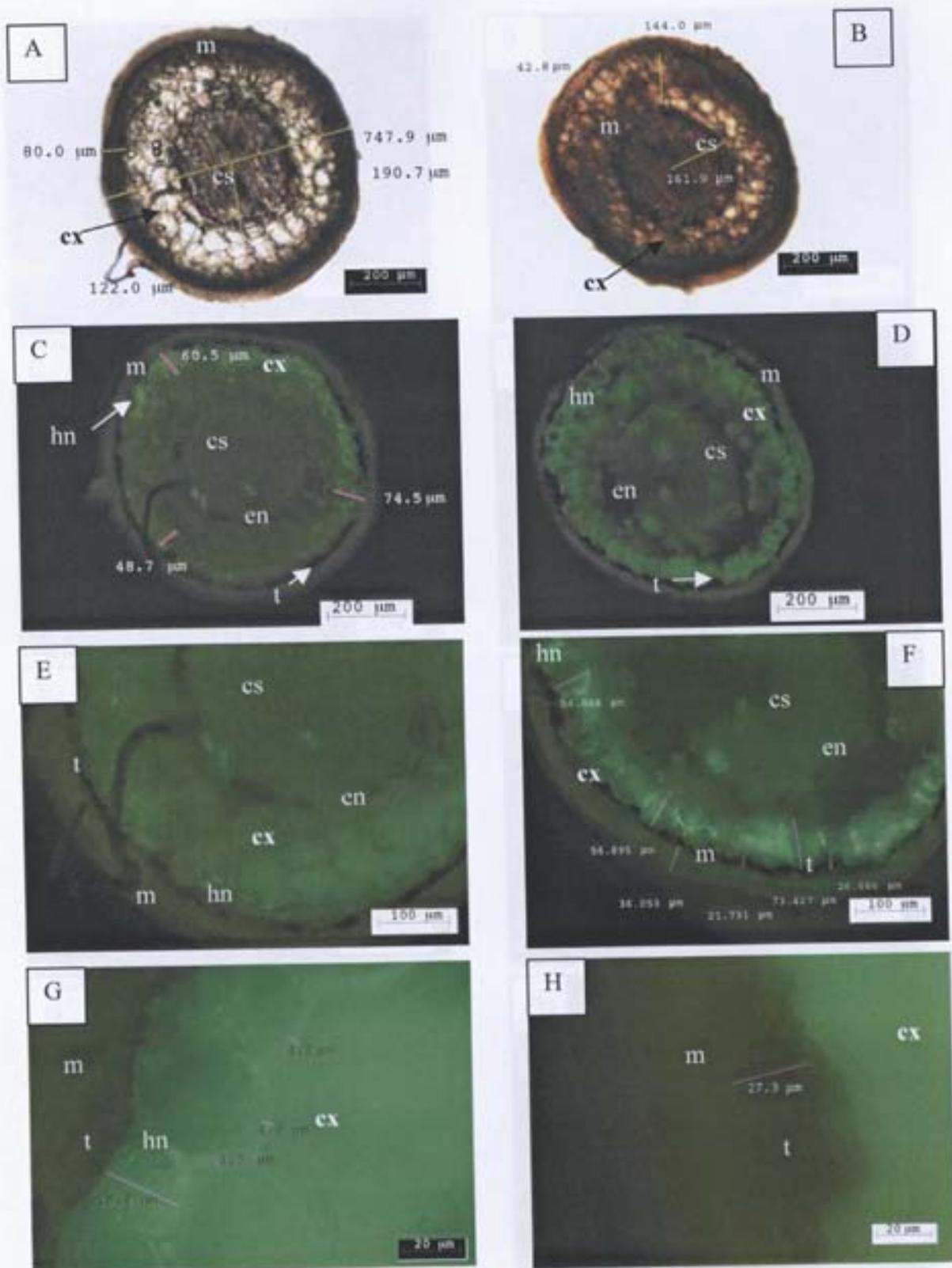


**Lámina 14.** Micelio externo del hongo arbuscular *Glomus intraradices* en microscopía de campo claro sobre una membrana de nitrocelulosa (A, C) y teñido con FDA y observado bajo fluorescencia de luz azul-roja del filtro WIB (460-490 nm) (B, D, E, F); hifas y espora sin actividad enzimática (A, B); espora e hifa productora sin actividad enzimática pero con una hifa corredora viable (C, D); hifa viable donde se aprecia segmentada la fluorescencia del material del citoplasma (E); esporas viables e hifas en proceso de senescencia (F). (s) esporas, (h) hifas.

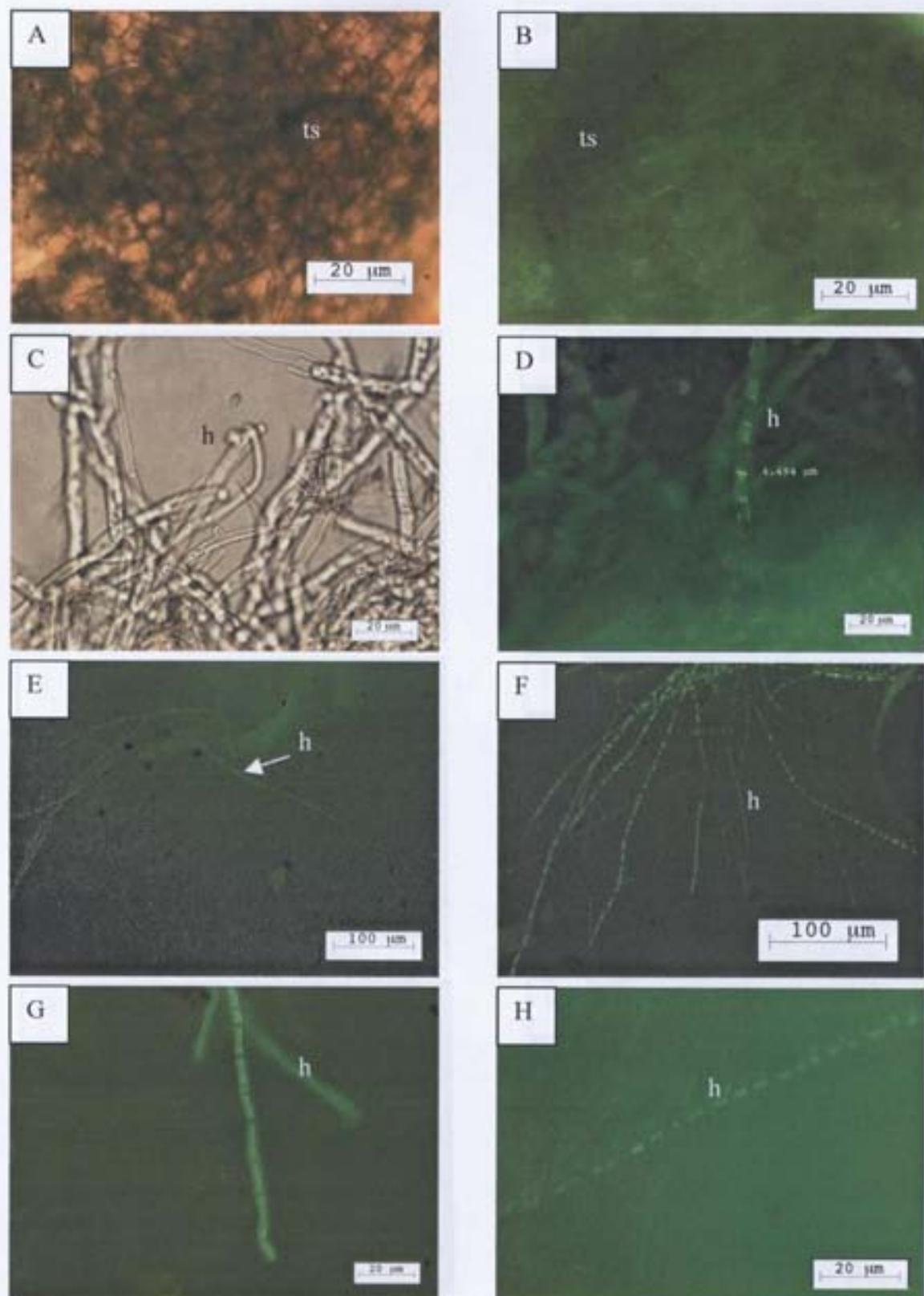


**Lámina 15.** Cuantificación de micelio externo activo de micorrizas arbusculares (*Glomus intraradices* en cultivo monoxénico) mediante análisis de imágenes digitales con el programa *Image Pro-Plus 5.0®* (B, D, F); previamente teñido con FDA y observado en el filtro WIB (460-490 nm) (A, C, E).

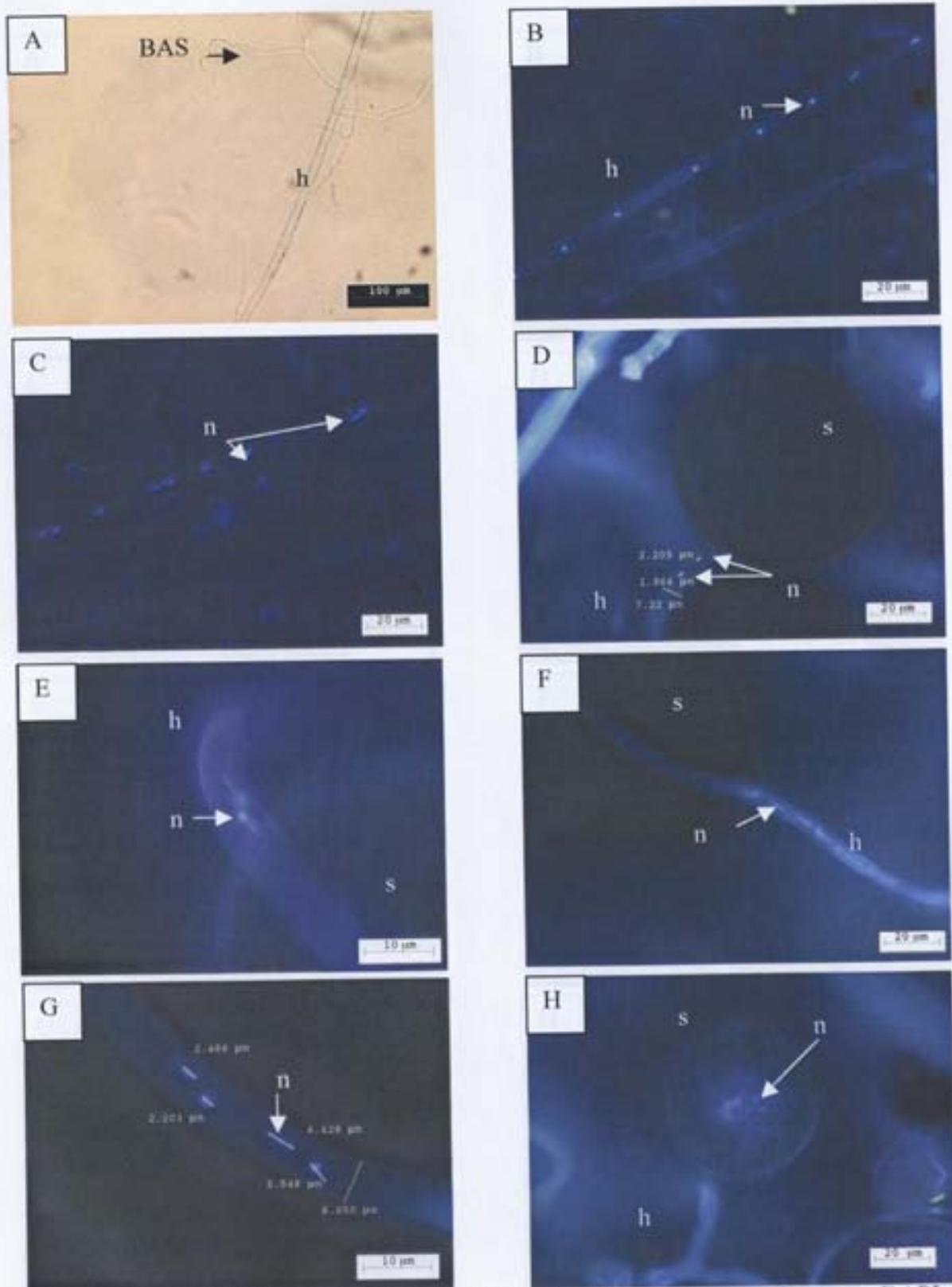
Lámina 15. Cuantificación de micelio externo activo de micorrizas arbusculares (*Glomus intraradices* en cultivo monoxénico) mediante análisis de imágenes digitales con el programa *Image Pro-Plus 5.0®* (B, D, F); previamente teñido con FDA y observado en el filtro WIB (460-490 nm) (A, C, E).



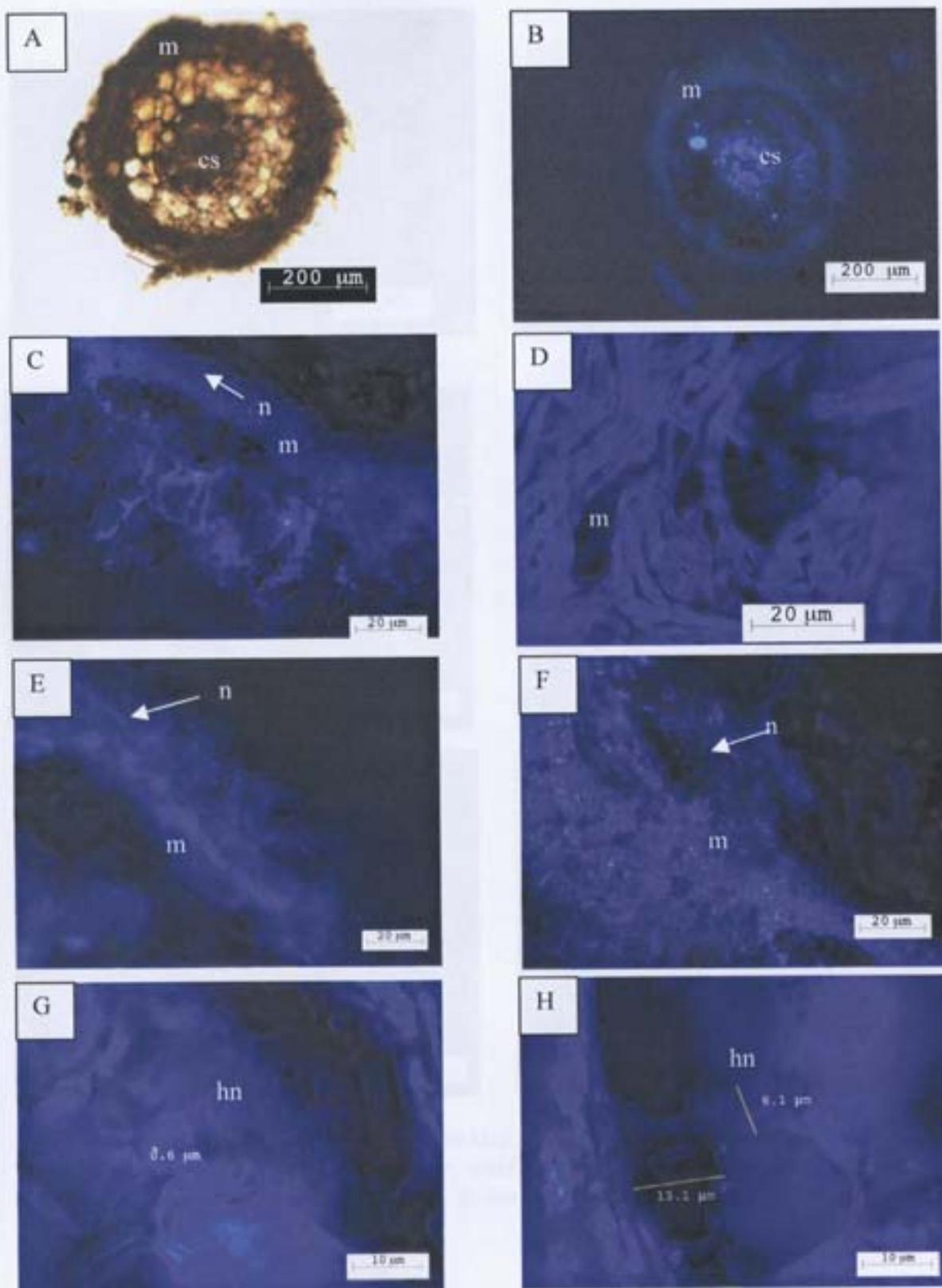
**Lámina 16.** Corte transversal de ápices de la ectomicorriza asociada a *Pinus montezumae* en microscopía de campo claro (A-B) y teñidos con FDA observadas en fluorescencia bajo luz azul-roja del filtro WIB (460-490 nm) (C-H). (m) manto, (t) epidermis radical con alto contenido de taninos, (cx) células del cortex, (hn) red de Hartig, (en) endodermis, (cs) estela central.



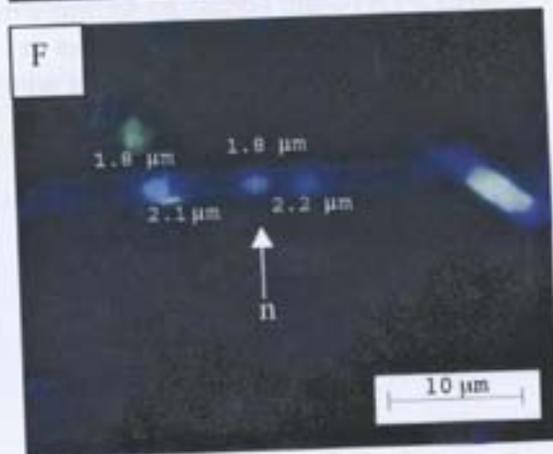
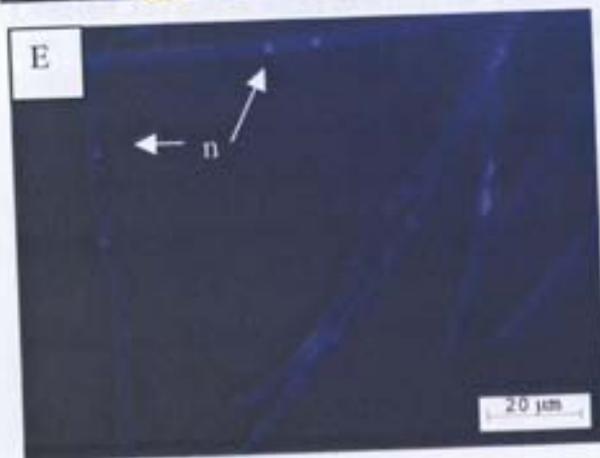
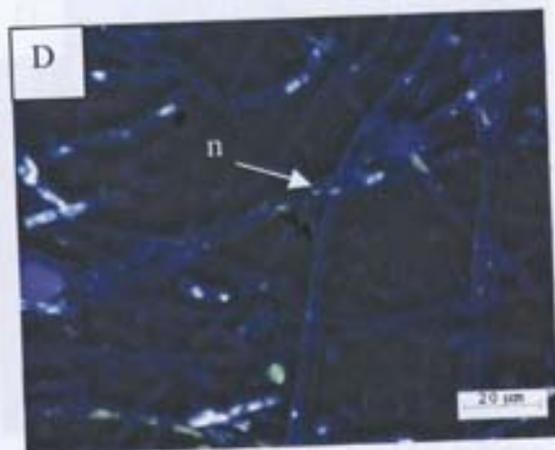
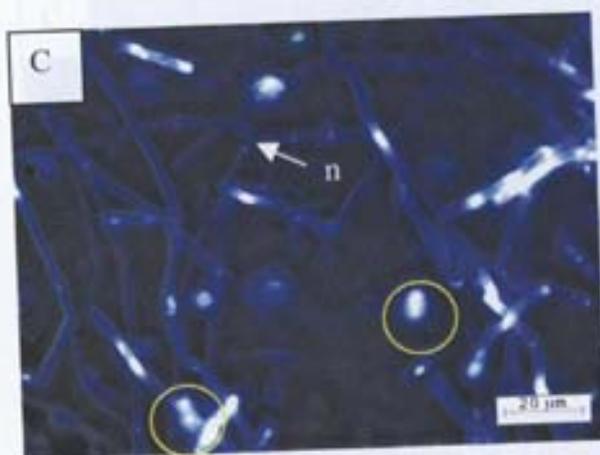
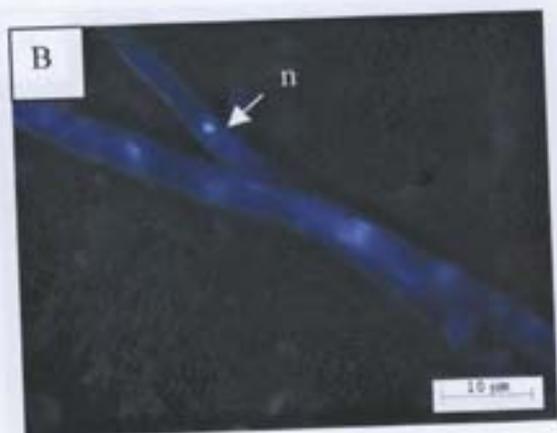
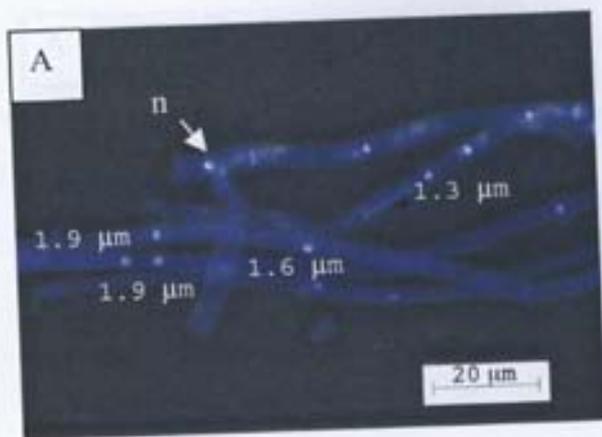
**Lámina 17.** Hifas de *Ceratorrhiza* sp. en microscopía de campo claro (A, C) y teñidas con FDA observadas bajo el filtro WIB (460-490 nm) (B, D, E-H); protocormo de *Dichromanthus aurantiacus* (A, B); hifas en la superficie del protocormo (C, D) y viabilidad del cultivo axénico (E - H). (h) hifas, (ts) residuos de la testa.



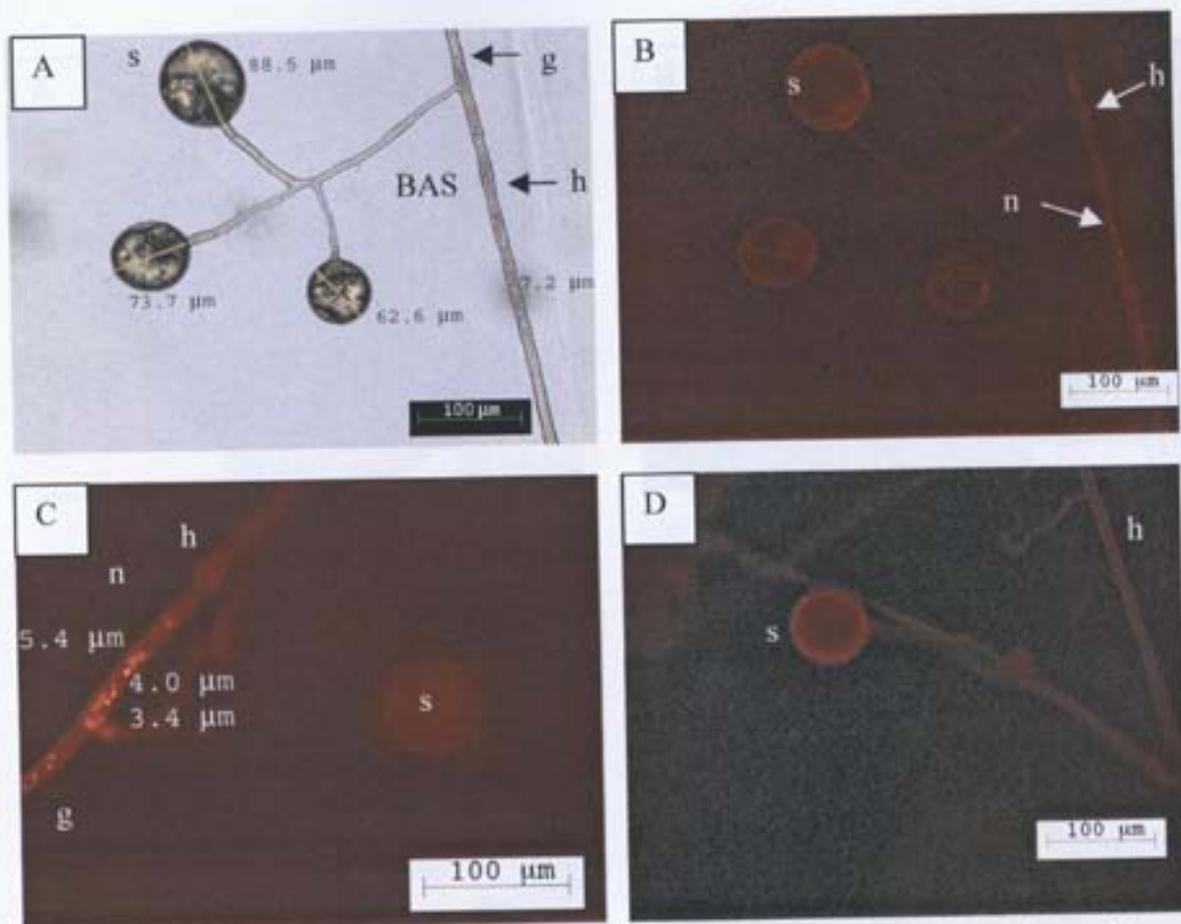
**Lámina 18.** Tinción de núcleos del hongo arbuscular *Glomus intraradices* con DAPI bajo luz ultravioleta (330-385 nm); campo claro de una hifa corredora con BAS en sus extremos (A); núcleos a lo largo de una hifa extrarradical (B, C); núcleos en la hifa de sostén de una espora (D); núcleos posiblemente migrando a lo largo de la hifa que origina a la espora (E-G); núcleos dentro de una espora (H). (n) núcleos, (s) espora, (h) hifa.



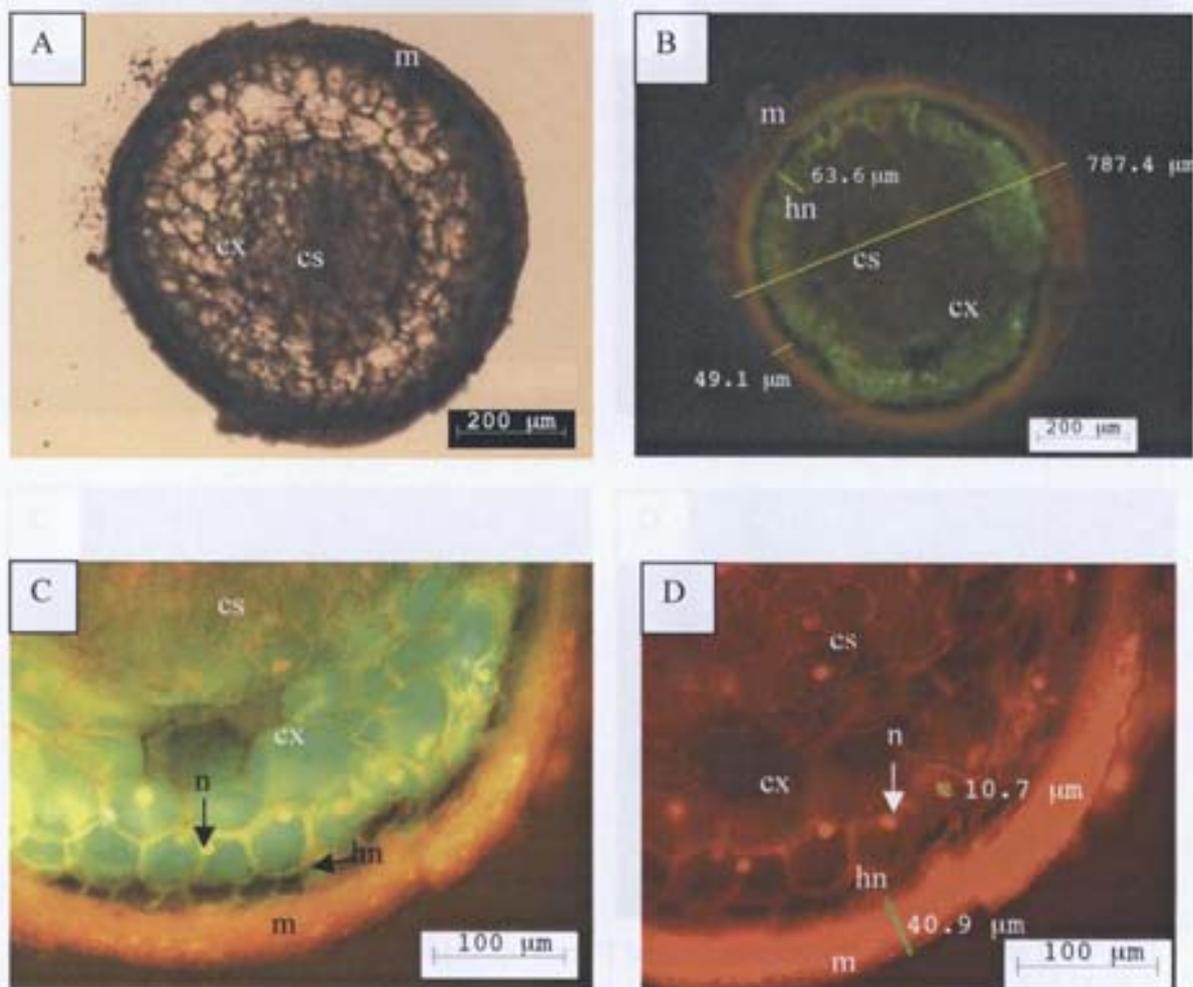
**Lámina 19.** Cortes transversales de ectomicorriza en *Pinus leiophylla*. Campo claro (A) y tinción con DAPI observada en luz ultravioleta (330-385 nm) (B-H), (C-F). Detalles de hifas del manto; (G, H) red de Hartig. (m) manto, (n) núcleos, (hn) red de Hartig, (cs) estela central.



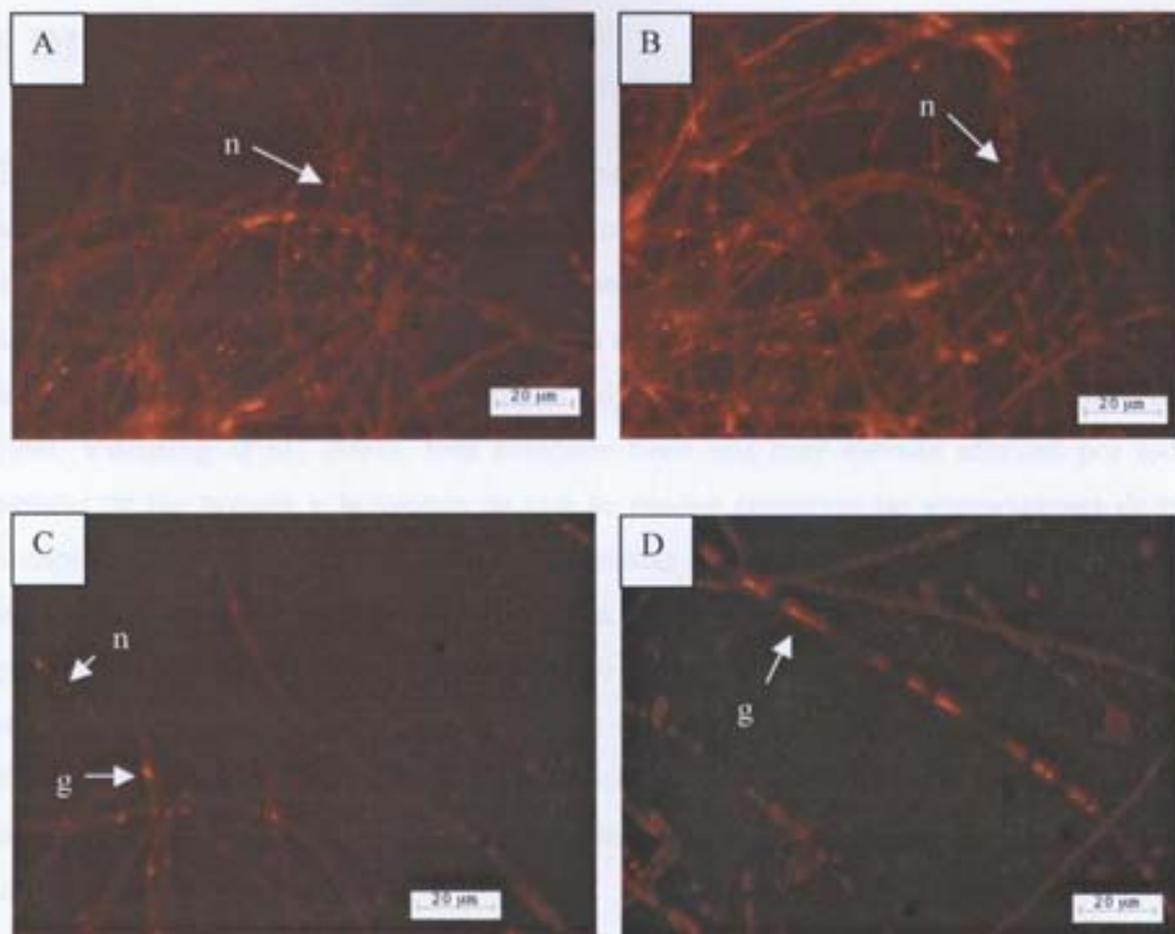
**Lámina 20.** Tinción de núcleos de *Ceratorhiza* sp. con DAPI bajo fluorescencia de luz ultravioleta (330-385 nm). Se observan artefactos marcados en círculos amarillos debidos a la interferencia de los dobleces de las hifas refringentes en (C). (h) hifas, (n) núcleos.



**Lámina 21.** Estructuras externas de *Glomus intraradices* en campo claro (A) y teñidas con PI bajo luz verde (510-550 nm) (B-D). (s) esporas, (h) hifas, (g) gránulos de polifosfato, (n) núcleo, (BAS) "branching absorbing structures".



**Lámina 22.** Corte transversal de ápices de ectomicorriza de *Pinus montezumae* en microscopía de campo claro (A) y teñidos con PI bajo fluorescencia de luz azul (450-480 nm) (B-C) y luz verde (510-550 nm) (D). (m) manto, (cx) córtex, (n) núcleo, (cs) estela central, (hn) red de Hartig.



**Lámina 23.** Tinción de *Ceratorhiza* sp. con PI bajo fluorescencia de luz verde (510-550 nm) donde se aprecian núcleos (n) y gránulos (g) de almacenamiento de carbohidratos que emiten fluorescencia rojo naranja más intensa.

## 8 DISCUSIÓN

En este trabajo se hizo una comparación entre la aplicación estandarizada de fluorocromos y autofluorescencia en varias estructuras micorrízicas (Cuadro 1), con la finalidad de definir cuál método permitía evidenciar mejor el tipo de estructuras característico de cada micorriza. Uno de los métodos más utilizados en la observación de micorrizas arbusculares ya sea intraradical como extraradical es la tinción con azul de Tripán (Phillips y Hayman, 1970; McGonigle *et al.*, 1990; Vierheilig *et al.*, 2001). Este colorante tiene una muy elevada afinidad por todas las paredes de los hongos y la ventaja de que se pueden conservar las preparaciones de manera semipermanente e indefinida y examinarlas teñidas en cualquier momento. Sin embargo, entre las ventajas de aplicar la fluorescencia para la observación de estructuras en MA están que se pueden realizar observaciones morfológicas o fotomicroscopía de alta magnificación, porque resultan imágenes con alto contraste en las que se distinguen con buena definición las estructuras fúngicas de las vegetales evitando la interferencia de varias capas celulares superpuestas como en la microscopía convencional con colorantes no fluorescentes (Brundrett *et al.*, 1984; Cudlín *et al.*, 1996).

De igual forma, la tinción con azul de Tripán resulta poco efectiva para realizar mediciones automatizadas de micelio externo por análisis de imágenes digitales, debido al bajo contraste que se obtiene sobre todo en matrices donde abundan partículas de materia orgánica y restos vegetales de colores oscuros obtenidas del suelo. Otra desventaja es que éste no permite distinguir entre el micelio viable del inactivo para determinar la biomasa fúngica funcional o viable en una muestra o inclusive el grado de senescencia de las estructuras como las esporas extramatriciales.

En cuanto a las pruebas de autofluorescencia, se puede decir que las diferencias en la intensidad de la luz emitida entre las diferentes estructuras de cada grupo de hongos, depende del espectro de luz de excitación de los componentes celulares y del grado de interacción en cada simbiosis con compuestos de paredes vegetales (Dreyer *et al.*, 2006). De esta manera, las hifas extramatriciales de *G. intraradices* fueron mejor vistas en las tres bandas de excitación generales de autofluorescencia, mientras que las vesículas intraradicales fueron significativamente mejor definidas en luz verde. La emisión adicional color naranja de esporas maduras observado en este

trabajo, había sido ya descrito por Dreyer *et al.* (2006), los cuales señalan que las esporas, cuando son excitadas con luz azul, fluorescen en diferente color dependiendo de su edad; las jóvenes fluorescen en verde y las maduras en color naranja. Por lo tanto la autofluorescencia con luz verde puede ser una buena herramienta para detectar colonización intraradical y para ver esporas inmaduras, mientras que la luz ultravioleta lo es para observar estructuras maduras. Todo esto sin mayor tratamiento de la muestra.

La intensa autofluorescencia en ECM bajo luz azul permitió reconocer las células del manto y la red de Hartig (Qian *et al.*, 1998a), por lo que es probable que el espectro de excitación de los componentes de pared de este hongo se estimulen entre las longitudes de onda principalmente del azul. La autofluorescencia azul intenso bajo excitación UV por parte de las paredes celulares de la planta se debió a la presencia de lignina, cutina, suberina y otros ácidos fenólicos que autofluorescen con esta excitación (Rost, 1995). La autofluorescencia por parte del material fúngico de baja intensidad posiblemente se produjo porque la longitud de onda de la luz UV produce menor excitación en los componentes de pared celular de las hifas.

Las hifas del cultivo de un hongo orquideoide fueron más definidas en ultravioleta, seguidas del azul y verde y en las tres longitudes se apreciaron contenidos citoplasmáticos de baja resolución. Igualmente los componentes de pared celular estructural de estos hongos responden de mejor manera a la luz UV.

Estudios de Dreyer *et al.* (2006) de aislamiento de estructuras internas de hongos micorrízicos demuestran que la fuente de autofluorescencia es la quitina de las paredes de las células de la mayor parte de estos hongos y por tanto en MA y MO, la fluorescencia de luz UV fue la que mejor excitó los componentes de pared de estos hongos. Sin embargo, dentro de un mismo grupo de micorriza, no todas las estructuras fúngicas presentan contenidos similares en proporciones dado que las esporas y vesículas no autofluorescen con igual intensidad que las hifas. Se sabe que las esporas al ir madurando, modifican los componentes de sus paredes celulares, incorporando pigmentos que les dan una coloración oscura en algunas especies y que les permiten funcionar como estructuras de resistencia. Esto no fue posible documentarlo en MO dado que los cultivos no presentaron en el momento células monilioides. Sin embargo lo común es que estas últimas no cambian su coloración si no su grosor (Currah y Zelmer, 1992) y posiblemente su fluorescencia se mantenga igual que el resto de las hifas.

Dentro de los fluorocromos probados, en la tinción de estructuras internas de MA con CFW, estas no se distinguieron claramente dentro del tejido de la raíz, debido a que la fluorescencia de la planta predomina sobre la del hongo y dificulta su distinción. Pese a esta situación, pudieron observarse en un tono opaco las hifas de micelio intramatricial.

La CFW constituye una buena herramienta para reconocer biomasa fúngica de micelio externo en muestras de suelo (West, 1988) o en una matriz de cultivo *in vitro* como Phytigel®, ya que permite hacer observaciones finas a grandes aumentos y se pueden analizar varias muestras en diferentes sesiones debido a que el colorante está activo hasta por 24 horas. También se obtiene buen contraste para realizar el protocolo de análisis de imágenes digitales. Este colorante puede funcionar para medir biomasa fúngica total (micelio externo) aunque tiene mayor afinidad por biomasa activa; sin embargo, este fluorocromo no puede considerarse como evaluador de viabilidad *sensu stricto* debido a que es un inhibidor de la síntesis de quitina (Morgan *et al.*, 1991) y por lo tanto de crecimiento. Al ser un colorante con mayor afinidad por las paredes vegetales que fúngicas (Morgan *et al.*, 1991), dificulta el trabajo de observación de micelio intrarrátrico de micorrizas, por esto se recomienda usar este para evaluar de manera general micelio externo pero no colonización interna.

En ECM la CFW permitió identificar con detalle la microestructura y tejido de las hifas del manto interno, así como las paredes celulares vegetales. Este realce permite reconocer las dimensiones del manto en un corte transversal de ápice y si se realizara en conjunto con la técnica de extensión del micelio en un plano de Agerer (1991) se podría reconocer el arreglo del manto, caracter útil para la clasificación taxonómica en esta simbiosis (Mukerji *et al.*, 2002). Con este fluorocromo, es factible estudiar los diferentes sistemas de exploración de micelio externo de ECM, los cuales se distinguen con base en la longitud y arreglo de hifas extramatriciales del manto o por la presencia y diferenciación de los rizomorfos. Para identificar estos últimos se requiere reconocer el patrón de acomodo de las hifas tanto en la superficie como en el interior a través de un corte longitudinal (Agerer, 1991). Las hifas nuevas y los rizomorfos son esenciales para la colonización de nuevas raíces para aumentar el área de absorción, lo que tiene funciones ecológicas relevantes en la dinámica del suelo tales como el movimiento de nutrientes (Agerer, 2001).

Por otro lado, aunque la CFW no es en sí misma un colorante que determine viabilidad, como se mencionó anteriormente, en la MO sí se incrementó la emisión de fluorescencia en hifas no digeridas que posiblemente tenían mayor actividad celular (Morgan *et al.*, 1991). Los pelotones al estar completamente colapsados y sin contenido citoplasmático no emitieron fluorescencia, por lo que es posible que estos componentes internos también contribuyan a la misma y no sólo la pared celular del hongo, en el caso de este tipo particular de micorriza, las paredes quedan encapsuladas al ser digerido el citoplasma por el hongo. Tanto en protocormos como en raíces, las células vegetales son poco conspicuas sin tinción y su realce al ser teñidas con este fluorocromo permite destacar su forma, tamaño y distribución de otra forma inapreciable. En este caso, el grado de digestión de los pelotones, como la intensa fluorescencia emitida por las paredes celulares vegetales, hicieron que los hongos se apreciaran poco y su definición fuera aún menor en mayores aumentos.

Como se ha discutido, en estructuras externas, la CFW da excelentes resultados dado que permite realzar con gran detalle a aumentos pequeños, las hifas de diversos hongos y entre ellos permite una clara definición. Por otro lado, en el análisis de imágenes semi-automático, se puede seleccionar artefactos y eliminarlo del conteo. Contrario al caso de las ECM donde la CFW permite observar el detalle de acomodo de las hifas en manto interno y externo, en las MO se observó con mejor precisión el detalle de las hifas externas.

El combinar la CFW con ANS permitió mejorar el contraste de la tinción en las hifas y esporas de las MA ya sea obtenidas en suelo o en medios gelificados semitransparentes. Además esta combinación retuvo la fluorescencia del ANS por más tiempo (Morgan *et al.*, 1991).

La doble tinción en MA permitió un mejor contraste del contenido citoplasmático de las hifas, por lo que ayuda a distinguir claramente entre las hifas septadas vacías y aquellas que conservan citoplasma y por lo tanto actividad. Esta combinación de colorantes no había sido reportada en la literatura, el resultado fueron mejoras en el contraste y definición de las estructuras, aún en aquellas en proceso de senescencia.

En ECM, la doble tinción permitió distinguir caracteres microscópicos útiles que, como se discutió anteriormente, no se evidenciaron con CFW sola por la fluorescencia de la pared vegetal, como la red de Hartig. El grosor de la red de Hartig y el número de células que abarca son caracteres que facilitan la determinación taxonómica al igual que el grosor del manto, de la

epidermis (con abundancia de taninos), los cuales se pueden observar con tal claridad que se pudieron realizar mediciones útiles para la caracterización del ejemplar.

En MO, las células vegetales toman una coloración azul intenso y la mayoría de las estructuras fúngicas verde-azul o azul claro. Se había destacado anteriormente que la elevada emisión de las estructuras vegetales predominaba sobre aquella de los hongos intercelulares. Al realizar la doble tinción, se realza completamente a las estructuras fúngicas siendo inclusive más definidas que los compuestos vegetales de la testa. Esto puede deberse a que el ANS tiene afinidad por los lípidos ergosteroles de la membrana celular de los hongos preferentemente (Mayfield, 1975), y a que además los hongos están metabólicamente muy activos y pueden tener más fluorescencia en tejidos vegetales muy inmaduros (es decir, paredes vegetales no lignificadas) como los protocormos con paredes celulares muy delgadas y con poca fluorescencia o a las tres cosas en conjunto.

La biomasa fúngica activa en suelo en MA se evaluó mediante la tinción con FDA, la cual permitió diferenciar fácilmente el material vivo del muerto pues genera alta fluorescencia verde-amarilla cuando se identifica actividad enzimática de esterases en citoplasma, muy diferente a la producida sólo por el fenómeno de autofluorescencia de las paredes celulares. Este colorante resulta una mejor opción para distinguir actividad en micorrizas en lugar de otros colorantes anteriormente usados como bromuro de etidio y púrpura de bromocresol utilizados por Kurzwielova y Sigler (1993), los cuales son más tóxicos y muestran menos definición.

En MA la extracción, la tinción y automatización del análisis de imágenes permitió la evaluación rápida y sencilla de biomasa fúngica. Si bien los valores obtenidos de longitud de las hifas fluorescentes teñidas con FDA son similares a los valores obtenidos con otras técnicas de viabilidad basados en la actividad enzimática (Söderström, 1977 en Cudlín, 1996), hay que mencionar que el análisis se realizó en muestras de un cultivo monoxénico en una matriz transparente donde no hay interferencia de ningún elemento del suelo. Con el software, se tendrían que realizar las modificaciones necesarias para eliminar del conteo a otros organismos y partículas que se convierten en artefactos para dicho estudio, como se muestra en la tinción con CFW donde se aprecian las hifas del resto de la matriz del suelo. Este procedimiento facilita la tarea de evaluar instantáneamente y con mayor precisión, la cantidad de micelio externo en muestras de suelo, pues el método tradicional de intersección con gradilla utilizando azul de Tripán como colorante

(McGonigle *et al.*, 1990) es tedioso, cansado, requiere mayor concentración para contar intersecciones en un campo visual sin repetir los cruces, tienen cierto error por la persona que lo cuenta y su apreciación de hifas de distintos grosores que hay en el suelo, no es repetitivo con relación al campo visual que se observa porque nunca vuelve a coincidir el campo con la gradilla y debido a que es directo, es decir sin almacenamiento de imágenes, no goza de las posibilidades de aumento de la imagen. Por otro lado, no da información acerca de la condición fisiológica de las hifas. Esto último es importante debido a que con la evaluación de biomasa fúngica activa en suelo se pueden relacionar su función con algunas propiedades particulares como la agregación, la resiliencia de propágulos y potencial colonizador del suelo, etc. (Downes *et al.*, 1992; Morris *et al.*, 1997).

El principio del análisis de imágenes digitales propuesto es un sistema semi-automático que puede reproducirse en otros programas con herramientas similares. La experiencia permite a los usuarios modificar ciertos pasos en la rutina del análisis para realizar la edición de la imagen previa al conteo. En general, es importante dar un ligero pretratamiento de la imagen como delimitar las zonas activas de las inactivas, mediante el reconocimiento visual del fenómeno (p. ej. Reconocimiento de artefactos que emiten alta fluorescencia como fibras u otros contaminantes microscópicos). De este modo, la aplicación del análisis de imágenes digitales no es automático y requiere de la intervención del conocimiento científico y experiencia en la identificación de los hongos y sus estructuras en el proceso de operación, pues existen muchas variantes en formas, colores, tamaños en los objetos que se detectan y necesitan un discernimiento por parte del experto o especialista que pueda reconocer los elementos de interés para que los pueda delimitar y sean cuantificados automáticamente por un sistema digital.

Por otro lado, para verificar la efectividad en la medición de la actividad del FDA, se realizaron pruebas en hongos micorrízicos de crecimiento rápido *in vitro* (*Ceratorhiza*) en las primeras fases de crecimiento y en los primeros estadios de desarrollo de protocormos micorrizados de orquídeas. Esto se hizo con el objeto de corroborar que la emisión fuera producto del metabolismo y no del colorante en sí. En ambos casos, se tenía más certeza del estado viable de las hifas por la tasa de crecimiento y el desarrollo de protocormos (Söderström, 1977 en Cudín *et al.*, 1996).

En las imágenes correspondientes a la prueba de actividad con FDA en ECM, la capa

externa del manto difería en su actividad de fluorescencia a lo largo de un mismo ápice, documentando regiones distintas con aparentemente más hifas activas en la red de Hartig. Esto se debe muy probablemente a que el corte estaba más cerca de la parte basal del ápice donde los tejidos son menos compactos y al encontrarse más lejos del meristemo las células son más grandes, interfiriendo menos con la gran emisión observada en los cortes cercanos a la región apical (Qian *et al.*, 1998a). Los métodos convencionales de cuantificación de la micorrización en ECM se llevan a cabo por extensión de raíces micorrizadas por presencia o ausencia de ápices (Brundrett *et al.*, 1996). Sin embargo, en estas cuantificaciones no se diferencia si los ápices están muertos o vivos. Los análisis por fluorescencia de cortes transversales podrían ser una herramienta poderosa para generar información más precisa del estado que guarda la simbiosis en el momento de la cuantificación.

Los resultados de emisión aquí obtenidos para la micorriza de *Pinus montezumae* corresponden a los descritos previamente en la mayoría de las ECM, las cuales presentan más actividad en la región basal del ápice y en el manto interno; así como niveles intermedios de actividad (++ y +) en la red de Hartig así como en manto externo (Qian *et al.*, 1998a). Por lo tanto, si se quiere hacer un estudio de la vitalidad de las ectomicorrizas en un sistema radical debe hacerse con cortes seriados a lo largo de todo el o los ápices y tomando en cuenta su posición en la raíz. Además, en las ectomicorrizas, la tinción con FDA permite conocer la zona de micelio con mayor actividad, lo cual está intrínsecamente relacionado con la secuencia de crecimiento y envejecimiento natural y las tasas de intercambio de nutrimentos y de crecimiento de las plantas. La intensidad de la fluorescencia regularmente revela el mismo patrón, en el cual fluorescen las hifas más jóvenes (Qian *et al.*, 1998a). Así, la tinción con FDA en tejidos de ECM puede servir como una herramienta para estudiar el sistema de regeneración o funcionalidad de ectomicorrizas en sistemas naturales como en los bosques, pues el crecimiento de éstas se caracterizan por un continuo envejecimiento y regeneración en las raíces de los árboles: una mayor regeneración de ápices podría implicar una mayor actividad en términos de toma de nutrimentos vs. el consumo de carbohidratos (Qian *et al.*, 1998a). Esto está en función de la actividad fisiológica de micorrizas y su tasa de recambio.

Las diferencias en la intensidad de la fluorescencia pueden reflejar la actividad de las micorrizas y es ecológicamente importante el distinguir si en un sistema predominan tipos muy

activos o inactivos (Al-Brass *et al.*, 1988), así como su relación con el tipo de suelo (Qian *et al.*, 1998b). La vida útil y vitalidad de las micorrizas también se ven afectadas por la calidad de sitio y la tinción con FDA permitiría evaluar la actividad de micorrizas de diferentes suelos.

El cultivo de MO funcionó como un control positivo en el cual se presentó intensa fluorescencia en las hifas como en los protocormos micorrizados con actividad enzimática potencial debido a su estado de crecimiento ininterrumpido, en este tipo de micorriza, faltó documentar más la fluorescencia en función de la degradación de los pelotones por la orquídea, lo que sería sin lugar a dudas, una de las aplicaciones más interesantes de esta técnica para el estudio de esta simbiosis particular. Muy pocos estudios existen en la literatura donde se apliquen técnicas de fluorescencia en la MO. Sin embargo, el contraste de emisión con CFW+ANS en pelotones digeridos y no, permitiría aventajar que existen cambios complejos en la permeabilidad de paredes celulares de ambos simbiontes (Arditti, 1992) durante la simbiosis que podrían ser precisados con gran detalle a través de la fluorescencia.

La fluorescencia de los núcleos también evidenció aspectos vitales muy importantes en las simbiosis estudiadas que con otros colorantes no es posible realizar. Como se ha documentado extensamente para las MA, se presentaron numerosos núcleos a lo largo del citoplasma de las hifas y se evidenció la posible migración de los mismos hacia la espora y su continuidad en pares a lo largo del micelio cenocítico externo. En este grupo particular de hongos, las esporas pueden contener hasta más de mil núcleos que van migrando del citoplasma cenocítico hacia las esporas (Giovannetti *et al.*, 1999) y constituyen uno de los fenómenos más importantes a través de los cuales estos hongos posiblemente mantengan su diversidad genética debido a que no se conoce su reproducción sexual (Giovannetti *et al.*, 2003). Por otro lado, también se pudo observar en las hifas que algunos de ellos dada su forma se encontraban realizando mitosis, lo cual también permitiría registrar viabilidad, crecimiento y reproducción.

En ECM la tinción de núcleos permitió observarlos en el manto y caracterizar con buena definición el micelio del manto y de la red de Hartig. Sin embargo, relacionando a los otros tipos de micorrizas, los núcleos fueron más difíciles de observar en los ápices, debido a que el colorante también tiñó paredes celulares y la densidad celular hizo que se vieran con menor claridad que en las otras micorrizas.

La determinación del número de núcleos en hifas vegetativas es importante en la

identificación de los anamorfos del género *Rhizoctonia* donde un carácter morfológico básico para la determinación taxonómica de los grupos micorrízicos es el número de núcleos en cada septo (Moore, 1987). Si bien una misma especie puede tener un número irregular de núcleos, los grupos anastomóticos presentan por lo regular patrones definidos y en el caso de los anamorfos asociados a orquídeas, tienen por lo general dos (Sneh *et al.*, 1991). El reconocimiento de hifas binucleadas en la *Ceratorhiza* se logró fácilmente con la tinción con DAPI lo que corroboró un aspecto más de la ya confirmada identidad molecular del teleomorfo *Ceratobasidium* sp.

La tinción con DAPI resultó muy apropiada y sencilla para reconocer núcleos. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que es un colorante muy tóxico para la salud y el ambiente (Meinhardt *et al.*, 2001), por lo que extremo cuidado debe ser puesto al manejarlo y sobre todo a confinar los materiales observados adecuadamente.

Finalmente, se puede decir que el uso del PI se planteó en un principio como control negativo en una tinción conjunta con el FDA. Esta técnica ha sido utilizada ampliamente en diversos organismos, entre ellos hongos filamentosos para marcar células muertas o con membranas celulares dañadas (Hickey *et al.*, 2004), donde el colorante se introduce en las células y se adhiere a los núcleos. En los hongos micorrízicos no funcionó así, pues tiñó organismos vivos, esto se debe muy probablemente a las diferencias en los componentes de pared celular de ambos simbiontes. Además, hizo resaltar núcleos y otras estructuras de tamaño y arreglo diferente a los núcleos obtenidos con el método de DAPI, que posiblemente sean gránulos de sustancias de almacenamiento como glicógeno que autofluorescen bajo luz verde. Un estudio más detallado en la interpretación de estas estructuras se hace necesario ya que no hay mucha documentación en la literatura.

En ECM, el PI tiñó paredes celulares y núcleos de la planta, operación de este colorante en células vegetales (Olivain *et al.*, 2006). Los núcleos del hongo no son muy claros debido a la interferencia de otros compuestos dentro del citoplasma que autofluorescen bajo esta longitud de onda. En hifas de *Ceratorhiza* sp., el PI hizo fluorescer núcleos, que corresponden debido a las medidas y acomodo intracelular con lo previamente observado en la tinción con DAPI y otras estructuras que posiblemente sean los reservorios de carbono dentro del citoplasma.

## 9 CONCLUSIONES

La microscopía de epifluorescencia aplicada al estudio de hongos micorrízicos mostró ser una poderosa herramienta para el análisis detallado de distintos parámetros estructurales y funcionales en los grupos más extendidos por su asociación con la mayor parte de las plantas. Nos permitió distinguir estructuras que caracterizan a cada tipo de micorriza para documentarlas como esporas, vesículas, manto, pelotones, etc. y/o ubicarlos en una categoría taxonómica; reconocer el estado fisiológico de la simbiosis, la biomasa fúngica activa en suelo, entre otras cosas.

Los métodos de montaje seleccionados, es decir, los micelios fijados en membrana por método de filtrado en MA y MO, los cortes delgados de ápices de ECM y protocormos de MO sobre un portaobjetos, resultaron los más convenientes para realizar las tinciones, enjuagues y observaciones de las muestras.

La tinción con CFW permitió observar con alta definición paredes celulares de todas las estructuras micorrízicas, aunque con mayor intensidad en aquellas más jóvenes. La fuerte afinidad de este colorante a las paredes celulares vegetales interfirió con la visualización de estructuras fúngicas endomicorrízicas, sobre todo en aquellas en proceso de senescencia o degradación.

La tinción con CFW y ANS mejoró el contraste para la observación de micelio de MA, del manto y red de Hartig en ECM y de las hifas y pelotones de MO. Mostró igualmente tinciones diferenciales entre estructuras vegetales y fúngicas en las micorrizas debido a que el ANS tiene afinidad por lípidos de membrana y produce distinta tonalidad dependiendo de los componentes de cada célula.

El FDA marcó células vivas en los tres tipos de micorriza debido a la acción enzimática de esterases. En ECM la fluorescencia se observó en varias intensidades entre los tejidos dependiendo de su actividad. La tinción con FDA en conjunto con la implementación de un sistema automatizado de análisis de imágenes digitales constituyen una herramienta factible para evaluar biomasa activa en micorrizas arbusculares con muestras montadas en membrana por el método de filtrado o en películas de agar.

El DAPI permitió observar núcleos con gran claridad en los tres tipos de micorrizas: en micelio externo y esporas extramatriciales en MA, en las hifas del manto en ECM y en hifas de

un cultivo de *Ceratorhiza* sp. El PI tiñó núcleos y moléculas de reserva dentro del citoplasma de MA y las hifas de *Ceratorhiza* sp., además mostró fuerte afinidad por paredes y núcleos vegetales en ECM. Con la tinción con DAPI se pudo certificar que el cultivo identificado con el anamorfo *Ceratorhiza* del aislado MCCBHQ011 y su correspondiente teleomorfo *Ceratobasidium*, posee hifas binucleadas, cuyos núcleos miden entre 1 y 2  $\mu\text{m}$ .

La estandarización de las técnicas de tinción con los colorantes analizados permitió comparar y conocer el manejo óptimo de éstos dependiendo del tipo de micorriza y permitió aplicarlos todos con distinta eficiencia en las emisiones de respuesta que dependieron del tipo de componentes celulares de cada hongo y especie de planta en particular

## 10 RECOMENDACIONES

A continuación se desprenden algunas recomendaciones metodológicas de importancia.

Es recomendable evitar el uso innecesario de fluorocromos cuando la autofluorescencia sea una herramienta suficiente y pertinente para la observación de estructuras dependiendo el tipo de micorriza y el tipo de estudio a realizar. Por ejemplo, ésta es suficiente para observar colonización micorrízica intrarradical y extrarradical de forma sencilla y rápida, sin generar desechos tóxicos y sin realizar pre-tratamientos a las raíces necesarios con otros colorantes convencionales.

En el montaje de las muestras es recomendable seguir los protocolos establecidos en el Anexo 1; particularmente se debe tener cuidado de disolver perfectamente el Phytigel® antes de realizar el filtrado en membrana de micelio de MA y MO, y de colocar una alícuota pequeña de los cultivos para observar cada hifa. En las muestras de ECM se deben realizar cortes transversales muy delgados del ápice para poder observar las estructuras correctamente.

Las tinciones resultan muy efectivas para observar estructuras muy específicas de cada tipo de micorriza, pero es necesario seguir los protocolos adecuados a las características de las micorrizas como los que se presentan en el Anexo 2. Se debe tener cuidado con el manejo de los reactivos porque son tóxicos y muy persistentes. Además se deben conocer los lapsos de tolerancia a la fotodestrucción para adecuar los tiempos de incidencia de luz en las muestras y realizar buenas observaciones.

Bajo el protocolo establecido en el Anexo 2 de tinción de paredes celulares fúngicas, la CFW resulta ser un colorante muy efectivo para observar paredes celulares de micelio externo micorrízico, sobre todo en matrices semitransparentes como el Phytigel® o en suelos de tonalidades oscuras. Debe tomarse en cuenta que este fluorocromo tiene alta residencia en las paredes fúngicas y vegetales por lo que pueden realizarse observaciones hasta por 24 horas, con pocos problemas de fotoblanqueamiento por la excitación continua. Sin embargo, para observar estructuras endomicorrízicas, al ser este colorante mucho más afín a paredes celulares vegetales, en muchas ocasiones éstas perturban la observación de la fluorescencia de los hongos, por lo que se necesita tener conocimiento de las formas de las estructuras fúngicas para reconocerlas entre las vegetales. El colorante produce menor intensidad de tinción en organismos senescentes.

Se sugiere agregar ANS a la CFW como en el protocolo establecido para observar estructuras micorrízicas intra o extrarradicales con mayor intensidad y en dos tonalidades (azul y azul verdoso) dependiendo de las diferencias en las paredes y membranas celulares, aún cuando los tejidos se encuentren en proceso de senescencia. El ANS por si sólo tiene residencia de 30 minutos aproximadamente, pero en combinación con la CFW puede incrementarse hasta por 12 horas, lo que resulta provechoso para analizar el material.

El FDA es un muy buen colorante para detectar micelio activo en MA, ECM y MO pues genera fluorescencia muy intensa color verde-amarillo, y se distingue desde aumentos de 10 ×. Esta prueba se debe hacer con organismos recién recolectados, pues la viabilidad se va perdiendo al dejar de estar en contacto con la fuente de nutrimentos y los resultados no serían fieles al estado de los organismos en su medio. Este colorante sólo tiene una duración de máximo 30 min en las células, por lo que la observación debe ser inmediata al proceso de incubación de la tinción del organismo. Se probaron diferentes soluciones buffer y tiempos de incubación y el protocolo sugerido con buffer fosfatos pH 7.6 fue el que produjo mejores resultados. Cabe mencionar que es indispensable eliminar el exceso de colorante con repetidos enjuagues con agua (al menos 5) para obtener los resultados de la fluoresceína en citoplasma específicamente; esto se realiza fácilmente con el dispositivo de vacío cuando se trabaja en membrana. La adición de glicerol a la muestra antes de observarla mejora la retención del colorante y la observación de la muestra.

Para realizar evaluaciones de actividad de tejidos y productividad de la asociación con FDA es recomendable realizar cortes seriados a lo largo de todo el ápice y teñir en los cortes de las diferentes secciones tomando en cuenta su posición en la raíz.

La tinción con DAPI resulta muy sencilla y efectiva para observar material genético en los tres tipos de micorrizas, debe observarse cuando las manchas amarillas (estado del colorante antes de unirse a ácidos nucleicos) hayan desaparecido y se observen los núcleos en color azul, esto toma aproximadamente 20 minutos posterior a la incubación. Este colorante debe manejarse con extremas precauciones pues es muy tóxico para el humano y tiene alta residencia. En el procedimiento estandarizado se establecen las medidas de seguridad sugeridas para el trabajo con DAPI.

El PI no funciona como un evaluador de mortalidad en células de micorrizas, por lo que no se puede realizar la prueba FDA y PI para propósitos de evaluación de viabilidad y

mortalidad. El PI si tiñe ácidos nucleicos pero se observa bajo luz verde y en estas longitudes de onda se presenta autofluorescencia de moléculas reservorios de nutrimentos en el interior del citoplasma (en MA y MO), por lo que causan interferencia para la detección de núcleos. Se recomienda mejor el uso de DAPI para la observación de núcleos de estos hongos.

Para llevar a cabo la documentación y/o mediciones de las estructuras se debe contar con el equipo adecuado, es decir, computadora, monitor, microscopio, cámara, software de análisis de imágenes compatibles, que permitan obtener imágenes de alta resolución y los diagnósticos pertinentes.

Para realizar los análisis de imágenes se debe tener especial cuidado en calibrar las fotografías correctamente de acuerdo con el aumento en el que éstas fueron tomadas. El procedimiento de análisis semi-automático de imágenes digitales propuesto para evaluar la biomasa fúngica de MA activa se estandarizó en muestras de un cultivo monoxénico *in vitro*, por lo que debe ser adaptado si se requieren hacer estudios en suelo. Para realizar este método propuesto de análisis semi-automático se debe tener amplio conocimiento de la morfología de los organismos, para descartar del conteo otros objetos que funjan como artefactos. También debe realizarse un pretratamiento de la imagen ajustando el contraste, brillo y factor de corrección gama para poder evaluar posteriormente las imágenes con el software.

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 1.1</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 81- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Medios de cultivo: Medio Mínimo (M)</b>	Preparación de muestras.

## Propósito

Cultivo *in vitro* de hongos micorrízicos asociados a raíces modificadas de *Daucus carota* L. en una matriz transparente que permita la visualización microscópica de la micorrización.

## Principio

El medio M (Bécard y Fortin, 1988) es un medio de cultivo sintético modificado del medio White para cultivar raíces de tomate (Butcher, 1980). La composición del medio M es bastante pobre en sales, principalmente en fósforo debido a que inhibe el desarrollo de la simbiosis micorrízica arbuscular. Las raíces transformadas de zanahoria con la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* crecen rápido y vigorosamente en este medio y a su vez, desarrollan una rápida colonización con el hongo micorrízico, lo que permite implementar distintos protocolos de investigación con el cultivo monoxénico.

## Técnicas relacionadas

- Uso de balanza analítica digital.
- Medición del pH con potenciómetro.
- Uso de autoclave.
- Subcultivo *in vitro* de hongos micorrízicos de *Glomus intraradices* asociados a raíces Ri t-DNA *Daucus carota* L (zanahoria).

## Equipo y material

- Parrilla de calentamiento con agitación magnética.
- Potenciómetro calibrado en el rango de pH 0 a 7.
- Balanza analítica digital.

<u>Autor:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 1.1</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 82- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Medios de cultivo: Medio Mínimo (M)</b>	Preparación de muestras.

- Micropipeta (100-1000  $\mu$ L) con 2 puntas.
- Micropipeta (1000-5000  $\mu$ L) con 4 puntas.
- Autoclave.
- Campana de flujo laminar (horizontal).
- 6 vasos de precipitados de 1 L.
- 1 vaso de precipitados de 2 L.
- 1 matraz aforado o probeta de 1 L.
- 4 frascos de 1 L transparentes.
- 2 frascos de 1 L ámbar.
- 7 agitadores magnéticos.
- 2 cajas Petri de vidrio.
- 19 espátulas de acero inoxidable de aproximadamente 4 mm de diámetro.
- 19 charolas cuadradas de poliestireno de 5.0 x 5.0 cm especiales para pesar .
- 2 matraces Erlenmeyer de 1 L.
- 2 ó 5 cuadros de papel aluminio de 15 x 15 cm de tres capas\*
- 1 cuadro de plástico de 20 x 20 cm (puede ser una bolsa de plástico cortada por ambos lados).
- Cinta indicadora de esterilización.
- Tijeras.
- Plumón indeleble negro.
- 2 ó 6 ligas gruesas nuevas.
- 20 cajas de Petri cuadradas de 9.5 x 9.5 cm desechables estériles\*\* (aproximadamente) ó 5 matraces Erlenmeyer de 250 mL.
- Mechero Bunsen.
- Protector de manos de silicón.
- 6 etiquetas para almacenaje de reactivos.

\*5 en caso de medio líquido

<u>Autor:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 1.1</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 83- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Medios de cultivo: Medio Mínimo (M)</b>	Preparación de muestras.

\*\*10 cajas de Petri redondas grandes de 14.2 cm de diámetro o 30 cajas redondas de dos compartimento desechables estériles.

## Reactivos

<b>Sol. concentradas (stocks)</b>	<b>Clave</b>	<b>Reactivo</b>	<b>mg L<sup>-1</sup></b>	<b>g (100X / 1L)</b>
<b>Macroelementos M1<sup>1</sup></b>	MCCR0063	KNO <sub>3</sub>	80.0	8.00
	MCCR0072	MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	731.0	73.1
	MCCR0028	KCl	65.0	6.50
	MCCR0044	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.8	0.48
<b>Macroelementos M2</b>	MCCR0060	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	288.0	28.80
			<b>mg L<sup>-1</sup></b>	<b>g (1000X / 1L)</b>
<b>Microelementos m1</b>	MCCR0027	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	6.00	6.00
	MCCR0001	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.50	1.5
	MCCR0075	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.65	2.65
	MCCR0057	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.0024	0.0024
	MCCR0070	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.13	0.13
<b>Microelementos m2</b>	MCCR0084	KI	0.75	0.75

83

<u>Autor:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 1.1</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 84- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Medios de cultivo: Medio Mínimo (M)</b>	Preparación de muestras.

			mg L <sup>-1</sup>	g (100X / 1L)
<b>Fe-EDTA<sup>2</sup></b>	MCCR0031	NaFe-EDTA	8	0.8
<b>Vitaminas<sup>2</sup></b>	MCCR0058	Glicina	3	0.3
	MCCR0042	Mio-inositol	50	5.0
	MCCR0007	Ácido nicotínico	0.5	0.05
	MCCR0065	Piridoxina HCl	0.1	0.01
	MCCR0078	Tiamina HCl	0.1	0.01
	MCCR0067	Sacarosa	10 g L <sup>-1</sup>	no aplica
	MCCR0036	Phytigel® *	3 a 5 g L <sup>-1</sup>	no aplica
		Agua destilada		

(\*3 g para el cultivo de raíces, 4 - 5 g para el cultivo de micorrizas).

Soluciones 1 N de NaOH para subir o HCl para disminuir el pH.

<sup>1</sup>caducidad tres meses <sup>2</sup> caducidad 1 mes

## Muestra

Caja de Petri con raíces de zanahoria DNA RiT *Daucus carota* L. y/o un cultivo monoxénico de un hongo micorrízico (*Glomus intraradices*, *Gigaspora gigantea*).

## Procedimiento

Elaboración de soluciones concentradas (stock).

<u>Autor:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 1.1</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 85- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Medios de cultivo: Medio Mínimo (M)</b>	Preparación de muestras.

Se pesan por separado en la balanza analítica cada uno de los reactivos indicados en la columna derecha del cuadro de reactivos con ayuda de las diferentes espátulas (para no contaminar los frascos) y se colocan cada uno en las distintas charolas de pesado. Después de pesar cada reactivo, las charolas se colocan por separado en cajas de Petri (para evitar que se hidraten mientras se elabora el medio), indicando la fórmula del reactivo con plumón. Se colocan 800 mL de agua destilada en un vaso de precipitados de 1 L; se introduce un agitador magnético antes de colocarlo en la parrilla que se regulará a velocidad media; se agrega el peso de cada reactivo en el estricto orden en que aparece en el cuadro para evitar precipitaciones o insolubilidad, cuidando que no queden ningún resto mineral en la base del vaso. Cada conjunto de soluciones se afora a 1 L en una probeta o en un matraz aforado y serán almacenadas en frascos transparentes, exceptuando la sol. de Fe-EDTA y la de vitaminas estas se almacenen en frascos ambas. Las soluciones deben almacenarse en el refrigerador (4 °C) con etiquetas que indiquen para qué medio de cultivo son, la fecha de elaboración, la persona que elaboró la solución, la fecha de caducidad y la concentración de la solución (formato de etiquetas de uso del laboratorio).

#### Elaboración del medio (1 L).

Se sacan del refrigerador con al menos 30 min de anticipación a la elaboración del medio, las soluciones concentradas con la finalidad de que se templen a temperatura ambiente. En un vaso de precipitados de 2 L, se colocan 500 mL de agua destilada y un agitador grande antes de ponerlo sobre la parrilla de agitación a velocidad media. Se añaden en el mismo orden del cuadro, las alícuotas de las soluciones concentradas preparadas en la sección anterior: 5 mL de M1, 5 mL de M2, 0.5 mL de m1, 0.5 mL de m2, 0.5 mL de Fe-EDTA, 0.5 mL de vitaminas y la sacarosa (10 g). Se afora en la probeta a un litro y se regresa al vaso de precipitados donde se ajusta la disolución a pH 5.5 con NaOH 1N para aumentarlo y HCl 1N para disminuirlo. Se calienta a temperatura alta agitando (cuidando de que no se bote el magneto) y adicionando en seguida el Phytigel® (si se realiza medio líquido no se agrega Phytigel®); se mantiene en agitación y calor constante hasta que la mezcla sea transparente y comience a hervir cuidando que NO se derrame (por eso el se elabora en un matraz del doble de volumen del que se va a preparar el medio). Se vierten 500 mL del medio en cada matraz Erlenmeyer de 1 L (para

<u>Autor:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 1.1</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 86- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Medios de cultivo: Medio Mínimo (M)</b>	Preparación de muestras.

evitar que se derrame dentro de la autoclave). Se tapan con el papel aluminio cuidando que los bordes se tallen sobre el labio del matraz con los dedos para que se pliegue correctamente el papel a la boca exterior y dejando el centro cóncavo. Se ajustan con al menos tres vueltas de una liga y se esteriliza en autoclave a 121 °C ó 15 lb durante 15 minutos exactos.

En caso de medio líquido, se distribuyen 200 mL de medio después de disolver la sacarosa, en matraces Erlenmeyer de 250 mL que se taparán con aluminio de la misma forma descrita.

El medio se vacía en condiciones de esterilidad en la campana de flujo (horizontal) en cajas Petri cuidando de no derramar líquido fuera de cada caja, vertiendo primero las cajas de adelante, tapando las cajas hasta que solidifique el medio para evitar evaporación de agua y posterior contaminación. Se puede agregar al medio M gentamicina y estreptomicina 0.2 % para evitar la contaminación por bacterias, esto en el momento de vaciarlo en las cajas de Petri\*\*\*. Se apilan las cajas y se guardan en la bolsa de plástico estéril bien rotuladas indicando tipo de medio y fecha de elaboración, quién elaboró. Se dejan en un cuarto a temperatura ambiente por unos días y se almacenan a 4 °C si no se utilizarán inmediatamente.

\* Si se van a utilizar cajas Petri de dos compartimentos, en una de las dos partes se llenan con medio hasta el borde aproximadamente 25 mL, y en otra parte verter aproximadamente 7 mL de medio.

## Cálculos

Si se requiere hacer menos de 1 L de medio o más se aplica la siguiente fórmula:

1) fórmula  
 $C1V1 = C2V2$

2) Ejemplo para preparar 500 mL de medio:  
 Solución M1  
 $(5 \text{ mL})(500 \text{ mL})/1000 \text{ mL} = 2.5 \text{ mL}$

<u>Autor:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 1.1</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 87- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Medios de cultivo: Medio Mínimo (M)</b>	Preparación de muestras.

Por lo que para preparar 500 mL se necesitarían: 2.5 mL de M1, 2.5 mL de M2, 0.25 mL de m1, 0.25 mL de m2, 0.25 mL de Fe-EDTA, 0.25mL de vitaminas.

## Referencias

- BÉCARD, G., J., FORTIN. 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri t-DNA transformed roots. *New Phytologist* 108: 211-218.
- BUTCHER, D. 1980. The culture of isolated roots. In: B. Scientific ed. *Tissue culture methods for plant pathologists*. D.S. Ingram J.P. Hegelson, Oxford. Pp. 13-17.

## Observaciones

El Phytigel® es un agente solidificador muy potente que se gelifica en mucho menos de 1 hora aproximadamente posterior a la esterilización, por lo que se debe vaciar en las cajas de inmediato. Por tanto, NO dejar el medio en la autoclave más de 15 minutos posteriores a su esterilización pues se solidifica y no es posible volverlo a fundir.

## Notas

<u>Autor:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 1.2</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	pág.: 88- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Subcultivo <i>in vitro</i> de <i>Glomus intraradices</i> asociado a raíces Ri T-DNA de <i>Daucus carota</i> L.</b>	Preparación de muestras

## Propósito

Mantener la línea monoxénica *in vitro* del hongo micorrízico arbuscular *Glomus intraradices* asociado a raíces Ri T-DNA transformadas de zanahoria *Daucus carota* L.

## Principio

El mantenimiento de los clones en cultivo monoxénico de las especies mencionadas se puede desarrollar *in vitro* de manera indefinida sin que se afecte la fisiología y/o funcionalidad de la simbiosis. El método desarrollado por Bécard *et al.*, (1989) ha permitido realizar numerosas investigaciones en torno a aspectos de ciencia básica que regulan la simbiosis y ha sido utilizado como partida de numerosos protocolos de investigación a 20 años de su establecimiento (Fortin *et al.*, 1992). Los cultivos son obtenidos por transferencia de raíces micorrizadas a nuevo medio Mínimo en donde los hongos intrarradicales recrecerán en el medio formando micelio extramatricial y dentro de las raíces que también crecerán nuevamente alimentadas por la sacarosa del medio de cultivo que suple los fotosintatos de la planta en ausencia de la parte fotosintética (Declerck *et al.*, 1996, St-Arnaud *et al.*, 1996). De este modo, el ciclo de vida del hongo se continua *in vitro*.

Existen variantes para llevar a cabo el subcultivo de estos hongos dependiendo del protocolo de investigación y cada una de ellas permitirá montar protocolos distintos como el método de dos compartimentos.

## Técnicas Relacionadas

- Preparación de medio Mínimo (Medio M).
- Uso de campana de flujo laminar (horizontal).

<u>Autor:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 1.2</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	pág.: 89- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Subcultivo <i>in vitro</i> de <i>Glomus intraradices</i> asociado a raíces Ri T-DNA de <i>Daucus carota</i> L.</b>	Preparación de muestras

## Equipo y material

- Campana de flujo laminar (horizontal).
- Cámara de incubación ( $25 \pm 2$  °C).
- Microscopio estereoscópico.
- 4 Pinzas metálicas de 15 cm de largo.
- 3 Bisturís mango número 3 ó 4.
- 3 navajas no. 11.
- Mechero Bunsen.
- Frasco (Gerber®) con tapa de plástico con algodón en su base conteniendo  $\frac{3}{4}$  de alcohol etílico al 96 %.
- Cajas de Petri con medio M solidificado con Phytigel® (redondas de 8.5 ó 15 cm de diámetro, redondas de doble compartimento o cuadradas) o matraces Erlenmeyer con medio M líquido.
- Tiras de plástico transparente adherente (Egapack®) de  $\pm 4$  cm de ancho.
- Plumón indeleble fino negro.

## Reactivos

Clave	Reactivo	mL
MCCR0103	Alcohol etílico 96 %	50

## Muestra

Subcultivar únicamente las cajas que muestren signos de una colonización madura que tengan

<u>Autor:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 1.2</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	pág.: 90- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Subcultivo <i>in vitro</i> de <i>Glomus intraradices</i> asociado a raíces Ri T-DNA de <i>Daucus carota</i> L.</b>	Preparación de muestras

abundante micelio externo, estén libres de contaminación y las raíces se encuentren vigorosas color amarillo claro. Esta se puede observar a simple vista poniendo la caja al trasluz donde se ven hebras muy finas que parten de las raíces. También se pueden seleccionar campos con abundante colonización observados bajo el microscopio estereoscópico y marcarlos con plumón como guía para sacar los explantes dentro de la campana de flujo laminar horizontal.

## Procedimiento

Transferir en condiciones de esterilidad en la campana de flujo laminar (horizontal) varios segmentos (de aproximadamente 2 - 3 cm<sup>2</sup>) de raíces micorrizadas cortadas con bisturí filoso con ayuda de pinzas flameadas y enfriadas previamente, a otra caja Petri con medio M. Colocar los segmentos de raíces en contacto con el medio M en la parte basal de la caja procurando que los explantes no se resequen con el aire de la campana o bien se quemen por no enfriar suficiente tiempo las pinzas.

Evitar los cortes de los explantes cuyas raíces quedan en los bordes de las cajas debido a que presentan contaminación sistémica (Fig. 1). Sellar las cajas perfectamente con 3 vueltas de plástico adherente e incubarlas de forma vertical a 45 ° con las raíces en la parte basal. Marcar las cajas con la fecha de siembra, el medio y las iniciales de la persona que sembró. Incubar en oscuridad a 25 ± 2 °C (esto puede ser dentro de una caja de cartón en la cámara de incubación). Las cajas Petri deben ser colocadas de forma inclinada para que las raíces crezcan hacia abajo por geotropismo positivo y los hongos hacia arriba por geotropismo negativo. En el caso de sembrar en cajas de dos compartimentos, transferir segmentos similares en el compartimento con más medio y colocarlos en la parte central (Fig. 2). Incubar en las mismas condiciones pero de manera horizontal.

Para cultivar *Gigaspora gigantea* se coloca un segmento de raíz sin colonización y una espora cercana a éste en el centro de una caja Petri de 15 cm de diámetro. Se incuba como las anteriores.

<u>Autor:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 1.2</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	pág.: 91- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Subcultivo <i>in vitro</i> de <i>Glomus intraradices</i> asociado a raíces Ri T-DNA de <i>Daucus carota</i> L.</b>	Preparación de muestras

## Referencias

DECLERCK, S., STRULLU, D. G., C. PLANCHETTE. 1996. *In vitro* mass production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* associated with Ri-TDNA transformed root carrots. *Mycological Research* 100: 1237-1242.

FORTIN, A., BÉCARD, G., Y. PICHÉ. 1992. Establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza in root organ culture: review and proposed methodology. *In*: Pp. 89-108. NORRIS, J., READ, D., A., VARMA, (Eds.) *Techniques for the study of mycorrhiza*. Nueva York, Academic Press.

ST-ARNAUD, M., HAMEL, C., VIMARD, B., CARON, M., J. A. FORTIN. 1996. Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in absence of host roots. *Mycological Research* 100: 328-332.

## Anexos

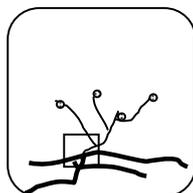


Fig. 1. Explantes sanos localizados al centro de la caja.

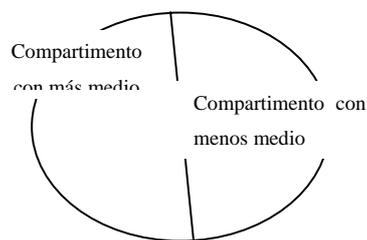


Fig. 2. Una sección contiene el triple de medio que la otra y se coloca el explante en el centro de la sección con más medio.

## Observaciones

## Notas

<u>Autor:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 1.3</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 92- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Solución amortiguadora de citratos para solubilizar Phytigel®.</b>	Preparación de muestras.

## Propósito

Solubilizar el sustrato de gelificación Phytigel® para poder extraer las muestras que se encuentren imbibidas en este gelificante, generalmente de hongos micorrízicos en cultivo monoxénico de la caja Petri de cultivo.

## Principio

La solución amortiguadora o buffer de citratos pH 6 se utiliza entre otras cosas, para solubilizar geles Phytigel® y mezclas de elementos como los que se presentan en el medio Mínimo. Phytigel® es un polisacárido industrial producido extracelularmente por la bacteria *Pseudomonas elodea*, que en presencia de cationes divalentes forma un gel firme y transparente que constituye una excelente matriz para medios de cultivo utilizados en la investigación de cultivo de tejidos vegetales. El buffer de citratos a pH 6 incrementa la concentración crítica de calcio y rompe los enlaces entre las moléculas que conforman los geles Phytigel® (Doner y Bécard, 1991).

## Técnicas relacionadas

- Elaboración de medios de cultivo (medio Mínimo).
- Medición de pH con potenciómetro.
- Uso de balanza digital.

## Equipo y material

- Balanza electrónica digital.
- Parrilla de calentamiento y agitación.
- Potenciómetro calibrado en el rango pH 0 a 7.

<u>Autor:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 1.3</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 93- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Solución amortiguadora de citratos para solubilizar Phytigel®.</b>	Preparación de muestras.

- Microondas.
- 2 charolas cuadradas de poliestireno de 5.0 x 5.0 cm especiales para pesar.
- 2 espátulas de acero inoxidable de aproximadamente 4 mm de diámetro.
- 2 cajas Petri de 8.5 cm de diámetro.
- 1 termómetro.
- 1 plumón indeleble negro.
- 1 probeta de 500 mL.
- 1 probeta de 50 mL.
- 1 piceta de 500 mL.
- 3 vasos de precipitados de 1000 mL.
- 1 vaso de precipitados de 100 mL.
- 2 frascos de vidrio de 500 mL con tapa de rosca.
- 1 frasco de vidrio de 50 mL con tapa de rosca.
- 3 agitadores magnéticos.
- 1 micropipeta de 1000-5000 µL con 1 punta.
- 2 pipetas Pasteur con bulbo.
- 1 pipeta de 10 mL graduada.
- 1 gendarme.
- 1 tamiz de metálico de 0.5 mm de apertura.
- 3 etiquetas para almacenaje de reactivos.

### Reactivos

Clave	Reactivo	PM (g/mol)	g / 500 mL	Concentración final
MCCR003	Ácido cítrico (HOC(CCOH)(CH <sub>2</sub> COOH) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O)	210.14	10.5	0.1 M
MCCR023	Citrato de sodio (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> )	294.1	14.7	0.1 M
	Agua destilada			

93

<u>Autor:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 1.3</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 94- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Solución amortiguadora de citratos para solubilizar Phytigel®.</b>	Preparación de muestras.

## Muestra

Cultivo *in vitro* de raíces de *Daucus carota* L. micorrizadas en medio M solidificado con Phytigel® o cualquier otra muestra cultivada en esta matriz.

## Procedimiento

Preparación de soluciones concentradas (stock).

Es necesario preparar dos soluciones concentradas, la primera de de ácido cítrico 0.1 M y la segunda de citrato de sodio 0.1 M. Se pesan por separado en la balanza electrónica de precisión cada uno de los reactivos indicados con ayuda de las diferentes espátulas (para no cantaminar los frascos) y se colocan en las distintas charolas de pesado, las cuales se colocan por separado dentro de las cajas Petri (para evitar que se hidraten mientras se elabora el medio), indicando la fórmula del reactivo con plumón.

El ácido cítrico se disuelve en 500 mL de agua destilada en la parrilla de agitación con ayuda de un agitador magnético colocado en la base del vaso. Para la solución de citrato de sodio, éste se diluye en 500 mL de agua destilada.

Preparar 50 mL de solución amortiguadora de citratos pH 6 con aproximadamente 8.5 mL de la solución concentrada de ácido cítrico 0.1 M y 41.5 mL de la solución concentrada de citrato de sodio 0.1 M. Medir el pH de la solución final y ajustarlo a pH 6 con los mismos componentes; si es mayor a 6, agregar ácido cítrico con una pipeta Pasteur; si es menor, agregar citrato con otra pipeta diferente. Para preparar la solución de trabajo diluir 10 veces (agregar a esta solución 450 mL de agua destilada) y comprobar que continúe a pH 6 sino, ajustarlo de la misma manera. Esta solución amortiguadora se guarda en un frasco de vidrio y se etiqueta. La solución de trabajo residual debe desecharse en la tarja ya que no se puede reutilizar.

<u>Autor:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 1.3</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 95- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Solución amortiguadora de citratos para solubilizar Phytigel®.</b>	Preparación de muestras.

Solubilización del gel.

Se ocupan tres volúmenes de buffer para licuar uno de Phytigel®. Por ejemplo: para aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> de Phytigel® se utilizan 3 cm<sup>3</sup> (≈ 3 mL) de buffer citratos pH 6. Colocar la muestra problema en un vaso de precipitados de 100 mL y calentar el Phytigel® con el buffer a baño María a 30 °C o en la parrilla de calentamiento utilizando un termómetro para prevenir que la temperatura no varíe utilizando un agitador magnético a velocidad media, esto será de 15 a 45 minutos (dependiendo del volumen de muestra a solubilizar). Posteriormente, se puede terminar de deshacer el agar presionándolo suavemente (para no afectar el micelio y las esporas) con un gendarme hasta observarlo disuelto.

Si el Phytigel® no termina de disolverse, se puede introducir al microondas por 5 s y posteriormente volver a presionar con el gendarme. Se puede pasar este agar disuelto con la solución de citratos por un tamiz de 0.5 mm de apertura para separar los restos de agar y recuperar la muestra con ayuda de una piceta con agua destilada para enjuagar los residuos de la solución. Otra forma de disolver la matriz es pasando la mezcla (Phytigel® - solución amortiguadora) en la batidora de licuados por 5 s en caso de necesitar romper el micelio externo y las raíces para su cuantificación.

## Referencias

DONER, L. W., G. BÉCARD.1991. Solubilization of gellan gels by chelation of cations. *Biotechnology Techniques* 5: 25-28.

[http://www.ihcworld.com/\\_protocols/epitope\\_retrieval/citrate\\_buffer.htm](http://www.ihcworld.com/_protocols/epitope_retrieval/citrate_buffer.htm); (27 de agosto del 2008).

<u>Autor:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 1.3</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 96- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Solución amortiguadora de citratos para solubilizar Phytigel®.</b>	Preparación de muestras.

## Cálculos

### 1) Fórmula

Mediante esta fórmula se puede obtener el peso necesario para elaborar una solución a una molaridad requerida.

$$\times = \text{Peso requerido} \quad \times = \frac{(\text{Molaridad requerida})(\text{PM})}{1 \text{ M}}$$

PM= peso molecular

### 2) Fórmula B

Mediante esta fórmula se puede obtener el peso necesario para elaborar una solución a una molaridad en un volumen requerido.

$$\times = \text{Peso requerido} \quad \times = \frac{(\text{Peso conocido})(\text{Volumen requerido})}{1 \text{ L}}$$

### 3. Soluciones stock de ácido cítrico y citrato de sodio.

Para preparar 500 mL de ácido cítrico 0.1 M

- A)  $(0.1\text{M})(210.14 \text{ g/mol})/1 \text{ M} = 21.014 \text{ g}$   
 B)  $(21.014 \text{ g}) (500 \text{ mL}) / 1000 \text{ mL} = 10.5 \text{ g}$

Para preparar 500 mL de Citrato de sodio 0.1 M

- A)  $(294.1\text{g}) (0.1 \text{ M}) / 1 \text{ M} = 29.41 \text{ g}$   
 B)  $(21.014 \text{ g}) (500 \text{ mL}) / 1000 \text{ mL} = 10.5 \text{ g}$

## Observaciones

## Notas

<u>Autor:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 1.4</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 97- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Elaboración de cortes transversales de ápices de ectomicorrizas para observación microscópica.</b>	Preparación de muestras.

## Propósito

Observación microscópica de ápices de ectomicorrizas para la identificación de estructuras anatómicas.

## Principio

La identificación microscópica de caracteres anatómicos que permitan determinar y caracterizar una asociación ectomicorrízica requiere de cortes finos elaborados de manera rápida e inmediata por lo que los cortes manuales requieren de una implementación que garantice finura y adecuada orientación del corte. La segmentación de raíces de forma manual es ideal para usarse en procedimientos histológicos en los cuales se necesitan observar estructuras microscópicas para su identificación. Este método evita los cambios estructurales causados por la fijación en alcoholes, u otros procedimientos de inmersión en parafina o resinas plásticas y permite tratar los cortes para procedimientos de tinción convencional o para fluorescencia (Brundrett *et al.*, 1996).

## Técnicas relacionadas

- Tinción de hongos micorrízicos con Calcofluorina y ANS (ácido 8-anilino-naftalensulfónico).
- Prueba de viabilidad de hongos micorrízicos con FDA (diacetato de fluoresceína).
- Manejo del módulo de fluorescencia del microscopio OLYMPUS BX51.

## Equipo y material

- Microscopio estereoscópico.
- 1 Bisturí número 3.
- 1 Pinza fina número 5.

<u>Autor:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 1.4</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 98- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Elaboración de cortes transversales de ápices de ectomicorrizas para observación microscópica.</b>	Preparación de muestras.

- 1 navaja de doble filo para rasurar.
- 1 caja de Petri de vidrio de 8.5 cm de diámetro.
- 1 piceta de 1000 mL con agua destilada.
- 1 pincel de cerda suave lo más fino posible (ej: pincel de pelo de marta Winsor and Newton® no. 000).
- 1 cubo de unicel de aproximadamente 125 cm<sup>3</sup>.
- Pastilleros desechables limpios o placas de 96 pozos.

### Reactivos y soluciones

Clave	Reactivo	mL
	Agua destilada	500

### Muestra

Ápices de ectomicorriza recientemente recolectados (turgentes) y conservados en frío a 4 °C.

### Procedimiento

Con ayuda de las pinzas y el bisturí, cortar varios ápices de ectomicorrizas bajo el microscopio de disección y depositarlos en una caja Petri con agua fría. Seleccionar un ápice, sumergirlo en agua y limpiarlo con ayuda del pincel de forma cuidadosa bajo el microscopio estereoscópico, verificando que no queden restos de materia orgánica adheridos a la superficie. Tomar el cubo de unicel y hacer una pequeña incisión en una cara para introducir el ápice acomodándolo de forma perpendicular a la superficie del unicel, presionarlo con los dedos para inmovilizar el ápice; realizar los cortes haciendo rebanadas lo más delgadas posible con la navaja de doble filo (Fig. 1). Tomar los cortes con las pinzas finas y depositarlos en un pastillero con agua.

<u>Autor:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 1.4</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 99- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Elaboración de cortes transversales de ápices de ectomicorrizas para observación microscópica.</b>	Preparación de muestras.

Confirmar bajo el microscopio estereoscópico que el corte sea lo suficientemente delgado para poder elaborar una preparación semipermanente (Fig. 2) y muestre una sección transversal de la raíz (Fig. 3).

Si se desea realizar una secuencia de cortes desde el extremo apical hasta el basal, se pueden colocar en pastilleros enumerándolos para mantener el orden de los cortes.

## Referencias

BRUNDRETT, M., BOUGHER, N., DELL, B, T., N. MALAJCZUK. 1996. *Working with mycorrhizas in forestry and agriculture*. ACIAR, Canberra, AUS. 374 p.

## Anexos

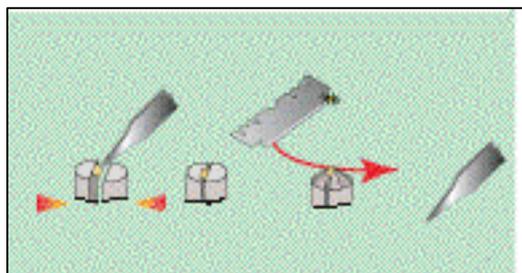


Figura 1. Diagrama del corte transversal de ápice. Modificado de Brundrett *et al.*, 1996.

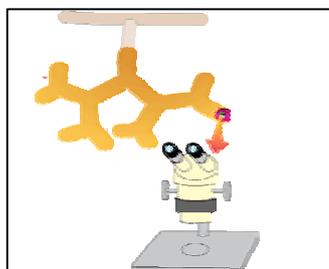


Figura 2. Esquema de la verificación de la sección transversal de un ápice de ectomicorriza. Modificado de Brundrett *et al.*, 1996.

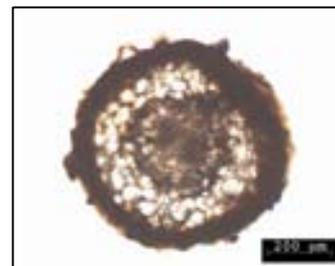


Figura 3. Sección transversal de un ápice de ectomicorriza.

<u>Autor:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 1.4</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 100- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Elaboración de cortes transversales de ápices de ectomicorrizas para observación microscópica.</b>	Preparación de muestras.

## Observaciones

- Si no se procesan de inmediato y no se requiere realizar una tinción de vitalidad, se pueden almacenar con agua dentro del pastillero o en tubos Eppendorf de 1 mL en refrigeración, en alcohol en un frasco o en el refrigerador.
- Manejar el corte de ápice con mucho cuidado pues es muy pequeño y puede adherirse fácilmente a las pinzas y perderse.

## Nota

<u>Autor:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 1.5</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 101- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Medios de cultivo: Medio basico de avena (MBA)</b>	Preparación de muestras.

### Propósito

Germinación y cultivo simbiótico de semillas de orquídeas para la obtención de protocormos o plántulas micorrizadas.

### Principio

Utilizar las enzimas de los hongos micorrízicos orquideoides para degradar celulosa o almidón contenidos en sustratos elementales o básicos o medianamente complejos como la avena para permitir el crecimiento del hongo y la traslocación de carbono en azúcares simples al embrión de la orquídea hasta su germinación y desarrollo en caso de compatibilidad.

Este medio es utilizado en la germinación simbiótica de semillas de orquídeas ya que está formulado especialmente para proveer carbohidratos básicos para el desarrollo del embrión de la semilla y el crecimiento del hongo. El hongo le brinda una fuente inicial de nutrimentos a la semilla para la germinación, por lo cual debe estar compuesto por sustancias que provean la nutrición balanceada al hongo. Este balance de nutrimentos en el medio resulta igualmente importante para el desarrollo adecuado de protocormo a plántula (Stewart *et al.*, 2004).

### Técnicas relacionadas

- Medición de pH con potenciómetro.
- Uso de autoclave.
- Soluciones para titular.

### Equipo y material

- Balanza electrónica de precisión.
- Potenciómetro calibrado en el intervalo de pH 0-7.
- Parrilla de calentamiento con agitación magnética.

<u>Autor:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 1.5</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 102- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Medios de cultivo: Medio basico de avena (MBA)</b>	Preparación de muestras.

- Autoclave 65 L de capacidad.
- Campana de flujo laminar (horizontal).
- 3 Charolas cuadradas de poliestireno de 5 x 5 cm especiales para pesar.
- 3 Espátulas de acero inoxidable de aproximadamente 4 cm de diámetro.
- Toallas de papel absorbente.
- 1 Vaso de precipitados de 2 L.
- 1 Probeta de 1 L.
- Agitador magnético mediano.
- Solución de KOH 1 N.
- Solución de HCl 1 N.
- 2 matraces Erlenmeyer de 1 L.
- 2 ó 5 cuadros de papel aluminio de 15 × 15 cm de tres capas\*
- 40 Cajas de Petri desechables estériles (aproximadamente).
- Aspensor de 250 mL lleno de alcohol al 96°-
- Mechero Bunsen.
- Protector de manos de silicón.
- Cinta masking tape
- Plumón negro indeleble

## Reactivos

Clave	Reactivo	g L <sup>-1</sup>
MCCR016	Avena en polvo	3.5
MCCR033	Extracto de levadura	0.1

102

<u>Autor:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 1.5</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 103- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Medios de cultivo: Medio basico de avena (MBA)</b>	Preparación de muestras.

MCCR009	Agar bacteriológico	6.0
-----	Agua destilada	Aprox.

Solución de HCl 0.1 N y NaOH 0.1 N (ver PRESOP soluciones para titular).

## Muestra

No aplica

## Procedimiento

Se pesan por separado en la balanza electrónica de precisión cada uno de los reactivos indicados con ayuda de las diferentes espátulas (para no cantaminar los frascos) y se colocan en las distintas charolas de pesado, las cuales se colocan por separado dentro de las cajas Petri (para evitar que se hidraten mientras se elabora el medio), indicando la fórmula del reactivo con plumón.

Se vierten 900 mL de agua destilada en el vaso de precipitado, se inserta un agitador magnético y se coloca en la parrilla a velocidad media, se agrega la avena y el extracto de levadura, una vez disueltos (mezcla homogénea) se mide el pH en agitación y ajusta de 6 a 5.5 (agregando unas gotas de la solución de KOH 1N para subirlo ó HCl 1 N para bajarlo según sea necesario) agregar el agar y aforar a un litro en la probeta. Se vierte el líquido en el vaso nuevamente, se calienta en agitación constante hasta que hierva y se observe un cambio de color de blanco opaco a translúcido.

Una vez cocido el medio se vacían 500 mL en cada uno de los matraces Erlenmeyer de 1 L (para evitar que se derrame dentro de la autoclave). Se tapan con el papel aluminio cuidando

103

<u>Autor:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 1.5</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 104- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Medios de cultivo: Medio basico de avena (MBA)</b>	Preparación de muestras.

que los bordes se tallen sobre el labio del matraz con los dedos para que se pliegue correctamente el papel a la boca exterior y dejando el centro cóncavo. Se ajustan con al menos tres vueltas de una liga y se esteriliza en autoclave a 121 °C ó 15 lb durante 15 minutos exactos.

Una vez finalizada la esterilización se espera a que el autoclave haya bajado la presión y se sacan los matraces con ayuda de los protectores de silicón y se deja enfriar el medio a temperatura ambiente hasta los 60 °C (aproximadamente). Dentro de la campana de flujo con el mechero prendido, se introducen los matraces previamente limpiados con alcohol etílico 96 °, se quita con pinzas flameadas el papel aluminio que los cubre y se flamea la boca de los matraces previamente a verter 25 mL (aproximadamente) de medio a cada una de las cajas Petri que serán dispuestas en líneas frente al flujo con la tapa a la mitad de la apertura de la caja para favorecer la evaporación y evitar la formación de vapor en la tapa que traerá problemas de contaminación posteriores. El vaciado de las cajas siempre es primero el de las que se sitúan frente al flujo y posteriormente las que quedan en segunda fila. Se deja solidificar el medio dentro de la campana de flujo.

Una vez solidificado el medio las cajas de Petri se reúnen en grupos de 10 y se vuelven a colocar dentro de las bolsas donde venían empacadas (siempre que estas sigan estériles) y la bolsa se sella con cinta masking, se anota con plumón la clave de la persona que lo preparó, la fecha de elaboración y el nombre del medio.

### **Cálculos**

No aplica

### **Referencias**

STEWART, S. 2004. Symbiotic Techniques in Orchid Seed Germination. Environmental Horticulture Department. EUA. 30 pp.

### **Anexos**

No aplica

<u>Autor:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 1.5</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 105- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Medios de cultivo: Medio basico de avena (MBA)</b>	Preparación de muestras.

### Observaciones

El molido de la avena debe ser lo más fino posible y tamizado con un colador casero.

La avena no logra disolverse en su totalidad en este medio y quedan partículas suspendidas de la misma por lo que para obtener cajas de Petri con un vaciado homogéneo de la avena, es recomendable agitar ligeramente el medio entre cada vaciado. Esto es importante porque cajas con mayor o menor contenido de sustrato pueden llevar a un mayor o menor crecimiento de los hongos y diferencias en tre las réplicas.

### Notas

El medio básico de avena (MBA) es el más utilizado para la germinación simbiótica de orquídeas, es recomendable para realizar las primeras pruebas en especies particulares de orquídeas y aislados de hongos.

<u>Autor:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 1.6</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 106- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Siembra simbiótica de semillas de orquídeas.</b>	Preparación de muestras.

## Propósito

Obtención de plántulas simbióticas de orquídeas.

## Principio

Las semillas de las orquídeas contienen un embrión indiferenciado. Este embrión no presenta cotiledones y no tiene reservas alimenticias (carece de endospermo). Los embriones indiferenciados de las orquídeas requieren para germinar de un aporte exógeno de carbono que puede en algunos casos suplirse mediante la adición de azúcares y en otros casos sólomente con un hongo micorrízico que sea capaz de obtener el carbono de un sustrato complejo adicionado en el medio de cultivo que el embrión en sí mismo no es capaz de adquirir (Rasmussen 1995).

La presencia de la asociación micorrízica es vital para la germinación y el establecimiento de las plántulas de orquídeas en condiciones naturales, especialmente para las especies terrestres (Rasmussen, 1995; Zettler, 1997).

## Técnicas relacionadas

- Estandarización de pesado de semillas para un rango dado.
- Elaboración de medio de cultivo Medio basico de avena (MBA).
- Uso de la campana de flujo laminar (horizontal).

<u>Autor:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 1.6</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 107- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Siembra simbiótica de semillas de orquídeas.</b>	Preparación de muestras.

## Equipo y material

- Balanza analítica.
- Parrilla de agitación magnética.
- Campana de flujo laminar.
- Papel filtro Watman N° 1\*.
- Tijeras para papel.
- 1 microespátula.
- Engrapadora con grapas del no. 10.
- 1 Probeta de 100 mL.
- 2 vasos de precipitados de 500 mL.
- Agitador magnético.
- Tijeras finas para flamear.
- Cajas Petri con medio MBA.
- Sacabocados de 0.7 cm de diámetro.
- Vidrio de reloj estéril de 15 cm de diámetro.
- 2 Pinzas largas (20 cm de largo) de punta roma y con dientes.
- Plumón negro indelebe.
- Plástico adherente Egapack®.
- 1 frasco Gerber® con algodón conteniendo alcohol etílico 96° con tapa.
- Mechero Bunsen.

\* un círculo de 125 mm de diámetro de papel Whatman 1 para dos sobres.

<u>Autor:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 1.6</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 108- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Siembra simbiótica de semillas de orquídeas.</b>	Preparación de muestras.

## Reactivos

Clave	Reactivo	mL
MCCR0103	Alcohol etílico	50 aprox.
	Cloro comercial (6%)	30
	Agua destilada estéril	500 mL aprox.**

\*\* en uno o varios recipientes

## Muestra

- Semillas de orquídeas previamente almacenadas en un desecador a temperatura 8 °C y humedad relativa 24% controladas.
- Aislados de hongos micorrízicos orquídeoides creciendo en caja en medio PDA.

## Procedimiento

Desinfestación de semillas.

Se elabora un sobre con el papel filtro para lo cual se debe cortar un rectángulo de aproximadamente 8 × 4.5 cm, el cual se dobla a la mitad tanto a lo largo como a lo ancho.

108

<u>Autor:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 1.6</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 109- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Siembra simbiótica de semillas de orquídeas.</b>	Preparación de muestras.

Después se vuelve a doblar en tres partes a lo largo y ancho como se muestra en la figura 1A del anexo.

Se pesa en la balanza analítica (previo tarado del papel filtro) un peso previamente estandarizado para obtener un rango similar de semillas ) con ayuda de la microespátula, teniendo mucho cuidado en prevenir que éstas se vuelen, derramen o queden adheridas en gran proporción a la espátula y se colocan en el centro del sobre. Se dobla el papel a lo largo como se ve en la figura 1B, después se doblan las pestañas que sobran sobre el centro (Fig. 1C) y se coloca una grapa en cada extremo (Fig. 1D) cuidando que ésta no quede sobre las semillas.

En el vaso de precipitados se prepara una solución de hipoclorito de sodio al 15 %, agregando 30 mL de hipoclorito a 170 mL de agua destilada, en esta solución se colocarán los sobres con las semillas durante 15 min en agitación constante. Dentro de la campana de flujo laminar se realizan tres enjuagues con agua destilada estéril, con intervalos de 5 min entre cada enjuague. Se desecha el agua utilizada entre cada enjuague; los sobres se pueden colocar en un vidrio de reloj estéril o dejarse en el fondo del vaso y sacarse con ayuda de unas pinzas largas.

Siembra simbiótica.

La campana debe prepararse previo al procedimiento limpiándola con alcohol, se pone el material estéril dentro y al mismo tiempo prever ya tener instaladas las cajas Petri con medio rociadas con alcohol para la siembra. Las cajas con medio MBA se inoculan con los aislados para lo cual se debe sacar previo a la inoculación un círculo con el sacabocados (el cual debe flamearse a rojo vivo y dejarse enfriar) en la parte central de la caja. Se cierra la caja y se procede a extraer un círculo del mismo tamaño de la caja que contenga el aislado de interés; a continuación se coloca en la caja con MBA la pastilla con el inóculo en el agujero con ayuda de pinzas previamente flameadas y enfriadas, ajustando bien los bordes para evitar desecación de la pastilla y en consecuencia que no recrezcan las hifas hacia el nuevo medio. Por otro lado,

109

<u>Autor:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 1.6</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 110- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Siembra simbiótica de semillas de orquídeas.</b>	Preparación de muestras.

se cortan los extremos del sobre que contiene a las semillas por la parte donde están las grapas con ayuda de tijeras previamente flameadas; se desenvuelven con cuidado los bordes de papel con la ayuda de dos pinzas flameadas hasta tener únicamente la sección donde están las semillas y éstas se colocan en el medio MBA previamente inoculado hacia los bordes de las cajas rodeando el círculo con el inóculo de manera que el crecimiento radial del hongo llegue hasta donde serán colocadas las semillas y las colonice de manera equitativa. Cada caja se sella con plástico adherible Egapack® y se incuban a  $25 \pm 2$  °C en oscuridad o luz según los requerimientos de la especie a propagar, se revisa periódicamente para cuantificar la germinación.

## Cálculos

No aplica

## Referencias

- ARDITTI J, GHANI A. K. 2000. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. Tansley Review No. 110. *New Phytol.* **145**: 367-421.
- CRIBB P J, KELL S P, DIXON K W, BARRETT R L. 2003. Orchid conservation: a global perspective. In: Dixon K W, Kell S P, Barrett R L, Cribb P J. *Orchid conservation*. Natural History publications. Malaysia. pp 1-24.
- RASMUSSEN H. 1995. *Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press. Cambridge, G. B. 444 p.
- ZETTLER L W. 1997. Terrestrial orchid conservation by symbiotic seed germination: Techniques and perspectives. *Selbyana* **18**(2): 188-194.

<u>Autor:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 1.6</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 111- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Siembra simbiótica de semillas de orquídeas.</b>	Preparación de muestras.

### Anexo

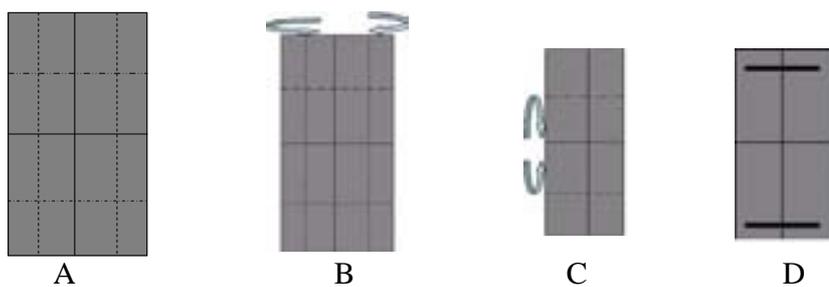


Figura 1. Elaboración del sobre para desinfestación de semillas.

### Observaciones

### Notas

<u>Autor:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 2.1</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 112- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Tinción de hongos micorrízicos con Calcofluorina M2R (CFW).</b>	Tinciones.

## Propósito

Observar mediante microscopía de fluorescencia determinadas estructuras de un organismo después de haber añadido CFW y determinar su estado de acuerdo a la actividad de la quitina sintetasa.

## Principio

La CFW es un fluorocromo con afinidad a las moléculas B-1,4-glucanos como la celulosa o la quitina contenidas en las paredes celulares de vegetales tanto como en esporas, hifas, vesículas o cuerpos fructíferos de los hongos (Von-Sengbusch *et al.*, 1983). En hongos, esta tinción permite analizar los patrones de crecimiento de las hifas que pueden ser fácilmente observadas bajo luz UV (360-380 nm) (Reed *et al.*, 1997). Aún cuando la CFW ha sido empleada para observar tejidos jóvenes, no puede ser utilizada como un marcador de viabilidad a largo plazo porque interfiere con la síntesis de quitina (Bartnicki-García *et al.*, 1994).

## Técnicas relacionadas

- Elaboración de cortes transversales de ápices de ectomicorrizas para observación microscópica.
- Uso de balanza analítica digital.
- Medición del pH con potenciómetro.
- Soluciones para titular.
- Solución amortiguadora de citratos para solubilizar Phytigel®.
- Micelio externo de hongos micorrízicos fijado en membranas por técnica de filtrado.
- Cortes transversales de raíces colonizadas por MA u hongos orquideoides.
- Cortes transversales de protocormo de orquídea micorrizado.
- Manejo del módulo de fluorescencia del microscopio OLYMPUS BX51.

## Equipo y material

- Balanza analítica digital.
- Incubadora a  $24 \pm 2$  °C.
- Parrilla de agitación magnética.

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 2.1</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 113- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Tinción de hongos micorrízicos con Calcofluorina M2R (CFW).</b>	Tinciones.

- Microscopio de fluorescencia equipado con filtro de luz UV.
- Campana de extracción con cubierta de resina fenólica resistente a solventes orgánicos, ácidos y bases al 10 % de concentración.
- Dispositivo de vacío individual Millipore® XX102503 de 15 mL (matraz Kitasato de 500 mL, manguera para vacío de 0.9 cm de diámetro interior, tapón de plástico con una perforación).
- Bomba de vacío (Máximo de vacío 0.0001 mm Hg, con un motor de ¾ HP).
- Potenciómetro calibrado en el intervalo de pH 0-10.
- Agitador vortex.
- 2 charolas cuadradas de poliestireno de 5 x 5 cm especiales para pesar.
- 1 espátula de plástico designada para pesar el CFW.
- 1 espátulas de acero inoxidable para micro nutrientes (4 cm x 2 cm aprox. por 14 cm de largo total).
- 1 vaso de precipitados de 100 mL.
- 1 vaso de precipitados de 50 mL.
- 1 probeta de 50 mL.
- 1 frasco de vidrio ámbar de 20 mL.
- 1 frasco de vidrio de 100 mL.
- Micropipeta de 10-100 µL.
- Micropipeta de 100 - 1000 µL con 2 puntas.
- Micropipeta de 1 - 5 mL con 1 punta.
- 1 microtubo (tipo Eppendorff) de 1.5 mL.
- 1 caja de Petri de vidrio de 8.5 cm de diámetro forrada con papel aluminio.
- 1 pipeta Pasteur larga con bulbo.
- 2 agitadores magnéticos chicos.
- Portaobjetos y cubreobjetos\*.
- 1 par de guantes de nitrilo.
- pastillero desechable.
- 1 plumón negro indeleble.
- 2 etiquetas para almacenaje de reactivos.
- Bata.
- 1 cubrebocas desechable para protección respiratoria filtro blanco.
- Recipiente de plástico para canalizar desechos\*\*.

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 2.1</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 114- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Tinción de hongos micorrízicos con Calcofluorina M2R (CFW).</b>	Tinciones.

\*Cantidad y tamaños de acuerdo al número de muestras que se trabajarán.

\*\*ver sección de notas.

## Reactivos

Clave	Reactivo	PM (g/mol)	mg a utilizar
MCCR0081	Trizma base	121.12	302.85
MCCR0151	CFW	916.98	50
MCCR0047	Glicerol	92.00	-----
	Agua destilada		600 mL aprox.

Solución de HCl 0.1 N y NaOH 0.1 N(ver PRESOP soluciones para titular).

## Muestra

Cualquiera organismos que contenga en sus paredes celulosa o quitina.

Micelio externo de hongos micorrízicos fijado en membranas por técnica de filtrado.

Corte transversal de ápices de ectomicorizas.

Cortes transversales de raíces colonizadas por MA u hongos orquídeoides.

Cortes transversales de protocormo de orquídea micorrizado.

## Procedimiento

Se utiliza bata, guantes y cubrebocas para realizar todo el procedimiento de preparación de muestras y tinción.

Soluciones amortiguadoras (buffer) y concentradas (Stock).

Se pesan por separado en la balanza analítica cada uno de los reactivos indicados en la columna derecha del cuadro de reactivos. Con ayuda de diferentes espátulas (para no contaminar los frascos) se colocan cada uno en las distintas charolas de pesado\*\*\*. Después

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 2.1</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 115- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Tinción de hongos micorrízicos con Calcofluorina M2R (CFW).</b>	Tinciones.

de pesar las charolas se colocan por separado cada una en cajas de Petri (para evitar que se hidraten mientras se elaboran las soluciones) indicando la fórmula del reactivo con plumón.

Es necesario preparar dos soluciones, la primera una solución amortiguadora (buffer) de Tris 50 mM a un pH 8.9 - 9.0 y la segunda una solución concentrada (stock) de calcofluorina (CFW) 10 mg/mL. Para la primera, en un vaso de precipitados de 100 mL se vierten 25 mL de agua destilada, se agregan los 302.85 mg de base Trizma, se coloca un agitador magnético y el vaso en la parrilla de agitación a velocidad media. Una vez disuelta se afora a 50 mL en la probeta con agua destilada y se regresa a agitación para ajustar el pH con una solución de HCl 0.1 N para bajarlo o NaOH 0.1 N para subirlo. Finalmente se le coloca una etiqueta para almacenaje de reactivos con los datos: tipo de solución, fecha de elaboración, persona que la elaboró y la caducidad del mismo y se almacena en el refrigerador (4 °C) en un frasco tapado.

El stock de CFW se prepara dentro de la campana de extracción, se agregan 5 mL de solución amortiguadora (buffer) TRIS pH 8.9 - 9.0 medidos con la micropipeta de 1 a 5 mL en el vaso de precipitados de 2 mL y se añaden 50 mg de CFW, se introduce un agitador magnético antes de colocarlo en la parrilla que se regulará a velocidad media. Al obtener la mezcla homogénea se almacena en un frasco ámbar de 20 mL, se le coloca una etiqueta para almacenaje de reactivos y se guarda en el congelador (- 21°C).

Tinción de muestras.

La solución de trabajo consiste en disolver 10 µL de solución stock de CFW en 990 µL de buffer Tris pH 8.9 en un microtubo de 1.5 mL. Esta solución se mezcla en el agitador vórtex, se toma una alícuota de 200 µL y se agrega a la muestra en el dispositivo de vacío si se utilizan membranas o a los cortes en el interior de un pastillero. Se deja incubar 30 min a 24 °C en obscuridad (las membranas dentro del dispositivo y los cortes en el pastillero dentro de una caja de Petri forrada de papel aluminio). Se enjuagan las muestras de 3 - 5 veces con buffer Tris pH 8.9 para eliminar el exceso de colorante, ya sea en el mismo dispositivo de vacío o los cortes dentro del pastillero (que pueden ser transferidas tres veces a otros pastilleros que contengan buffer con la ayuda de pinzas), con una pipeta Pasteur. La muestra teñida se monta en un portaobjetos, se agrega una gota o dos de glicerol y se coloca encima un cubreobjetos. Se observa bajo el microscopio de fluorescencia con el filtro de luz UV.

Dirigir los residuos en un contenedor de plástico cerrado dentro de la campana de extracción debidamente etiquetado.

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 2.1</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 116- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Tinción de hongos micorrízicos con Calcofluorina M2R (CFW).</b>	Tinciones.

\*\*\*la espátula de plástico y la charola que se utilizaron para pesar el CFW, así como los vasos de precipitados y el agitador magnetico que tuvieron contacto con el CFW, se lavan con agua sobre un recipiente para concentrar los residuos del lavado y colocar estos en el contenedor indicado. El material se almacenara en un recipiente para ser usado sólo para estos fines.

## Cálculos

### 1) Fórmula A

Mediante esta fórmula se puede obtener el peso necesario para elaborar una solución a una molaridad requerida.

$$\times = \text{Peso requerido} \quad \times = \frac{(\text{Molaridad requerida})(\text{PM})}{1 \text{ M}}$$

PM= peso molecular

### 1) Fórmula B

Mediante esta fórmula se puede obtener el peso necesario para elaborar una solución a una molaridad y en un volumen requerido.

$$\times = \text{Peso requerido} \quad \times = \frac{(\text{Peso conocido})(\text{Volumen requerido})}{1 \text{ L}}$$

### 3) Solucion Trizma base 50mM

$$\times = \frac{(50\text{mM})(121.12 \text{ g})}{1 \text{ 000 mM}} = 6.056 \text{ g} \quad \times = \frac{(6.056 \text{ g})(50\text{mL})}{1 \text{ 000 mL}} = 0.3028 \text{ g}$$

## Referencias

BARTNICKI-GARCÍA, S., PERSSON, L., H. CHANZY. 1994. An electron microscope and electron diffraction study of the effect of calcofluor and congo red on the biosynthesis of chitin in vitro. *Archives Biochemistry Biophysics* 310: 6-15.

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 2.1</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 117- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Tinción de hongos micorrízicos con Calcofluorina M2R (CFW).</b>	Tinciones.

REED, J., EDWARDS, D., C. GONZÁLES. 1997. Synthetic peptide combinatorial libraries. A method for the identification of bioactive peptides against phytopathogenic fungi. *Molecular Plant-Microbe Interact* 5: 537-549.

VON-SENGBUSCH, P., HECHLER, J., U. MÜLLER. 1983. Molecular architecture of fungal cell walls. An approach by use of fluorescence markers. *European Journal of Cell Biology* 30: 305-312.

### Observaciones

- La fluorescencia con calcofluorina será estable durante 24 horas aproximadamente posteriores a la tinción si la preparación se conserva en obscuridad.
- El colorante tiene tiempo de resiliencia de 24 h, no se decolora con la exposición constante, pero la intensidad de fluorescencia está relacionada con la viabilidad de la estructura, por lo que las estructuras jóvenes tendrán mayor intensidad que las viejas por la degradación de los componentes de la pared celular; sin embargo no puede considerarse como prueba de viabilidad.

### Notas

Es imprescindible el uso de bata debido a que la CFW es un colorante altamente tóxico por lo que deben ser etiquetadas las soluciones con esta advertencia, tener el contenedor de desechos en un lugar a resguardo y lavar con agua destilada dentro de un recipiente sólo destinado a este fin y marcado, los materiales utilizados en la elaboración del mismo antes de ponerlos a lavar en la tarja.

Una vez terminada la observación de la muestra, la platina del microscopio se limpia con un trozo de papel absorbente que se almacena en un contenedor para residuos.

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 2.2</b>
	Departamento de edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 118- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Tinción de hongos micorrízicos con Calcofluorina (CFW) y ANS (ácido 8-anilino-naftalensulfónico)</b>	Tinciones.

## Propósito

Observar mediante microscopía de fluorescencia determinadas estructuras de un organismo después de haber añadido CFW y ANS. La combinación de estos colorantes permite observar estas estructuras con mayor brillo y contraste, aún aquellas en proceso de senescencia.

## Principio

La CFW es un fluorocromo con afinidad a las moléculas B-1,4-glucanos como la celulosa o la quitina contenidas en la pared celulares de esporas, hifas, vesículas o cuerpos fructíferos de los hongos (Von-Sengbusch *et al.*, 1983). En hongos, esta tinción permite analizar el crecimiento de las hifas que pueden ser fácilmente observadas bajo luz UV (360-380 nm) (Reed *et al.*, 1997). Aún cuando la CFW ha sido empleada para observar tejidos jóvenes, no puede ser utilizada como un marcador de viabilidad a largo plazo porque interfiere con la síntesis de quitina (Bartnicki-García *et al.*, 1994).

Mayfield (1975) utilizó Mg-ANS para teñir bacterias y hongos en agregados de suelo y logró que se presentara tal brillo en las estructuras que eliminara el ruido causado por la oscuridad de las partículas del suelo. La combinación de CFW y ANS tiñe hifas de hongos y material vegetal permitiendo una mejor visibilidad a pesar del contraste del fondo oscuro del suelo y de matrices transparentes (Morgan *et al.*, 1991).

## Técnicas relacionadas

- Elaboración de cortes transversales de ápices de ectomicorrizas para observación microscópica.
- Uso de balanza analítica digital.
- Medición del pH con potenciómetro.
- Soluciones para titular.
- Solución amortiguadora de citratos para solubilizar Phytigel®.
- Micelio externo de hongos micorrízicos fijado en membranas por técnica de filtrado.
- Cortes transversales de raíces colonizadas por MA u hongos orquideoides.
- Cortes transversales de protocormo de orquídea micorrizado.

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 2.2</b>
	Departamento de edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 119- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Tinción de hongos micorrízicos con Calcofluorina (CFW) y ANS (ácido 8-anilino-naftalensulfónico)</b>	Tinciones.

- Manejo del módulo de fluorescencia del microscopio OLYMPUS BX51.

## Equipo y material

- Balanza analítica digital.
- Incubadora a  $24 \pm 2$  °C.
- Agitador vortex.
- Parrilla de agitación magnética.
- Microscopio de fluorescencia equipado con filtro de luz UV.
- Campana de extracción con cubierta de resina fenólica resistente a solventes orgánicos, ácidos y bases al 10 % de concentración.
- Dispositivo de vacío individual Millipore® XX102503 de 15 mL (matraz Kitasato de 500 mL, manguera para vacío de 0.9 cm de diámetro interior, tapón de plástico con una perforación)
- Bomba de vacío (Máximo de vacío 0.0001 mm Hg, con un motor de ¾ HP).
- Potenciómetro calibrado en el intervalo de pH 0-10.
- 4 charolas cuadradas de poliestireno de 5 x 5 cm especiales para pesar.
- 2 Espátulas de acero inoxidable para micronutrientes (4 cm × 2 cm por 14 cm de largo total).
- 2 espátulas de plástico designadas para pesar el CFW y ANS.
- 2 vasos de precipitados de 100 mL.
- 1 vaso de precipitados de 50 mL.
- 1 vaso de precipitados de 150 mL.
- 1 probeta 50 mL.
- 1 probeta 100 mL.
- Micropipeta de 1 - 5 mL con 2 puntas.
- Micropipeta de 100 - 1000 µL con 1 puntas.
- 1 frasco de vidrio ámbar de 20 mL.
- 2 frascos de vidrio de 100 mL.
- 1 caja de Petri de vidrio de 8.5 cm de diámetro forrada de con papel aluminio.
- 1 pipeta Pasteur larga con bulbo.
- 3 microtubos (tipo Eppendorff) de 2 mL.
- Portaobjetos y cubreobjetos\*.

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 2.2</b>
	Departamento de edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 120- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Tinción de hongos micorrízicos con Calcofluorina (CFW) y ANS (ácido 8-anilino-naftalensulfónico)</b>	Tinciones.

- Hojas de papel aluminio de 20 x 20 cm.
- 1 par de guantes de nitrilo.
- pastillero desechable.
- 1 plumón negro indeleble.
- 4 etiquetas para almacenaje de reactivos.
- Bata.
- 1 cubrebocas desechable para protección respiratoria filtro blanco.
- Recipiente de plástico para canalizar desechos\*\*.

\*Cantidad y tamaños de acuerdo al número de muestras que se trabajarán.

\*\*ver sección de notas.

## Reactivos

Clave	Reactivo	PM (g/mol)	mg a utilizar
MCCR0081	Trizma base	121.12	302.85
MCCR0151	CFW	916.98	50
MCCR0155	ANS	299.35	50
MCCR0052	Hidroxido de sodio	40	4
MCCR0047	Glicerol	92	
	Agua destilada		600 mL aprox

Solución de HCl 0.1 N y NaOH 0.1 N (ver PRESOP soluciones para titular).

## Muestra

- Cualquiera organismos que contenga en sus paredes celulosa o quitina:
- Micelio externo de hongos micorrízicos fijado en membranas por técnica de filtrado. Corte transversal de ápices de ectomicorrizas.
- Cortes transversales de raíces colonizadas por MA u hongos orquideoides.
- Cortes transversales de protocormo de orquídea micorrizado.

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 2.2</b>
	Departamento de edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 121- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Tinción de hongos micorrízicos con Calcofluorina (CFW) y ANS (ácido 8-anilino-naftalensulfónico)</b>	Tinciones.

## Procedimiento

Se utiliza bata, guantes y cubrebocas para realizar todo el procedimiento de preparación de muestras y tinción.

Soluciones amortiguadoras (buffer) y concentradas (Stock).

Se pesan por separado en la balanza analítica cada uno de los reactivos indicados en la columna derecha del cuadro de reactivos. Con ayuda de diferentes espátulas (para no contaminar los frascos) se colocan cada uno en las distintas charolas de pesado\*\*\*. Después de pesar las charolas se colocan por separado cada una en cajas de Petri (para evitar que se hidraten mientras se elaboran las soluciones) indicando la fórmula del reactivo con plumón.

Es necesario preparar cuatro soluciones: una solución amortiguadora (buffer) Tris pH 8.9 - 9.0 50 mM, una solución concentrada (stock) de calcofluorina (CFW) 10 mg/mL, una solución de NaOH 1 M y una solución concentrada (stock) de ANS 50 mg/mL.

En un vaso de precipitados de 100 mL, se vierten 25 mL de agua destilada, se agregan los 302.85 mg de base Trizma, se coloca un agitador magnético y el vaso en la parrilla de agitación a velocidad media. Una vez disuelta se afora a 50 mL en la probeta con agua destilada y se regresa a agitación para ajustar el pH con una solución de HCl 0.1 N para bajarlo o NaOH 0.1 N para subirlo. Finalmente se le coloca una etiqueta para almacenaje de reactivos con los datos: tipo de solución, fecha de elaboración, persona que la elaboró y la caducidad del mismo y se almacena en el refrigerador (4 °C) en un frasco tapado.

Dentro de la campana de extracción se prepara el stock de CFW, se agregan 5 mL de solución buffer TRIS pH 8.9 - 9.0 (medidos con la micropipeta de 1 a 5 mL) en el vaso de precipitados de 50 mL y se añaden 50 mg de CFW, se introduce un agitador magnético antes de colocarlo en la parrilla que se regulará a velocidad media. Al obtener la mezcla homogénea se almacena en un frasco ámbar de 20 mL, se le coloca una etiqueta para almacenaje de reactivos y se guarda en el congelador (- 21°C).

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 2.2</b>
	Departamento de edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 122- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Tinción de hongos micorrízicos con Calcofluorina (CFW) y ANS (ácido 8-anilino-naftalensulfónico)</b>	Tinciones.

Para la solución de NaOH 1 M se colocan 50 mL de agua destilada y se agrega el hidróxido poco a poco, una vez disuelto el reactivo se afora a 100 mL en una probeta. Este procedimiento debe hacerse con cuidado ya que durante la disolución se experimenta una reacción exotérmica. La solución se almacena en un frasco de 100 mL al cual se le coloca una etiqueta para almacenaje de reactivos y se guarda a temperatura ambiente.

Dentro de la campana de extracción se prepara el stock de ANS agregando 1 mL de solución de NaOH 1 M medido con la micropipeta de 100 -1000  $\mu$ L que se colocan en un microtubo de 2 mL se agregan los 50 mg de ANS; el microtubo se forra con el papel aluminio y se etiqueta para almacenaje de reactivos y se almacena en el congelador a -21 °C.

Tinción de muestras.

Todo el procedimiento se lleva a cabo dentro de la campana de extracción y con el equipo de seguridad arriba mencionado. Se necesitan dos soluciones de trabajo, la primera consiste en disolver 10  $\mu$ L de solución stock de CFW en 990  $\mu$ L de buffer Tris pH 8.9 en un microtubo de 2 mL. Esta solución se mezcla en el agitador vórtex, la segunda solución de trabajo se prepara disolviendo 60  $\mu$ L de solución stock de ANS y mezclándola en 940  $\mu$ L de agua destilada en un microtubo de 2 mL, ambos microtubos se resguarda de la luz cubriéndolo con papel aluminio.

Se toma una alícuota de 200  $\mu$ L de cada solución de trabajo y se agrega a la muestra en el dispositivo de vacío si se utilizan membranas o a los cortes en el interior de un pastillero. Se deja incubar 30 min a 24 °C en obscuridad (las membranas dentro del dispositivo y los cortes en el pastillero dentro de una caja de Petri forrada de papel aluminio). Se enjuagan las muestras de 3 - 5 veces con buffer Tris pH 8.9 para eliminar el exceso de colorante, ya sea en el mismo dispositivo de vacío o los cortes dentro del pastillero (que pueden ser transferidos tres veces a otros pastilleros que contengan buffer con la ayuda de pinzas), con una pipeta Pasteur. La muestra teñida se monta en un portaobjetos, se agrega una gota o dos de glicerol y se coloca encima un cubreobjetos. Se observa bajo el microscopio de fluorescencia con el filtro de luz UV.

Dirigir los residuos en un contenedor de plástico cerrado dentro de la campana de extracción debidamente etiquetado.

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 2.2</b>
	Departamento de edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 123- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Tinción de hongos micorrízicos con Calcofluorina (CFW) y ANS (ácido 8-anilino-naftalensulfónico)</b>	Tinciones.

\*\*\*la espátula de plástico y la charola que se utilizaron para pesar el CFW y el ANS, así como los vasos de precipitados y el agitador magnético que tuvieron contacto con el CFW y el ANS, se lavan con agua sobre un recipiente para concentrar los residuos del lavado y colocar estos en el contenedor indicado. El material se almacenará en un recipiente para ser usado sólo para estos fines.

## Cálculos

### 2) Fórmula A

Mediante esta fórmula se puede obtener el peso necesario para elaborar una solución a una molaridad requerida.

$$\times = \text{Peso requerido} \quad \times = \frac{(\text{Molaridad requerida})(\text{PM})}{1 \text{ M}}$$

PM= peso molecular

### 2) Fórmula B

Mediante esta fórmula se puede obtener el peso necesario para elaborar una solución a una molaridad en un volumen requerido.

$$\times = \text{Peso requerido} \quad \times = \frac{(\text{Peso conocido})(\text{Volumen requerido})}{1 \text{ L}}$$

### 3) Ejemplo: solución Trizma base 50mM

$$\times = \frac{(50\text{mM})(121.12 \text{ g})}{1 \text{ 000 mM}} = 6.056 \text{ g} \quad \times = \frac{(6.056 \text{ g})(50\text{mL})}{1 \text{ 000 mL}} = 0.3028 \text{ g}$$

## Referencias

BARTNICKI-GARCÍA, S., PERSSON, L., H. CHANZY. 1994. An electron microscope and electron diffraction study of the effect of calcofluor and congo red on the biosynthesis of chitin in vitro. *Archives Biochemistry Biophysics* 310: 6-15.

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 2.2</b>
	Departamento de edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 124- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Tinción de hongos micorrízicos con Calcofluorina (CFW) y ANS (ácido 8-anilino-naftalensulfónico)</b>	Tinciones.

REED, J., EDWARDS, D., C. GONZÁLES. 1997. Synthetic peptide combinatorial libraries. A method for the identification of bioactive peptides against phytopathogenic fungi. *Molecular Plant-Microbe Interact* 5: 537-549.

VON-SENGBUSCH, P., HECHLER, J., U. MÜLLER. 1983. Molecular architecture of fungal cell walls. An approach by use of fluorescence markers. *European Journal of Cell Biology* 30: 305-312.

MAYFIELD, C., I. 1975. A simple fluorescence staining technique for *in situ* soil microorganisms. *Canadian Journal of Microbiology*, 21, 727-729.

MORGAN, P., C., J., COOPER, N., S., BATTESBY, S. A., LEE, S. T., LEWIS, T. M., MACHIN, S., C., GRAHAM, R., J., WATKINSON. 1991. Automated image analysis method to determine fungal biomass in soils y on solid matrices. *Soil Biology Biochemistry*, 23, 609-616.

## Observaciones

- La fluorescencia con calcofluorina será estable durante 24 horas aproximadamente posteriores a la tinción si la preparación se conserva en oscuridad.
- El colorante tiene tiempo de resiliencia de 24 h, no se decolora con la exposición constante, pero la intensidad de fluorescencia está relacionada con la viabilidad de la estructura, por lo que las estructuras jóvenes tendrán mayor intensidad que las viejas por la degradación de los componentes de la pared celular; sin embargo no puede considerarse como prueba de viabilidad.

## Notas

El CFW y el ANS son colorantes altamente tóxicos por lo que deben ser etiquetadas las soluciones con esta advertencia, tener el contenedor de desechos en un lugar resguardado y lavar con agua destilada dentro de un recipiente sólo destinado a este fin y marcado.

Una vez terminada la observación de la muestra, la platina del microscopio se limpia con un trozo de papel absorbente que se almacena en un contenedor para residuos.

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 2.3</b>
	Departamento de edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 125- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Tinción de hongos micorrízicos con diacetato de fluoresceína (FDA)</b>	Tinciones.

## Propósito

Reconocer las células vivas mediante una prueba de actividad de esterases.

## Principio

El diacetato de fluoresceína (FDA) tiñe células metabólicamente activas que posean esterases activas y una membrana celular intacta. El FDA es hidrofóbico, se introduce en las células pasando a través de la membrana celular (hidrofóbica) y es convertido en fluoresceína hidrofílica por acción de las esterases. La fluoresceína se acumula lentamente en las células por la baja permeabilidad de la membrana a este compuesto. No se acumula en células muertas, ya que generalmente tienen membranas perforadas (Takashi *et al.*, 1995).

## Técnicas Relacionadas

- Elaboración de cortes transversales de ápices de ectomicorrizas para observación microscópica.
- Uso de balanza analítica digital.
- Medición del pH con potenciómetro.
- Soluciones para titular.
- Solución amortiguadora de citratos para solubilizar Phytigel®.
- Micelio externo de hongos micorrízicos fijado en membranas por técnica de filtrado.
- Cortes transversales de raíces colonizadas por MA u hongos orquideoides.
- Cortes transversales de protocormo de orquídea micorrizado.
- Tinción de hongos micorrízicos con Calcofluorina M2R (CFW).
- Manejo del módulo de fluorescencia del microscopio OLYMPUS BX51.

## Equipo y material

- Incubadora a  $24 \pm 2$  °C.
- Microscopio de fluorescencia equipado con un filtro U-MWIB (460-490 nm).
- Balanza analítica digital.

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 2.3</b>
	Departamento de edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 126- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Tinción de hongos micorrízicos con diacetato de fluoresceína (FDA)</b>	Tinciones.

- Parrilla de agitación magnética.
- Campana de extracción con cubierta de resina fenólica resistente a solventes orgánicos, ácidos y bases al 10 % de concentración.
- Dispositivo de vacío individual Millipore® XX102503 de 15 mL (matraz Kitasato de 500 mL, manguera para vacío de 0.9 cm de diámetro interior, tapón de plástico con una perforación).
- Bomba de vacío (Máximo de vacío 0.0001 mm Hg, con un motor de ¾ HP).
- Agitador vortex.
- 2 probetas de 500 mL.
- 1 probeta de 100 mL
- 2 vasos de precipitados de 1 L.
- 1 vaso de precipitados de 100 mL.
- 3 agitadores magnéticos medianos.
- 1 pipeta de 10 mL graduada.
- 2 frascos de vidrio de 500 mL con tapa.
- 1 frasco de vidrio de 100 mL con tapa.
- 3 charolas cuadradas de poliestireno de 5 x 5 cm especiales para pesar..
- 1 espátulas de plástico designadas para pesar el FDA.
- 2 espátulas de acero inoxidable para micro nutrientes (4 × 2 cm aprox. por 14 cm de largo total).
- pastillero desechable.
- 2 pipetas Pasteur larga con bulbo.
- Micropipeta de 100-1000 µL con 2 puntas.
- Micropipeta de 1-5 mL con 2 puntas.
- 3 microtubo (tipo Eppendorff) de 1.5 mL.
- 1 caja de Petri de vidrio de 8.5 cm de diámetro forrada con papel aluminio.
- Portaobjetos y cubreobjetos\*.
- 1 par de guantes de nitrilo.
- 1 plumón negro indeleble.
- 2 etiquetas para almacenaje de reactivos.
- Papel aluminio un cuadrado de 10 × 10 cm.
- Bata.
- 1 cubrebocas desechable para protección respiratoria filtro blanco.

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 2.3</b>
	Departamento de edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 127- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Tinción de hongos micorrízicos con diacetato de fluoresceína (FDA)</b>	Tinciones.

- 4 etiquetas para almacenaje de reactivos.
- Recipiente de plástico con tapa para desechos\*\*.

\*Cantidad y tamaños de acuerdo al número de muestras que se trabajarán.

\*\*ver sección de notas.

## Reactivos

Clave	Reactivo	PM (g/mol)	Cantidad a utilizar
MCCR0154	FDA	416.39	5mg o 4mg*
MCCR0002	Acetona	58	1 mL
MCCR0193	DMSO	78	1 mL
MCCR0045	Fosfato dibásico de sodio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12 H <sub>2</sub> O)	358.157	35.84 g
Física de suelos	Fosfato monobásico de sodio (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O)	137.99	13.9 g
MCCR0047	Glicerol	92	10 mL aprox.
	Agua destilada		1 500 mL aprox.

\*Esta cantidad de FDA se utiliza si el solvente a utilizar es DMSO.

## Muestra

Micelio externo de hongos micorrízicos fijado en membranas por técnica de filtrado.

Corte transversal de ápices de ectomicorrizas.

Cortes transversales de raíces colonizadas por MA u hongos orquídeoides.

Cortes transversales de protocormo de orquídea micorrizado.

## Procedimientos

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 2.3</b>
	Departamento de edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 128- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Tinción de hongos micorrízicos con diacetato de fluoresceína (FDA)</b>	Tinciones.

Soluciones amortiguadoras (buffer) y concentradas (Stock).

Se pesan por separado en la balanza analítica cada uno de los reactivos indicados en la columna derecha del cuadro de reactivos. Con ayuda de diferentes espátulas (para no contaminar los frascos) se colocan cada uno en las distintas charolas de pesado\*\*\*. Después de pesar las charolas se colocan por separado cada una en cajas de Petri (para evitar que se hidraten mientras se elaboran las soluciones) indicando la fórmula del reactivo con plumón.

Es necesario elaborar cuatro soluciones: fosfato dibásico de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 0.2 M, fosfato monobásico de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 0.2 M, un buffer de fosfato de sodio 60 mM a pH 7.4 y una solución stock de FDA.

Para preparar la solución concentrada de fosfato dibásico de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 0.2 M se vierten 400 mL de agua destilada en un vaso de precipitados de 1 L, se agrega el fosfato dibásico sodio, se coloca un agitador magnético y el vaso en la parrilla de agitación a velocidad media. Una vez disuelta se afora a 500 mL en la probeta con agua destilada. Finalmente se le coloca una etiqueta para almacenaje de reactivos con los datos: tipo de solución, fecha de elaboración, persona que la elaboró y la caducidad del mismo y se almacena en el refrigerador (4 °C) en un frasco tapado.

Para preparar la solución concentrada de fosfato monobásico de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 0.2 M se vierten 400 mL de agua destilada en un vaso de precipitados de 1 L, se agrega el fosfato monobásico sodio, se coloca un agitador magnético y el vaso en la parrilla de agitación a velocidad media. Una vez disuelta se afora a 500 mL en la probeta con agua destilada. La solución se vierte en un frasco de 500 mL y finalmente se le coloca una etiqueta para almacenaje de reactivos y se almacena en el refrigerador (4 °C).

El buffer fosfato pH 7.4 en un vaso de precipitados de 100 mL se mezclan 3.4 mL de solución stock dibásica 0.2 M (medidos con la micropipeta de 1 -5 mL), con 14.5 mL de solución stock monobásica 0.2 M (medidos con la pipeta de 10 mL graduada), se coloca un agitador magnético y el vaso en la parrilla de agitación a velocidad media una vez obtenida una mezcla homogénea se afora en una probeta a 60 mL con agua destilada y se regresa a agitación para ajustar a pH 7.4 agregando más stock monobásico para bajarlo y stock dibásico para subirlo, esta solución se utiliza de inmediato y el sobrante se desecha (en la traja)..

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 2.3</b>
	Departamento de edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 129- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Tinción de hongos micorrízicos con diacetato de fluoresceína (FDA)</b>	Tinciones.

Se utiliza bata, guantes, cubrebocas y se trabaja dentro de la campana de extracción, pues los reactivos son tóxicos y se gasifican fácilmente durante todo el procedimiento de preparación de soluciones y tinción.

El colorante FDA puede disolverse en acetona o DMSO dependiendo del material con el que se cuente: A) FDA en acetona o B) FDA en DMSO.

A) La solución stock de FDA 5 mg/mL en acetona, se prepara en un microtubo tipo Eppendorf de 1.5 mL, se agrega 1 mL de acetona y los 5 mg de FDA, se agitan con el vortex para disolver el FDA, el microtubo se forra con papel aluminio, finalmente se le coloca una etiqueta para almacenaje de reactivos y se almacena a 4°C. La solución de trabajo se prepara agregando 100 µL de solución stock FDA a 900 µL de buffer fosfato de sodio 60 mM pH 7.4, en un microtubo tipo Eppendorf de 1.5 mL forrado con papel aluminio se se agitan con el vortex, se le coloca una etiqueta para almacenaje de reactivos y se puede almacenar a 4°C por 2 semanas\*\*\*\*.

B) Para preparar la solución stock de FDA 10 mM en DMSO, se prepara en un microtubo tipo Eppendorf de 1.5 mL donde se agrega 1 mL de DMSO (Dimetil sulfóxido) y los 4 mg de FDA se agitan con el vortex para disolver el FDA, el microtubo se forra con papel aluminio, finalmente se le coloca una etiqueta para almacenaje de reactivos y se almacena a 4°C. La solución de trabajo se prepara agregando 40 µL de solución stock a 460µL de agua destilada, en un microtubo tipo Eppendorf de 1.5 mL forrado con papel aluminio se se agitan con el vortex, se le coloca una etiqueta para almacenaje de reactivos y se puede almacenar a 4°C\*\*\*\*.

Tinción de muestras.

Se adicionan 200 µL de la solución de trabajo a la muestra en el dispositivo de vacío si se utilizan membranas o a los cortes en el interior de un pastillero., se incuba de 10 a 20 min a 25 °C en oscuridad (las membranas dentro del dispositivo y los cortes en el pastillero dentro de una caja de Petri forrada de papel aluminio). Se enjuaga la muestra de 4 - 6 veces s con agua destilada para eliminar el exceso de colorante, ya sea en el mismo dispositivo de vacío o los cortes dentro del pastillero (que pueden ser transferidas tres veces a otros pastilleros que contengan agua destilada, con la ayuda de pinzas), con una pipeta Pasteur. La muestra teñida se monta en un portaobjetos, se agrega una gota o dos de glicerol y se coloca encima un

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 2.3</b>
	Departamento de edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 130- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Tinción de hongos micorrízicos con diacetato de fluoresceína (FDA)</b>	Tinciones.

cubreobjetos. Se observa bajo el microscopio de fluorescencia con el filtro de luz U-MWIB. Las células vivas aparecerán en color verde brillante.

La muestra se coloca en un portaobjetos, se agregan aproximadamente 100 µL de glicerina colocando un cubreobjetos encima y se examinan en el microscopio de epifluorescencia utilizando el filtro U-MWIB2 para analizar la tinción con FDA.

Dirigir los residuos en un contenedor de plástico cerrado dentro de la campana de extracción debidamente etiquetado.

\*\*\*la espátula de plástico y la charola que se utilizaron para pesar el CFW, así como los vasos de precipitados y el agitador magnetico que tuvieron contacto con el CFW, se lavan con agua sobre un recipiente para concentrar los residuos del lavado y colocar estos en el contenedor indicado. El material se almacenara en un recipiente para ser usado sólo para estos fines.

\*\*\*\* Cuando se preparen mayores cantidades de las soluciones de FDA es conveniente pasrlas por un filtro de 0.2 mm, para evitar contaminación por bacterias.

## Cálculos

### 3) Fórmula A

Mediante esta fórmula se puede obtener el peso necesario para elaborar una solución a una molaridad requerida.

$$\times = \text{Peso requerido} \quad \times = \frac{(\text{Molaridad requerida})(\text{PM})}{1 \text{ M}}$$

PM= peso molecular

### 4) Fórmula B

Mediante esta fórmula se puede obtener el peso necesario para elaborar una solución a una molaridad y en un volumen requerido.

$$\times = \text{Peso requerido} \quad \times = \frac{(\text{Peso conocido})(\text{Volumen requerido})}{1 \text{ L}}$$

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 2.3</b>
	Departamento de edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 131- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Tinción de hongos micorrízicos con diacetato de fluoresceína (FDA)</b>	Tinciones.

3) Solucion Fosfato dibásico de sodio 0.2 M

$$\times = \frac{(0.2 \text{ M})(358.157 \text{ g})}{1 \text{ M}} = 71.63 \text{ g}$$

$$\times = \frac{(71.63 \text{ g})(500 \text{ mL})}{1000 \text{ mL}} = 35.84 \text{ g}$$

## Referencias

TAKASHI, T., KAWASAKI, Y., TAKESHIMA, S., SEKIYA, T. Y TANAKA, S. 1995. A new fluorescence staining assay for visualizing living microorganisms in soil. *Applied & Environmental Microbiology* 61, 3415-3421.

## Observaciones

- Los tiempos de incubación y tinción deben realizarse puntualmente porque el FDA se decolora aprox. a los 30 min de incidencia de luz continua.
- La tinción con FDA-DMSO presenta mayor intensidad de fluorescencia y mejor resolución que FDA-acetona.

## Notas

Es imprescindible el uso de bata debido a que la FDA es un colorante altamente tóxico por lo que deben ser etiquetadas las soluciones con esta advertencia, tener el contenedor de desechos en un lugar a resguardo y lavar con agua destilada dentro de un recipiente sólo destinado a este fin y marcado, los materiales utilizados en la elaboración del mismo antes de ponerlos a lavar en la tarja.

Una vez terminada la observación de la muestra, la platina del microscopio se limpia con un trozo de papel absorbente que se almacena en un contenedor para residuos.

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 2.4</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 132- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Tinción de núcleos de hongos micorrízicos con DAPI</b>	Tinciones.

## Propósito

Teñir núcleos celulares de diversos hongos micorrízicos.

## Principio

El 4'-6-Diamino-2-fenilindole (DAPI) es un compuesto que forma complejos fluorescentes con cadenas de ADN, ya que muestra especificidad por los pares de bases A-T. Esto permite llevar a cabo la observación de núcleos en un tejido (Martin, 1987). Sin embargo, también tiene afinidad a paredes celulares de plantas. En hongos arbusculares, el DAPI se ha utilizado para reconocer el número de núcleos se puede correlacionar con la proliferación de la ramificación de las hifas debido al crecimiento celular (Buée et al., 2000), así como para realizar identificación taxonómica de hongos del complejo *Rhizoctonia* (Shan et al., 2002). Su excitación máxima es a 365 nm que corresponde al intervalo de luz ultravioleta. Ha sido utilizado en cultivo de tejidos y ofrece un procedimiento para detectar virus, contaminación por hongos o bacterias (Rost, 1995).

## Técnicas relacionadas

- Elaboración de cortes transversales de ápices de ectomicorrizas para observación microscópica.
- Uso de balanza analítica digital.
- Medición del pH con potenciómetro.
- Soluciones para titular.
- Solución amortiguadora de citratos para solubilizar Phytigel®.
- Micelio externo de hongos micorrízicos fijado en membranas por técnica de filtrado.
- Cortes transversales de raíces colonizadas por MA u hongos orquídeoides.
- Cortes transversales de protocormo de orquídea micorrizado.
- Tinción de hongos micorrízicos con Calcofluorina M2R (CFW).
- Manejo del módulo de fluorescencia del microscopio OLYMPUS BX51.

## Equipo y material

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 2.4</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 133- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Tinción de núcleos de hongos micorrízicos con DAPI</b>	Tinciones.

- Balanza analítica digital.
- Incubadora a  $24 \pm 2$  °C.
- Parrilla de agitación magnética.
- Microscopio de fluorescencia equipado con filtro de luz UV.
- Campana de extracción con cubierta de resina fenólica resistente a solventes orgánicos, ácidos y bases al 10 % de concentración.
- Dispositivo de vacío individual Millipore® XX102503 de 15 mL (matraz Kitasato de 500 mL, manguera para vacío de 0.9 cm de diámetro interior, tapón de plástico con una perforación).
- Bomba de vacío (Máximo de vacío 0.0001 mm Hg, con un motor de  $\frac{3}{4}$  HP).
- Potenciómetro calibrado en el intervalo de pH 0-10.
- Agitador vortex.
- 1 charola cuadrada de poliestireno de 5 x 5 cm especial para pesar.
- 1 espátula de plástico designada para pesar el DAPI.
- 1 vaso de precipitados 150 mL
- 2 vasos de precipitados 50 mL
- 1 probeta de 100 mL.
- 1 probeta de 10 mL
- Portaobjetos y cubreobjetos\*.
- Micropipeta de 1 - 5  $\mu$ L con 2 puntas.
- Micropipeta de 100 - 1000  $\mu$ L con 3 puntas.
- 2 pastilleros desechables.
- 1 caja Petri de vidrio de 8.5 cm de diámetro forrada de con papel aluminio.
- 1 pipeta Pasteur larga con bulbo.
- 1 agitador magnético chico (especial para reactivos de fluorescencia).
- 1 frasco de vidrio ámbar de 100 mL.
- 2 frascos de vidrio de 25 mL.
- 1 par de guantes de nitrilo.
- 1 plumón negro indeleble.
- 3 etiquetas para almacenaje de reactivos.
- Bata.
- 1 cubrebocas desechable para protección respiratoria filtro blanco.
- Recipiente de plástico para canalizar desechos\*\*.

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 2.4</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 134- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Tinción de núcleos de hongos micorrízicos con DAPI</b>	Tinciones.

\*Cantidad y tamaños de acuerdo al número de muestras que se trabajarán.

\*\*ver sección de notas.

### Reactivos

Clave	Reactivo	PM (g/mol)	Cantidad a utilizar
MCCR0152	4'-6-Diamino-2-phenylindole (DAPI)	350	0.5 mg
MCCR0094	Formaldehído	30	0.2 mL
MCCR0047	Glicerol	92	5 mL
	Agua destilada		500 mL (aprox.)

### Muestra

- Tejidos de hongos:
- Micelio externo de hongos micorrízicos fijado en membranas por técnica de filtrado. Corte transversal de ápices de ectomicorrizas.
- Cortes transversales de raíces colonizadas por MA u hongos orquideoideos.
- Cortes transversales de protocormo de orquídea micorrizado.

### Procedimiento

Para realizar todo el procedimiento de tinción con DAPI se utilizan bata, guantes y cubrebocas

Solución concentrada (Stock).

Se pesa el DAPI con ayuda de la espátula en la charola\*\*\* de pesado en la balanza analítica digital. Después de pesar las charolas se coloca en una caja Petri (para evitar que se hidrate) y se marca con un plumón.

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 2.4</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 135- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Tinción de núcleos de hongos micorrízicos con DAPI</b>	Tinciones.

La solución de DAPI se elabora dentro de la campana de extracción, se vierten 100 mL de agua destilada (medidos con la probeta) en el vaso de precipitados de 150 mL, se agregan 0.5 mg de DAPI, se coloca un agitador magnético y el vaso en la parrilla de agitación a velocidad media. Una vez que la solución sea homogénea se almacena en un frasco de vidrio ámbar al cual se le coloca una etiqueta para almacenaje de reactivos y se guarda en refrigeración (4°C).

Preparación de soluciones:

Para preparar una solución de formaldehído al 2 % en un vaso de precipitado de 50 mL se agregan 8 mL de agua destilada (medida en una probeta) y se adicionan 2 mL de formaldehído (medido con la micropipeta de 1 - 5 mL), se coloca un agitador magnético y se pone el vaso en la parrilla de agitación a velocidad media. Una vez obtenida una mezcla homogénea, esta se almacena en un frasco de vidrio de 25 mL al cual se le coloca una etiqueta para almacenaje de reactivos y se almacena a temperatura ambiente.

Finalmente se prepara una solución 1:1 glicerina-agua en un vaso de precipitados de 50 mL, agregando 5 mL de glicerina a 5 mL de agua destilada (estas cantidades medidas con la micropipeta de 1 - 5 mL), se coloca un agitador magnético y el vaso en la parrilla de agitación a velocidad media. Una vez obtenida una mezcla homogénea, se almacena en un frasco de vidrio de 25 mL al cual se le coloca una etiqueta para almacenaje de reactivos y se almacena a temperatura ambiente.

Tinción de muestras.

Se toma una alícuota de 200 µL de la solución de formaldehído y se agrega a la muestra en el dispositivo de vacío si se utilizan membranas o directamente a los cortes en el interior de un pastillero y se deja incubar a temperatura ambiente por 20 min; una vez transcurrido el tiempo se agregan 200 µL de la solución DAPI 5 µg/mL (las cantidades de ambas soluciones se toman con la micropipeta de 100 – 1000 µL), se deja incubar 20 min en la oscuridad (las membranas dentro del dispositivo y los cortes en el pastillero dentro de una caja de Petri forrada de papel aluminio). Se enjuaga por 2 minutos para eliminar el exceso de colorante, ya sea en el mismo dispositivo de vacío o los cortes dentro del pastillero (que pueden ser transferidas tres veces a otros pastilleros que contengan buffer con la ayuda de pinzas) con una pipeta Pasteur. La muestra teñida se monta en un portaobjetos, se adicionan aproximadamente 100 µL de

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 2.4</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 136- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Tinción de núcleos de hongos micorrízicos con DAPI</b>	Tinciones.

glicerina-agua destilada (1:1) colocando un cubreobjetos encima (según el tamaño de la muestra). Se observa bajo el microscopio de fluorescencia con el filtro de luz UV.

Dirigir los residuos en un contenedor de plástico cerrado dentro de la campana de extracción debidamente etiquetado.

\*la espátula de plástico y la charola que se utilizaron para pesar el DAPI, así como los vasos de precipitados y el agitador magnético que tuvieron contacto con él, se lavan con agua sobre un recipiente para concentrar los residuos del lavado y colocar estos en el contenedor indicado. El material se almacenará en un recipiente para ser usado sólo para estos fines.

## Cálculos

### 1) Formula A

Mediante esta fórmula se puede obtener el volumen necesario para elaborar una solución a una concentración requerida.

$$\text{Concentración1 Volumen1} = \text{Concentración2 Volumen2}$$

### 2) Ejemplo solución de formaldehído 2%

$$\text{Volumen 2} = (2\%)(100 \text{ mL})/100\% = 2 \text{ mL}$$

## Referencias

BUÉE, M., ROSSIGNOL, M., JAUNEAU, A., RANJEVA, R., G. BÉCARD. 2000. The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *The American Phytopathological Society* 13: 693-698.

MARTIN, B. 1987. Rapid tentative identification of *Rhizoctonia* spp. associated with diseased turfgrasses. *Plant Disease* 71: 47-49.

ROST, F. W. 1995. *Fluorescence microscopy*. Cambridge University Press, Cambridge. 267 pp.

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 2.4</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 137- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Tinción de núcleos de hongos micorrízicos con DAPI</b>	Tinciones.

SHAN, X. C., LIEW, E. C. Y., WEATHERHEAD, M. A., I. J. HODGKISS. 2002. Characterization and taxonomic placement of *Rhizoctonia*-like endophytes from orchid roots. *Mycologia*, 94: 230-239.

### Observaciones

- Debe darse suficiente tiempo a la tinción; es decir al menos 20 min si se trata de hifas y 12 horas si se trabaja con esporas de hongos arbusculares, ya que pueden aparecer manchas amarillas fluorescentes que dificultan la observación de los núcleos (éstas corresponden a una reacción del DAPI con ácidos grasos).

### Notas

El DAPI es un colorante altamente tóxico por lo que deben ser etiquetadas las soluciones con esta advertencia, tener el contenedor de desechos en un lugar resguardado y lavar con agua destilada dentro de un recipiente sólo destinado a este fin y marcado.

Una vez terminada la observación de la muestra, la platina del microscopio se limpia con un trozo de papel absorbente que se almacena en un contenedor para residuos.

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 2.5</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 138- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Tinción de hongos micorrízicos con yoduro de propidio (PI)</b>	Tinciones

## Propósito

Teñir paredes celulares de plantas y ácidos nucleicos de hongos micorrízicos.

## Principio

El PI es un colorante con estructura fenantridina utilizado con gran frecuencia para determinaciones de contenido de ADN dado que se intercala entre el ADN y ARN de doble cadena. Su utilización para la determinación del contenido de ADN requiere de la utilización de agentes permeables y del tratamiento con ARNasa (Prigione y Filipello, 2004). El PI es afín a paredes celulares vegetales (Olivain *et al.*, 2006).

## Técnicas relacionadas

- Elaboración de cortes transversales de ápices de ectomicorrizas para observación microscópica.
- Uso de balanza analítica digital.
- Medición del pH con potenciómetro.
- Soluciones para titular.
- Solución amortiguadora de citratos para solubilizar Phytigel®.
- Micelio externo de hongos micorrízicos fijado en membranas por técnica de filtrado.
- Cortes transversales de raíces colonizadas por MA u hongos orquídeoides.
- Cortes transversales de protocormo de orquídea micorrizado.
- Manejo del módulo de fluorescencia del microscopio OLYMPUS BX51.

## Equipo y material

- Balanza analítica digital.
- Campana de extracción con cubierta de resina fenólica resistente a solventes orgánicos, ácidos y bases al 10 % de concentración.
- Microscopio de fluorescencia equipado con filtro de luz WG.

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 2.5</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 139- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Tinción de hongos micorrízicos con yoduro de propidio (PI)</b>	Tinciones

- Micropipeta de 100 - 1000  $\mu$ L con 2 puntas.
- 1 charola cuadradas de poliestireno de 5 x 5 cm especial para pesar.
- 1 espátula de plástico designada para pesar el PI.
- Dispositivo de vacío individual Millipore® XX102503 de 15 mL (matraz Kitasato de 500 mL, manguera para vacío de 0.9 cm de diámetro interior, tapón de plástico con una perforación).
- Bomba de vacío (Máximo de vacío 0.0001 mm Hg, con un motor de  $\frac{3}{4}$  HP).
- Agitador vortex.
- 1 microtubo (tipo Eppendorff) de 1.5 mL.
- 1 caja de Petri de vidrio de 8.5 cm de diámetro forrada con papel aluminio.
- Portaobjetos y cubreobjetos\*.
- 1 par de guantes de nitrilo.
- Pastillero desechable.
- 1 plumón negro indeleble.
- 2 etiquetas para almacenaje de reactivos.
- Bata.
- 1 cubrebocas desechable para protección respiratoria filtro blanco.
- Recipiente de plástico para canalizar desechos\*\*.

\*Cantidad y tamaños de acuerdo al número de muestras que se trabajarán.

\*\*ver sección de notas.

## Reactivos

Clave	Reactivo	PM (g/mol)	Cantidad a utilizar
MCCR0153	Yoduro de propidio (PI)	668.41	0.06 mg
MCCR0047	Glicerol	92.00	20 mL
	Agua destilada		100 mL

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 2.5</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 140- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Tinción de hongos micorrízicos con yoduro de propidio (PI)</b>	Tinciones

## Muestra

- Micelio externo de hongos micorrízicos fijado en membranas por técnica de filtrado. Corte transversal de ápices de ectomicorrizas.
- Raíces colonizadas por MA.
- Cortes de protocormo de orquídea micorrizado en estadio 2.

## Procedimiento

Se utiliza bata, guantes y cubrebocas para realizar todo el procedimiento de preparación de soluciones y tinción.

Soluciones.

Pesar el PI en la balanza con ayuda de la espátula y la charola\*\*\* se coloca la charola dentro de una caja Petri (para evitar que se hidrate) y se marca con un plumón. La solución de PI 1 mM se prepara en un microtubo tipo Eppendorf de 1.5 mL, se agrega 1 mL de agua destilada y los 0.06 mg, se agitan con el vortex para disolver el PI, el microtubo se forra con papel aluminio, finalmente se le coloca una etiqueta para almacenaje de reactivos y se almacena a -20°C.

Tinción de muestras.

Se agregan 200 µL de la solución PI a la muestra en el dispositivo de vacío si se utilizan membranas o a los cortes en el interior de un pastillero, se incuba durante 20 minutos en oscuridad a 24 °C (las membranas dentro del dispositivo y los cortes en el pastillero dentro de una caja de Petri forrada de papel aluminio). Se enjuaga por 2 minutos para eliminar el exceso de colorante, ya sea en el mismo dispositivo de vacío o los cortes dentro del pastillero (que pueden ser transferidas tres veces a otros pastilleros que contengan buffer con la ayuda de pinzas) con una pipeta Pasteur. La muestra teñida se monta en un portaobjetos, se agrega una gota o dos de glicerol y se coloca encima un cubreobjetos. Se observa bajo el microscopio de

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 2.5</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 141- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Tinción de hongos micorrízicos con yoduro de propidio (PI)</b>	Tinciones

fluorescencia con el filtro de luz WG (488 nm-550 nm).

Dirigir los residuos en un contenedor de plástico cerrado dentro de la campana de extracción debidamente etiquetado.

\*\*\*la espátula de plástico y la charola que se utilizaron para pesar el PI, así como los vasos de precipitados y el agitador magnetico que tuvieron contacto con el PI, se lavan con agua sobre un recipiente para concentrar los residuos del lavado y colocar estos en el contenedor indicado. El material se almacenara en un recipiente para ser usado sólo para estos fines.

## Cálculos

### 5) Fórmula A

Mediante esta fórmula se puede obtener el peso necesario para elaborar una solución a una molaridad requerida.

$$\times = \text{Peso requerido} \quad \times = \frac{(\text{Molaridad requerida})(\text{PM})}{1 \text{ M}}$$

PM= peso molecular

### 3) Fórmula B

Mediante esta fórmula se puede obtener el peso necesario para elaborar una solución a una molaridad en un volumen requerido.

$$\times = \text{Peso requerido} \quad \times = \frac{(\text{Peso conocido})(\text{Volumen requerido})}{1 \text{ L}}$$

### 3) Solucion PI 1mM

$$\times = \frac{(1\text{mM})(668.41 \text{ g})}{1000 \text{ mM}} = 0.66841 \text{ g} \quad \times = \frac{(0.66841 \text{ g})(1\text{mL})}{1000 \text{ mL}} = 0.0006 \text{ g}$$

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 2.5</b>
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 142- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Tinción de hongos micorrízicos con yoduro de propidio (PI)</b>	Tinciones

## Referencia

OLIVAIN, C., HUMBERT, C., NAHALKOVA, J., FATEHI, J., L'HARIDON, F. Y ALABOUVETTE, C. 2006. Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains inoculated together and separately into the soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 1523-1531.

PRIGIONE, V. Y FILIPELLO, V. 2004. Method to maximise the staining of fungal propagules with fluorescent dyes. *Journal of Microbiological Methods*, 59, 371-379.

## Observaciones

- El yoduro de propidio en micorrizas no marca organismos muertos.

## Notas

Es imprescindible el uso de bata debido a que la PI es un colorante altamente tóxico por lo que deben ser etiquetadas las soluciones con esta advertencia, tener el contenedor de desechos en un lugar a resguardo y lavar con agua destilada dentro de un recipiente sólo destinado a este fin y marcado, los materiales utilizados en la elaboración del mismo antes de ponerlos a lavar en la tarja.

Una vez terminada la observación de la muestra, la platina del microscopio se limpia con un trozo de papel absorbente que se almacena en un contenedor para residuos

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 3.1</b>
	Departamento de edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 143- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Manejo del módulo de fluorescencia del microscopio OLYMPUS BX51</b>	Microscopía y Análisis de imágenes.

## Propósito

Conocer el manejo adecuado del microscopio Olympus BX51 para utilizar el módulo de fluorescencia.

## Principio

El diseño del microscopio para luz fluorescente reflejada incluye un espejo dicroico que dirige la estimulación lumínica a través del objetivo para iluminar la muestra y proporcionar una observación eficiente con luz fluorescente (Olympus, 1992).

La fluorescencia es uno de los fenómenos en donde los átomos emiten energía cuando sus electrones descienden de algún estado de excitación, emitiendo luz. Esta emisión tiene diferentes características. Las más importantes son los espectros de fluorescencia y los tiempos de exposición (Cudlín *et al.*, 1996).

Los parámetros de fluorescencia son a menudo dependientes de las propiedades fisico-químicas del ambiente y de las moléculas fluorescentes (también llamadas fluorocromos) que se utilizan (Cudlín *et al.*, 1996).

## Técnicas Relacionadas

- Tinción de hongos micorrízicos con Calcofluorina M2R (CFW).
- Tinción de hongos micorrízicos con Calcofluorina y ANS (ácido 8-anilino-naftalensulfónico).
- Tinción de núcleos de hongos micorrízicos con DAPI.
- Prueba de viabilidad de hongos micorrízicos con Diacetato de Fluoresceína (FDA).
- Tinción de hongos micorrízicos con yoduro de propidio (PI).

## Equipo y material

- Microscopio Olympus BX51

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 3.1</b>
	Departamento de edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 144- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Manejo del módulo de fluorescencia del microscopio OLYMPUS BX51</b>	Microscopía y Análisis de imágenes.

- Cubos de fluorescencia
- Toallas de papel absorbente
- Guantes de polipropileno

Cuadro. 1. Relación de posición de campo claro y filtros de fluorescencia del microscopio Olympus BX51

No de filtro	Clave	Excitación (nm)	Tipo de luz
1	BF		campo claro
2	WB	450 - 480	Azul
3	WG	510 - 550	Verde
4	WU	330 - 385	UV
5	WIB	460 - 490	Azul-roja

## Muestra

Muestra a observar montada en un portaobjetos sin teñir o teñida con algún fluorocromo.

## Procedimiento

Véase Anexo 1 para reconocer las partes del microscopio.

1. Colocar toallas de papel absorbente sobre la mesa para no contaminarla al poner encima las laminillas debido a que los reactivos son muy tóxicos.
2. Remover la cubierta del microscopio.
3. Remover los polarizadores superiores.

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 3.1</b>
	Departamento de edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 145- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Manejo del módulo de fluorescencia del microscopio OLYMPUS BX51</b>	Microscopía y Análisis de imágenes.

4. Encender la lámpara de mercurio con el interruptor principal (18). El indicador de luz (19) en la fuente de poder debe indicar encendido (ON). Esperar de 5 a 10 minutos para que se estabilice la lámpara de mercurio. Ésta debe estar encendida al menos 15 min antes de apagarse.

5. Ajustar el microscopio para hacer observaciones en campo claro.

6. Ajustar la unidad de fluorescencia (17) en el cubo de fluorescencia apropiado (Cuadro 1).

7. Bajar la intensidad de la luz por completo utilizando el botón de ajuste de iluminación (3).

8. Permitir que la luz de la lámpara de mercurio alcance el espécimen, deslizar el botón shutter (20) hacia la posición marcada de encendido.

9. Para mejorar el contraste de la imagen y prevenir que los colores se atenúen con la luz de fluorescencia en otra parte que no sea la región observada, jalar el botón del campo del diafragma de iris (21) para que la imagen del campo del diafragma de iris abarque el campo de visión.

10. Para ajustar la iluminación de la imagen observada y mejorar el contraste, jalar el botón de apertura del diafragma de iris (22), la apertura del diafragma de iris se reducirá.

11. Examinar el espécimen y tomar la fotografía de la imagen si es necesario.

12. Para prevenir la decoloración, deslizar el botón shutter (20) hacia la posición de apagado mientras no se observa al espécimen.

13. Al terminar:

- Deslizar el botón shutter (20) hacia la posición de apagado.
- Si la lámpara de mercurio ha estado encendida al menos por 15 minutos, apague la lámpara de mercurio con el interruptor manual (18) en la fuente de poder junto con su respectivo regulador. NOTA: La lámpara de mercurio necesita enfriarse al menos 15 minutos antes de volver a encenderla.
- Bajar la plataforma moviendo el botón de foco (10) hacia uno mismo y remover la muestra con el espécimen de la plataforma (7).
- Mover hacia atrás el revólver (12) hasta colocar el objetivo 4X en la posición listo para hacer observaciones con éste.
- Si el objetivo de 100x fue utilizado, limpiar los lentes con cuidado con papel seda.
- Presionar el botón del diafragma de iris (21) y el botón de apertura del diafragma de iris (22).
- Ajustar la unidad de fluorescencia a campo claro (17).

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 3.1</b>
	Departamento de edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 146- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Manejo del módulo de fluorescencia del microscopio OLYMPUS BX51</b>	Microscopía y Análisis de imágenes.

- Cubrir el microscopio cuando la lámpara de mercurio se haya enfriado.

### Cálculos

No aplica

### Referencias

CUDLÍN, P., CHMELÍKOVÁ, E. Y PLÁSEK, J. (1996) Fluorescence microscopy in mycorrhiza studies. IN MUKERJI, K. (Ed.) *Concepts in Mycorrhizal Research*. Netherlands, Kluwer Academic Publisher.

Olympus Instructions BX51/BX52. 1992. System Microscope.

### Anexos

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 3.1</b>
	Departamento de edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 147- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Manejo del módulo de fluorescencia del microscopio OLYMPUS BX51</b>	Microscopía y Análisis de imágenes.

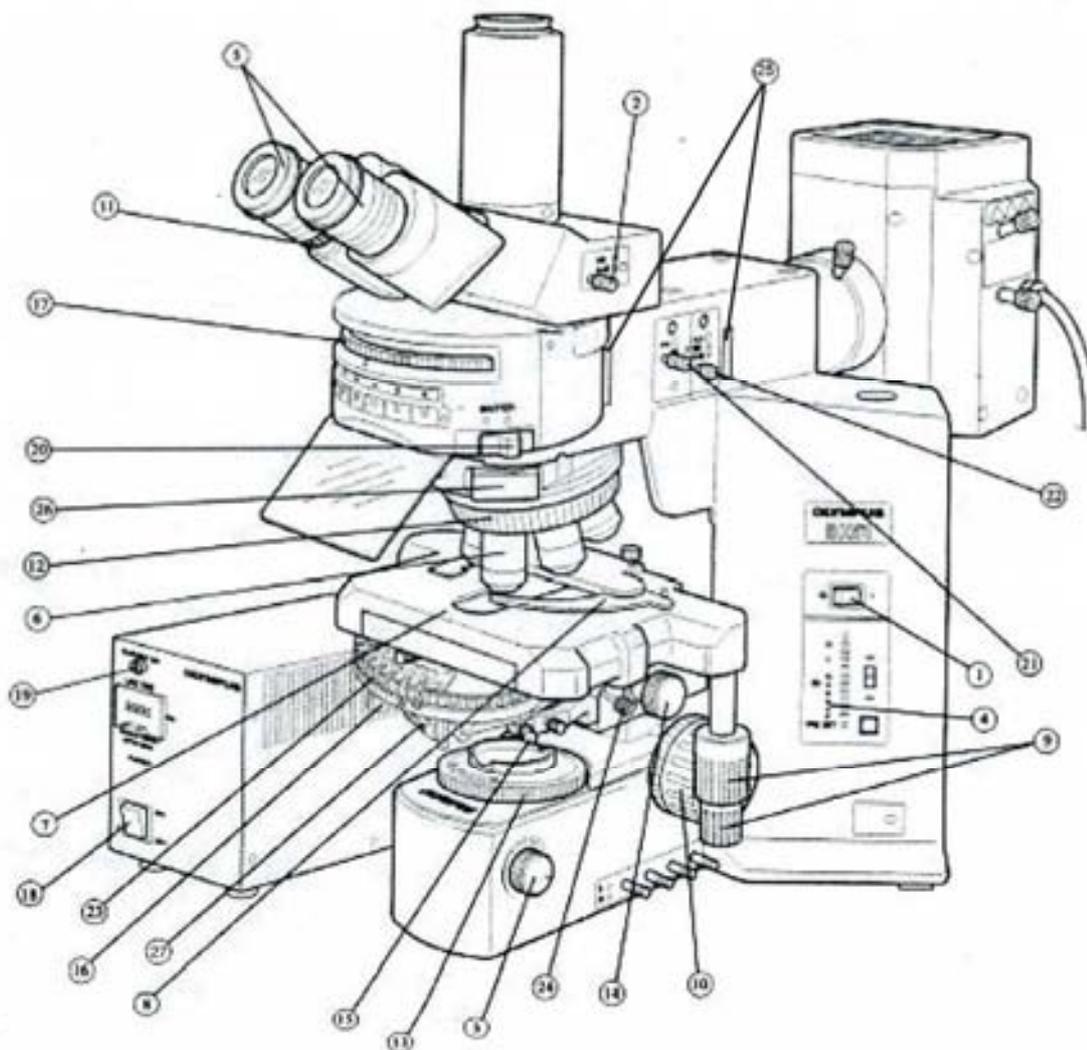


Figura 1. Esquema del microscopio Olympus BX51

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 3.1</b>
	Departamento de edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 148- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Manejo del módulo de fluorescencia del microscopio OLYMPUS BX51</b>	Microscopía y Análisis de imágenes.

**Cuadro 2. Partes del microscopio**

Clave	Parte del microscopio
1	Interruptor de la lámpara de halógeno.
2	Botón de selección de dirección de luz.
3	Botón de ajuste de brillo.
4	Indicador de voltaje.
5	Ajustador de oculares.
6	Objetivo 10x.
7	Platina.
8	Sujetador de laminillas.
9	Controlador de ejes de la plataforma.
10	Botones macrométrico y micrométrico.
11	Anillo de ajuste de dioptría.
12	Revólver.
13	Diafragma de iris.
14	Botón de ajuste de altura del condensador.

Clave	Parte del microscopio
15	Tornillos para centrar el condensador.
16	Condensador de apertura del diafragma de iris.
17	Cubos de fluorescencia.
18	Interruptor principal.
19	Indicador de luz.
20	Shutter (opturador).
21	Botón del campo del diafragma de iris.
22	Botón de apertura del diafragma de iris.
23	Condensador.
24	Tornillos para centrar el condensador.
25	Polarizadores.
26	Deslizador del prisma de luz transmitida DIC.
27	Botón de filtro micrométrico.

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	<b>ANEXO 3.1</b>
	Departamento de edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 149- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Manejo del módulo de fluorescencia del microscopio OLYMPUS BX51</b>	Microscopía y Análisis de imágenes.

### Observaciones

Los reactivos utilizados para microscopía de fluorescencia son muy tóxicos, por lo que se debe tener cuidado de no contaminar el microscopio ni la mesa.

En ocasiones es más fácil localizar el espécimen bajo tinción que en campo claro, observar de ambas formas.

Cuidar que la imagen que se quiere obtener tenga los tiempos de exposición adecuados y se observe en la vista previa tal como se quiere.

Dejar limpio el microscopio y el sitio donde se trabajó.

### Nota

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	ANEXO 3.2
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 150- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Calibración referencial de objetivos en el programa IMAGE PRO PLUS 5.0.</b>	Microscopía y análisis de imágenes.

## Propósito

Realizar y/o verificar la calibración del programa *Image Pro plus 5.0*® a partir de distintos objetivos – aumentos para realizar mediciones y aplicar diversas herramientas del mismo.

## Principio

*Image-Pro Plus*® es un programa diseñado para la adquisición, el procesamiento y análisis de imágenes a partir de cualquier método de captura de imágenes en formato TIFF, el cual puede proporcionar control y automatización de los sistemas de análisis de imágenes.

La calibración de las medidas de los objetos de las imágenes requiere primero conocer la óptica utilizada para la adquisición de imágenes, así como contar con el sistema de captura de éstas adecuado. *Image Pro Plus 5.0*® tiene dos tipos de calibración – calibración de referencia y calibración del sistema.

Las calibraciones de referencia se realizan para combinaciones de cámaras específicas y ciertos lentes de objetivos y pueden ser usadas repetidamente si las propiedades de magnificación no cambian, es decir si no se utiliza otro lente. Esto es muy útil en la microscopía cuando la muestra se coloca siempre a la misma distancia focal de los lentes.

Las calibraciones de imágenes individuales se crean y se usan cuando la imagen tiene marcas de referencia en la misma. Estas puede ser medidas como pixel/unidad y posteriormente utilizar algún factor de conversión.

## Técnicas relacionadas

- Manejo del módulo de fluorescencia del microscopio Olympus BX51

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	ANEXO 3.2
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 151- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Calibración referencial de objetivos en el programa IMAGE PRO PLUS 5.0.</b>	Microscopía y análisis de imágenes.

## Equipo y material

- Microscopios óptico LEICA o estereoscópico LEICA u óptico con módulo de fluorescencia OLYMPUS BX51.
- Computadora equipada con al menos 2 GB de memoria RAM, 160 GB de memoria del disco duro, 1 GB de memoria para tarjeta de video, procesador Intel Core 2 Duo a 3.72 GHz y Windows XP.
- Cámara digital acoplada al microscopio.
- Llave de seguridad de usuario que permita el acceso al programa.
- Laminilla graduada de 1 mm dividida en 1000  $\mu\text{m}$  para los microscopios ópticos ó 1 cm dividida en 100 para el estereoscópico.

## Reactivos

Clave	Reactivo	cantidad
	Aceite de inmersión	1 gota

## Muestra

Fotografía con escala correcta para cada aumento para corroborar la calibración mediciones.

## Procedimiento

Encender el regulador, microscopio y la computadora con la llave del programa previamente insertada en el puerto paralelo, abrir el programa Image Pro Plus. Colocar la laminilla graduada correspondiente al microscopio del cual se desean calibrar los objetivos (1mm para el óptico y 1 cm para el estereoscópico) en la platina y enfocar la imagen en campo claro en el objetivo de menor aumento.

Seleccionar dentro del menú "Acquire", y presionar el ícono , aparecerá el menú de CoolSNAP-Pro (Fig. 1) en dónde se puede establecer el tiempo de exposición requerido para obtener la iluminación deseada. Presionar "Start Preview" para obtener una vista previa,

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>	151
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>	

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	ANEXO 3.2
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 152- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Calibración referencial de objetivos en el programa IMAGE PRO PLUS 5.0.</b>	Microscopía y análisis de imágenes.

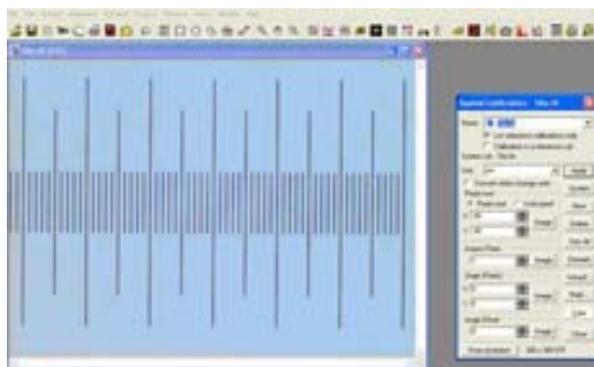
enfocar hasta tener una imagen clara y horizontal de la regleta. Cuando la imagen sea la adecuada presionar Snap para capturarla y guardar la imagen en el menu principal con la opción "File" - "Save As", dándole el nombre del objetivo con el que se tomó esa fotografía. Este procedimiento se sigue en todos los aumentos del microscopio.

Para crear la calibración de referencia se debe abrir la imagen tomada de la regleta desde el objetivo que se desea calibrar. Ir al menú "Measure" - "calibrate", seleccionar "spatial" y escribir el nombre del objetivo que se desea calibrar en la ventana Name. Seleccionar la opción "calibration is a reference cal", verificar que esté seleccionada la opción de "Pixels/unit" (Fig. 2) y presionar la celda "image" del primer recuadro (se formará una línea de calibración dentro de la imagen), seleccionar la línea y alargarla o acortarla hasta que ocupe la mayor cantidad de unidades posibles que aparezcan bien delimitadas en la imagen de la regleta. A continuación se debe escoger la unidad de referencia (micrómetros, milímetros, etc.) y escribir la equivalencia de unidades reales que representa la línea\*, presionar "OK". Escoger apply dentro mismo cuadro de diálogo. Seguir el procedimiento de calibración para el resto de los objetivos.



Figura 1. Menú Cool SNAP- Pro.

\* Las calibraciones se realizan generalmente en micrómetros por lo que se toma 1 mm = 1000 mm y como la regleta está dividida en 10 partes será 0.1mm= 100 mm.



## Cálculos

No aplica

Figura 2. Menú Spatial Calibration

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	ANEXO 3.2
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 153- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Calibración referencial de objetivos en el programa IMAGE PRO PLUS 5.0.</b>	Microscopía y análisis de imágenes.

## Referencia

www. mediacy.com

Image Pro-Plus 5.0® user manual. 1999. Editorial Media Cybernetics. The Imaging Experts. EUA.

## Observaciones

- Tener especial atención en plantear bien las equivalencias. La calibración de los objetivos sólo es válida para el microscopio donde fueron tomadas las imágenes.

## Notas

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	ANEXO 3.3
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 154- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Cuantificación de micelio externo activo de micorriza arbuscular <i>G. intraradices</i> por análisis de imágenes en el programa Image Pro Plus 5.0</b>	Microscopía y análisis de imágenes.

## Propósito

Este procedimiento debe llevarse a cabo para cuantificar de forma semi-automática el micelio externo activo de micorriza arbuscular en un cultivo *in vitro* en Phytigel® montado en membrana de nitrocelulosa por el método de filtrado teñido con FDA a partir de análisis de imágenes digitales utilizando el programa Image Pro Plus 5.0®.

## Principio

Las mediciones manuales de longitud de hifas en imágenes proyectadas o en microfotografías o en el simple método de intersección en cuadrilla requieren mucho tiempo y atención. Los sistemas de análisis de imágenes han revolucionado las técnicas de detección, enumeración y monitoreo de microorganismos en sus ambientes naturales. Estos han sido utilizados para medir tamaño y número de células de bacterias, particularmente de ambientes acuáticos y para monitorear el crecimiento microbiano en superficies (Caldwell y Lawrence, 1989).

Las técnicas visuales han sido preferidas para la determinación de la biomasa de hongos en el suelo (Frankland *et al.*, 1978). La concentración de hongos es medida como el total de la longitud de las hifas por unidad de suelo y esto estima el biovolumen y biomasa utilizando factores de conversión apropiados. Esto puede realizarse utilizando el método de filtrado en membrana, en el cual se pueden utilizar varios colorantes (Baath y Söderström, 1980, West, 1988).

La extracción, tinción y automatización del análisis de imágenes desarrollado permite la evaluación rápida y sencilla de biomasa fúngica en suelo u otras superficies inertes. El diacetato de fluoresceína ha sido utilizado como colorante vital y los valores obtenidos de longitud de las hifas fluorescentes teñidas con FDA son comparables con valores obtenidos con otras técnicas para determinar biomasa fúngica activa (Söderström, 1977).

## Técnicas relacionadas

- Uso del módulo de fluorescencia del microscopio Olympus BX51.

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>	154
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>	

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	ANEXO 3.3
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 155- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Cuantificación de micelio externo activo de micorriza arbuscular <i>G. intraradices</i> por análisis de imágenes en el programa Image Pro Plus 5.0</b>	Microscopía y análisis de imágenes.

- Calibración de referencia de objetivos de microscopio con el programa Image Pro Plus 5.0®.
- Prueba de viabilidad de hongos micorrízicos con diacetato de fluoresceína (FDA).

### Equipo y material

- Microscopio óptico de epifluorescencia Olympus BX51 equipado con cámara CoolSnap.
- Computadora equipada con el software Image Pro Plus 5.0.
- Llave del programa Image Pro Plus 5.0.

### Reactivos

No aplica.

### Muestra

Micelio externo teñido con FDA montado en un portaobjetos con cubreobjetos o imágenes de la muestra previamente tomadas y guardadas en formato TIFF.

### Procedimiento

Encender el regulador y la computadora con la llave del programa Image Pro Plus 5.0® insertada en el puerto paralelo, abrir el programa en modo completo. Abrir la fotografía de una sección de micelio externo, convertir la imagen a escala de grises desde el menú “Edit”⇒ “convert to”⇒ “gray scale 16”. Aumentar el contraste de la foto si es necesario para distinguir las zonas activas (fluorescentes) de las inactivas (Fig 1).

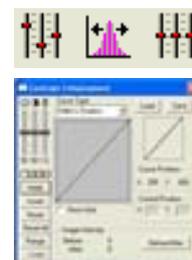


Figura 1. Menú de contraste

Calibrar la imagen desde el menú “Measure” ⇒ “Calibration” ⇒ “Select Spatial” y seleccionar la calibración correspondiente al objetivo con el cual

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>	155
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>	

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	ANEXO 3.3
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 156- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Cuantificación de micelio externo activo de micorriza arbuscular <i>G. intraradices</i> por análisis de imágenes en el programa Image Pro Plus 5.0</b>	Microscopía y análisis de imágenes.

se tomó la foto.

Seleccionar “measurement” ⇒ “count /size” ⇒ “select ranges” y mover la barra del rango dinámico hasta que sólo queden visibles las zonas fluorescentes y lo demás cubierto en color constituyendo la clase 1 (Fig. 2), hacer una clase nueva (2) con “new” y elegir las zonas fluorescentes que quedaron descubiertas igual moviendo el rango dinámico. Cerrar el menú.

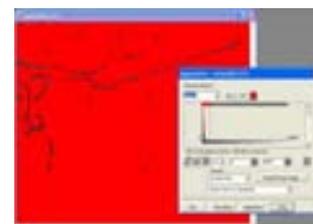


Figura 2. Zonas elegidas de la clase 1

Seleccionar “count” ⇒ “measure” ⇒ “select measurements”, elegir “area” y “size (length)”, aceptar presionando “OK”, elegir “count” y posteriormente mandar los resultados a una hoja de excel desde “view” ⇒ “measurement data file” ⇒ “DDE to Excel”. Cuando los datos hayan sido enviados a excel reconocer sólo los datos arrojados por los objetos marcados por el número 2 (ya que es la clase que nos importa), es decir sólo el área correspondiente a las zonas fluorescentes y sumarlos en excel, para obtener el área de la biomasa activa y la longitud total.

Realizar el mismo procedimiento en 10 imágenes de partes de la membrana elegidas al azar y obtener un promedio para llegar a un resultado que represente la muestra.

## Cálculos

No aplica

## Referencias

www. mediacy.com

Image Pro-Plus 5.0 user manual.

BAATH, E. Y SÖDERSTRÖM, B. (1980) Comparisons of the agar-film and membrane-filter methods for the estimation of hyphal in soil with particular reference to the effect of magnification. *Soil Biology & Biochemistry*, 12, 385-387.

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>	156
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>	

	<b>MICROCOSMOS BIOEDÁFICO</b>	ANEXO 3.3
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 157- 178
	PRESOP	01-09-2008
	<b>Cuantificación de micelio externo activo de micorriza arbuscular <i>G. intraradices</i> por análisis de imágenes en el programa Image Pro Plus 5.0</b>	Microscopía y análisis de imágenes.

CALDWELL, D. Y LAWRENCE, J. (1989) Image analysis y computer modelling of microbial growth on surfaces. *Binary*, 1, 147-150.

FRANKLAND, J. C., LINDLEY, D. K. Y SWIFT, M. J. (1978) A comparison of two methods for the estimation of mycelial biomass in leaf litter. *Soil Biology & Biochemistry*, 10, 323-333.

SÖDERSTRÖM, B. E. (1977) Vital staining of fungi in pure cultures and in soil with fluorescein diacetate. *Soil Biology & Biochemistry*, 9, 59-63.

WEST, A. (1988) Specimen preparation, stain type and extraction and observation procedures as factors in the estimation of soil mycelial lengths and volumes by light microscopy. *Biology & Fertility of Soils*, 7, 88-94.

## Anexo

### Observaciones

- Realizar una buena edición de la imagen blanco y negro utilizando las opciones brillo, contraste y corrección gama antes de comenzar a medir para mejorar los resultados del conteo automatizado.

Si se requiere, seleccionar áreas de interés con la opción AOI para eliminar objetos que no se desean cuantificar, esto se aplica cuando existe demasiado ruido.

<u>Autores:</u> Lorena Segura Morán.	<u>Fuente:</u>	157
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>	

## 11 LITERATURA CITADA

- ABRAMOWITZ, M. Y DAVIDSON, M. (2003) Introduction to Fluorescence. <http://www.microscopy.fsu.edu/primer/lightandcolor/fluorointroduction.html> (21/Agosto/2008).
- AGERER, R. (1991) Characterisation of ectomycorrhizas. XXIV. Ectomycorrhiza. *Methods in Microbiology* 23, 25-73.
- AGERER, R. (2001) Exploration types of ectomycorrhizae. A proposal to classify ectomycorrhizal mycelial systems according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. *Mycorrhiza*, 11, 107-114.
- AL-BRASS, K., BILGER, I., MARTIN, F. Y TACON, F. L. (1988) Morphological y physiological changes in ectomycorrhizas of spruce (*Picea excelsa* (L.A., Link) associated with ageing. *New Phytologist*, 110, 553-540.
- ALTERMÜLLER, H, VAN VLIET-LANOE B. (1990) Soil thin section fluorescente microscopy. In: douglas LA (ed) Soil micromorphology: a Basic and applied science. Elsevier, Amsterdam. 565-579 p.
- AMES, R., INGHAM, E. Y REID, C. (1982) Ultraviolet-induced autofluorescence of arbuscular mycorrhizal root infections: an alternative to clearing y staining methods for assesing infections. *Canadian Journal of Microbiology*, 28, 351-355.
- ANDERSON, J. Y DOMSCH, K. (1973) Quantification of bacterial and fungal contributions to respiration. *Archiv fur Mikrobiologie*, 93, 113-127.
- ANONIMO (2002). Fluorescent imaging. Principles and methods. [www4.gelifesciences.com/applic/upp00738.nsf/vLookupDoc/224673459B500/\\$file/63003528.pdf](http://www4.gelifesciences.com/applic/upp00738.nsf/vLookupDoc/224673459B500/$file/63003528.pdf) . (7/Julio/2008).
- ARDITTI, J. (1992) *Fundamentals of Orchid Biology*. John Wiley & Sons. Boston USA. 691 p.
- AUGER, P., MARQUIS, G. Y DALLAIRE, L. (1979) Viability assessment by dye exclusion. *Archives Dermatology*, 115, 1195-1196.
- BAATH, E. Y SÖDERSTRÖM, B. (1980) Comparisons of the agar-film and membrane-filter methods for the estimation of hyphal in soil with particular reference to the effect of magnification. *Soil Biology & Biochemistry*, 12, 385-387.
- BAGO, B., ZIPFEL, W., WILLIAMS, R., CHAMBERLAND, H., LAFONTAINE, J., WEB, W.

- Y PICHÉ, Y. (1998) *In vivo* studies on nuclear behavior of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* grown under axenic conditions. *Protoplasma*, 203, 1-15.
- BEISER, A. (2003) *Concepts of Modern Physics*. Mc.Graw Hill. New York. 442 p.
- BENJAMINSON, M. (1969) Conjugates of chitinase with fluorescein isothiocyanate or lissamie rhodamie as specific stains for chitin in situ. *Staining Technology*, 44, 27-31.
- BOLWELL, G. (1988) Synthesis of cell wall components: Aspects of control. *Phytochemistry*, 27, 1235-1253.
- BONFANTE-FASOLO, P. Y SCANNERINI, S. (1992) The cellular Basis of Plant-Fungus Interchanges in Mycorrhizal Associations Pp 65-101. In ALLEN, M. (Ed.) *Mycorrhizal Functioning. An Integrative Plant Fungal Process*. Chapman and Hall. New York. 560 p.
- BRUNDRETT, M., PICHÉ, Y. Y PETERSON, R. (1984) A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Canadian Journal of Botany*, 62, 2128-2134.
- BRUNDRETT, M., KENDRICK, B. Y PETERSON, C. (1991) Efficient lipid staining in plant material with Sudan red 7B or fluorol yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechniques Histochemistry*, 91, 111-116.
- BRUNDRETT, M., BOUGHER, N., DELL, B., GROVE, T. Y MALAJCZUK, N. (1996) *Working with mycorrhizas in forestry and agricultura*. ACIAR. Canberra. Pp 374.
- BRUNDRETT, M. (2008). Mycorrhizal Associations: The Web Resource. <http://www.mycorrhizas.info>. (13/08/2008).
- BRUNIUS, G. (1980) Technical aspects of the use of 3',6' diacetyl fluorescein for vital fluorescent staining of bacteria. *Current Microbiology*, 4, 321-323.
- BUÉE, M., ROSSIGNOL, M., JAUNEAU, A., RANJEVA, R. Y BÉCARD, G. (2000) The Pre-Symbiotic Growth of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Is Induced by a Branching Factor Partially Purified from Plant Root Exudates. *The American Phytopathological Society*, 13, 693-698.
- CALDWELL, D. Y LAWRENCE, J. (1989) Image analysis y computer modelling of microbial growth on surfaces. *Binary*, 1, 147-150.
- CAMPBELL, R. (1987) *Soil microbiology and biochemistry*, Academic Press. San Diego, C.A. 234 p.
- CLEMENTS, M. (1988) Orchid mycorrhizal associations. *Lindleyana*, 3 (2):73-86.
- CUDLÍN, P., CHMELÍKOVÁ, E. Y PLÁSEK, J. (1996) Fluorescence microscopy in mycorrhiza studies. Pp 303-314. In: MUKERJI, K. (Ed.) *Concepts in Mycorrhizal Research*. Kluwer

Academic Publisher. Netherlands, 374 p.

- CURRAH, R. Y ZELMER, C. (1992) A key and notes for the genera of fungi mycorrhizal with orchids and a new species in the genus *Epurorhiza*. *Rep. Tottori Mycorl. Inst* 30: 43-59.
- DANELL, E. (1994) *Cantharellus cibarius*: mycorrhiza formation and ecology. Comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the faculty of science and technology 35. Uppsala, Acta Universitatis Upsalensis.
- DAVEY, H. Y KELL, D. (1997) Fluorescent Brighteners: novel stains for the flow cytometric analysis of microorganisms. *Cytometry*, 28, 311-315.
- DECLERCK, S., STRULLU, D. G. Y PLANCHETTE, C. (1996) *In vitro* mass production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* associated with Ri-TDNA transformed root carrots. *Mycological Research*, 100, 1237-1242.
- DEARLANEY, J. D. W. 2007. Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza*, 17(6), 475-486.
- DRENT, P. (2008). Digital Imaging-New Opportunities for Microscopy. <http://www.microscopyu.com/articles/digitalimaging/drentdigital.html> (21/Agosto/2008).
- DREYER, B., MORTE, A., MANUELA, P. Y HONRUBIA, M. (2006) Autofluorescence detection of arbuscular mycorrhizal fungal structures in palm roots: an underestimated experimental method. *Mycorrhizal Research*, 110, 887-897.
- EKBLAD, A; WALLANDER, H Y NASHOLM, T. (1998). Chitin and ergosterol combined to measure total and living fungal biomass in ectomycorrhizas. *New Phytologist*, 128 (1), 143-149.
- ELORZA, M. V., RICO, H. Y SENTANDREU, R. (1983) Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans* cells. *Journal of Genetics Microbiology*, 129, 1577-1582.
- EVANS, N. Y HOYNE, P. (1982) A fluorochrome from aniline blue: Structure, synthesis and fluorescent properties. *Australian Journal of Chemical*, 35, 2571-2575.
- FRANKLAND, J. C., LINDLEY, D. K. Y SWIFT, M. J. (1978) A comparison of two methods for the estimation of mycelial biomass in leaf litter. *Soil Biology & Biochemistry*, 10, 323-333.
- GANGE, A., BOWER, E., STAGG, P., APLIN, D., GILLAM, A. Y BRACKEN, M. (1999) A comparison of visualization technique for recording arbuscular mycorrhizal colonization. *New Phytologist*, 142, 123-132.
- GASPAR, M., CABELLO, M., POLLERO, R. Y AON, M. (2001) Fluorescein diacetate

hydrolysis as a measure of fungal biomass in soil. *Current Microbiology*, 42, 339-344.

GETLIFF, J. Y FRY, J. (1989) Using the Solitaire Plus image analyser for direct estimates of bacterial volume. *Binary*, 1, 93-100.

GIOVANNETTI, M. Y MOSSE, B. (1980) An evaluation of Techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, 84, 489-500.

GIOVANNETTI, M., AZZOLINI, D. Y CITERNESI, A. S. (1999) Anastomosis Formation and Nuclear y Protoplasmic Exchange in Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Applied & Environmental Microbiology* 65, 5571-5575.

GIOVANNETTI, M., SBRANA, C., STRANI, P., AGNOLUCCI, M., RINAUDO, V. Y AVIO, L. (2003) Genetic diversity of isolates of *Glomus mosseae* from different geographic areas detected by vegetative compatibility testing and biochemical and molecular analysis. *Applied & Environmental Microbiology*, 69, 616-624.

GLASBEY, C. Y HORGAN, G. (1995) Image analysis for the biological sciences. Wiley. Edimburgh. 168 p.

GUIBAULT, G. G. Y KRAMER, D. N. (1964) Fluorometric determination of lipase, acylase, alpha- y gamma- chymotrypsin y inhibitors of these enzymes. *Annals of Chemistry*, 36, 409-412.

HARLEY, J. Y SMITH, S. (1983) Mycorrhizal symbiosis. Academic Press. London. 605 p.

HARRIS, K., CRABB, D., YOUNG, I., H.WEAVER, GILLIGAN, C., OTTEN, W. Y RITZ, K. (2002) *In situ* visualisation of fungi in soil thin sections: problems with crystallisation of the fluorochrome FB28 (Calcofluor M2R) and improved staining by SCRI Reinassance 2200. *Mycological Research*, 106, 293-297.

HAUGLAND, R. (1996) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. Eugene, USA. Pp. 680.

HERMAN, B. (1998). Microscopy handbooks 40: fluorescente microscopy. BIOS, Oxford. Pp. 170.

HICKEY, P. C., SWITF, S. R., ROCA, M. B. Y READ, N. D. (2004) Live-cell Imaging of Filamentous Fungi Using Vital Fluorescent Dyes and Confocal Microscopy. *Methods in Microbiology*, 34, 63-83.

HILDEBRANDT, U., JANETTA, K. Y BOTHE, H. (2002) Towards growth of arbuscular mycorrhizal fungi independent of a plant host. *Applied & Environmental Microbiology*, 68, 1919-1924.

- HOCH, H. C., GALVANI, D., SZAROWSKI Y J. TURNER. (2005) Two new fluorescent dyes applicable for visualization of fungal cell walls. *Mycologia* (3): 580-588.
- HOLM-HANSEN, O. (1973) The use of ATP determinations in ecological studies. Buletin from the Ecological Research Comiteé. NFR. France. Pp 222.
- HORTON, T. (2006) The number of nuclei in basidiospores of 63 species of ectomycorrhizal Homobasidiomycetes. *Mycologia*, 98, 233-238.
- HUYN, T. Y COATES, F. (1999) Propagation and seed viability of the endangered orchid *Prasophyllum correctum* D. L. Jones (Gaping leek-orchid). Final Report to Australian Flora Foundation. Victoria. 9 p.
- JABAJI-HARE, S., PERUMALLA, C. Y KENDRICK, W. (1984) Autofluorescence of vesicles, arbuscules, and intercellular hyphae of a vesicular-arbuscular fungus in leek (*Allium porrum*) roots. *Canadian Journal of Botany*, 62, 2665-2669.
- JENSEN, C., NEUMEISTER, H. Y LYSEK, G. (1998) Fluorescence Microscopy for the Observation of Nematophagous Fungi inside Soil. *Mycologist*, 12, 107-111.
- JONES, K. H. Y SENFT, J. A. (1985) An improved method to dermine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *Histochemistry and Cytochemistry*, 33, 77-79.
- JONES, W., KUEHNLE, A. Y ARUMUGANATHAN, K. (1998) Nuclear DNA content of 26 orchid (Orchidaceae) genera with emphasis on *Dendrobium*. *Annals of Botany*, 82, 189-194.
- KOTTKE, I. Y OBERWINKLER, F. (1987) The cellular structure of the Hartig net: Coecytic y transfer cell-like organization. *Nordic Journal Botany*, 7, 85-95.
- KURZWEILOVA, H. Y SIGLER, K. (1993) Fluorescent staining with bromocresol purple: a rapid method for determining yeast cell dead count developed as an assay of killer toxin activity. *Yeast*, 9, 1207-1211.
- LI, Y., DICK, W. Y O.TUOVINEN (2004) Fluorescence microscopy for visualization of soil microorganisms-a review. *Biological Fertility Soils*, 39, 301-311.
- LING-LEE, M., CHILVERS, G. A. Y ASHFORD, E. (1977) A histochemical study of phenolic materials in mycorrhizal and uninfected roots of *Eucalyptus fastigata* Deane and Maiden. *New Phytologist*, 78, 313-328.
- LUNDGREEN, B. (1981) Fluorescein diacetate as a stain of metabolically active bacteria in soil. *Oikos*, 36, 17-22.

- MARTIN, B. (1987) Rapid tentative identification of *Rhizoctonia* spp. associated with diseased turfgrasses. *Plant Disease*, 71, 47-49.
- MCGONIGLE, T., MILLER, M., EVANS, D., FAIRCHILD, G. Y SWAN, J. (1990) A new method which gives an objective measure of colonization of roots. *New Phytologist*, 115, 495-499.
- MAYFIELD, C. I. (1975) A simple fluorescence staining technique for *in situ* soil microorganisms. *Canadian Journal of Microbiology*, 21, 727-729.
- MEINHARDT, L., BELLATO, C. Y TSAI, S. (2001) SYBR Green I used to evaluate the nuclei number of fungal mycelia. *Biotechniques*, 31, 42-46.
- MELVILLE, L., DICKSON, S., FARQUHAR, M., SMITH, S. Y PETERSON, R. (1998) Visualization of mycorrhizal fungal structures in resin embedded tissues with xanthene dyes using laser scanning confocal microscopy. *Canadian Journal of Botany*, 76, 174-178.
- MITCHEL, R. (1989). Growing ardi orchids from seed at Kew. *The Plants man* 3(2), 152-169.
- MOORE, R. (1987) The genera of Rhizoctonia-like fungi: *Ascorhizoctonia*, *Ceratorhiza* gen. nov. *Epulorhiza* gen. nov., *Monilliopsis*, and *Rhizoctonia*. *Mycotaxon*, 29, 91-99.
- MORGAN, P., COOPER, C. J., BATTESBY, N. S., LEE, S. A., LEWIS, S. T., MACHIN, T. M., GRAHAM, S. C. Y WATKINSON, R. J. (1991) Automated image analysis method to determine fungal biomass in soils and on solid matrices. *Soil Biology & Biochemistry*, 23, 609-616.
- MORRIS, S. J., ZINK, T., CONNERS, K. & ALLEN, M. F. (1997) Comparison between fluorescein diacetate and differential fluorescent staining procedures for determining fungal biomass in soil. *Applied & Environmental Microbiology* 6, 161-167.
- MUKERJI, K., MANOHARACHARY, C. Y CHAMOLA, B. (2002) *Techniques in Mycorrhizal Studies*, Springer. UK. 554 p.
- NAVA, K. (2008) *Reactivos Fluorescentes. Accesolab. Accesorios para Laboratorios. México.* 40 p.
- OLIVAIN, C., HUMBERT, C., NAHALKOVA, J., FATEHI, J., L'HARIDON, F. Y
- PARKINSON, D. (1982) Filamentous fungi. Pp 949-968. In PAGE, A. L. (Ed.) *Methods of Soil Analysis. Parte 2. Chemical and Microbiological Properties* American Society for Agronomy. Madison. 1692 p.
- PETERSON, R. L., MASSICOTTE, H. B. Y MELVILLE, L. H. (2004) *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology*, NRC-CNRC. Ottawa. 173 p.

- PHILLIPS, J. M. Y HAYMAN, D. S. (1970) Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55, 158.
- QIAN, X., KOTTKE, I. Y OBERWINKLER, F. (1998a) Activity of different ectomycorrhizal types studied by vital fluorescence. *Plant & Soil*, 199, 91-98.
- QIAN, X., KOTTKE, I. Y OBERWINKLER, F. (1998b) Influence of liming and acidification on the activity of the mycorrhizal communities in a *Picea abies* (L.)Karst. stand. *Plant & Soil*, 199, 99-109.
- RANGEL, M. (2006) Germinación simbiótica y reintroducción de orquídeas terrestres en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Angel, México. Tesis de Maestría, facultad de Ciencias. UNAM. México. D.F. 115 p.
- RASMUSSEN, H. (1995) Terrestrial orchids: From seed to mycotrophic plant. University Press. Cambridge. 460 p.
- RITTER, T. (1990) Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Vitalität der Mykorrhizen von Fichten (*Picea abies* (L.) Karst.) und Tannen (*Abies alba* Mill.) unterschiedlich geschädigter Bestände im Schwarzwald. Tübingen.
- RONCERO, C. Y DURAN, A. (1985) Effect of calcofluor white and congo red on fungal wall morphogenesis: *in vivo* activation of chitin polymerization. *Journal of Bacteriology*, 170, 1950-1954.
- ROST, F. (1995) Fluorescence microscopy. Cambridge University Press. Cambridge. Pp 267.
- ROTMAN, B. Y PAPERMASTER, B. W. (1996) Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Microbiological Ecology*, 6, 217-226.
- SCHNÜRER, J. Y ROSSSWALL, T. (1982) Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 1256-1261.
- SCHÜSSLER, A., SCHWARZOTT, D. Y WALKER, C. (2001) A new fungal Phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105, 1413-1421.
- SCHWEIGER, P., ROUHIER, H. Y SÖDERSTRÖM, B. (2002) Visualization of ectomycorrhizal rhizomorph structure using laser scanning confocal microscopy. *Mycorrhizal Research*, 106, 349-354.
- SHAN, X. C., LIEW, E. C. Y., WEATHERHEAD, M. A. Y HODGKISS, I. J. (2002) Characterization and taxonomic placement of Rhizoctonia-like endophytes from orchid roots.

*Mycologia*, 94, 230-239.

SIERACKI, M., JOHNSON, J. Y SIEBURTH, J. (1985) Detection, enumeration, and sizing of planktonic bacteria by image analysed epifluorescence microscopy. *Applied & Environmental Microbiology*, 49, 799-810.

SILVA, M., RAMOS, E. Y SILVA, J. (2004) Hidrólise de diacetato de fluoresceína como bioindicador da atividade microbiológica de um solo submetido a reflorestamento. *Ciencia Rural*, 34, 1493-1496.

SMITH, S. Y READ, D. (1997) Mycorrhizal Symbiosis. 2ª edición. Academic Press. London. 605 p.

SNEH, B., BURPEE, L. Y OGOSHI, A. (1991) Identification of *Rhizoctonia* species, American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. 132 p.

SÖDERSTRÖM, B. E. (1977) Vital staining of fungi in pure cultures and in soil with fluorescein diacetate. *Soil Biology & Biochemistry*, 9, 59-63.

SWISHER, R. Y CARROLL, G. (1980) Fluorescein diacetate hydrolysis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces. *Microbiology Ecology*, 6, 217-226.

TAYLOR, L. Y BRUNS, T. (1996) Population, habitat y genetic correlates of mycorrhizal specialization in the "cheating" orchids *Corallorhiza maculata* y *C. mertensiana*. *Molecular Ecology*, 8, 1719-1732.

VIERHEILIG, H., KNOBLAUCH, K., JUERGENSEN, K., BEL, A. V., GRUNDLER, F. Y PICHÉ, Y. (2001) Imaging arbuscular mycorrhizal structures in living roots of *Nicotiana tabacum* by light, epifluorescence and confocal laser microscopy. *Canadian Journal of Botany*, 79, 231-237.

WARCUP, J. Y TALBOT, P. (1996) Perfect states of some *Rhizoctonia*. *Transactions of the British Mycological Society*, 49, 427-435.

WEST, A. (1988) Specimen preparation, stain type and extraction and observation procedures as factors in the estimation of soil mycelial lengths and volumes by light microscopy. *Biology & Fertility of Soils*, 7, 88-94.

WEST, A., GRANT, W. Y SPARLING, G. (1987) Use of ergosterol diaminopimelic acid and glucosamine contents of soils to monitor changes in microbial populations. *Soil Biology & Biochemistry*, 19, 607-612.

YOKOYAMA, H., DANJO, T., OGAWA, K. Y WAKABAYASHI, H. (1997) A vital staining technique with fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI) for the determination of

viability of mycosporean and actinospororean spores. *Journal of Fish Disease*, 20, 281-286.

ZIEGLER, G., ZIEGLER, E. Y WITZENHAUSEN, R. (1975) Vital fluorescent staining of microorganisms by 3',6'-diacetyl -fluoresceine for determination of their metabolic activity.

*Zentralbl Bakteriol*, 230, 252-264.