

Tesis de Posgrado

Influencia de las raíces sobre las poblaciones fúngidas del suelo : efecto rizoplano-rizósfera

Chiocchio, Viviana Mónica

2000

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Chiocchio, Viviana Mónica. (2000). Influencia de las raíces sobre las poblaciones fúngidas del suelo : efecto rizoplano-rizósfera. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3290_Chiocchio.pdf

Cita tipo Chicago:

Chiocchio, Viviana Mónica. "Influencia de las raíces sobre las poblaciones fúngidas del suelo : efecto rizoplano-rizósfera". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2000. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3290_Chiocchio.pdf

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Influencia de las raíces sobre las
poblaciones fúngicas del suelo.
Efecto rizoplano- rizósfera

Licenciada Viviana Mónica Chiocchio
Para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Director: Dra A. Godeas
Codirectora: Dra María Carla Marino

Año 2000

№ 3290

Influencia de las raíces sobre las poblaciones fúngicas del suelo. Efecto rizoplano-rizosfera. Lic. Viviana Chiocchio Dpto de Ciencias Biológicas. Universidad de Buenos Aires. Agosto de 2000.

Resumen

El propósito de este estudio ha sido investigar el efecto de las raíces de soja y trigo sobre las comunidades fúngicas del suelo de Pergamino, Provincia de Buenos Aires.

Debido a la complejidad química y microbiológica del ambiente de las raíces varias experiencias se hicieron con el objeto de comprender el efecto de estas sobre la población fúngica del suelo:

- a) aislamiento y enumeración de los hongos del suelo. Poblaciones.
- b) colonización de las raíces. Efecto rizósfera-rizoplano.
- c) relaciones microbianas.
- d) disponibilidad de nutrientes (exudados).
- e) efecto de los exudados sobre algunos aislamientos.

Influence of the roots on soil fungal population. Rhizoplane-rhizosphere effect. Lic. Viviana Chiocchio Dpto de Ciencias Biológicas. Universidad de Buenos Aires. August 2000.

Summary

The aim of this work has been to study the effect of the soybean and wheat roots on soil fungi population at Pergamino, Buenos Aires Province.

Because of the enormous complexity of the chemical and microbiological environment of roots several experiences were necessary in order to understand root effect on soil fungal population:

- a) Isolation and enumeration of soil fungi.
- b) Root colonization: rhizosphere-rhizoplane effect.
- c) Microbial interrelationships
- d) Nutrient availability (exudates)
- e) Effect of exudates on some fungal strains

*Ferralado por el índice del Sol
camina mi padre para que yo siempre lo vea*

A la memoria de Horacio N. Chiocchio

Ab mi querido Franco

*Cuando se miran sus ojos
cuando se escucha su voz
es más linda la mañana
nos alumbra más el Sol
cuando nos brindan su risa
cuando nos dan su candor
brotan un manantial
de agua fresquita en el corazón
ellos son el tesoro
ellos son la alegría
es por ellos que la vida
se vuelve más dulce, se vive mejor
Son los hijos la bendición
el milagro de nuestro amor
nos enseñan como amar
como abrir nuestro corazón,
son la esencia del hogar
Un regalo de Dios
Su mirada serena
su inocente verdad
es un calorcito que llena
de alegría la soledad,
mensajeros del alma
sembradores de paz
de un mañana pleno
de respeto y de libertad
ellos son la esperanza
ellos son la ilusión
es por ellos que la vida
se vuelve más dulce,
se vive mejor..... E.F.*

Agradecimientos

A la Dra. Alicia Godeas, por enseñarme a dar mis primeros pasos en la investigación. Por darme un lugar en su grupo de trabajo. Por su entusiasmo, por compartir los momentos académicos como de la vida diaria.

A la Dra. M.Carla Marino, por su buena predisposición y el tiempo brindado.

A la Universidad de Buenos Aires, por haberme otorgado una beca de iniciación y una beca de perfeccionamiento.

Al C.O.N.I.C.E.T. y a la U.B.A. por los subsidios otorgados durante estos últimos años, que hicieron posible realizar este trabajo.

Al Dr. Jorge Wright, por el valioso material bibliográfico contenido en la Biblioteca Micológica de nuestra área.

Al Ing. Roberto García del Inta Pergamino por facilitarme las muestras de suelo y las semillas utilizadas en este trabajo.

A la Lic. Liliana Marbán del Instituto Laquige por el análisis químico de las muestras de suelo.

Al Lic. Carlos Lima por haberme guiado en los primeros pasos en el estudio químico de esta tesis.

Al Dr. Mauricio Terebiznik por su ayuda en el liofilizado de las muestras.

A la Sra. Laura del Busto, por su ayuda cada vez que consulto la biblioteca.

A la Sra. Mercedes por la ayuda brindada en el manejo del material.

A mis vecinos del Laboratorio 8, por los préstamos y por el buen humor, siempre.

A la "gente del 5", por las charlas del café.

A mis compañeros del laboratorio 12, por tantas horas y tantos acontecimientos compartidos.

A Alicia, por su ayuda en la compaginación de esta tesis.

A Nadia, por sus palabras de aliento, por creer en las mismas cosas.

A Alejandra Ribichich, por las charlas inolvidables compartidas.

A Alexandra, por darme ánimo, y tirar siempre para adelante.

A mi hermana del alma, Verónica, por estar siempre, en las buenas y en las malas, siempre.

A mi mamá, por haberme dado la vida. Por todos los sacrificios hechos para darme un estudio. Por entenderlo todo.

A mis hermanos, por estar siempre en los momentos especiales para mi.

A Eduardo, por caminar conmigo en la vida, por haberme dado la posibilidad de ser mamá.

Finalmente a vos, Franco, por tanta ternura, sos lo más maravilloso que me pasó en la vida,

Gracias a todos.....

Indice

Introducción	
a) El suelo y su ambiente	1
b) La rizosfera	3
c) Estimulación de los microorganismos por la rizosfera	8
d) Morfología y fisiología de la raíz	11
e) Estabilidad de los agregados del suelo	13
f) Colonización de las raíces por los microorganismos	14
g) Producción de exudados por las raíces	17
g1) Clasificación de las sustancias liberadas por las raíces	20
g2) Métodos de colección y análisis	21
h) Balance de los distintos compuestos en el suelo	22
h1) Sustancias carbonadas y nitrogenadas	23
i) Ciclo del carbono	23
ii) Ciclo del nitrógeno	25
h2) Ácidos orgánicos y lípidos	26
h3) Enzimas	27
h4) Factores de crecimiento	27
h5) Flavonoides	28
h6) Otros componentes	29
i) Clasificación de exudados de acuerdo a su movilidad en el suelo	29
j) Factores que afectan la exudación	31
i) Especies de plantas y estadios de desarrollo	31
ii) Temperatura y luz	32
iii) Humedad y atmósfera del suelo	33
iv) Nutrición de las plantas	34
Efecto de los microorganismos en la colonización de lugares con bajos nutrientes	35
v) Factores que dañan a las plantas	36
vi) Efectos de los microorganismos sobre la exudación	36
vii) Pulverización foliar	37
viii) Materia orgánica desprendida	38
Relación C/N	39

Influencia de las raíces sobre las poblaciones fúngicas del suelo. Efecto rizoplano-rizosfera. Lic. Viviana Chiochio Dpto de Ciencias Biológicas. Universidad de Buenos Aires. Agosto de 2000.

El propósito de este estudio ha sido investigar el efecto de las raíces de soja y trigo sobre las comunidades fúngicas del suelo de Pergamino, Provincia de Buenos Aires.

Debido a la complejidad química y microbiológica del ambiente de las raíces varias experiencias se hicieron con el objeto de comprender el efecto de estas sobre la población fúngica del suelo:

- a) aislamiento y enumeración de los hongos del suelo. Poblaciones.
- b) colonización de las raíces. Efecto rizósfera-rizoplano.
- c) relaciones microbianas.
- d) disponibilidad de nutrientes (exudados).
- e) efecto de los exudados sobre algunos aislamientos.

Influence of the roots on soil fungal population. Rhizoplane-rhizosphere effect. Lic. Viviana Chiochio Dpto de Ciencias Biológicas. Universidad de Buenos Aires. August 2000.

The aim of this work has been to study the effect of the soybean and wheat roots on soil fungi population at Pergamino, Buenos Aires Province.

Because of the enormous complexity of the chemical and microbiological environment of roots several experiences were necessary in order to understand root effect on soil fungal population:

- a) Isolation and enumeration of soil fungi.
- b) Root colonization: rhizosphere-rhizoplane effect.
- c) Microbial interrelationships
- d) Nutrient availability (exudates)
- e) Effect of exudates on some fungal strains

k) Variación de los exudados por efecto de las poblaciones micorrícicas y de <i>Rhizobium</i>	40
l) Clasificación de microorganismos en la rizosfera	42
Poblaciones	42
m) Tipos de interacciones entre los microorganismos del suelo	44
a) Positivas	44
b) Negativas	45

Objetivos

Capítulo N° 1

<i>Ensayo N° 1</i>	47
Materiales y Métodos	53
Resultados	58
<i>Ensayo N° 2</i>	69
Materiales y Métodos	69
Resultados	71
<i>Ensayo N° 3</i>	117
Materiales y Métodos	117
Resultados	117
Discusión ensayo 1,2 y 3	165
<i>Ensayo N° 4</i>	170
Materiales y Métodos	170
Resultados	170
Discusión del ensayo 4	192

Capítulo N° 2 Exudados radiculares

<i>Ensayo N° 1: Cultivo de plántulas de trigo en macetas en el campo experimental de Ciudad Universitaria</i>	195
Obtención de extractos	195
Resultados	199

<i>Ensayo N° 2: Cultivo de plántulas de trigo bajo condiciones controladas de luz y temperatura.</i>	202
A) en erlenmeyers con solución nutritiva mineral	202
Materiales y métodos	202
i) Determinación cuantitativa de hidratos de carbono solubles	204
ii) Cromatografía de intercambio iónico sobre la fracción S	204
a) Cuantificación de hidratos de carbono	205
b) Cromatografía en papel para la fracción F ₁ por ensayo a la gota	205
iii) Determinación de aminoácidos para las fracciones F ₂ y F ₃	205
iv) Determinación de azúcares en una placa de sílicagel para la muestra M	205
v) Determinación de aminoácidos en una placa para la muestra S y P	206
vi) Determinación de aminoácidos en placa de celulosa en la muestra P	206
vii) Determinación por el método Bradford para F ₁ , F ₂ , F ₃ y P	206
Resultados	207
B) con solución nutritiva mineral limitada	211
Materiales y Métodos	219
Resultados	224
Discusión del Capítulo N° 2	230
Capítulo N° 3	
Ensayo N° 1	238
Materiales y Métodos	238
Resultados	239
Discusión y conclusiones del Capítulo N° 3	244

Conclusiones Generales	245
Bibliografía	250
Anexos	273

Introducción

a) EL SUELO Y SU AMBIENTE

El suelo, es el medio natural para el desarrollo de las plantas, en él habita una comunidad diversa y compleja de algas, bacterias y hongos. Estos microorganismos, junto con los virus y los componentes de la microfauna (amebas, artrópodos, flagelados, nematodos y otros), forman la microbiota del suelo. Se estima que existen unas 30.000 especies de bacterias y 1.500.000 de hongos, de los que solo se han identificado 8% y 1% respectivamente.

Las partículas minerales y orgánicas, constituyentes de la fase sólida del suelo, se asocian en agregados. En la superficie de las partículas, en el interior de los agregados o asociados a las raíces, los microorganismos, hallan nichos adecuados para desarrollarse. Este conjunto, queda así inmerso en la atmósfera del suelo y su solución acuosa. Figura 1.

La actividad y la diversidad de la microbiota además de condicionar la fertilidad del suelo, determinan la estabilidad y funcionamiento de ecosistemas naturales y agroecosistemas. Se considera que, la diversidad microbiana es esencial para garantizar los ciclos de los nutrientes y los fenómenos de descomposición de material vegetal en cualquier ecosistema terrestre. En un gramo de suelo pueden existir decenas de millones de microorganismos, pero sin embargo, la disponibilidad de nutrientes asimilables, en particular de sustratos carbonados metabolizables, es baja. Por ello, la mayoría de los microorganismos suelen hallarse inactivos desde el punto de vista fisiológico.

Cuando se introducen plantas en el sistema, la situación de los microorganismos cambia de forma drástica, ya que las plantas son las principales proveedoras de sustratos energéticos al suelo.

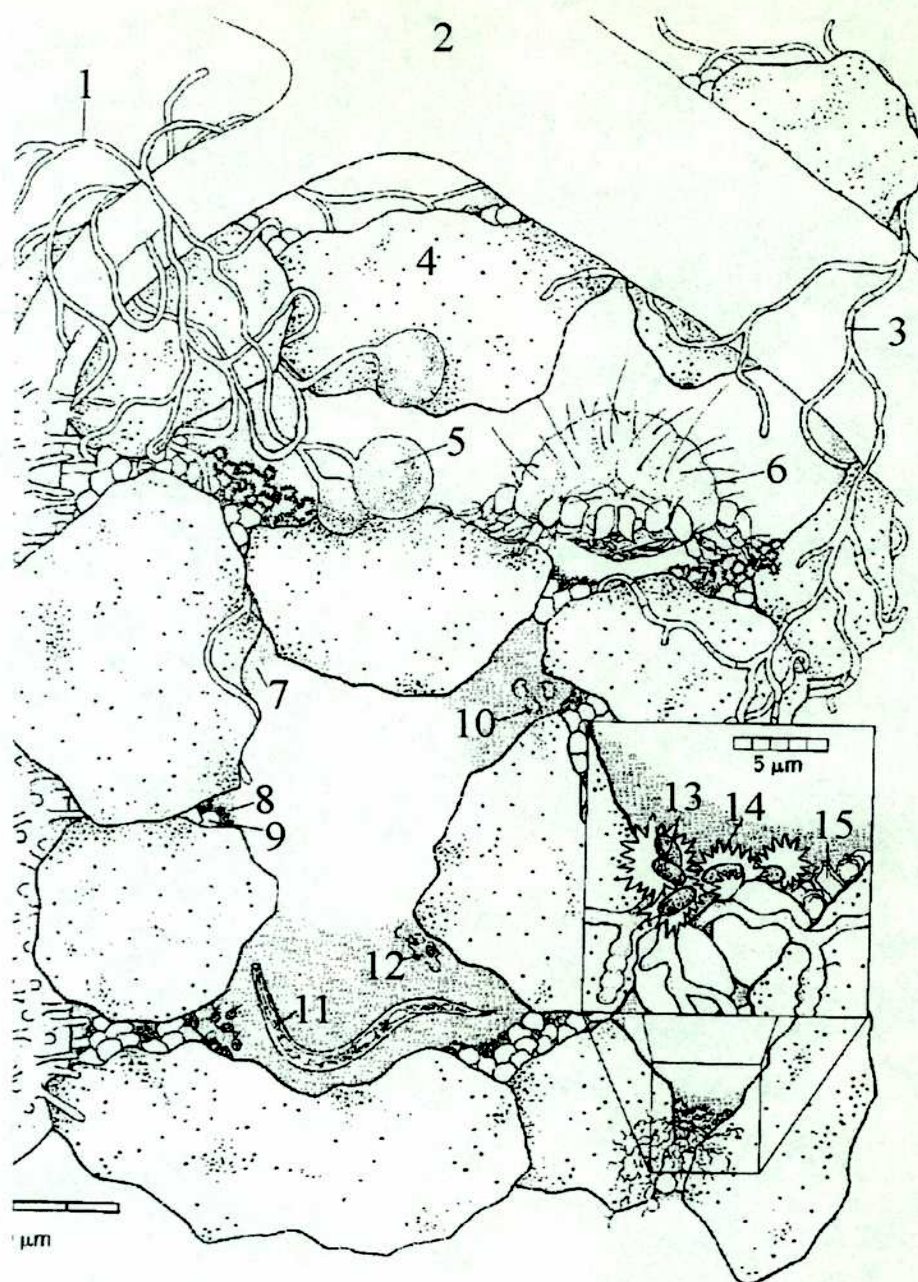


Fig. 1. El suelo como habitat de los microorganismos. Wollum(1998)
 1. Hifas de micorrizas; 2. Raíz, 3. Hifa de hongos saprofiticos; 4. Arena; 5. Espora de micorriza; 6. Hormiga; 7. Agua; 8. Arcilla; 9. Limo; 10. Protozoo ciliado; 11. Nematode; 12. Protozoo flagelado; 13. Bacteria; 14. Materia orgánica; 15. Arcilla.

b) LA RIZOSFERA

El año 1984 marcó el aniversario de tres notables eventos en el estudio de la rizosfera. Hiltner, en 1904, (80 años antes), acuñó el término "rizosfera"; Marton (50 años antes) obtenía la primer micrografía electrónica de un espécimen biológico en el suelo y 21 años antes, Jenny & Grossenbacher (1963) acuñaban la palabra mucigel para la mezcla íntima de los coloides del suelo, geles derivados de raíces y microorganismos en la interfase suelo-raíz.

Estudios con microscopía electrónica dieron tres modelos de ultraestructura de la superficie de la raíz:

1) Scott et al. (1958) propusieron que el gel de la superficie de la raíz estaba encerrado por una fina capa de cutícula. Más tarde, trabajos con microscopía electrónica de barrido (SEM), mostraron que las bacterias sobre muchas raíces estaban encerradas por una membrana papirácea. Estas no fueron visualizadas hasta que, esta membrana se removió por lisis microbiana o se rompió al prepararse muestras para su observación con SEM (microscopía electrónica de barrido).

Foster et al. (1983), encontraron esta membrana en raíces de gimnospermas, monocotiledóneas y dicotiledóneas tomadas del campo.

2) Jenny & Grossenbacher (1963) observaron que el gel no tenía un grosor determinado sino que, se incrementaba levemente con la distancia desde la superficie de la raíz y el límite externo se demostraba por tratamiento con partículas de hierro coloidal. Ellos confirmaron la observación hecha por Scott et al. en 1958, que dijeron que el gel estaba habitado por microorganismos; algunos de los cuales también secretaban polisacáridos. Así los geles de las raíces y los producidos por microorganismos eran inseparables desde el punto de vista químico y ultraestructural. Los autores que propusieron este modelo llamaron a este complejo de geles provenientes de raíces y microbios "mucigel". Figura 2.

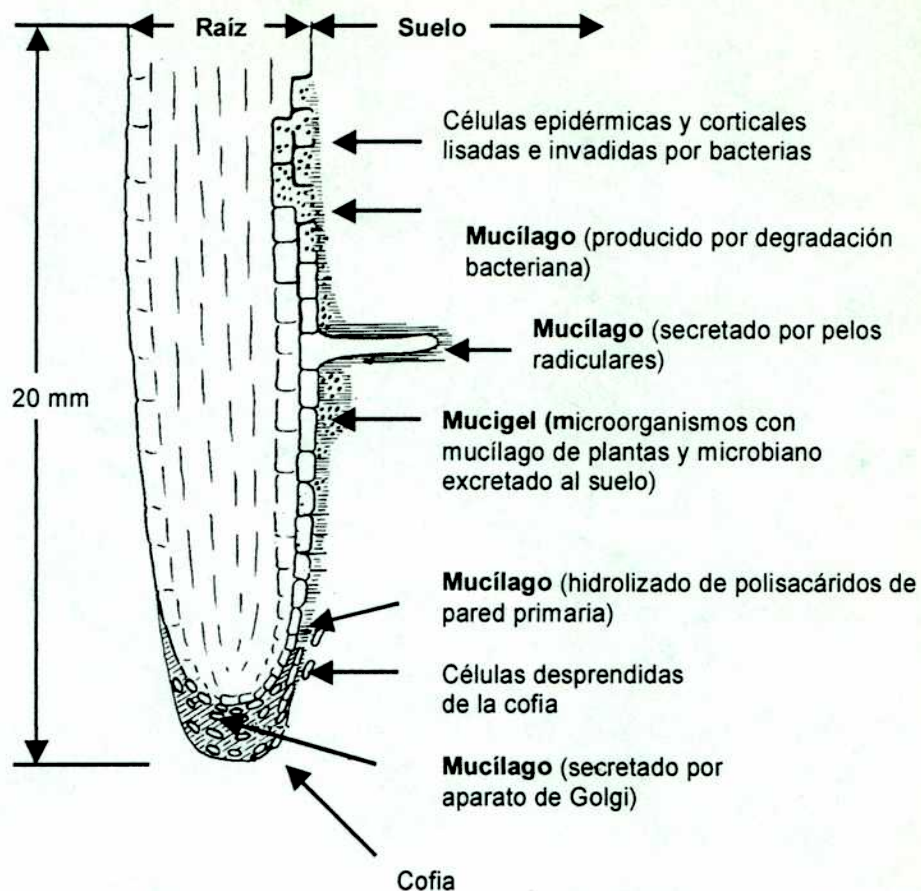


Fig. 2. Corte longitudinal de raíz mostrando el origen de los materiales orgánicos en la rizosfera. (Rovira et al., 1979).

3) En 1975, Leppard & Ramamoorthy postularon que la superficie de la raíz produce microfibrillas finas y largas que hacen contacto con los minerales del suelo. En algunos preparados estas microfibrillas parecen estar empaquetadas densamente y orientadas. Haynes, en 1980, sugirió que estas pueden conducir los iones desde la superficie mineral hasta el espacio libre de raíces atravesando la zona de los microorganismos que crecen en el rizoplano. La ultraestructura del

rizoplano también mostró diferencias de acuerdo con el origen, la ontogenia y el estado de desarrollo de la superficie de la raíz, así como con las condiciones de crecimiento y las técnicas utilizadas en la preparación del material a estudiar.

Las diferentes clases de materiales liberados por las raíces incluyen secreciones poliméricas (mucílagos, enzimas), exudados solubles en agua (azúcares, aminoácidos, hormonas, etc), lisados y gases (CO₂, etileno, terpenos), variando en cantidad y tipo con la distancia desde el ápice radicular.

Se ha calculado que 12 a 18% de todo el carbono fijado fotosintéticamente pasa al suelo y proviene de raíces sanas en cereales (Barber & Martin, 1976). La cantidad total de toda la materia orgánica, detritos celulares, exudados y liberados dentro del suelo ha sido estimado aproximadamente en 50-100 mg/gramo de raíces por día para algunas plantas (Foster et al, 1983) y están regulados por múltiples factores (Hale et al., 1981).

La liberación de mucílagos domina en la zona de la cofia, en la zona de extensión y en la zona de pelos radiculares, donde también se liberan exudados solubles. La muerte de células corticales y epidérmicas por encima de la zona de pelos radicales aumenta la cantidad de lisados en la rizosfera. Todas las sustancias difunden a diferentes distancias en el suelo adyacente.

Las rizosferas tratadas histoquímicamente para observaciones con TEM (microscopía electrónica de transmisión) y SEM (microscopía electrónica de barrido) mostraron una zona gelificada densa y homogénea, donde el espesor depende de la parte de la raíz examinada.

En raíces viejas esta zona es colonizada por numerosas bacterias. Este gel no es removido por lavado y es por eso la capa que usualmente se estudia con microscopio óptico (LM) y SEM utilizándose como modelo en estudios de la rizosfera. Solo la sonicación, lisis enzimática o agitación con esferas de vidrio logra remover esta capa de gel y los microorganismos que contienen. Esta capa es considerada morfológicamente el rizoplano. Está rodeada por una zona menos densa que difunde hacia la estructura del suelo y retiene el suelo adherido sobre las

raíces. Estudios con TEM y SEM mostraron que esta zona se extiende a menos que $100\ \mu\text{m}$ desde la superficie de la raíz.

Tan & Nopamornbodi, en 1981, comprobaron que había un cambio en la concentración de iones de Ca y P en los primeros de $400\ \mu\text{m}$ desde la superficie de la raíz. Tanto los modelos teóricos como las técnicas de plaqueo tradicionales muestran que la población de bacterias en la rizosfera es de alrededor de $1/10$ de la del rizoplano. Esta zona se distingue microbiológica e histoquímicamente, mide $10\text{--}400\ \mu\text{m}$ desde la superficie de la raíz. Puede ser descrita como rizosfera interna. Figura 3.

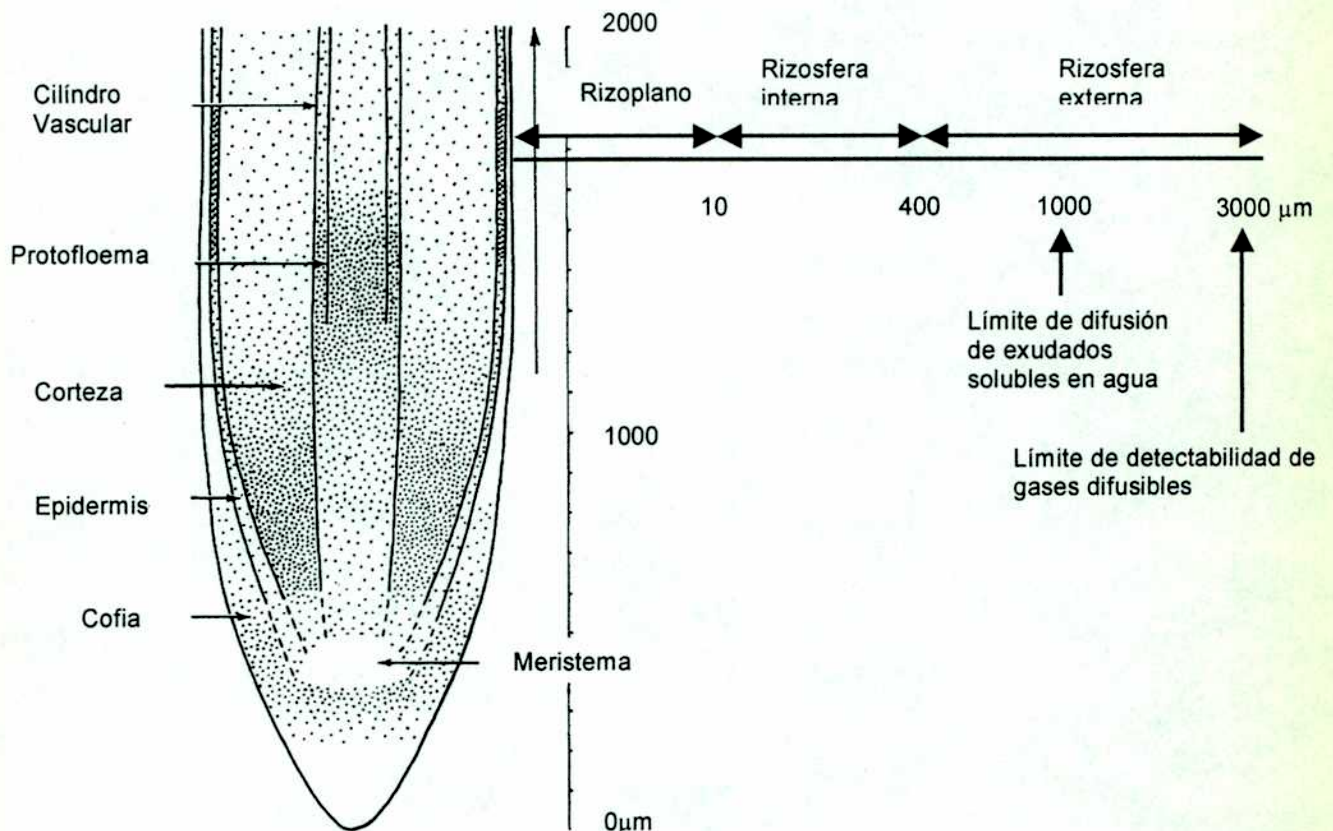


Fig. 3. Corte longitudinal de raíz. Zonas de la rizosfera. Esau (1982).

El número de microorganismos alcanza el máximo a 1000 μm desde la superficie radicular; este es probablemente el límite de difusión de los exudados solubles en agua. Algunos patógenos pueden detectar raíces a 3 mm de distancia; este es el límite externo de detectabilidad de gases difusibles de raíces. La zona entre 400 - 3000 μm se definió como rizosfera externa.

Las proporciones relativas de gases, sustancias solubles en agua y materiales poliméricos liberados por las raíces varía con la edad de la superficie radicular, el ancho del rizoplaneo y la estructura de la rizosfera interna y externa. Varía también con la distancia al ápice radicular.

La cubierta microbiana estudiada con TEM, ha arrojado valores de 120-160 $\times 10^{10}$ bacterias por cm^2 de rizoplaneo y los exudados liberados soportarían 40-100 mg bacterias / mg de raíces (2×10^{11} bacterias por mg de una raíz de 400 μm de diámetro).

La cubierta bacteriana medida con LM es del orden del 7%, dependiendo de las especies de plantas (Sarkar et al., 1979). Van Vuurde et al. (1979 a, b) encontraron que la cubierta de actinomicetes y hongos varía de 2 – 26% y de 2 – 4% dependiendo de la edad de la raíz (con un máximo a los 9 días). Por otra parte Bowen & Theodorou (1973) mostraron que la cubierta microbiana varía al 10% después de 21 días y al 37% después de 90 días. Estudios realizados con LM muestran que los microorganismos no están distribuidos aleatoriamente sobre la superficie de la raíz; la mayoría de bacterias y hongos están confinados a los espacios entre las células rizodérmicas.

Kloepper et al. (1992) proponen eliminar el uso del término, endorizosfera, tanto para describir un nicho ecológico como adjetivo para la descripción de los microorganismos que viven dentro de ese nicho. Ellos sugieren seguir usando el término rizosfera y rizoplaneo para describir los nichos y los microorganismos que ocupan nichos externos a las raíces, mientras que para los microorganismos encontrados dentro de las raíces podrían referirse como colonizadores internos de raíces o específicamente colonizadores corticales o vasculares. Estos

microorganismos pueden ser llamados también endofitos o microorganismos endorrícos.

c) ESTIMULACION DE LOS MICROORGANISMOS POR LA RIZOSFERA

El suministro de compuestos orgánicos a la rizosfera es de entre 50 y 100 mg. de materia orgánica seca por gramo de raíz. En contrapartida, los microorganismos desarrollan en la rizosfera actividades metabólicas de las que se benefician las plantas. El conjunto de interacciones que se establecen recibe el nombre de **efecto rizosférico**.

La estimulación de los microorganismos por la rizosfera, en virtud del efecto rizosférico se cuantifica en términos de la relación R/S, o sea, el cociente entre el número de microorganismos presentes en el suelo rizosférico y los que viven en zona libre de raíces, en zonas próximas a la planta. Este efecto comienza a manifestarse después de la germinación de las semillas, para alcanzar su máximo durante la floración y fructificación. En la senescencia de la planta, el efecto decrece en forma acelerada.

Las poblaciones de microorganismos en la rizosfera alcanzan 10^8 células por centímetro cúbico, densidad que resulta unas 10 a 1000 veces mayor que la del suelo no rizosférico. Figura 4.

Estudios realizados por Peterson (1958) en Canadá pusieron en evidencia que la edad de la planta y el tipo de suelo influyen la naturaleza de la biota fúngica asociada a sus raíces. A su vez en Inglaterra, Pugh (1963) comparó en el litoral marítimo los hongos asociados a suelos de duna y de pantano; el resultado de este estudio: un número mayor de aislamientos en las dunas, siendo esta diferencia más cuantitativa que cualitativa.

Los estudios sobre raíces de cebada, col y habas enanas durante los primeros 10 días de crecimiento indicaron que la colonización inicial puede ser realizada por una amplia variedad de hongos de suelo, pero esta mezcla de

poblaciones deriva rápidamente a una microbiota típica y estable de la superficie radicular formada por *Fusarium*, *Cylindrocarpon radicola* y especies de *Gliocladium* y *Penicillium*.

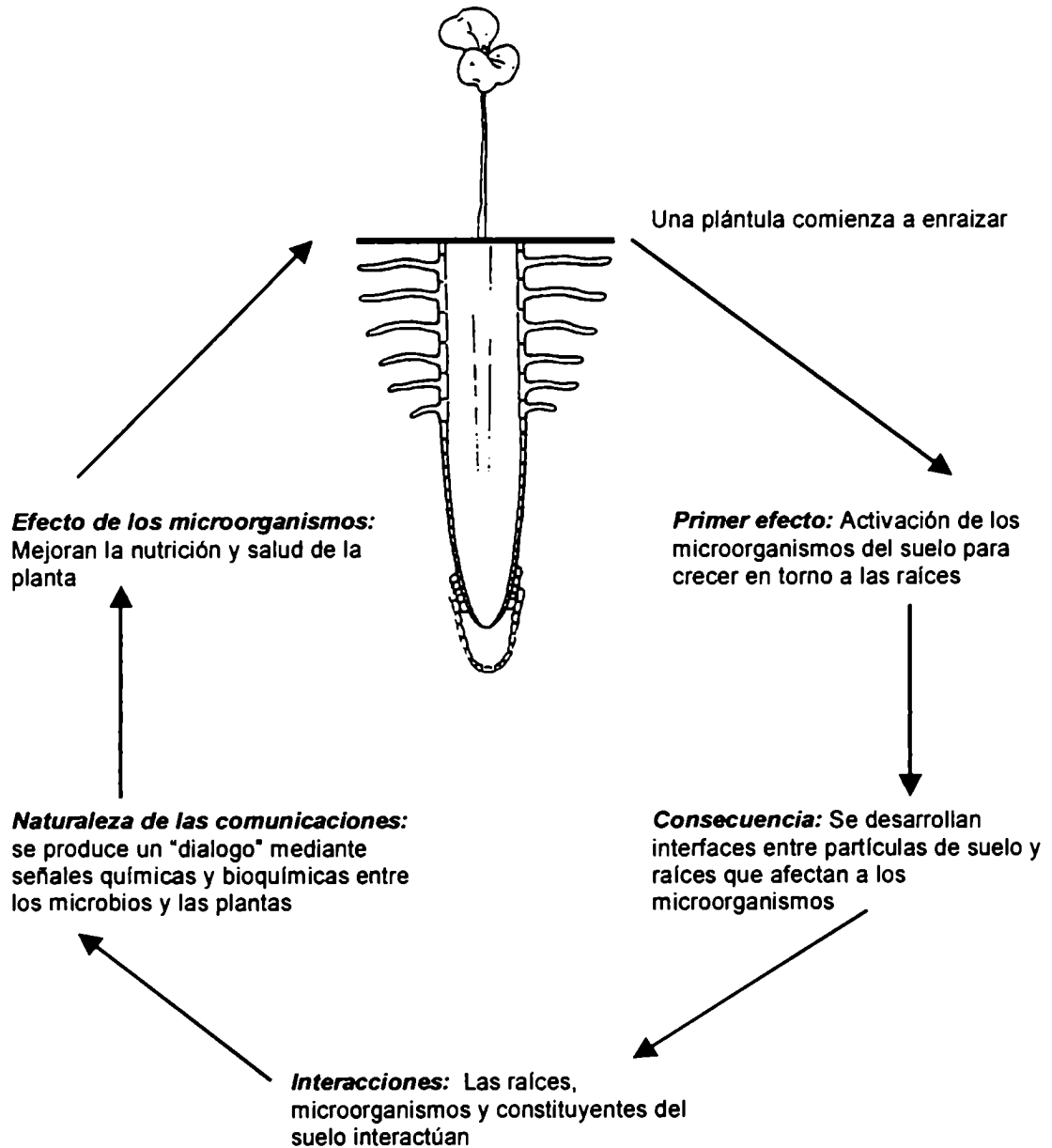


Fig. 4. Efecto rizosférico. Barea (1998).

Parkinson & Thomas (1965) realizaron estudios de poblaciones fúngicas comparando suelo rizosférico y no rizosférico de porotos enanos. Usaron tres técnicas: dilución de suelo con siembra, siembra de suelo, y lavado de suelo sembrando posteriormente las partículas en medio nutritivo. Esta última técnica dio una evaluación más acabada de los hongos activos en la rizosfera.

Esta técnica mostró, pequeñas pero consistentes diferencias, entre ambos suelos. En suelos rizosféricos fueron comunes las siguientes especies: *Fusarium spp.*, *Mucor spp.*, *Cylindrocarpon radicum*, formas estériles, *Varicosporium elatum* y *Humicola grisea*; en suelos no rizosféricos estuvo presente *Trichoderma viride*.

Lee & Baker (1973) estudiando la rizosfera de raíces de *Rhizophora mangle*, en Oahu, Hawaii, notó una marcada acción de las raíces, aumentando el número de hongos en la rizosfera con respecto al suelo salino circundante. Del total de los aislamientos el 87.7% correspondió a imperfectos, y el resto a Ascomycetes y Phycomycetes. Dentro de los imperfectos, el 31.5% fueron comunes al rizoplano y rizosfera y el 23.7% fueron comunes al rizoplano y al macerado de tejido radicular.

Rovira & Davey (1974) encontraron que típicamente el 4-10% del rizoplano está cubierto por microbios de suelo; sin embargo este valor es mucho más alto si las raíces están involucradas en asociaciones simbióticas directas como las micorrizas.

Hay relativamente pocos microbios sobre la cofia de la raíz y en la zona de elongación, siendo la zona de pelos radiculares la que está más densamente poblada.

Dentro de los microorganismos que colonizan el rizoplano y la rizosfera, las bacterias gram negativas son las más comunes, mientras que las coliformes pueden ser importantes durante el desarrollo de raíces (Campbell, 1985). De las gram negativas la más destacada es *Pseudomonas fluorescens*.

Los hongos se presentan en menor importancia debido probablemente a que el tamaño de los poros del suelo le impiden aproximarse a la raíz. Los grandes poros tienden a ser las rutas preferidas para los pelos radiculares y la difusión de

exudados de raíces y mucílagos los cuales proveen sustrato para las bacterias de la rizosfera.

Desde el punto de vista ecológico es más importante la actividad microbiana que el número de microorganismos.

Bowen & Rovira en 1973, estudiando el rizoplano de pino, encontraron que el crecimiento microbiano (medido como el tiempo de generación) de *Pseudomonas* fue más alto en la rizosfera (5 horas) que en el volumen de suelo circundante (3 días).

d) MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA DE LA RAÍZ

Los sistemas de raíces se extienden a través del suelo por división y elongación de células del extremo apical o cercanas a él.

Los meristemas apicales están protegidos por la cofia, la cual controla la curvatura geotrópica de la raíz. Los ápices radiculares están cubiertos por mucílagos (polisacáridos muy hidratados-sustancias pécticas) secretados por las células externas de la cofia (Esau, 1982).

Por debajo de la caliptra está la zona de la raíz donde se produce la división celular (zona meristemática), a continuación se encuentra la zona de elongación y diferenciación previo a la maduración y por último el desarrollo de los pelos radiculares. La extensión de los ejes principales de la raíz y de los laterales a través del suelo, sigue un esquema similar. Figura 3.

Los sistemas de raíces varían en su morfología, longevidad, actividad y composición como un resultado de las diferencias ambientales y de las especies de plantas. Su función está relacionada con el abastecimiento de agua y de nutrientes minerales y con el anclaje de la planta al suelo. Casi todos los sistemas de raíces tienen como requerimiento obligado condiciones aeróbicas en el ambiente del suelo.

El crecimiento de las raíces contribuye a la mayoría de las propiedades físicas del suelo. La velocidad con la que penetran en el suelo varía con la planta y

con las condiciones ambientales. En general se considera que crece unos pocos centímetros por día en los ejes principales; y un porcentaje algo más bajo en las raíces laterales. Al penetrar en el suelo, desplazan a las partículas y comprimen el suelo circundante a la raíz. Las arcillas minerales y en general, las partículas del suelo suelen orientarse con su eje menor paralelas al eje radicular. Esta disposición determina una zona diferente alrededor de la raíz disminuyendo el paso del agua, nutrientes, microbios y microfauna. Debido a esto la materia orgánica liberada por las raíces puede acumularse en el suelo cercano a la raíz.

El régimen del potencial agua de la rizosfera es muy diferente del resto del suelo, siendo generalmente más bajo el primero; esto causa un flujo neto de agua hacia las raíces estableciéndose un gradiente de nutrientes a través de la rizosfera.

El pH, varía mucho como resultado de la liberación de carbono desde las raíces y la toma selectiva de iones desde la solución del suelo.

Las plantas actúan como una bomba, fijando C de la atmósfera y entregándola al suelo como exudados de las raíces.

A pesar de esto, las concentraciones de carbono disponible alrededor de las raíces no son particularmente altas, ya que, los microorganismos lo incorporan rápidamente. La toma selectiva de iones por las raíces desde la solución del suelo, provoca el agotamiento de algunos iones en la rizosfera mientras que otros que no son absorbidos tienden a acumularse.

La absorción de nutrientes por la planta a través de las raíces está influenciada por la interacción con los microorganismos que influyen en la morfología y fisiología de la raíz, (en equilibrio con los nutrientes, a través de cambios de pH y de potencial redox), en la química del suelo (a través de cambios en la mineralización) y temporalmente, en la competencia por nutrientes (en especial a través del bloqueo del rizoplasma) y la formación de asociaciones simbióticas (por ejemplo micorrizas, nódulos en raíces) Nye & Tinker (1977).

e) ESTABILIDAD DE LOS AGREGADOS EN EL SUELO

Los suelos de pastura contienen una biomasa de raíces más grande que los suelos arados en virtud de la naturaleza perenne de las plantas. Consecuentemente su biomasa microbiana es al menos el doble que las de los suelos arables (Adams et al, 1981; Jenkinson et al, 1980; Lynch et al, 1980).

En cultivos de siembra directa, la proliferación de raíces en las capas superficiales (5cm de profundidad) de suelo es mayor que la de cultivos sembrados después del laboreo. En consecuencia, la biomasa microbiana resulta más grande en estos suelos.

La labranza no puede cambiar la actividad biológica total del suelo pero ésta probablemente altera su distribución en el perfil.

La estabilidad de los agregados del suelo incrementan con la biomasa (Lynch, 1981), sin embargo, la relación entre biomasa y efecto estabilizante depende de los microorganismos presentes.

En estudios realizados sobre el efecto de raíces sobre la estabilidad de los agregados del suelo, pocos intentos han sido hechos para distinguir entre los efectos de las raíces por si mismas y de los asociados a la biomasa microbiana.

Tisdall y Oades (1979) sugirieron que las AM son responsables de un incremento en la estabilidad de los agregados asociados con el crecimiento de las raíces de ryegrass (*Lolium multiflorum*).

En un modelo simple de agregación, Fletcher et al. en 1980 mostraron que las bacterias y partículas de arcillas, en los poros finos de los agregados, proveen una acción cementante, con los biopolímeros producidos. La interacción de cargas se debe a la neutralización de las cargas negativas netas de las superficies de las arcillas, y de las bacterias por puentes con iones bivalentes metálicos.

Tisdall y Oades (1982) clasificaron la organización de los agregados de acuerdo al tamaño de este:

- raíces e hifas (200 μm), detritos de plantas y hongos incrustados con sustancias inorgánicas (20 μm), detritos microbianos y fúngicos incrustados con sustancias inorgánicas (2 μm) y aluminosilicatos, óxidos y polímeros orgánicos adsorbidos a la superficie de las arcillas y uniones electrostáticas floculadas (0.2 μm).

Químicamente los agentes de unión pueden ser clasificados como transitorios (principalmente polisacáridos), temporarios (raíces e hifas fúngicas) y persistentes (componentes aromáticos resistentes asociados con cationes de metal polivalentes y polímeros fuertemente adsorbidos).

f) COLONIZACIÓN DE LAS RAÍCES POR LOS MICROORGANISMOS

Por el uso de diferentes técnicas de lavado de raíces (Harley & Waid, 1955a), demostraron que las asociaciones microbianas presentes en y entre las células de la corteza, difieren cualitativamente de las que se encuentran en la superficie de la raíz, y a su vez difieren de las de la rizosfera de suelo (Zagallo & Katznelson, 1957).

Si esto es así, hay un "continuum" en la población microbiana en dirección radial desde las raíces que abre la posibilidad del establecimiento de diferentes comunidades en la rizosfera del suelo. Hay una gran cubierta microbiana continua.

En cambio, las observaciones indican la presencia de numerosas comunidades pequeñas o microcomunidades que pueden estar fisiológicamente relacionadas.

Esto no pudo ser confirmado por microscopía ni por cultivos, ya que estos se hicieron a partir de aislamientos en medio artificial usando trozos pequeños de raíces del orden de algunos milímetros o centímetros.

Las raíces son colonizadas desde el suelo, desde las semillas o por la extensión de microorganismos a lo largo de la raíz (Parkinson et al., 1963; Bowen & Rovira, 1976), en los patógenos de raíz se encontraron evidencias de conexión entre plantas de un cultivo o con cultivos anteriores a través de la raíz o restos de

ellas (Slater; 1978, Newman et al.; 1981) en las MA y algunos saprófitos (Newman et al., 1981; Parkinson et al., 1963).

Newman (1985) determinó la pequeña distancia existente entre las raíces, muertas o vivas e hipotetizó una cerrada conexión entre raíces vecinas, especialmente con respecto a la flora fúngica. Además, de los estudios que realizó sobre rizodeposición, hongos y bacterias de rizosfera, densidad y descomposición de raíces, concluyó que los hongos aislados de la superficie de una raíz viva pueden ser dependiente de un sustrato de carbonado, que no proviene de ella sino de otra raíz muerta que se encuentra a unos pocos mm de distancia. Esto confirma la distribución espacial y temporal de los microorganismos sobre las raíces.

Los microorganismos asociados a las raíces dependen del tipo de suelo (Trolldenier, 1971), del estado nutricional de la planta (Van Vuurde, 1979^b), la humedad, (Thornton, 1965) y materia orgánica de suelo (Newman et al.; 1981), la temperatura (Rouatt et al., 1963) y la luz suplementada a las plantas (Harley & Waid, 1955a).

Los microorganismos saprobios de la rizosfera son además dependientes de otros componentes intrínsecos de la rizosfera, como la infección de raíces por patógenos (Beute & Lockwood, 1968), las micorrizas (Rambelli, 1973) y *Rhizobium* (Elkan, 1962).

La respuesta diferencial de los microorganismos a las especies de plantas ha sido demostrado por muchos patógenos de raíces y organismos simbióticos de raíces. Para los saprobios la influencia es menos obvia y también más dificultosa de imponer.

Hay evidencias en suelos arados (Schroth & Hancock, 1981; Jenkinson, 1977), en suelos de bosque (Gadgil & Gadgil, 1975) y en estudios de laboratorios (Stenton, 1958; Reid & Goss, 1982) que la cantidad total de C transformada en materia orgánica del suelo es más pequeña en suelos con vegetación que en suelos bajo barbecho. Esta descomposición la realizan los microorganismos.

Estudios de laboratorio mostraron que la disminución observada en la tasa de descomposición fue más grande cuando la masa de raíces era menor. Esto hizo pensar en que los productos gaseosos eran los responsables de esto. La formación de etileno por parte de las raíces disminuye la actividad fúngica y actuaría sobre los hongos que son los principales descomponedores de M.O. insoluble.

La capacidad de los microorganismos del suelo para sintetizar varios metabolitos es considerado como uno de los más importantes factores de fertilidad de suelos, estos metabolitos influyen en la formación de asociaciones entre los microorganismos de la rizosfera.

La rizosfera contiene acerca de 10^6 hongos, 10^7 actinomycetes 10^9 bacterias y 10^3 protozoos por gramo de suelo.

La mayoría de los hongos que crecen en el suelo de la rizosfera y el rizoplano están distribuidos ampliamente en el suelo. Un pequeño número crece en el rizoplano y está confinado a este habitat. Forman un grupo ecológico separado de especies saprofíticas o habitantes parasíticos de raíces débiles.

Los hongos habitantes del suelo incluyen especies comunes del género *Fusarium*, *Penicillium*, *Gliocladium*, *Mucor* y *Mortierella* que son encontrados sobre todo tipo de detritos de plantas caídos en el suelo. Las levaduras también se aíslan de rizosfera y algunas cepas de *Cryptococcus terreus* y pueden ser consideradas habitantes normales del suelo, aunque sus relaciones ecológicas son inciertas. (Last & Price, 1969).

Los hongos presentes en las raíces incluyen micelios estériles. Son frecuentes sobre las raíces de pasturas, cereales y plantas leñosas (Harley & Waid, 1955^a, Gadgil, 1965).

No todos los hongos rizosféricos colonizan el rizoplano. Las especies *Trichothecium roseum*, *Trichocladium asperum*, *Papulospora sp.*, *Stysanus stemonitis* (*Doratomyces stemonitis*), algunas especies de *Penicillium* y algunos hongos mucoraceos fueron raros o estuvieron ausentes de la superficie de las

raíces, Dix (1964). Los hongos de la rizosfera y del rizoplasma son dos comunidades distintas con muchas especies en común.

El efecto rizosfera tiende a decrecer con el incremento de la profundidad en el suelo. En tabaco (*Nicotiana tabacum*), Timonin & Lochhead (1948) recuperaron solo 4000 hongos por gramo de suelo rizosférico a una profundidad entre 25-28 cm y 550.000 por gramo a profundidades entre 0-12.7 cm. Esto, junto con la tendencia de las raíces por ser más numerosas cerca de la superficie del suelo, muestra que el efecto rizosfera es esencialmente un fenómeno de las capas superficiales del suelo.

g) PRODUCCIÓN DE EXUDADOS POR LAS RAÍCES

Durante muchos años se estimó los componentes orgánicos liberados desde las raíces, utilizando plantas que crecían en condiciones axénicas con solución nutritiva. Se comprobó que los fotosintatos exudados constituyen del 0.1 al 0.9% del total de los fotosintatos producidos por las plantas.

Rovira & Mc Dougall (1965, 1967) usando soluciones hidropónicas y cultivos axénicos de trigo encontraron valores de 0.1-0.4%. Barber & Gunn (1974) mostraron que 5-9% del peso total de las plantas se liberaron como exudados en medio líquido y al usar esferas de vidrio como soporte liberaron azúcares y aminoácidos equivalentes a valores que van del 5 a 9% de la fotosíntesis total.

El contacto entre las raíces y las esferas produjeron una estimulación mecánica que incrementó la exudación. Además hubo diferencias cualitativas con el control en la cantidad de aminoácidos.

Barber & Martin (1976) observaron que los exudados de trigo y cebada alcanzaban entre 7-13% del peso seco total de las plantas, en suelo estéril. En suelo no estéril los exudados radiculares aumentaron a 19-25%.

Otros valores fueron encontrados por Martin (1977) y Sauerbeck & Johnen (1977). Observaron que el C liberado a través de las raíces que crecían en suelo ascendió a un 20% del total de materia seca de lo fijado por fotosíntesis.

Martin (1977) concluyó que el 39% del C traslocado a las raíces fue liberado en el suelo, atribuyendo esto a la lisis de las paredes celulares de las raíces más que a la exudación a través de las células intactas.

Los componentes carbonados y nitrogenados exudados por las raíces de las plantas indudablemente sirven como nutrientes para la flora del rizoplasma y la rizosfera. El sitio, naturaleza y cantidad de estos determinará la colonización microbiana en la raíz (Bowen & Rovira, 1976; Hodge & Millard, 1998).

Newman & Watson (1977) desarrollaron un modelo matemático que permitió predecir los efectos de los cambios en el agua del suelo, densidad de raíces, exudación de raíces, población microbiana inicial y la respuesta de microorganismos a distintas concentraciones de sustratos y a diferentes distancias desde la superficie de la raíz.

Newman et al. (1979) estudiaron la abundancia de hongos, bacterias y micorrizas sobre la superficie de raíces de 4 especies (*Anthoxanthum odoratum*, *Lolium multiflorum var perenne*, *Plantago lanceolata* y *Trifolium repens*); haciéndolas crecer solas y en mezclas de 2 especies, en invernadero, en macetas y en el campo. La abundancia de los 3 grupos microbianos fue afectada significativamente por la presencia de las especies de las plantas. Se observaron los siguientes resultados: los valores de abundancia de hongos aislados en los casos en que había dos especies diferentes tuvieron valores intermedios con respecto a los valores de monocultivos. Otros resultados evidenciaron la exudación de algún compuesto que inhibe el crecimiento de hongos micorrícicos en plantas vecinas y en estos casos se observaron cambios en la abundancia de bacterias. Las variaciones estuvieron correlacionadas con cambios en la concentración de N en la planta hospedante. La competencia entre las plantas alteraría el "status" nutritivo, influenciando la exudación y el crecimiento microbiano.

Los polisacáridos bacterianos están activamente involucrados en el metabolismo del resto de los microorganismos del suelo y son usados por ellos para suplementar parte del requerimiento energético.

Las transformaciones microbianas de polisacáridos bacterianos en el suelo están acompañadas por la formación de cantidades considerables oligosacáridos, los cuales son parcialmente utilizados por la biota del suelo y parcialmente lavados del horizonte donde se producen.

El enriquecimiento del suelo con polisacáridos bacterianos inducen cambios en la estructura de la cenosis microbiana, activa los procesos de mineralización e incrementa la actividad metabólica de la microflora del suelo.

Jackson (1957), Rovira (1959, 1991) y Schroth & Snyder (1961) demostraron que los exudados estimularon la germinación de esporas fúngicas en el suelo. En efecto, hubo más esporas germinadas cuando los propágulos estuvieron en contacto con raíces o exudados radiculares.

Benizri et al. (1995), simularon la rizosfera haciendo crecer las plántulas de maíz en condiciones hidropónicas y asépticas para evitar la complejidad del ambiente del suelo. Los exudados que contienen C y N indujeron la germinación de *Fusarium graminearum*; demostrándose que los exudados contenían factores que estimulaban la germinación de las esporas de este hongo. Encontraron una correlación directa entre esporas germinadas y la inhibición inducida por inoculación de una cepa de *Pseudomonas*. (Elad & Baker, 1985; Simeoni et al., 1987). Esta bacteria fue efectiva como protectora y produjo compuestos antifúngicos.

Hepper & Jakobsen (1983) trabajando con centeno encontraron que las raíces producían lisina y glicina que estimulaban el crecimiento de *Glomus caledonium*.

Pearson & Parkinson (1961) y Schroth & Snyder (1961) encontraron que los exudados reaccionaban con ninhidrina y nitrato de plata en los ápices y en la zona

de elongación de las raíces de las plántulas de habas (*Vicia faba*) y porotos (*Phaseolus vulgaris*) que en la zona vieja de las raíces.

En cambio, Mc Dougall (1968) encontró más exudación de componentes marcados con C^{14} en la zona de raíces laterales de trigo que de la región de los ápices.

Bowen (1968) trabajando en plántulas de *Pinus radiata* observó que la pérdida más grande de Cl^{36} ocurrió en la región apical de las raíces.

En condiciones de campo, se observó la degeneración de células corticales de raíces (Waid, 1974). Estudios posteriores, empleando microscopía electrónica, pusieron en evidencia la invasión extensiva y degradación de los tejidos epidérmicos y corticales de las raíces por la microflora del suelo (Greaves & Darbyshire, 1975; Old & Nicholson, 1975; Foster & Rovira, 1976). Sin embargo no hubo indicaciones de que la pérdida de la corteza fue el resultado de la invasión microbiana.

g1) Clasificación de las sustancias liberadas por las raíces

Hale et al. (1981) basándose en estudios de Rovira et al. (1979), dio la siguiente clasificación:

exudados radiculares: metabolitos químicos y elaborados liberados a la superficie de la raíz o al ambiente radicular

exudación radicular: proceso que involucra numerosas vías y mecanismos bioquímicos.

Filtrados (leakages): componentes de bajo peso molecular que difunden dentro del apoplasto y vía el apoplasto y son movidos a la superficie de la raíz o salen directamente de células corticales o epidérmicas.

Secreciones: componentes que atraviesan las barreras de membranas con gasto de energía.

Mucílagos: hay cuatro fuentes de materiales orgánicos que contribuyen a la materia orgánica rizosférica:

- i) originados en células de la cofia de la raíz y secretados por cuerpos de Golgi.
- ii) polisacáridos hidrolizados de la pared celular primaria de la epidermis y las células que se desprenden de la cofia de la raíz.
- iii) secretados por células epidérmicas con pared primaria, incluidos los pelos radiculares.
- iv) degradación de las paredes bacterianas.

Componentes de bajo peso molecular liberados por raíces que son volátiles a la temperatura y presión normal.

Todos estos compuestos se ven aumentados por la presencia de microorganismos radiculares (Barber & Martin, 1976; Přikryl & Vančura, 1980), debido a daños físicos en el tejido cortical o a la liberación de metabolitos por los microorganismos que afectan la fisiología de la raíz, incrementando la exudación.

g2) Métodos de colección y análisis

Los métodos generalmente utilizados, pueden dividirse en tres grupos:

- a) Plantas que crecen en agua estéril o solución nutritiva. Los solutos de la solución se consideran como liberadas por las raíces.
- b) Plantas que crecen sobre sustratos sólidos (suelo, arena o suelo simulado). El lavado o lixiviado de las raíces y el sustrato se analizan por cromatografías y procedimientos bioquímicos.

c) Plantas crecen en el suelo u otro sustrato sólido y la parte aérea es expuesta a isótopos radioactivos. El material radioactivo liberado posteriormente por las raíces se detecta en los sustratos lixiviados.

Jones & Darrah (1993) encontraron que las plantas de maíz que crecieron en un cultivo estático de solución estéril, donde se acumulan exudados, liberaron 8 veces menos compuestos carbonados que las plantas que crecen en una solución que es reemplazada diariamente. Los modelos de simulación demostraron que los patrones de acumulación y las concentraciones finales de equilibrio dependieron de la velocidad de exudación, la distribución de la exudación, volumen de la solución, rango de crecimiento de raíces y la presencia de poblaciones microbianas.

También es conocido que una plántula en condiciones axénicas y en cultivo hidropónico satura su nivel de exudación. Por consiguiente, para lograr activar este mecanismo se requiere la renovación del medio por agregado de medio fresco. (Přikryl & Vančura, 1980). En estas condiciones, al cabo de 12 días, la cantidad de exudados colectado representó el 50% del peso seco de las raíces y el 12% del peso seco de la planta entera.

La remoción diaria de la solución nutritiva duplica además la exudación de los compuestos fenólicos mostrando que la exudación fenólica depende de la concentración externa y de la reabsorción de estos compuestos.

h) BALANCE DE LOS DISTINTOS COMPUESTOS EN EL SUELO

Rovira (1965a) fue esencialmente el encargado de reunir en tablas los datos obtenidos por él y otros investigadores.

Las plantas en cultivos no-bióticos y asépticos exudan material que no puede ser siempre distinguido de las sustancias originadas a partir de pelos radiculares desprendidos y de células de la cofia radicular.

Un problema común al evaluar los componentes exudados cuantitativamente es la falta de una expresión estandarizada para ellos. Se ha dado información en

términos de mg o μgr / planta, μgr / unidad peso seco raíz; % total del material (azúcares reducidos, aminoácidos, etc.) o número e intensidad de manchas sobre los cromatogramas.

h1) Sustancias carbonadas y nitrogenadas

i) Ciclo del carbono

La glucosa y fructosa son los carbohidratos más mencionados en los trabajos sobre exudados radiculares.

Cuantitativamente, los azúcares específicos en exudados de raíces de dos especies de plantas bajo las mismas condiciones de cultivo puede ser similar o puede variar considerablemente como ocurre por ejemplo con la cebada y el trigo (Vančura, 1964).

En trigo, Vančura (1964) encontró cantidades considerables de oligosacáridos, glucosa, arabinosa + fructosa, xilosa y ramnosa; mientras que en cebada no hubo valores altos de glucosa y ramnosa pero si de galactosa.

Moghimi et al. (1978 b), empleando técnicas cromatográficas determinó que el ácido 2 cetoglucónico fue el único ácido orgánico presente producto de la acción microbiana sobre la glucosa.

Las plantas de avena y arvejas produjeron glucosa y fructosa durante los primeros diez días de crecimiento. Luego, los azúcares no se detectaron en de los exudados radiculares, indicando una reabsorción o síntesis de oligosacáridos a partir de los azúcares originales.

Se ha postulado que el vector primario para la pérdida de C desde las raíces recién formadas es por difusión pasiva desde las células epidérmicas o vía el apoplasto y difusión por los espacios libres dentro del suelo (Curl & Truelove, 1986).

Para el potencial agua, >140 Kda, los compuestos carbonados se pierden a través del plasmalema y la pared celular de células radiculares de soja (Meiners et al., 1991).

Virtanen et al. (1936) encontraron que la lisina y el ácido aspártico excretado

asépticas del cultivo no fueron mantenidas estrictamente, las bacterias liberaron componentes amino por síntesis o por descomposición de células radiculares o fragmentos desprendidos.

La zona de estimulación de las poblaciones microbianas en la rizosfera está determinada por la extensión a la cual el carbono rizodepositado difunde a través del suelo. Este sistema fue modelado por Newman & Watson (1977), donde los microorganismos, particularmente los heterótrofos, aumentan su densidad.

Aproximadamente la mitad del Carbono orgánico en el suelo, se encuentra formando parte de estructuras aromáticas, el 20% está asociado con nitrógeno y el 30% restante está dividido en hidratos de carbono sencillos (degradables) y ácido fático. Figura 5.

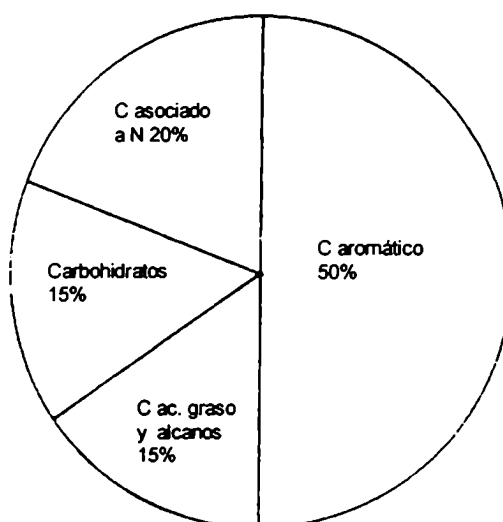


Fig. 5. Formas de carbono orgánico encontrado en suelo y sus cantidades relativas. Killham (1995).

Aunque el carbono orgánico de suelo existe en una gran variedad de formas, este se puede considerar como: carbono insoluble, carbono soluble y biomasa microbiana de carbono.

El carbono orgánico del suelo insoluble comprende más del 90% del carbono total del suelo, incluye los componentes principales de las paredes celulares de las plantas (celulosa y lignina) y los principales componentes de exoesqueletos de animales del suelo y paredes fúngicas (quitina). Esta fuente también incluye material descompuesto que forma el humus del suelo.

El C soluble provee un sustrato inmediato para un amplio rango de microorganismos del suelo y es producido por raíces de las plantas como exudados radiculares, por otros organismos vivientes en el suelo que producen exudados y por la descomposición enzimática del C insoluble y del C fijado en la biomasa microbiana. Debido a su rápida asimilación como sustrato, las concentraciones de C soluble en el suelo son muy bajas, representando menos del 1% de C orgánico del suelo.

La actividad de los descomponedores (saprobios) es la responsable del reciclaje del C en el suelo. Toda la materia orgánica pasa a través de estos antes de ser redistribuidos (Paul & Voroney, 1980).

La hojarasca y las raíces muertas contribuyen en gran proporción al carbono orgánico derivado de plantas incorporados al suelo (van Veen et al, 1989), proveyendo un amplio rango de sustratos potenciales a las comunidades descomponedoras en el suelo.

ii) Ciclo del nitrógeno

Según Rovira, en 1956, la población rizosférica puede cambiar la utilización de aminoácidos por sustancias más complejas derivadas del material proveniente de las células que se pierden de la raíz. En estudios realizados, utilizando semillas de avena y arvejas, que germinaron en tubos con arena, las cromatografías dieron como resultado que: en arvejas los exudados de glutamina, homoserina y treonina fueron abundantes en los primeros 10 días de crecimiento mientras que, luego de

los 21 días el exudado es relativamente más rico en asparragina y alanina. En avena durante el primer período estuvieron enriquecidos en lisina, serina y glicina, mientras que a los 21 días los aminoácidos predominantes fueron lisina, glicina, serina, asparragina y leucina. La aparición tardía de algunos aminoácidos no significa que fueran exudados luego de los 10 días, sino que la exudación al comienzo las cantidades son indetectables.

Al cultivar plántulas de pepino, habas y trigo en arena estéril, durante 14 días, Vančura & Hanzlíková (1972) observaron que en los exudados el N formaba parte de los aminoácidos libres más que de proteínas o péptidos.

Wallace & Lochhead (1950) mostraron que los requerimientos del 80 % de aminoácidos necesarios para el crecimiento de las bacterias rizosféricas podría ser satisfecho por el suministro de metiotina como único aminoácido, lo que sugiere que la metionina puede ser uno de los mayores aminoácidos excretados en la rizosfera.

El uso de esferas de vidrio para coleccionar exudados resultó beneficioso ya que la estimulación mecánica incrementó la exudación. Se establecieron diferencias cualitativas y cuantitativas con el control (Barber & Gunn, 1974).

h2) Ácidos orgánicos y lípidos

Los ácidos orgánicos requieren atención particular debido al rol importante que tienen en el metabolismo celular y su efecto sobre el pH de la rizosfera y la actividad microbiana. Los ácidos orgánicos son componentes importantes en el quelado de metales y juegan un rol importante en la absorción y traslocación de nutrientes.

Riviere (1960) cultivando plantas de trigo en solución nutritiva hasta el estadio de 6 semanas, encontró que altas cantidades de acético. Los ácidos propiónico, butírico, valérico y málico se encontraron en pequeñas cantidades y de otros sólo se encontraron trazas.

Los ácidos palmíticos, esteárico, oleico y linoleico se encontraron presentes en los exudados de habas (Papavizas & Kovacs, 1972) y maní (Thompson & Hale, 1983). En maní, se encontró además, colesterol, campesterol, stigmasterol y sitosterol.

h3) Enzimas

Krasilnikov (1958) aportó datos que sugieren la exudación de enzimas por las raíces a la rizosfera. Las determinó evaluando la hidrólisis del almidón, glicerofosfatos, glucosa fosfato, ácido ribonucleico y otros sustratos. Algunos de estos estudios se realizaron con plantas en cultivo en suelo, lo que permite la contaminación microbiana. Esto aceleraría la degradación de sustancias supuestamente hidrolizada por las enzimas de los exudados radiculares.

Las raíces liberan selectivamente componentes proteicos. Los sitios y mecanismos de esta selectividad no son muy bien conocidos, no puede ser descartada la degradación de las proteínas liberadas. Otros datos indican que las raíces no liberan enzimas proteolíticas. La absorción de proteínas por las raíces intactas también parece ser pequeña (Jensen & Mc Laren, 1960). Los mecanismos de secreción de proteínas por las células de las plantas no está bien entendido. Chang & Bandurski (1964) registraron que los exudados radiculares de plántulas de maíz contenían una amplia variedad de exoenzimas pero no propusieron un mecanismo para la liberación de estas. Una alteración en la permeabilidad de la membrana celular podría estar involucrada en la liberación de proteínas.

h4) Factores de crecimiento

Las vitaminas son necesarias para satisfacer los requerimientos de ciertos microorganismos en la rizosfera. Pueden ser provistos desde tres fuentes:

- i) síntesis por otros microorganismos

- ii) descomposición o autólisis de tejidos de animales o plantas
- iii) exudación desde las raíces de las plantas

Lochhead (1957), encontró que la mitad de los aislamientos de microorganismos de suelo y de rizosfera sintetizan uno o más de los siguientes factores de crecimiento: tiamina, biotina, riboflavina y vitamina B12. En la rizosfera, esto puede significar que los microorganismos por si mismos suministran los factores de crecimiento suplementando las cantidades escasas producidas por las raíces de las plantas.

h5) Flavonoides

Las plantas sintetizan una amplia variedad de componentes fenólicos en los tejidos del vástago y de las raíces, durante su crecimiento y desarrollo. Estos componentes son producidos vía el paso biosintético fenil- propanoide y son las unidades utilizadas para la formación de los pigmentos de las plantas (Ebel & Hahlbrock, 1982), para estructura de la pared celular (Hahlbrock & Grisebach, 1979), en la protección de la luz ultravioleta y defensa contra patógenos (Dixon et al., 1983). Son posiblemente usados para modificar la acción hormonal (Jacobs & Rubery, 1988). La síntesis de estos compuestos está inducida en respuesta a los estímulos ambientales y hormonales como el etileno (Ecker & Davis, 1987), la infección de patógenos y las lesiones (Lawton & Lamb, 1987).

Muchos microorganismos en la rizosfera catabolizan compuestos fenólicos secretados por las raíces de las plantas. Otros microorganismos asociados, pueden responder a componentes fenólicos específicos para interactuar con sus respectivas plantas hospedantes, aunque los genes involucrados en cada interacción no se encuentran aun bien identificados (Peters & Verma, 1990).

Los flavonoides son compuestos vegetales que poseen un esqueleto carbonado $C_6-C_3-C_6$ que se encuentran en: flavonona, aurona, chalcona, flavona,

flavanonol, flavonol, flavandiol 3,4 (leucoantocianidina), autocianidina, catequina, isoflavona y neoflavona.

Se conocen más de 200 flavonoides naturales, encontrándose ampliamente distribuidos en las plantas, tanto libres como glicosidados. Estos últimos contribuyen a darle color a las flores, frutos y hojas (Dominguez, 1973).

Los flavonoides presentan todos los matices de solubilidad, desde totalmente solubles en agua hasta insolubles en ella pero solubles en éter etílico, son insolubles en éter de petróleo.

En las Monocotiledóneas, en la familia Gramineae (estudiando 22 géneros y 33 especies), se encontró: leucoantocianinas en raíces, flavonas (apigenina y tricina), saponatetina, ácidos ferúlicos y escopoletina. Los flavonoles están ausentes en este grupo.

En las Dicotiledóneas, (estudiando el Orden Rosales, Flia Leguminosae), se encontró que la soja posee leucoantocianinas en las semillas, flavonas, flavonoles (miricetina, quercetina, kaempferol), isoflavonas (diadzein, formononetina, afrormosina) y cumarinas. (Harborne, 1957; Geinsman, 1962).

La identificación de estos compuestos se realizaron a través de: reacciones colorimétricas, propiedades de solubilidad, cromatografía en papel y en capa delgada y espectros de absorción. En el ultravioleta los flavonoides poseen absorciones características que están sujetas a desplazamientos pronosticables cuando se les añaden soluciones de ácido bórico, tricloruro de aluminio y acetato de sodio, que contribuyen a dilucidar su estructura.

Todos los flavonoides en etanol tienen una banda de absorción más o menos intensa, a 200 – 270 nm y otra más intensa a mayor longitud de onda, pudiendo observarse otras bandas menos intensas.

h6) Otros componentes

Una variedad de componentes definidos e indefinidos también son liberados por las raíces. Algunos de estos como el ácido hidrocianico y saponinas (glucósidos) nos recuerda que los exudados y la rizosfera contienen sustancias que son inhibitorias o que pueden resultar estimulantes para el crecimiento microbiano.

i) CLASIFICACION DE EXUDADOS DE ACUERDO A SU MOVILIDAD EN EL SUELO

Los compuestos liberados por las raíces fueron clasificados por Rovira & Davey (1974) de acuerdo a su movilidad en el suelo en: (1) solubles difusibles en agua, (2) difusibles volátiles, y (3) compuestos no difusibles. La última categoría incluye mucilagos y células que se separan de la raíz. Las cantidades de los 3 tipos de exudados varía con las especies, estado de desarrollo y condiciones de cultivo. Usando $^{14}\text{CO}_2$ en plantas de trigo, Rovira & Davey (1974) estimaron que la cantidad relativa de los 3 tipos de exudados desde las raíces fueron 1:8-10:3-5, respectivamente.

Los compuestos solubles en agua incluyen una variedad de componentes como mono y disacáridos, numerosos aminoácidos y ácidos orgánicos, flavononas y nucleótidos, enzimas y otras sustancias.

Otro grupo son los compuestos volátiles difusibles, Whitfield et al. (1981) aislaron 270 compuestos orgánicos distintos en la leguminosa *Acacia pulchella*, 176 de ellos fueron identificados como: 2 ácidos orgánicos, 17 alcoholes, 7 aldehídos, 12 cetonas, 112 esterres, 4 fenoles, 16 terpenoides y compuestos misceláneos.

Pueden ser activos en dos fases, la fase vapor donde la transferencia es rápida y la fase líquida en la cual los compuestos volátiles son solubilizados en agua desde la cual más tarde pueden revolatilizarse (Stotzky & Schenck, 1976; French, 1985).

Los compuestos volátiles son capaces de moverse a grandes distancias y más rápidamente que los solubles y son activos en una región mayor desde la superficie de la raíz a varios centímetros dentro del suelo.

Los solubles en agua se exudan desde las raíces, en cantidades significantes, y no difunden muy lejos en el suelo ya que son consumidos por las bacterias en la rizosfera (Newman & Watson, 1977). Los efectos de exudados solubles en agua son más evidentes en la superficie de la raíz y se extienden a pocos milímetros en el suelo.

Pseudomonas, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* y *Agrobacterium* fueron estimuladas por la rizosfera debido a la liberación de exudados y lisados (Alexander, 1977; Curl & Truelove, 1986). La variedad de componentes orgánicos liberados por las plantas resultó ser un factor clave en el establecimiento de las poblaciones de los microorganismos en la rizosfera de diferentes especies de plantas (Rovira, 1965; Trolldenier, 1967; Bowen & Rovira, 1991; Bolton et al., 1992).

j) FACTORES QUE AFECTAN LA EXUDACION

i) Especies de plantas y estadios de desarrollo

Las diferencias en la cantidad y composición de los exudados se hace más grande entre plantas lejanas filogenéticamente, siendo menor la diferencia si las plantas pertenecen a una misma familia.

A veces surgen diferencias en los resultados obtenidos sobre la misma especie de planta. Esto sugiere que la variación puede estar dada por el estadio en el crecimiento de la planta (semilla germinando, plántula establecida), en los componentes específicos evaluados y en las diferencias físico-químicas en el ambiente cultivo-planta.

Los exudados de raíces de plantas de cebada y trigo maduras tuvieron un espectro más bajo de azúcares que los exudados de plántulas. Las semillas liberan más componentes volátiles oxidables, como aldehídos alifáticos, durante los primeros 3-4 días luego de la imbibición (Stotzky & Schenck, 1976). La producción de volátiles requiere del metabolismo activo de las semillas.

Ha habido numerosos estudios caracterizando los exudados radiculares de las plantas, la mayoría involucra a plantas como trigo, maíz, cebada, etc. (Hale et al., 1978; Bolton et al., 1992). En ellos se vio que la calidad y la cantidad de los exudados radiculares están influenciados por los factores ambientales (Rovira, 1959; Martin, 1977; Vančura et al., 1977; Krafczyk et al., 1984).

Sin embargo, la similitud en los patrones de utilización de C de las comunidades microbianas de la rizosfera de *Lolium multiflorum* y *Agrostis tenuis* sugieren que estas dos gramíneas pueden tener un espectro similar de exudados.

ii) Temperatura y luz

Hale et al. (1971) y Hale & Moore (1979), mostraron que la exudación aumenta para la mayoría de las plantas con la temperatura hasta el óptimo, coincidiendo con el crecimiento de las plantas. Sin embargo, algunas especies liberan grandes cantidades a bajas temperaturas.

Esta diferencia revela diferente tasa de fotosíntesis y de translocación de fotosintatos a las raíces, actividad enzimática distinta en la síntesis o degradación de fotosintatos y variación en la permeabilidad de membrana (Hale & Moore, 1979).

Algunas plantas como el maíz y el pepino (Vančura, 1967) pueden ser inducidas a liberar altas cantidades de exudados al someterlas a un período de baja temperatura creando un "shock de frío".

Por otra parte, Rovira (1959) comprobó que la intensidad de luz al afectar la fotosíntesis influencia cuali y cuantitativamente la naturaleza de los exudados radiculares. Las raíces de tomate tuvieron niveles más bajos de ácidos aspártico,

glutámico, fenilalanina y leucina al reducir la luz y aumentaron los valores de serina y asparagina.

iii) Humedad y atmósfera del suelo

Los experimentos realizados para obtener la máxima cantidad de exudados muestran la necesidad de someter a las plantas jóvenes a un período de desecación parcial seguida de un rehumedecimiento y crecimiento continuo.

El stress creado por la baja humedad del suelo en muchos casos aumenta la exudación de varios componentes y da como resultado una alta densidad de la población microbiana.

Las plantas de arvejas, soja, trigo, cebada y tomate después de dejarlas secar hasta el punto de marchitez y rehumedeciéndolas, las raíces liberaron una cantidad más grande de aminoácidos que cuando se mantuvo a humedad constante (Katznelson et al., 1955). Al parecer, el incremento de α - aminoácidos surge como resultado de la proteólisis ocurrida durante el proceso de marchitez, este desbalance puede provocar una tendencia de los aminoácidos a moverse hacia el exterior (Kemble & Macpherson, 1954).

Además de los efectos directos sobre el proceso de exudación, la humedad del suelo también influencia la distancia a la cual los exudados pueden difundir en el suelo afectando el comportamiento microbiano, particularmente la migración de nematodos y el movimiento de esporas móviles de hongos.

La humedad y la atmósfera del suelo están estrechamente relacionados. El intercambio gaseoso, está ligado con el tipo de suelo y la humedad, que afectan el desarrollo de las raíces y la actividad microbiana.

iv) Nutrición de las plantas

La disponibilidad de nutrientes minerales y la absorción de nutrientes por el sistema de raíces están relacionados con la cantidad y calidad de nutrientes disponible en el suelo circundante a las raíces.

La liberación de aminoácidos en la solución nutritiva depende de la cantidad de K suministrado por las plantas. Esta decrece al aumentar uniformemente el K disponible.

Trolldenier (1971), realizó experiencias con trigo que crecía en condiciones de hidroponia no estéril. Encontró en la solución nutritiva bajas cantidades de aminoácidos por gramo de materia seca de raíz al agregar alta concentración de K, concluyendo que el K en altas concentraciones inhibe la exudación de aminoácidos.

En otros experimentos agregó diferentes fuentes de N. Al agregar nitrato obtuvo más ácido glutámico y aspártico (47 – 58%) que al suplementar la solución con nitratos y amonio (38-43%).

Otros autores, (Shay & Hale, 1973) detectaron diferencias cuanti y cualitativas en exudados, correlacionados con la edad de la planta y los niveles de calcio. Las plántulas de *Arachis hypogaea* (maní) exudó cuatro veces más azúcares a bajos niveles de Ca, pero no obtuvieron diferencias significativas en el crecimiento.

Harris (1958) y Marinos (1962) observaron que bajos niveles de Ca (suficientemente bajo como para causar síntomas visuales de deficiencia) produce cambios en la permeabilidad de membranas celulares, aún antes que aparezcan síntomas visuales de deficiencia.

Las diferencias en la permeabilidad del plasmalema pueden explicar el incremento en la exudación de azúcares. Si la permeabilidad de membrana se ha alterado en respuesta a diferentes niveles de Ca, se esperaría un gran flujo inicial en las plantas. Al colocarlas en soluciones hipotónicas, estas vuelven a tomar iones.

La diferencia en los tiempos de recuperación indica que la permeabilidad de membrana puede haber sido alterada por los tratamientos de Ca. Estos datos sugieren que bajos niveles de calcio incrementan la permeabilidad la que causa un incremento cuantitativo en la exudación de azúcares en raíces de maní.

Efecto de los microorganismos en la colonización de lugares con bajos nutrientes

Haystead & Marriott (1979), Nakas & Klein (1980), Sherwood & Klein (1981), Dahm (1984a,b) y Gaskins et al. (1985) han mostrado que la microflora de la rizosfera es un componente activo del ecosistema que provee nutrientes a los productores primarios o bien actúa como mecanismo buffer en las plantas para competir con el stress ambiental (Coleman et al. 1983).

Sin embargo, bacterias de la rizosfera han demostrado tener 4 o 5 veces más capacidad para efectuar cambios bioquímicos rápidos que las no rizosféricas (Rovira & McDougall, 1967; Richards, 1972).

Estudios en el año 1988 mostraron relaciones críticas entre exudados radiculares, microflora rizosférica y micro y mesofauna. Estas tienen la posibilidad de acelerar el ciclo de nutrientes e intensificar la capacidad de las plantas para adquirir nutrientes en condiciones de stress nutritivo (Clarholm, 1985; Ingham et al., 1985).

Los exudados solubles liberados por las plantas pueden ejercer un aumento de la inmovilización y remineralización por microfauna de P y N inorgánico), "efecto priming" sobre el crecimiento microbiano (Coleman et al., 1977). Esta regeneración aumentada de nutrientes puede jugar un rol importante en el establecimiento y crecimiento de plantas, particularmente en situaciones pobres de nutrientes.

v) Factores que dañan a las plantas

Los experimentos realizados bajo condiciones controladas a veces dañan la superficie de la raíz aumentando la cantidad de exudados.

El efecto de las esferas de vidrio utilizadas por Barber & Gunn (1974) ponen en evidencia que la más mínima presión o resistencia es suficiente para influenciar la exudación.

Los fisiólogos piensan que cualquier destrucción en las plantas, causadas tanto por defoliación, enfermedades foliares, daños por herbicidas interfieren en el proceso de fotosíntesis y en consecuencia en la exudación de raíces.

Otras formas de daño o injuria no mecánica, resulta de algún componente de la solución nutritiva, como el cloruro de sodio que causa una disminución en la cantidad de aminoácidos encontrados en los exudados radiculares de cebada (Polonenko et al., 1983). Este provoca stress osmótico, afecta la permeabilidad de membrana, la absorción de nutrientes y de oxígeno y el movimiento de exudados desde las raíces al suelo.

vi) Efectos de los microorganismos sobre la exudación

El estudio del efecto de los exudados radiculares sobre las poblaciones microbianas es dificultoso debido a la inmediata utilización y transformación de los compuestos por los microorganismos (Hodge et al., 1998).

El primer requerimiento para realizar un estudio de exudados radiculares es la exclusión de microorganismos del sistema de cultivo de plantas. Esto permite separar los productos metabólicos de ellos y los componentes de los exudados.

Rovira & Davey (1974) mencionaron cuatro vías por las cuales los microorganismos pueden afectar los exudados:

- i) afectando la permeabilidad de las células de las raíces
- ii) afectando el metabolismo de las raíces

- iii) absorbiendo ciertos exudados o componentes
- iv) alterando la disponibilidad de nutrientes a la planta

Otros autores (Curl & Truelove, 1986) reducen la acción de los microorganismos en suelos a:

- absorción y utilización de componentes exudados
- síntesis de metabolitos microbianos en la rizosfera

Přikryl & Vančura (1980) al cultivar plantas de trigo en presencia de *Pseudomonas putida* duplicó el aumento de los exudados obtenidos en cultivo axénico. La exudación es afectada también por las citoquininas producidas por los hongos del suelo y bacterias (Thompson & Hale, 1983).

Rhizobium, produce ácido indolacético aumentando el crecimiento de la raíz. Además incrementa la cantidad de azúcares no reductores: poligalacturonasas y metilesterasas.

Los efectos de las MA sobre la exudación se infiere del aumento que se produce en las poblaciones de bacterias solubilizadoras de fosfato, bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre ya que es dificultoso separarlas de la actividad de la raíz.

vii) Pulverización foliar

Los exudados radiculares pueden ser alterados por la aplicación de algunos componentes a las hojas (Rovira, 1969; Hale et al., 1971, 1978; Rovira & Davey, 1974). A través del uso de materiales radioactivos, autoradiografías y bioensayos, se probaron sustancias tales como reguladores de crecimiento, antibióticos y nutrientes. Estos al aplicarse sobre el vástago se mueven desde el follaje hacia las raíces y salen de estas hacia el medio de cultivo por exudación.

En las aplicaciones foliares con nitrógeno, la concentración de aminoácidos aumentó mientras que disminuyó el contenido de azúcares. Al agregar P, cambió la relación (Balabsuramian & Rangaswami, 1969).

El principal sitio de liberación de nitrógeno al suelo en plantas jóvenes son los ápices de raíces. Schroth & Snyder (1961) trabajaron con semillas germinadas de poroto (*Phaseolus vulgaris*) entre papeles de filtro. Identificaron, con reactivos específicos, los ápices como los sitios principales donde los exudados difusibles contenían azúcares y aminoácidos.

Jones & Darrah en 1993 demostraron que la pérdida de azúcares en raíces de maíz ocurre de forma pasiva, y no está espacialmente restringida a regiones apicales como propuso Trofymow et al. en 1987.

Pearson & Parkinson (1961) encontraron que el centro de máxima exudación de aminoácidos en haba (*Vicia faba*) estaba a 28 mm del ápice por debajo de la zona de las raíces laterales, correspondiendo con una región de alta actividad proteolítica. El volumen de materia orgánica liberada de los ápices jóvenes de raíces es sin embargo, no difusible (Mc Dougall & Rovira, 1970) y experimentos de Rovira (1973) con plantas marcadas con C¹⁴ indicaron que el sitio de máxima acumulación de material insoluble es la zona de elongación de las mismas.

viii) Materia orgánica desprendida

Al realizarse observaciones microscópicas se estableció que las coñas enteras de raíces, fragmentos de tejidos y células individuales son liberadas durante el crecimiento (Griffin et al., 1976).

Las raíces que están creciendo activamente liberan componentes orgánicos en la rizosfera por desprendimiento de células, secreciones, lisados y exudados (Lynch & Whipps, 1990; Bowen & Rovira, 1991).

Estas sustancias soportan comunidades microbianas en la rizosfera, las cuales incrementan la densidad de la población y su actividad. A veces modifica la comunidad presente en el suelo (Curl & Truelove, 1986; Bowen & Rovira, 1991).

Los organismos no simbióticos, aeróbicos, fijadores de nitrógeno como *Azotobacter* están activos y las bacterias denitrificantes están incrementadas en la rizosfera, dado que algunos son facultativos anaerobios, y como la raíz crea zonas de anaerobiosis, los denitrificadores y los anaerobios facultativos son más competitivos que los heterótrofos aeróbicos.

La rizosfera presenta una zona de alto potencial denitrificación, algunos estarán fuertemente expresados en términos de actividad si el suelo se vuelve saturado de agua periódicamente. La expresión de este potencial dependerá de la agregación del suelo o de la saturación del mismo.

Relación C/N

Las comunidades microbianas de la rizosfera son importantes en el funcionamiento del ecosistema, en la interacción directa con las plantas (deletéreos o benéficos para el crecimiento) y al ciclaje de la materia orgánica y los nutrientes.

Esto es esencial para entender los efectos de la elevada incorporación al suelo de CO₂ en forma orgánica y sobre los procesos del suelo en los que interviene el C y la biomasa microbiana.

La presencia de bacterias fijadoras de N₂ de vida libre en la rizosfera y el rizoplano permitió especular acerca de la cantidad de C por las bacterias para obtener una actividad nitrogenasa significativa. (Beck & Gilmour, 1983).

Los fotosintatos solubles exudados por las plantas no alcanzaban para suministrar a estas.

Krafczyk et al. (1984), Barber & Gunn (1974) y Barber & Martin (1976) reflexionaron acerca de los experimentos que han sido criticados por no reflejar las condiciones naturales y que no tomaron en cuenta las sustancias no solubles en agua que

proviene de las raíces. Sin duda, el material mucilaginoso, células de la caliptra y detritos de raíces son la fuente más importante de materia orgánica en el suelo, su descomposición influye en la actividad microbiana.

Un incremento en la relación C/N de la hojarasca se produce bajo un enriquecimiento de CO₂ (Norby et al., 1986; McKee & Woodward, 1994; Thompson & Drake, 1994). Consecuentemente, los rangos de descomposición pueden ser reducidos, al menos en el corto período, cuando la biomasa microbiana tiene pocos nutrientes disponibles (van Veen et al., 1991).

k) VARIACIÓN DE LOS EXUDADOS POR EFECTO DE LAS POBLACIONES MICORRÍDICAS Y DE RHIZOBIUM

Curl & Truelove (1986), Hawes (1990); Rovira (1985), Bansal & Mukerji (1994) estudiaron el efecto que tenían sobre la población microbiana el establecimiento de los hongos AM dentro de las raíces. Ellos producen cambios cuanti y cualitativos en los patrones de exudación (Graham et al. 1981). La explicación aceptada es que los efectos de los hongos AM sobre las plantas son nutricionales estando involucrada especialmente la disponibilidad de fósforo (Paulitz & Linderman, 1991). Los cambios observados en la micoflora de la rizosfera incluyen la supresión de patógenos en las plantas, haciendo que el crecimiento de éstas sea más vigoroso. Este hecho se mezcla con los efectos nutricionales de las AM.

La colonización y establecimiento micorrícico cambia la composición mineral de nutrientes, el balance hormonal, los patrones de localización de C, y otros aspectos de fisiología de plantas (Azcón-Aguilar & Bago, 1994; Smith et al., 1994). El transporte de nutrientes atribuidos a los hongos AM, cuando están activos, y la liberación de materiales, cuando están senescentes, representan un suministro de nutrientes en la rizosfera (Harley & Smith, 1983). La simbiosis afecta la composición química de exudados radiculares mientras que el desarrollo de un micelio de suelo

micorrízico también introduce modificaciones físicas en el ambiente circundante a las raíces. Estos cambios afectan la comunidad microbiana rizosférica formando lo que se denomina micorrizosfera (Linderman 1992). Estos cambios afectan cuanti y cualitativamente las poblaciones microbianas tanto en la rizosfera como en el rizoplano (Azcón-Aguilar & Barea, 1992; Linderman, 1992). Una función típica del micelio AM en el suelo es servir como fuente de carbono a la actividad microbiana, esto resulta en una importante contribución de la micorrizosfera al mejoramiento de la calidad del suelo (Bethlenfalvay & Schüepp, 1994).

Por otra parte, los microorganismos del suelo pueden afectar la formación de micorrizas. Los microorganismos específicos del suelo son capaces de beneficiar el establecimiento de simbiosis mutualistas en raíces de plantas y en la correspondiente rizosfera (Azcón-Aguilar & Barea, 1992; Fitter & Garbaye, 1994; Fracchia et al., 1998; Fracchia et al., 2000; García-Romera et al., 1998; Godeas et al., 1999; Puppi et al., 1994). Los cambios microbianos inducidos en los patrones de exudación radicular o en el balance hormonal de las plantas puede afectar la formación de la simbiosis AM.

Janse (1896) reportó la coexistencia de bacterias y hongos colonizando el sistema radicular de plantas leguminosas. Este hongo fue más tarde descrito como un hongo micorrízico arbuscular (Jones, 1924, y Asai, 1944) y se encontró que la nodulación de las raíces por las bacterias depende en gran medida de la formación de micorrizas.

Debido a la demanda de P en el proceso de fijación de nitrógeno, el principal efecto beneficioso de las AM sobre la simbiosis de *Rhizobium* es el de proveer P por el hongo. En adición, hay un alto requerimiento de nitrógeno por las AM para sintetizar quitina, el principal constituyente de las paredes. Por eso, la nodulación y la formación de AM terminan por ser procesos interactivos y compiten por carbohidratos cuando la fotosíntesis del hospedante es limitada.

I) CLASIFICACION DE MICROORGANISMOS EN LA RIZOSFERA.

a) Poblaciones

Los microorganismos adquieren sustratos en el suelo de diferente forma. Esto fue considerado primeramente por Winogradsky en 1924. En experimentos de laboratorio los organismos zimógenos o fermentativos rápidamente aumentan la biomasa en respuesta a la entrada de sustrato fresco, luego esta declina a menos que tengan otra fuente de energía disponible. El suelo también sostiene una cantidad constante de biomasa la cual responde a la entrada de sustrato fresco, esa es la población autóctona, la cual necesita solamente una pequeña fuente energética para su sobrevivencia. En la terminología moderna estos grupos pueden ser considerados como estrategistas r y K respectivamente. (Bowen, 1980).

Una amplia variedad de organismos viven en la vecindad de las raíces. Estos incluyen miembros de la mayoría de grupos taxonómicos de organismos heterotróficos aeróbicos y anaeróbicos desde bacterias a hongos y de protozoos a animales.

Se pueden distinguir cinco categorías:

- 1) Organismos saprotrofos o saprobios: son capaces de usar un amplio rango de moléculas orgánicas complejas (lignina, proteínas, glicoproteínas, celulosa y otros polisacáridos), no difieren mucho de los que viven lejos de las raíces. Son capaces de habitar sobre materia orgánica viva o muerta. Son más numerosos en la rizo/micorrizosfera.
- 2) Organismos especializados de la micorrizosfera: estos organismos dependen completamente de las moléculas orgánicas simples (azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos) liberados por las plantas y sus simbiontes fúngicos. Compiten entre ellos, con los simbiontes y los patógenos en la superficie de la raíz, en la

colonización y en los estadios de pre-infección. Está representado por las llamadas rizobacterias como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum sp.*

- 3) Patógenos de raíces: son biotróficos y penetran en el tejido radicular. Su interrelación con el ambiente y con otros microorganismos habitantes de la rizosfera es compleja, debido a que su ciclo de vida en parte ocurre fuera y en parte dentro de la raíz. Causan daño en el tejido radicular, alteran la función de absorción y perjudican a la planta. Durante su fase fuera de la raíz compiten por los exudados radiculares con otros organismos de la rizosfera y micorrizosfera. Incluye algunas bacterias y hongos como: *Phyitium sp.*, *Fusarium sp.* y *Rhizoctonia sp.*.
- 4) Simbiontes de raíz: son biotróficos y dependientes de la raíz. Completan como el grupo anterior el ciclo de vida fuera y dentro de la raíz. Son benéficos para las plantas ya que fijan nitrógeno atmosférico (*Rhizobium* y *Frankia*), formando nódulos con las raíces de algunas familias de plantas o proveen agua, minerales y otras sustancias de crecimiento como hacen los hongos micorrícicos.

Estos grupos, 3 y 4, al igual que el 2 dependen de moléculas pequeñas provistas por la planta.

- 5) Predadores: Los miembros de este grupo: protozoos, nematodos, hormigas, colémbolos y otros insectos, se alimentan de los organismos citados previamente y reducen sus poblaciones.

m) TIPOS DE INTERACCIONES ENTRE LOS MICROORGANISMOS DEL SUELO (Bottomley, 1998).

El crecimiento microbiano en el suelo es transitorio y depende de la disponibilidad de nutrientes y adecuadas condiciones físico-químicas. En la rizosfera hay una cantidad determinada de nutrientes disponibles, mezclada con materia orgánica lábil y humus. Puede ser utilizada solo por microorganismos equipados con las enzimas necesarias para atacar este sustrato complejo (Stevenson, 1982).

Cada situación de crecimiento permite a los microorganismos expresar sus características individuales de crecimiento y competir por los nutrientes. Entre ellos se pueden establecer distintos tipos de interacciones:

a) Positivas

- i) **Comensalismo:** este término se refiere a una asociación en la cual una población o microorganismo se beneficia con la interacción y el otro permanece inafectado.
- ii) **Sinergismo:** ambas poblaciones resultan beneficiadas con la asociación. Esta interacción no es esencial para que los dos microorganismos existan en ese ambiente.
Sintrofia: se refiere a la interacción de 2 o más poblaciones que suministran cada una a otra necesidades nutricionales. Frecuentemente involucra la posibilidad de una población a suministrar factores de crecimiento a otra población.
- iii) **Mutualismo:** también llamado simbiosis. Esta asociación usualmente ocurre entre organismos específicos más que entre poblaciones. Esta relación puede ser altamente especializada entre los 2 organismos y le

permiten a estos ocupar juntos el habitat que nunca podrían ocupar solos.

b) Negativas

- i) **Prelación:** esta interacción se produce cuando una población tiene un impacto negativo sobre el tamaño de otra población por reducir su número.

La actividad de la población sobreviviente puede ser estimulada por la liberación de nutrientes durante la actividad de alimentación.

- ii) **Competición:** en esta interacción, ambas poblaciones compiten por la misma fuente limitante, y tiene un efecto negativo una sobre la otra.

- iii) **Amensalismo:** en este tipo de interacción una población gana una ventaja competitiva sobre la otra y produce sustancias que inhiben el crecimiento.

Muchos hongos y bacterias tienen el potencial para producir sustancias de crecimiento antimicrobiano que pueden servir para inhibir otros microorganismos vecinos.

De lo visto anteriormente, en la rizosfera se expresa un proceso interactivo de flujos causa - efecto interrelacionado y eficaz: los microorganismos de la rizosfera mejoran el crecimiento, nutrición, salud y resistencia al estrés de la planta, mientras que ésta, así fortalecida, es una fuente de energía para el desarrollo de la microbiota alrededor de las raíces. Los componentes de la microbiota, estimulados en la rizosfera, intervienen en la formación de agregados, con la consiguiente mejora de la estructura y calidad del suelo, lo que favorece el desarrollo de las plantas, para cerrar la cadena de interacciones característica de la biología de la rizosfera.

Los efectos de las plantas sobre los microorganismos del suelo y el efecto de los microorganismos sobre las plantas son interactivos, interdependientes y enormemente complejos. Las plantas proveen en los exudados radiculares las materias primas que alimentan la maquinaria microbiana de la rizosfera, la cual posee el poder para promover buena salud y crecimiento de una planta o crear el monstruo que la destruye.

Objetivos

Las comunidades fúngicas del suelo ha sido un tema muy estudiado en los '70, sin embargo muchos problemas quedaron pendientes de resolver, sobre todo aquellos relacionados con el efecto ejercido por la raíz al introducirse en el suelo, debido a lo complejo del sistema.

Algunas de las preguntas son:

Las especies fúngicas que colonizan el rizoplano y la rizósfera de dónde provienen?

Cuál es la sucesión de especies? es igual para todas las plantas en un determinado lugar?

Los exudados de las raíces ejercen presión de selección sobre las especies del suelo?

Cuáles son los compuestos que exudan las raíces de las distintas especies de plantas?

Se mantienen constantes a lo largo del ciclo de la planta?

La cantidad de micelio se mantiene constante ? es homogéneo en su distribución?

Algunos de estos problemas han sido resueltos a lo largo de este trabajo, cumpliendo así con el objetivo central de esta tesis que es:

CUAL ES LA INFLUENCIA DE LAS RAICES EN LAS POBLACIONES FUNGICAS DEL SUELO?

Capítulo 1

*Reconocimiento de la biodiversidad
fúngica en suelos de Pergamino (Prov.
de Buenos Aires) bajo diferentes cultivos*

ENSAYO N°1:

OBJETIVO: Conocer la biodiversidad fúngica en el suelo y la influencia que los distintos cultivos tienen sobre ella.

Descripción área de muestreo:

Zona de muestreo: Estación Experimental Agropecuaria INTA Pergamino, ubicada en el Km 223, hacia el NE de la Provincia de Buenos Aires.

Dicha zona corresponde a la región II Sur del mapa de cultivos. Esta estación tiene como zona de influencia el centro-norte de la Pcia de Buenos Aires.

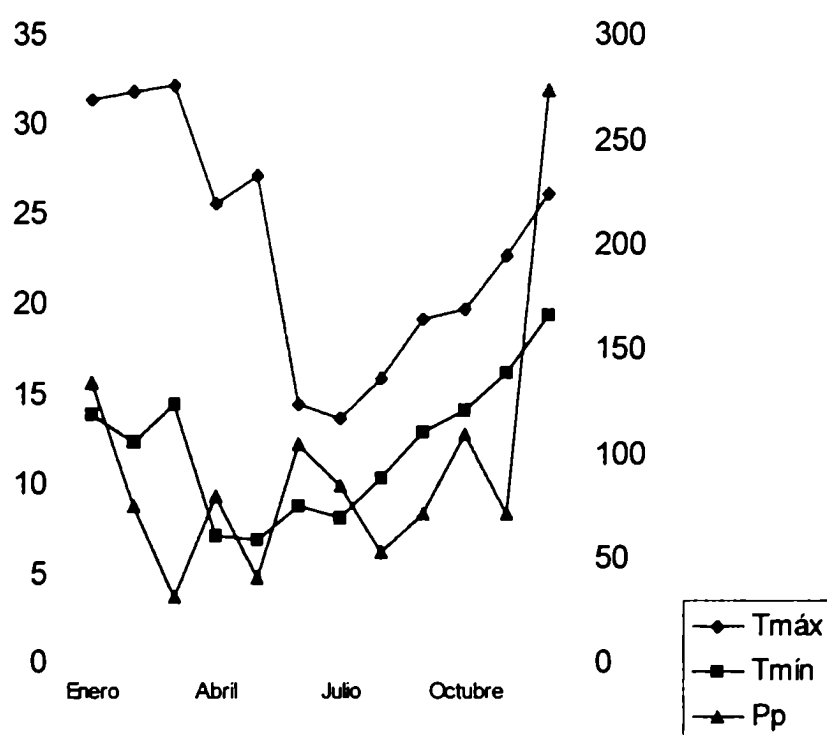
Las muestras de suelo utilizadas en el desarrollo de este trabajo fueron tomadas de la Estación Experimental INTA Pergamino. En esta zona se cultiva principalmente soja durante los primeros meses del año y trigo durante la época de invierno y primavera.

Tiene un régimen climático del tipo templado con lluvias distribuidas a lo largo del año (Köppen, 1931). La variación de la temperatura y las precipitaciones en el tiempo del muestreo se ven en la Figura 6, (los datos fueron provistos por el Servicio Meteorológico Nacional, Fuerza Aérea Argentina).

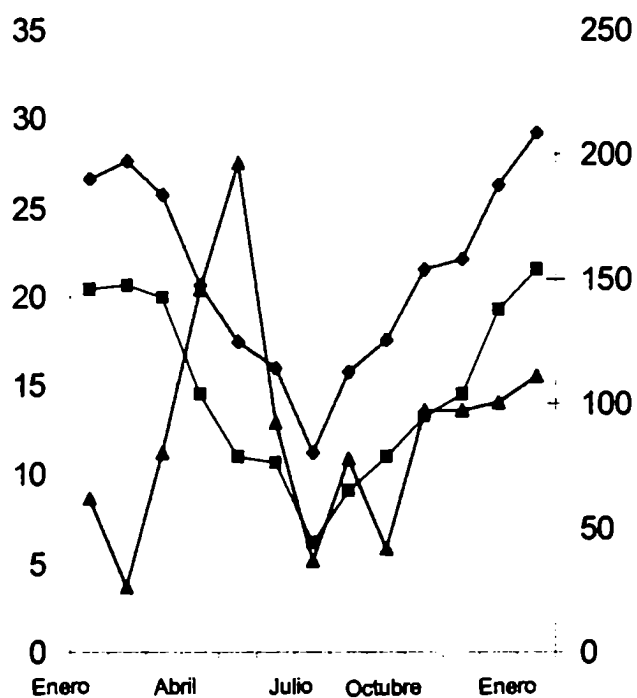
El tipo de suelo, desarrollado sobre loess, es un Argiudol típico con un horizonte B2t fuertemente textural. En los paisajes suavemente ondulados, con menos del 1% de pendiente, este suelo presenta una amplia aptitud para cultivos, forrajes y pasturas. La capa arable llega hasta una profundidad de 25 – 30 cm (horizonte A1), es granular, de textura franco limosa y de color pardo grisáceo muy oscuro. Hacia abajo pasa gradualmente a otro horizonte más arcilloso (horizonte B2t), que se extiende aproximadamente desde los 35 – 40 cm hasta más o menos un metro. Su color es pardo o pardo oscuro, su estructura es prismática y presenta abundantes barnices en las caras de los agregados. La transición entre el B2t y el loess del sustrato (horizonte C) es muy gradual. Este último, se encuentra a una

profundidad promedio de 1,60 m; es un material franco limoso, suelto y con escasa cantidad de calcáreo, tanto diseminado en la masa como en concreciones.

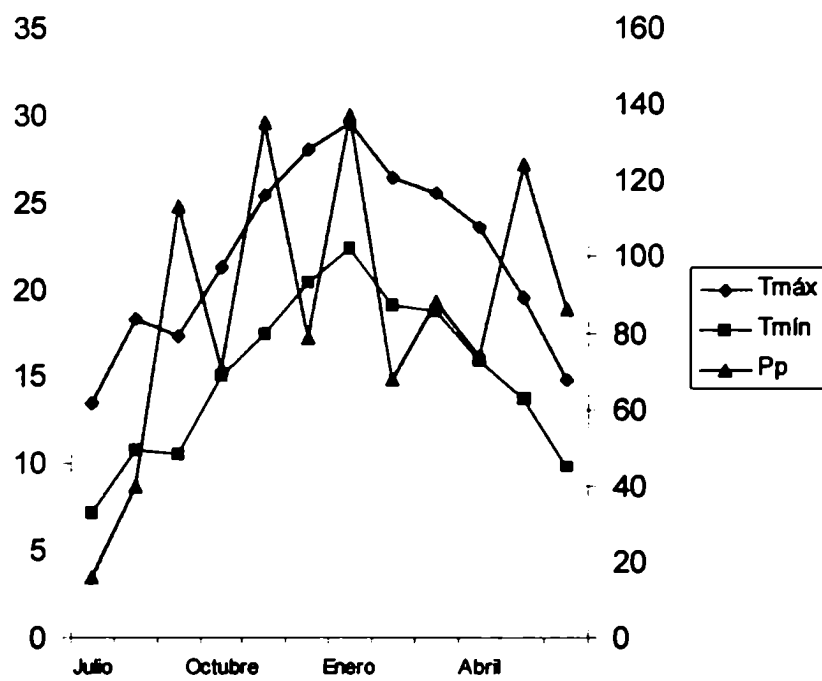
**T. máx., T. mín., Precipitaciones en promedio mensual.
Estación Meteorológica Aeroparque (Año 1991)**



**T. máx., T. mín. y Precipitaciones en promedio mensual.
Estación Meteorológica Aeroparque (Años 92 - 93).**



**T. máx., T. mín. y Precipitaciones en promedio mensual.
Estación Meteorológica Aeroparque (Año 96 - 97)**



Muestreo:

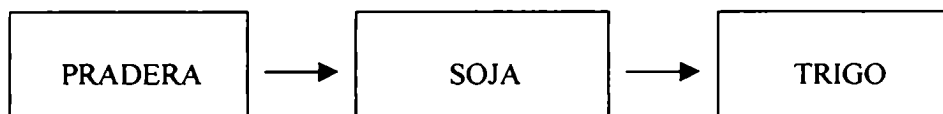
El muestreo comenzó en mayo de 1991. Se tomó suelo de la parcela N° 9 (parcela testigo) con cultivo de soja de segunda, sin fertilizantes (0 Potasio, 0 Nitrógeno, 0 Fósforo) y labranza reducida y suelo de pradera de una zona sin cultivar del mismo lugar.

En el mes de enero de 1992 se regresó a la parcela y se tomó una nueva muestra de suelo pero bajo un cultivo de trigo en tiempo de cosecha.

El tratamiento seguido con parte de las muestras fue el esquematizado en la Figura 7.

Posteriormente se determinó la sucesión fúngica presente en la rizosfera, rizoplano y endofítica de raíz en cultivos de trigo y soja.

En este lote de experimentos se trató de repetir en macetas la sucesión de cultivos que se realiza en la zona.



Se muestreó a) suelo de pradera y en él se cultivó soja y b) suelo de soja donde se cultivó trigo.

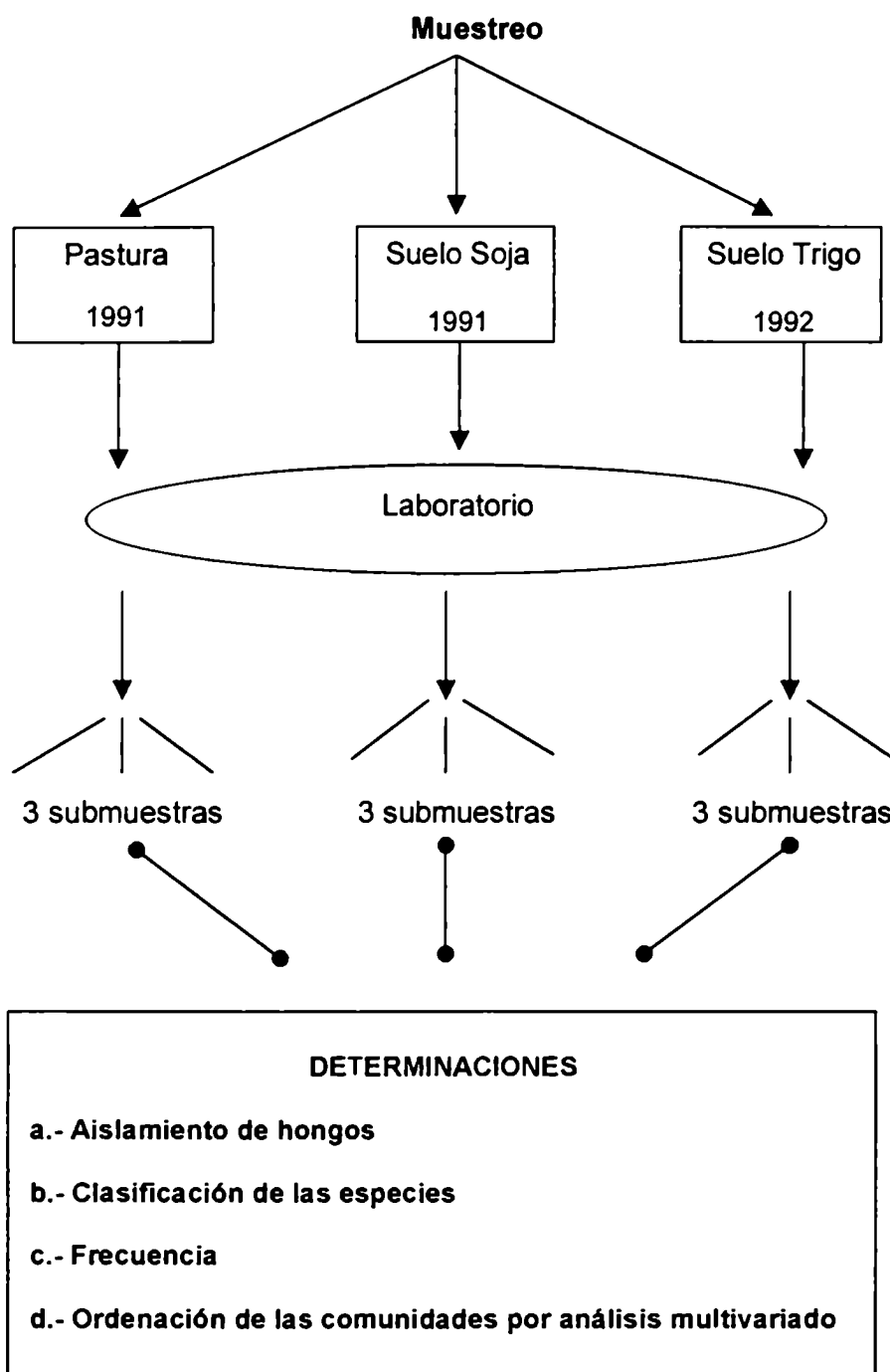


Fig. 7. Esquema de muestreo realizado en la EE INTA Pergamino.

a) Aislamiento e identificación de especies activas en muestras de rizosfera de trigo, de soja y de pastura (suelo sin cultivar).

Materiales y métodos:

Aislamiento de hongos:

Se utilizó la técnica de lavado para suelo (Parkinson & Williams, 1951, Williams et al., 1965, Hering 1965), para muestras múltiples (Bissett & Widden, 1972).

Se aplicó el método de lavado de muestras múltiples (Bissett & Widden, 1972).

Este método permite el aislamiento de las especies fúngicas que se encuentran en estado vegetativo (metabólicamente activas), eliminando aquellas especies que se encuentran esporuladas.

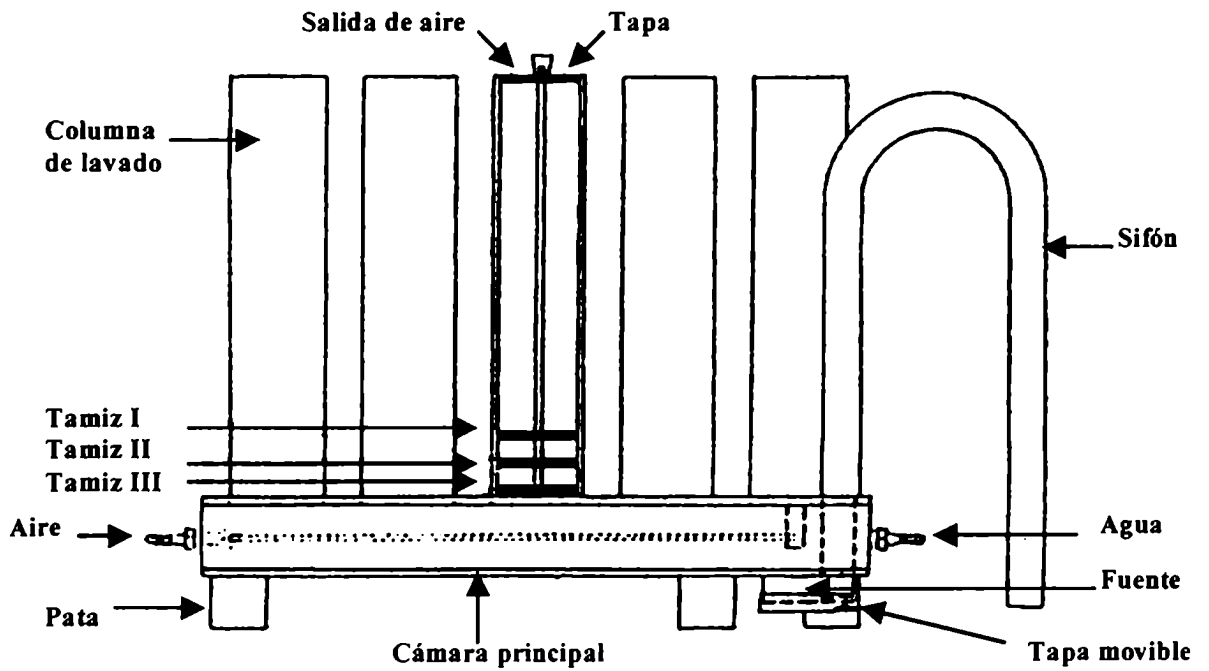
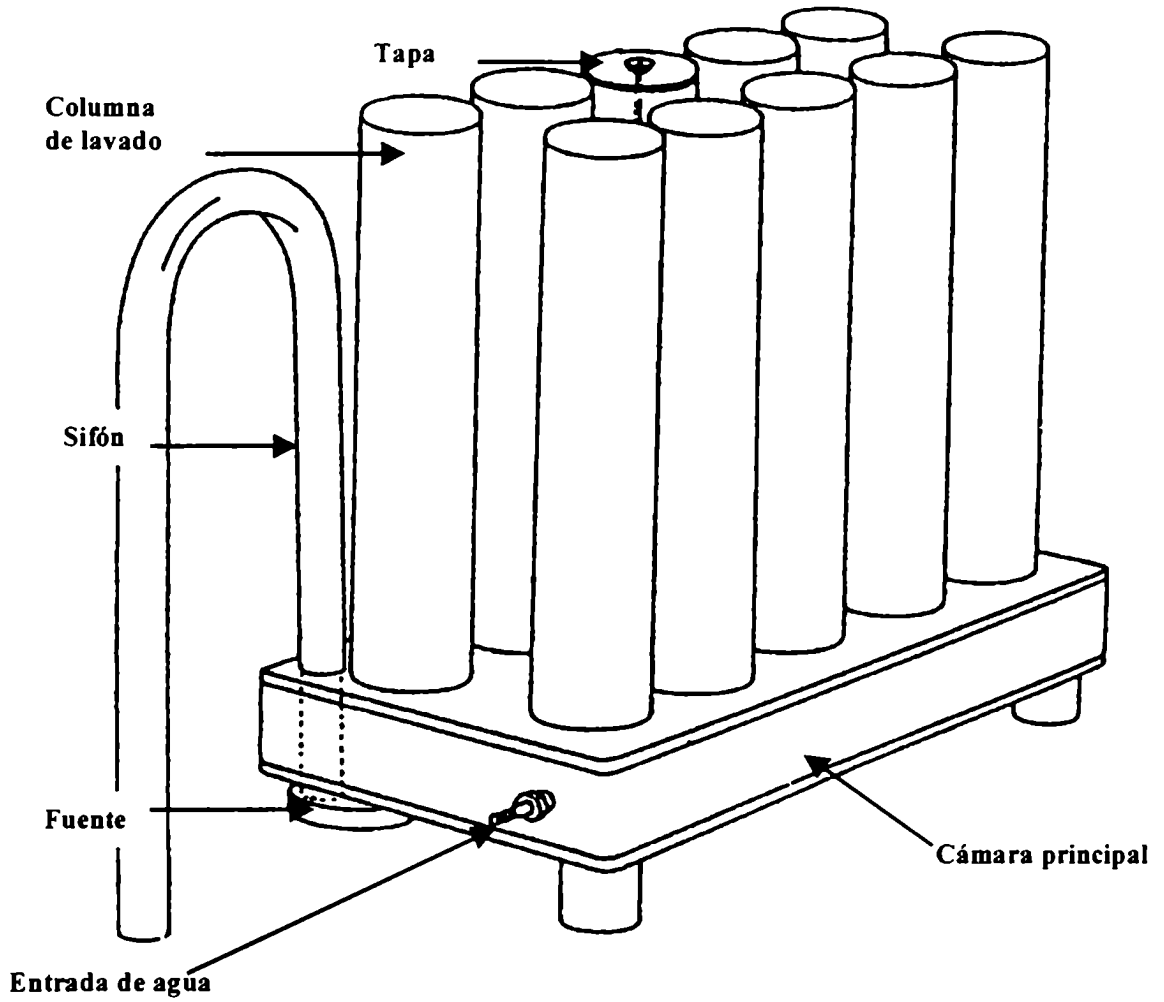
El aparato de lavado (Figura 8) utilizado en este caso es el que tiene 10 columnas de lavado que permite lavar muestras simultáneamente. Cada una de ellas es un cilindro de acrílico de 5 cm de diámetro por 35 cm de largo conectados en su parte inferior a una cámara rectangular donde se encuentra una abertura para la entrada de agua, una salida para el sifón y una tercera para la entrada de aire. Los cilindros en su extremo se encuentran cerrados con discos de acrílico con un orificio para la salida de los gases y para mantener la presión atmosférica en el sistema mientras se desagota el aparato.

En el interior de cada columna se colocan tres tamices de tamaño de poro decreciente (842, 700 y 200 μm , de tamaño de malla). Cada malla se coloca entre dos discos de acrílico que ajustan con un o-ring al cilindro. Entre la fuente de aire comprimido y la entrada de aire al aparato se coloca un filtro de algodón estéril para evitar posibles contaminaciones provenientes del aire a presión.

Previo al uso, el aparato se esteriliza mediante una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 24 horas y enjuagado con agua estéril obtenida por el pasaje del agua de canilla por un sistema de filtros Millipore.

Fig. 8

APARATO AUTOMATICO DE LAVADO



Corte longitudinal

Curva de lavado:

Tiene como objetivo determinar el número de lavados que es necesario efectuar para eliminar la mayor cantidad de hongos que se encuentran como formas de resistencias, (esporas o esclerocios) en las muestras de suelo.

Luego de acondicionado el aparato, aproximadamente cinco gramos de suelo se colocan en el tamiz superior para comenzar a lavarlas. En cada lavado el aparato se llenó hasta la mitad de las columnas con agua y se dejó burbujear con aire estéril por espacio de 2 minutos. Luego de cerrado el aire, se desagotó el agua, recogiendo 3 alícuotas de la misma en frascos estériles en el 1er, 5to., 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40° lavado. Un ml. de agua de cada una de estas alícuotas de agua se sembró en cajas de Petri con agar malta y antibiótico (Estreptomomicina y Clorhidrato de tetraciclina), incubándose a temperatura ambiente. Luego de tres días se contó el número de colonias presentes en cada lavado y se graficaron los datos de nº de colonias en función del nº de lavados. Con este procedimiento se determinó el número de lavados necesarios para eliminar la mayor cantidad de propágulos de resistencia.

Las partículas lavadas se recogieron en cada uno de los tres tamices y se transfirieron a cajas de Petri con papel de filtro estéril, por espacio de 24 horas. Se tomaron al azar 40 partículas por muestra (4 partículas por caja), y se sembraron en cajas de Petri con agar malta y antibiótico (Estreptomomicina y Clorhidrato de tetraciclina). Luego de cinco días de incubación a temperatura ambiente las cepas que crecieron fueron repicadas a tubos de ensayo con agar malta en pico de flauta para su posterior identificación.

Luego de la identificación taxonómica de todas las cepas aisladas se calculó para cada una de ellas la frecuencia de aparición según la fórmula:

F (frecuencia de aparición de cada sp.) = número de apariciones de la especie/ número de partículas sembradas.

También se calculó el número de aislamientos por muestra, el número de especies y la diversidad en especies para cada uno de los casos.

Ordenación de las comunidades fúngicas

El análisis multivariado es la rama de la estadística y de análisis de datos que estudia e interpreta un conjunto de datos multivariados (vectores aleatorios).

Estos surgen al medir más de una variable sobre cada individuo, persona u objeto. Las variables pueden ser de tipo cualitativo, cuantitativo o una mezcla de ambos, con la propiedad de estar correlacionados y que ninguna de ellas tenga importancia superior a las demás. Los datos multivariados se expresan normalmente en forma de matrices.

$$X_{11}, X_{12}, \dots, X_{1n}$$

$$X_{21}, X_{22}, \dots, X_{2n}$$

$$X_{p1}, X_{p2}, \dots, X_{pn}$$

Las columnas y filas representan variables e individuos o casos.

Para el análisis estadístico de las frecuencias fúngicas se construyó una matriz básica de datos compuesta por 13 variables y 28 casos. En esta matriz las variables son las especies fúngicas y los casos son las muestras.

Las especies con una frecuencia de aparición menor o igual al 3% no fueron consideradas para el armado de la matriz.

Se realizó una transformación de los datos que se hace necesaria en el caso en que las variables están medidas en distintas escalas o aunque estén medidas en la misma escala si se tienen diferencias cuantitativamente grandes, como en la abundancia de las especies fúngicas. De otra forma unas pocas especies que son muy abundantes dominarían el análisis a expensas o detrimento de otras menos abundantes. En estos casos se recomienda la transformación logarítmica (Kenkel & Booth, 1992). A la tabla de frecuencias se aplicó la transformación $\log(x+0.5)$; donde x = frecuencia de la especie considerada.

Medidas de asociación

El término asociación se refiere a cualquier medida de semejanza, similitud, distancia o diferencia, por ejemplo, la correlación de 2 especies fúngicas basados en su co-ocurrencia. La asociación se puede medir entre todos los pares de variables y entre todos los pares de individuos o casos. La mayoría de los métodos multivariados primero calculan la matriz de asociación entre variables o individuos y luego aplican el método multivariado a dicha matriz que da el resultado analítico. Los métodos multivariados analizan las relaciones descritas por la matriz de asociación.

Métodos de ordenación

Logran una representación de los datos en un espacio de 2 o 3 dimensiones, reteniendo la mayor variación posible. Los métodos de ordenación se basan sobre la idea de que un espacio de p dimensiones puede ser representado en menos dimensiones ya que las p variables están más o menos correlacionadas.

El análisis de componentes principales (PCA) expresa la posición coordinada de n individuos en término de ejes ortogonales; de manera que el eje PC1 se maximiza. PC2 es perpendicular a PC1 y además expresa la máxima variación lineal residual, y así sucesivamente para los ejes siguientes. Los componentes surgen del análisis de la matriz de correlación o covarianza entre variables.

Análisis discriminante

Su objetivo es discriminar 2 o más grupos de individuos y determinar que variable es mejor discriminante para distinguir los grupos.

Son condiciones para aplicar el análisis discriminante (AD) que la distribución de las variables sea normal o razonablemente simétrica, la matriz de covarianza dentro de los grupos debe ser relativamente homogénea y el número de casos debe ser mayor que el de variables.

Resultados:

Como resultado del lavado de las muestras de pastura y de soja de segunda se obtuvo una curva (Figura 9), a partir de la cual se determinó el número de lavados necesarios para eliminar las estructuras de dispersión. El número de colonias aisladas se mantuvo prácticamente constante (menos de 10 colonias) desde el lavado 20 y la rizosfera de trigo desde el lavado 30. Después de estos en las partículas sólo queda el micelio activo.

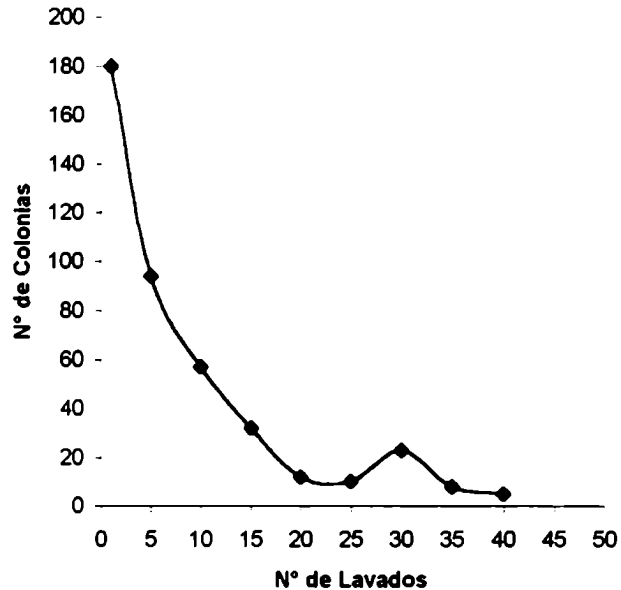
Se hicieron siembras de 36 partículas para pastura, 38 para soja y 36 para trigo. Las frecuencias de cada especie fúngica en cada muestra fue expresada como el número de apariciones de cada especie por submuestra sobre el número de partículas.

Se obtuvieron 66 aislamientos a partir de la siembra realizada de las muestras de suelo y de rizosfera de soja. Se identificaron un total de 13 especies, de las cuales, 10 pertenecen a los Hyphomycetes, 2 a los Ascomycetes y 1 al grupo de los Coelomycetes. (Tabla 1).

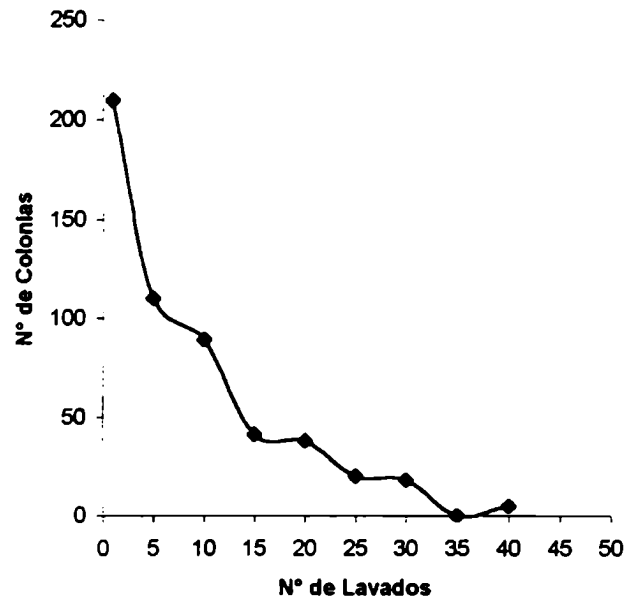
De las tres muestras analizadas, la muestra de soja de segunda fue la que tuvo mayor diversidad de especies (12). En trigo se encontraron 8 especies y en la pastura solo se aislaron 9 especies diferentes.

En el caso de la pastura, el género *Cylindrocarpon didymum* y *Cylindrocarpon obtusisporum* fueron los que se presentaron en mayor frecuencia, al igual que *Talaromyces flavus* y *Phoma eupyrena* en la muestra de trigo y *Cylindrocarpon obtusisporum* y *Trichoderma harzianum* en la muestra de soja.

Se presentaron asociaciones sobre partículas de pastura y de soja. En el caso de la pastura se encontró una asociación entre *C. didymum* y *Phoma eupyrena*. Para soja se presentaron diferentes asociaciones de *T. harzianum* con *Fusarium oxysporum*, con m. dematiáceo estéril, con *Fusarium sp.* y con *Humicola fuscoatra*. También se presentó una asociación entre *C. obtusisporum* y *Fusarium sp.*, Tabla 2.



curva pastura - soja de segunda



curva de trigo

Fig. 9. Curvas de lavado para las muestras de pastura, soja de segunda y trigo traídas del campo.

Xn	PASTURA										SOJA										TRIGO																									
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9																		
1														0,25																																
	Aspergillus clavatus																																									0,25				
	Alternaria alternata																																													
	Chaetomium sp.																																											0,25		
2	Cylindrocarpon obtusisporum	0,25						0,25	0,25																																					
3	Cylindrocarpon didymum	0,25	0,25	0,25	0,50	0,25		0,50	0,50																																					
4	Fusarium sp.									0,25	0,50																																			
	Fusarium equiseti																																													
5	Fusarium oxysporum											0,50	0,50																																	
6	Fusarium solani											0,25	0,25	0,25																																
	Micelio dematiáceo estéril																																													
7	Phoma eupyrena																																													
8	Humicola fuscoatra																																													
9	Talaromyces flavus																																													
10	Trichoderma koningii																																													
11	Thielavia terricola																																													
12	Trichoderma harzianum																																													
13	Trichoderma sp.																																													
	N° aislamientos /part. sembradas	28 / 36										38 / 40										35 / 36																								

Tabla 1. Frecuencias de las distintas especies presentes en los cultivos de soja, trigo y pastura.

	Pastura	Soja
<i>C. didymum</i> + <i>Phoma eupyrena</i>	1	
<i>C. obtusisporum</i> + <i>Fusarium sp.</i>		1
<i>Trichoderma sp.</i> + <i>Fusarium sp.</i>		1
<i>T. harzianum</i> + <i>F. oxysporum</i>		2
<i>T. harzianum</i> + <i>M. dem. estéril</i>		1
<i>T. harzianum</i> + <i>Fusarium sp.</i>		1
<i>T. harzianum</i> + <i>H. fuscoatra</i>		1

Tabla2. Apariciones de distintas asociaciones entre especies para el cultivo de soja y de pastura.

MATRIZ BASICA DE DATOS PARA MUESTRAS DE CAMPO

p1 0.25 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0
p2 0 0.25 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0
p3 0 0.25 0 0 0.25 0 0 0 0 0.25 0
p4 0.25 0.5 0 0 0.25 0 0 0 0 0.25 0
p5 0 0.25 0 0 0.25 0.5 0 0 0 0 0
p6 0 0 0.25 0.5 0 0 0 0 0 0 0
p7 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0
p8 0.25 0.5 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0
p9 0.25 0.5 0 0 0 0 0 0 0 0 0
s1 0.25 0 0.25 0 0 0.25 0 0 0 0.25 0
s2 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0.25 0
s3 0 0 0 0.5 0.25 0 0 0 0.5 0 0
s4 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0.5 0.5
s5 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0
s6 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0.5 0
s7 0.25 0 0 0 0.25 0 0.25 0 0 0 0
s8 0.25 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0.25 0
s9 0.25 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0.25 0.25
s10 0.25 0.25 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0
t1 0 0 0 0 0 0 0.75 0.25 0 0 0
t2 0 0 0 0.5 0 0.25 0 0.25 0 0 0
t3 0.25 0 0 0.25 0 0.25 0 0.25 0 0 0
t4 0 0 0 0 0.25 0 0.5 0 0.25 0 0
t5 0 0 0 0 0.5 0 0.25 0 0 0 0
t6 0 0 0 0 0 0 0.5 0 0.5 0 0
t7 0 0 0 0 0.25 0 0.25 0 0.25 0 0
t8 0 0 0 0 0.5 0 0.25 0 0 0 0
t9 0 0 0 0 0.25 0 0.75 0 0 0 0

p: pastura

s: soja

t: trigo

submuestras: i: 1,....,10.

REFERENCIAS MATRIZ BASICA DE DATOS PARA MUESTRAS DE CAMPO

	Ej:
X1: variable identificatoria	p1
X2: <i>Cylindrocarpon obtusisporum</i>	0.25
X3: <i>Cylindrocarpon didymum</i>	0.25
X4: <i>Fusarium sp.</i>	0
X5: <i>Fusarium oxysporum</i>	0
X6: <i>Fusarium solani</i>	0
X7: <i>Phoma eupyrena</i>	()
X8: <i>Humicola fuscoatra</i>	0
X9: <i>Talaromyces flavus</i>	0
X10: <i>Trichoderma koningii</i>	()
X11: <i>Thielavia terricola</i>	0
X12: <i>Trichoderma harzianum</i>	0
X13: <i>Trichoderma sp.</i>	0

p: pastura

s: soja

t: trigo

': submuestras: 1, 2, 3,, 10.

Lista de especies fúngicas aisladas de pastura, rizosfera de soja y rizosfera de trigo.

Siglas según Kirk & Ansell (1992).

1 <i>Aspergillus clavatus</i>	Desm.
2 <i>Alternaria alternata</i>	(Fr.) Keissl.
3 <i>Chaetomium sp.</i>	
4 <i>Cylindrocarpon obtusisporum</i>	(Cooke & Hark.) Wollenw.
5 <i>Cylindrocarpon didymum</i>	(Hartig) Wollenw.
6 <i>Fusarium sp.</i>	
7 <i>Fusarium equiseti</i>	(Corda) Sacc.
8 <i>Fusarium oxysporum</i>	Schltld. emend. Sny. & Hausm.
9 <i>Fusarium solani</i>	(Mart.) Sacc.
10 Micelio dematiáceo estéril	
11 <i>Phoma eupyrena</i>	Sacc.
12 <i>Humicola fuscoatra</i>	Traaen
13 <i>Talaromyces flavus</i>	(Klöcker) Stolk & Samson
14 <i>Trichoderma koningii</i>	Oudem.
15 <i>Thielavia terricola</i>	(Gilman & Abbott) Emmons
16 <i>Trichoderma harzianum</i>	Rifai
17 <i>Trichoderma sp.</i>	

Análisis de las comunidades fúngicas para pastura y el cultivo de soja y trigo

En cuanto al análisis estadístico de las comunidades fúngicas en los tres tipos de muestreos realizado sobre la matriz de frecuencias fúngicas, 12 especies x 28 censos; los primeros tres componentes explicaron el 84.24% de la variación entre los censos con relación a las especies presentes y sus valores de frecuencias.

Las contribuciones de las especies a los componentes pueden observarse en la Tabla 3.

El componente 1 en su extremo positivo segrega la totalidad de las muestras correspondientes a los censos de rizosfera de trigo; caracterizados por la presencia de las especies *Talaromyces flavus* y *Thielavia terricola*. El sector negativo del componente está caracterizado por las especies *C. obtusisporum*, *C. didymum* y *T. harzianum*. Figura 10.

El componente 3 segrega 3 censos de pastura, 7 censos de soja y 2 de trigo en el sector positivo del eje, caracterizados por la presencia de *Humicola fuscoatra*, seguida por *T. harzianum* y *C. obtusisporum*. El resto de los censos se encuentran ubicados en el sector negativo del eje y está caracterizado por la presencia de *Phoma eupyrena* y *Talaromyces flavus*.

Los censos fueron analizados mediante análisis discriminante (AD) utilizando como variable de agrupamiento el tipo de cultivo.

El análisis discriminante dio como resultado 2 funciones, las cuales explicaron el 100% de la varianza total. Tabla 4a.

La primera función estuvo asociada con *Talaromyces flavus* (-) y *Phoma eupyrena* (-). La segunda función con *C. didymum*.

La distribución de las muestras en relación a las dos funciones discriminantes (Fig.11) muestra que los censos de pastura están asociados a valores positivos de la variable canónica 2 (VC2), los censos de trigo están asociados a valores positivos de VC1 y negativos de VC2 y los censos de soja a valores negativos de VC1.

La clasificación general obtenida del análisis discriminante muestra que el 89,3% de las muestras estuvieron bien clasificadas. Tabla 4b.

	C1	C2	C3	C4 ;
X(2) <i>C. obtusisporum</i>	-0.436	-0.562	0.455	-0.068
X(3) <i>C. didymum</i>	-0.530	-0.426	-0.083	-0.463
X(4) <i>Fusarium sp.</i>	-0.276	0.038	-0.198	0.684
X(5) <i>F. oxysporum</i>	-0.131	0.733	-0.033	0.235
X(6) <i>F. solani</i>	-0.402	0.263	0.026	-0.596
X(7) <i>Phoma eupyrena</i>	0.347	-0.144	-0.624	-0.009
X(8) <i>Humicola fuscoatra</i>	0.077	-0.148	0.800	-0.103
X(9) <i>Talaromyces flavus</i>	0.839	0.048	-0.256	-0.070
X(10) <i>Trichoderma koningii</i>	0.002	0.762	0.045	-0.376
X(11) <i>Thielavia terricola</i>	0.707	-0.119	-0.005	-0.040
X(12) <i>T. harzianum</i>	-0.446	-0.157	0.422	0.333
X(13) <i>Trichoderma sp.</i>	-0.074	0.250	0.480	0.613
Varianza explicada	2.260	1.831	1.761	1.742

Tabla 3. Contribución de las especies al espacio de los componentes.

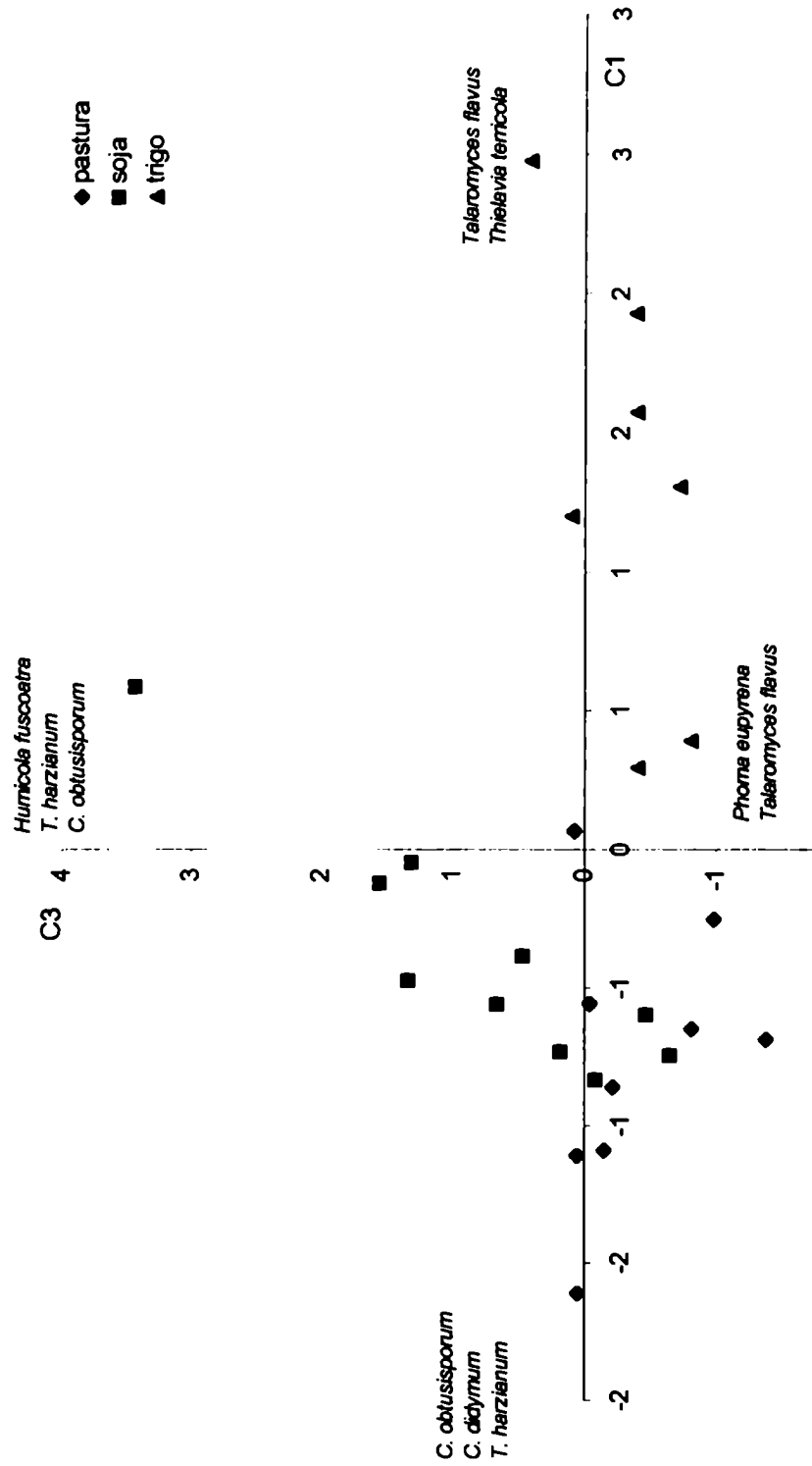


Fig. 10. Distribución de los censos en el espacio de los componentes 1 y 3.

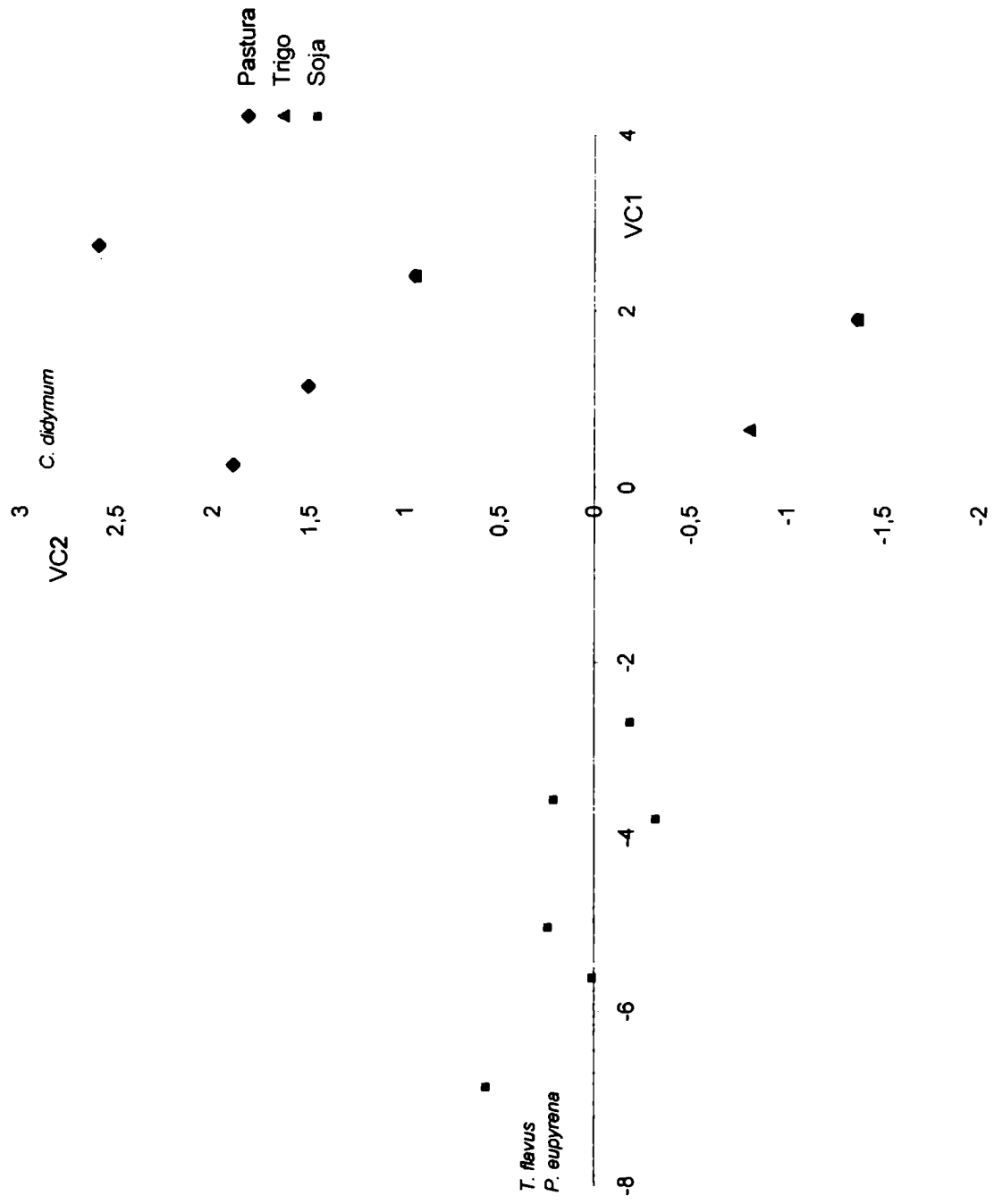


Fig. 11. Análisis de la función discriminante de los datos de frecuencias en el espacio de las variables canónicas (VC1, VC2)

variable	Coeficiente estandarizado para las variables canónicas	
	F1	F2
<i>Cylindrocarpon didymum</i>	0,20560	0,96826
<i>Phoma eupyrena</i>	-0,65957	0,29509
<i>Talaromyces flavus</i>	-1,04169	0,19027
Varianza explicada acumulada	90	100

Tabla 4a. Coeficiente estandarizado para las variables canónicas.
Varianza explicada

Grupo	% de clasificación correcta	N° de casos clasificados		
		pastura	trigo	soja
pastura	77,8	7	2	0
trigo	90	1	9	0
soja	100	0	0	9
Total	89,3	8	11	9

Tabla 4b. Clasificación del análisis discriminante basado en las frecuencias de los hongos de suelo usando el tipo de cultivo como variable discriminante.

ENSAYO N°2:

OBJETIVO: Aislamiento e identificación de especies activas en un cultivo de trigo en maceta.

Materiales y métodos:

Este ensayo se realizó en julio de 1992. Se utilizaron 30 macetas de plástico con una capacidad de 5000cm³ con suelo traído de la Estación Experimental INTA Pergamino. En cada una se sembraron 5 – 6 semillas de trigo (*Triticum aestivum* var. **Inta Federal**) con 85% de poder germinativo.

Las macetas se mantuvieron a la intemperie en el campo experimental de Ciudad Universitaria y fueron regadas en los momentos que fue necesario.

Se realizaron tres muestreos, uno en estadio de plántula, a los 67 días, otro en floración, a los 92 días y otro al tiempo de cosecha (espiga madura), a los 145 días desde la fecha de siembra. Figura 12.

Para cada muestreo se separó la parte aérea y se midió sobre ella los siguientes parámetros: longitud y % de humedad de parte aérea, raíces y espiga de plantas de trigo.

En cada muestreo, se tomó, con una cuchara en condiciones de esterilidad, una muestra de rizosfera de cinco macetas distintas, lo que fue colocado en una bolsa estéril. En el lavado de las muestras de suelo del primer muestreo de rizosfera de trigo se tomaron por triplicado muestras de agua de lavado y se construyó la curva de lavado correspondiente, determinando así el número de estos que es necesario efectuar en los dos muestreos posteriores.

Para el aislamiento de especies fúngicas sobre partículas se procedió de igual forma que en el Ensayo 1., (pág. 53).

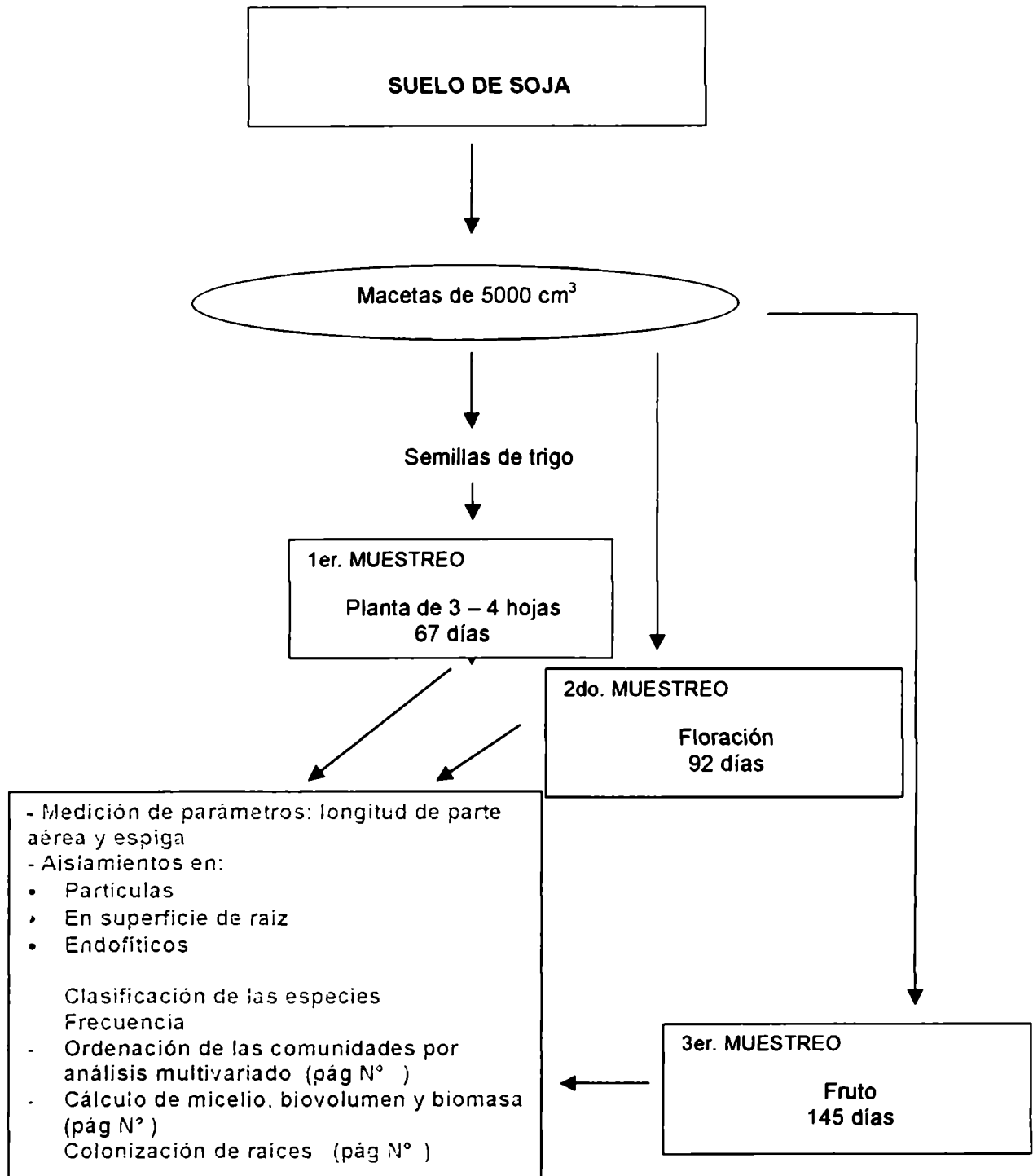


Fig. 12. Esquema de muestreo y determinaciones realizadas sobre trigo.

El aislamiento de especies fúngicas en las raíces de trigo, se hizo según dos procedimientos, a fin de aislar los hongos que crecen: sobre la superficie de las raíces y en el interior de las raíces. Para ello, se cortaron los extremos de las raíces de las plantas jóvenes y se lavaron sobre un tamiz hasta eliminar todo el suelo pegado a ellas. Finalmente se enjuagaron con agua destilada y se colocaron en cajas de Petri con papel de filtro estéril y humedecido con agua destilada estéril. Se sembraron 40 trozos de 1cm de longitud en cajas de Petri con agar extracto de malta y antibiótico (Estreptomycina + Clorhidrato de tetraciclina).

De las raíces enjuagadas otra parte se colocó en un vaso de precipitado con lavandina - agua (1:2) por espacio de 1 minuto y medio. Luego se le realizaron 3 lavados para quitar el hipoclorito de sodio con agua destilada estéril. Por último, se cortaron 40 trozos de 1cm de longitud y se sembraron en cajas de Petri con agar-agua.

Para el análisis estadístico de los datos de aislamientos fúngicos, las especies con una frecuencia de aparición menor o igual al 3% no fueron consideradas para el armado de la matriz.

Se hicieron tres réplicas, en cada muestreo. Se realizaron aislamientos en 10 muestras de partículas de suelo y en raíces con y sin esterilización superficial.

Las frecuencias de cada especie fúngica en cada muestra fue expresada como el número de apariciones de cada especie por submuestra sobre el número de partículas o raíces sembradas por submuestra.

Resultados:

De la curva de lavado (Figura 13) realizada sobre las muestras de rizosfera de trigo del 1er. Muestreo, se concluye con que es necesario realizar sobre las mismas 15 lavados para reducir al mínimo el número de formas esporuladas en las muestras.

Para los parámetros medidos, se realizó un análisis de varianza, dando diferencias significativas entre los 3 muestreos para la longitud de la parte aérea ($F_{2,9} = 175,5$; $p > 0,05$). Se realizaron posteriormente contrastes de Tukey. No se encontraron diferencias significativas entre el 2do. y 3er. Muestreo ($VC = 4,38$; $5,61$; $p < 0,05$). Para las espigas el análisis de varianza no dio diferencias significativas ($F_{1,6} = 2,89$; $p < 0,05$). Fig. 14.

En el análisis realizado sobre el porcentaje de humedad de los vástagos de trigo se encontraron diferencias significativas ($F_{2,6} = 1188,35$, $p > 0,05$). Realizando contrastes de Tukey se encontró que no hubo diferencias significativas en los valores obtenidos entre el 2do. y 3er. Muestreo ($VC = 3,3$; $p > 0,05$) y sí de éstos con respecto al 1er. Muestreo ($VC = 4,27$; $p > 0,05$).

Para las raíces, el contenido de humedad de las mismas mostró diferencias significativas a lo largo de los muestreos ($F_{2,6} = 32,90$; $p > 0,05$). De igual forma ocurrió con las muestras de espigas ($F_{1,4} = 1699$; $p > 0,05$).

Los resultados de los contrastes de Tukey realizados sobre las raíces mostraron que hay diferencias significativas entre los tres muestreos ($VC = 2,96$ y $3,86$; $p > 0,05$).

Con respecto al porcentaje de humedad de las hojas, raíces y espiga a lo largo de los muestreos, se observa que hacia el final del ciclo ésta disminuye notablemente debido a la senescencia de la planta que dirige todo su potencial hacia la formación y maduración del fruto. Fig. 15.

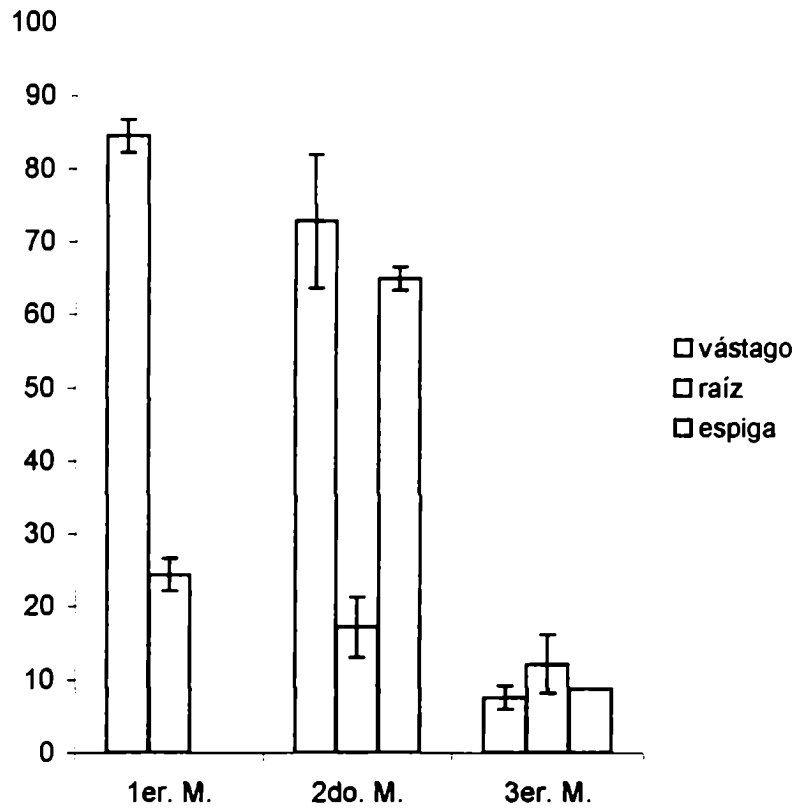


Fig.15. Porcentajes de humedad presentes en vástagos, raíces y espigas durante los 3 muestreos.

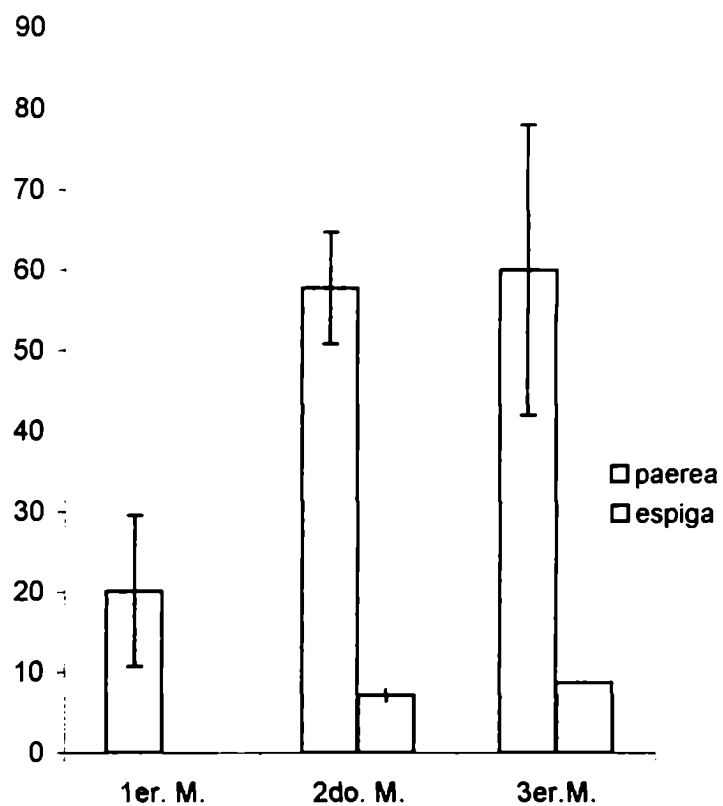


Fig. 14. Parámetros de longitud de parte aérea y espigas (en cm) sobre plantas de trigo.

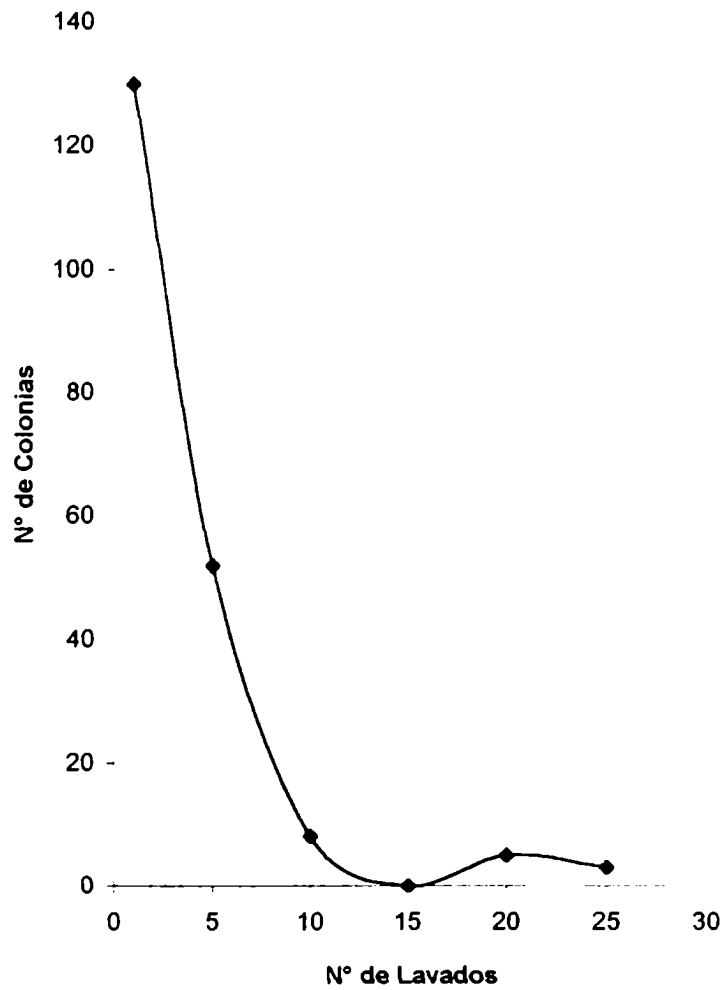


Fig. 13. Curva de lavado para la muestra de suelo tomada para la siembra de trigo en macetas.

En la Tabla 5 se presentan los resultados de los aislamientos para cada tratamiento.

En el desarrollo de este ensayo se aislaron 299 cepas que correspondieron a:

96 aislamientos sobre 116 partículas y raíces para el 1er. muestreo,

116 sobre 120 partículas y raíces para el 2do. muestreo y

87 aislamientos sobre 115 partículas y raíces sembradas en el 3er. muestreo.

Se identificaron 48 especies distintas, entre las cuales 39 fueron identificadas a especies y 3 a género. Pertenecieron a los siguientes grupos taxonómicos: 6 Ascomycetes, 2 Zygomycetes, 4 Coelomycetes, 5 Micelios estériles, 1 indeterminado y 30 Hyphomycetes.

Entre los micelios estériles se encontraron distintos tipos: 2 micelios dematiáceos estériles, 2 micelios moniliáceos estériles y 1 micelio estéril rojizo (Tabla 6).

Las especies aisladas con mayor frecuencia a lo largo de todo el ensayo fueron: *Cylindrocarpon didymum*, *Fusarium oxysporum*, *Periconia macrospinoso*, *Phoma eupyrena* y *Trichoderma koningii*. Las siguientes especies se presentaron en baja frecuencia y fueron exclusivas del 1er. muestreo sobre partículas: *Chaetomium mollicellum* y *Phoma nebulosa*. Sobre las raíces con esterilización superficial se registró la presencia de *Alternaria tenuissima* y *Penicillium verrucosum* var. *corimbyferum*, *P. notatum* y *P. frequentans*, estos tres últimos también presentes en las raíces con esterilización pero del 2do. muestreo. Sobre las partículas del 2do. muestreo se encontró la presencia de *Chaetomium dolichotrichum*, *Ch. globosum* y *Trichoderma pseudokoningii*. En las raíces sin esterilización superficial fueron aisladas: *Curvularia brachyspora* y *Dreschlera australiensis*. Por último sobre las raíces con esterilización superficial en el 2do. muestreo estuvieron presentes *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium lateritium*, *Gliocladium roseum*, *Paecilomyces variotii*, *Phoma glomerata*, *Talaromyces wortmanii* y *Rhizopus arrhizus*.

En el último muestreo sobre las partículas aparecieron *Acroconidiella* sp. y *Aspergillus fumigatus* mientras que sobre las raíces sin esterilización se aislaron *Humicola fuscoatra*, *Mucor hiemalis* var. *corticola* y *Phoma pomorum*.

		P / A	
		Trigo	Soja
Micelio dematiáceo estéril 1	micelio dematiáceo estéril, hifas muy articuladas	P	P
Micelio dematiáceo estéril 2	micelio dematiáceo estéril con clamidosporas intercalares de color oscuro y con pared lisa	P	P
Micelio moniliáceo estéril 1	micelio moniliáceo estéril con clamidosporas intercalares y terminales de color dorado y con pared ornamentada	P	P
Micelio moniliáceo estéril 2	micelio moniliáceo estéril	P	A
Micelio moniliáceo estéril 3	micelio moniliáceo estéril con clamidosporas intercalares en cadena intercalares de color oscuro y con pared lisa	A	P
Micelio estéril rojizo	micelio estéril rojizo con pelotas rojas; colonia con micelio aterciopelado gris oscuro , reverso de la colonia bordó oscuro	A	P
Micelio estéril amarillo	micelio amarillo, hifas muy articuladas, con clamidosporas intercalares de color negro	P	P

TABLA 6.Características de los distintos micelios estériles

Trigo		1° Muestreo			2° Muestreo			3° Muestreo		
		P	S	C	P	S	C	P	S	C
1	Acroconidiella sp	0	0	0	0	0	0	2,8	0	0
2	Alternaria alternata	0	5	0	0	0	0	0	0	0
3	Alternaria tenuissima	0	0	1,7	0	0	0	0	0	0
4	Aspergillus fumigatus	0	0	0	0	0	0	2,8	0	0
5	Aspergillus niger	5	0	0	0	2,8	0	2,8	2,5	0
6	Chaetomium dolichotrichum	0	0	0	2,5	0	0	0	0	0
7	Chaetomium globosum	0	0	0	5	0	0	0	0	0
8	Chaetomium mollicellum	5	0	0	0	0	0	0	0	0
9	Colletotrichum gloeosporoides	0	0	0	0	0	5	0	0	0
10	Curvularia brachyspora	0	0	0	0	2,5	0	0	0	0
11	Cylindrocarpon dydimum	5	37,5	21,5	0	5	10	0	20	7,5
12	Cylindrocarpon obtusisporum	0	7,5	0	0	20	0	0	10	0
13	Drechslera australiensis	0	0	0	0	5	2,5	0	0	0
14	Fusarium equiseti	5	0	3,5	0	7,5	0	0	0	0
15	Fusarium lateritium	0	0	0	0	0	5	0	0	0
16	Fusarium oxysporum	0	22,5	1,7	0	15	2,5	5,7	15	5
17	Fusarium solani	0	20	12,5	0	7,5	0	0	2,5	5
18	Fusarium sp	0	0	0	0	12,5	2,5	0	0	0
19	Gliocladium roseum	0	0	0	0	0	2,5	0	0	0
20	Gliocladium sp	0	0	0	0	0	2,5	0	0	0
21	Humicola fuscoatra	0	0	0	0	0	0	0	2,5	0
22	Indeterminado	0	0	7,1	2,5	0	5	2,8	2,5	0
23	Micelio dematiaceo esteril 1	0	0	3,5	0	0	7,5	0	0	5
24	Micelio dematiaceo esteril 2	0	0	1,7	0	5	7,5	0	0	2,5
25	Micelio moniliáceo esteril 1	0	0	0	0	0	10	0	0	0
26	Micelio moniliáceo esteril 2	0	0	5,3	0	0	5	0	0	0
27	Micelio estéril rojizo	0	0	0	0	0	20	0	0	0
28	Mucor hiemalis variedad corticola	0	0	0	0	0	0	0	2,5	0
29	Paecilomyces variotti	0	0	0	0	0	0	2,5	0	0
30	Paecilomyces sp.	0	0	0	0	0	2,5	0	0	0
31	Penicillium frequentans	0	0	7,1	0	0	0	0	0	0
32	Penicillium funiculosum	0	0	0	2,5	0	0	0	0	0
33	Penicillium notatum	0	0	5,3	0	0	0	0	0	0
34	Penicillium verrocosum vr. corimbyferum	0	0	1,7	0	0	5	0	0	0
35	Periconia macrospinoso	0	0	0	0	0	5	0	7,5	3,5
36	Phoma eupyrena	10	0	3,5	5	22,5	0	8,5	7,5	0
37	Phoma glomerata	0	0	0	0	0	5	0	0	0
38	Phoma nebulosa	15	0	0	0	0	0	0	0	0
39	Phoma pomorum	0	0	0	0	0	0	0	2,5	0
40	Rhizopus arrhizus	0	0	0	0	0	2,5	0	0	0
41	Talaromyces flavus	0	2,5	0	2,5	0	0	0	0	0
42	Talaromyces wortmanii	0	0	0	0	0	7,5	0	0	0
43	Thielavia terricola	0	5	1,7	2,5	0	0	0	0	0
44	Trichoderma harzianum	0	0	0	7,5	12,5	0	2,8	15	0
45	Trichoderma koningii	0	5	0	15	7,5	0	0	27,5	2,5
46	Trichoderma pseudokoningii	0	0	0	2,5	0	0	0	0	0
47	Trichoderma viride	0	0	0	5	0	0	0	0	0
48	Ulocladium chartarum	0	0	1,7	0	0	2,5	0	5	0
	N° Especies diferentes	6	8	15	11	13	21	77	15	7
	N° Aislamientos	9	42	45	21	50	45	10	52	25
	N° Partículas sembradas	20	40	56	40	40	40	35	40	40

Tabla 5. Frecuencias de aparición de las distintas especies en los muestreos

En los distintos muestreos de trigo se presentaron asociaciones sobre una misma partícula, o sobre raíces con y sin esterilización superficial.

En el 1er. muestreo se encontró a *Fusarium oxysporum* asociado a *T. koningii* sobre las raíces sin esterilización superficial y a *Fusarium solani* con *Ulocladium chartarum* sobre las raíces con esterilización superficial.

En el 2do. muestreo *T. koningii* estuvo asociado a *Ch. globosum* y a *R. arrhizus* sobre partículas. Sobre las raíces con esterilización se presentó asociado el micelio dematiáceo estéril 2 a *C. didymum*, y a *Fusarium oxysporum*, también *T. koningii* a *P. eupyrena* y *Fusarium oxysporum* a *T. harzianum*.

El mayor número de asociaciones lo presentó *C. obtusisporum* con *Phoma eupyrena* y *T. harzianum* con *F. solani*.

En las raíces con esterilización superficial hubo 3 asociaciones, *U. chartarum* con *F. solani*, *R. arrhizus* con micelio estéril rojizo y micelio dematiáceo estéril 1 con *Fusarium sp.* y con *T. wortmanii*. (Tabla 7).

En el 3er. muestreo hubo una única asociación entre *Mucor hiemalis* var. *corticola*, *T. harzianum* y *F. solani* sobre raíces sin esterilización superficial.

La diversidad de especies (Figura 16) varía en los distintos muestreos. Es mayor en las partículas que en las raíces con y sin esterilización. Los valores mayores corresponden al 3er. muestreo.

Los valores encontrados en las raíces con esterilización superficial fueron superiores a los de raíces sin esterilización superficial a lo largo de todos los muestreos.

Trigo	1° Muestreo			2° Muestreo			3° Muestreo		
Chaetomium globosum + Trichoderma koningii	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Trichoderma koningii + Rhizopus arrhizus	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Fusarium oxysporum + Trichoderma koningii	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Fusarium oxysporum + Micelio dematiáceo estéril 2	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Fusarium sp. + Trichoderma koningii	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Cylindrocarpon didymum + Micelio dematiáceo estéril 2	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Cylindrocarpon obtusisporum + Phoma eupyrena	0	0	0	0	4	0	0	0	0
Trichoderma harzianum + Fusarium solani	0	0	0	0	3	0	0	0	0
Trichoderma harzianum + Fusarium oxysporum	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Ulocladium chartarum + Fusarium solani	0	0	1	0	0	1	0	0	0
Micelio dematiáceo estéril + Rhizopus arrhizus	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Micelio dematiáceo estéril + Fusarium sp.	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Mucor hiemalis var. corticola + T. harzianum + F. solani	0	0	0	0	0	0	0	1	0

TABLA 7. Asociaciones para trigo en los distintos muestreos

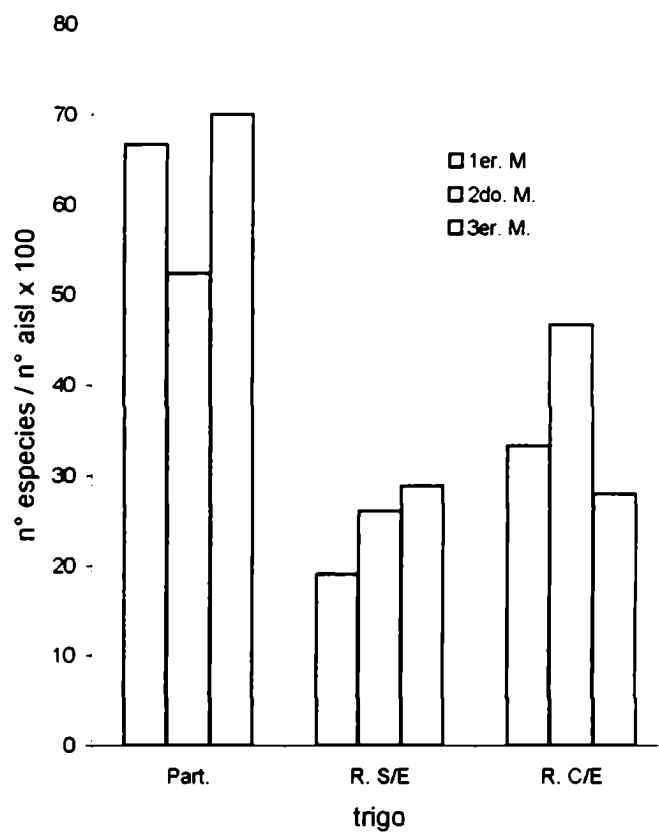


Fig. 16. Diversidad de las especies en los distintos muestreos.
Part= partícula, R. S/E= raíz sin esterilización superficial, R.C/E= raíz con esterilización superficial.

MATRIZ BASICA DE DATOS PARA TRIGO

T1P1 0.5 0 0 0 0 0
 T1P2 0.25 0 0 0 0 0 0
 T1P3 0 0.25 0.25 0
 T1P4 0
 T1P5 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0.25 0 0 0 0 0 0
 T1S1 0 0 0 0 0 0 0.75 0
 T1S2 0.5 0 0 0 0 0 1 0.5 0
 T1S3 0 0 0 0.5 0 0 0 1.25 0
 T1S4 0 0 0 0.25 0.25 0 0 0
 T1S5 0 0 0 0 0 0 0 0.75 0.25 0 0 0
 T1S6 0 0 0 0 0 0 0 0.5 0
 T1S7 0 0 1 0
 T1S8 0 0 1 0
 T1S9 0 0 0.75 0
 T1S10 0 0 1 0
 T1C1 0 0 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
 T1C2 0 0 0.5 0 0 0.25 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
 T1C3 0 0 0.5 0 0 0 0 0.25 0
 T1C4 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.5 0.25 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
 T1C5 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0
 T1C6 0 0 0.25 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0
 T1C7 0 0 0.5 0 0 0 0 0.25 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
 T1C8 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.75 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
 T1C9 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
 T1C10 0 0 0.25 0 0 0.25 0
 T1C11 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
 T1C12 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
 T1C13 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0
 T1C14 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25
 T2P1 0.25 0 0 0 0 0 0
 T2P2 0.25 0.25 0
 T2P3 0.25 0 0 0 0 0.5 0
 T2P4 0.25 0 0 0
 T2P5 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0

T2P6 0
T2P7 0.25 0
T2P8 0.5 0
T2P9 0
T2P10 0.5 0 0
T2S1 0 0 0.25 0 0 0.75 0
T2S2 0 0 0.25 0 0 0.5 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
T2S3 0 0 0.25 0.25 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0.25 0
T2S4 0 0 0.75 0
T2S5 0 0 0 0 0.25 0.5 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0.75 0 0 0 0
T2S6 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.75 0 0 0 0 0 0 0 0
T2S7 0 0 0.5 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0
T2S8 0 0 0 0 0 0.25 0.5 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0
T2S9 0 0 0 0 0 0 0.75 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0
T2S10 0 0 0 0.25 0.5 0 0.25 0
T2C1 0 0 0.25 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
T2C2 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
T2C3 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
T2C4 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0 0
T2C5 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0.5 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
T2C6 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
T2C7 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0.25 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
T2C8 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0.25 0 0 0.25 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
T2C9 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
T2C10 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0.25 0 0 0 0.25 0 0 0.25
T3P1 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
T3P2 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0
T3P3 0 0 0 0 0 0.25 0
T3P4 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0
T3P5 0.25 0 0
T3P6 0 0.25 0
T3P7 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0
T3S1 0.25 0.25 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0.25 0
T3S2 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0.75 0
T3S3 0 0 0.25 0.75 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0
T3S4 0.25 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.5 0.25 0

T3S5 0 0 0.5 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0.5 0
T3S6 0.25 0 0.75 0
T3S7 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0.75 0 0 0 0 0 0
T3S8 0 0 0.25 0 0 0 0.75 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0.25 0 0
T3S9 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0.5 0
T3S10 0.5 0.5
T3C1 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0
T3C2 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0
T3C3 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0
T3C4 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0
T3C5 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0
T3C6 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0
T3C7 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
T3C8 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0
T3C9 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0
T3C10 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0

REFERENCIAS DE LA MATRIZ BASICA DE DATOS

	Ej: T1P1
X1: variable identificatoria	
X2: Alternaria alternata	0
X3: Aspergillus niger	0
X4: Cyllindrocarpon dydimum	0
X5: Cyllindrocarpon obtusisporum	0
X6: Drechslera australiensis	0
X7: Fusarium equiseti	0
X8: Fusarium oxysporum	0
X9: Fusarium solani	0
X10: Fusarium sp.	0
X11: Indeterminado	0
X12: Micelio dematiáceo estéril 1	0
X13: Micelio dematiáceo estéril 2	0
X14: Micelio estéril hialino 1	0
X15: Micelio estéril hialino 2	0
X16: Micelio estéril rojizo	0
X17: Penicillium frequentans	0
X18: Penicillium notatum	0
X19: Penicillium verrucosum var. corimbyferum	0
X20: Periconia macrospinosa	0
X21: Phoma eupyrena	0
X22: Phoma nebulosa	0.5
X23: Talaromyces wortmanii	0
X24: Thielavia terricola	0
X25: Trichoderma harzianum	0
X26: Trichoderma koningii	0
X27: Ulocladium chartarum	0
T: trigo	
i: muestreos 1, 2, y 3.	
P: partículas	
S: raíces sin esterilización superficial	
C: raíces con esterilización superficial	
j: submuestras 1, 2, 3,.....10.	

Lista de especies fúngicas aisladas de un cultivo de trigo
(*Triticum aestivum*). Siglas según Kirk & Ansell (1992).

1 <i>Acroconidiella</i> sp.	
2 <i>Alternaria alternata</i>	(Fr.) Keissl.
3 <i>Alternaria tenuissima</i>	(Kunze ex Pers.) Wiltshire
4 <i>Aspergillus fumigatus</i>	Fresen
5 <i>Aspergillus niger</i>	Tiegh.
6 <i>Chaetomium dolichotrichum</i>	Ames
7 <i>Chaetomium globosum</i>	Kunze ex Steud.
8 <i>Chaetomium mollicellum</i>	Ames
9 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	(Penz.) Penz. & Sacc.
10 <i>Curvularia brachyspora</i>	Boedijn
11 <i>Cylindrocarpon didymum</i>	(Hartig) Wollenw.
12 <i>Cylindrocarpon obtusisporum</i>	(Cooke & Hark.) Wollenw.
13 <i>Drechslera australiensis</i>	(Bugnicourt) Subram. & Jain
14 <i>Fusarium equiseti</i>	(Corda) Sacc.
15 <i>Fusarium lateritium</i>	(Nees) emend. Snyder & Hausen
16 <i>Fusarium oxysporum</i>	Schldtl. emend. Snyder & Hausen
17 <i>Fusarium solani</i>	(Mart.) Sacc.
18 <i>Fusarium</i> sp.	
19 <i>Gliocladium roseum</i>	Bain
20 <i>Gliocladium</i> sp.	
21 <i>Humicola fuscoatra</i>	Traaen
22 Indeterminado	
23 Micelio dematiáceo estéril 1	
24 Micelio dematiáceo estéril 2	
25 Micelio moniliáceo estéril 1	
26 Micelio moniliáceo estéril 2	
27 Micelio estéril rojizo	
28 <i>Mucor hiemalis</i> var. <i>corticola</i>	(Hagem) Schipper
29 <i>Paecilomyces variotii</i>	Bain
30 <i>Paecilomyces</i> sp.	
31 <i>Penicillium frequentans</i>	Westling
32 <i>Penicillium funiculosum</i>	Thom
33 <i>Penicillium notatum</i>	Westling
34 <i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>corymbiferum</i>	(Westling) Samson, Stolk & Hadlok
35 <i>Periconia macrospina</i>	Lefebvre & A.G. Johnson
36 <i>Phoma eupyrena</i>	Sacc.
37 <i>Phoma glomerata</i>	(Corda) Wollenw. & Hochapfel
38 <i>Phoma nebulosa</i>	(Pers. ex S.F. Gray) Berk.
39 <i>Phoma pomorum</i>	Thüm
40 <i>Rhizopus arrhizus</i>	Fischer
41 <i>Talaromyces flavus</i>	(Klöcker) Stolk & Samson
42 <i>Talaromyces wortmanii</i>	(Klöcker) C.R. Benjamin
43 <i>Thielavia terricola</i>	(Gilman & Abbott) Emmons
44 <i>Trichoderma harzianum</i>	Rifai
45 <i>Trichoderma koningii</i>	Oudem.
46 <i>Trichoderma pseudokoningii</i>	Rifai
47 <i>Trichoderma viride</i>	Pers. ex Gray
48 <i>Ulocladium chartarum</i>	(Preuss) Simmons

Análisis de las comunidades fúngicas en todos los tratamientos

En el análisis de componentes principales derivados del análisis efectuado sobre la matriz de frecuencias (26 especies x 86 censos), los primeros 3 componentes explicaron el 65.51% de la variación total entre los censos en relación a las especies presentes y sus valores de frecuencias.

En la Tabla 8 pueden observarse las contribuciones de las especies a los cinco componentes.

El componente 2 segrega hacia el sector positivo del eje 18 censos de un total de 28 pertenecientes a los tratamientos de raíces sin esterilización superficial, este sector del eje se encuentra caracterizado por *T. koningii*, *Alternaria alternata* y *T. harzianum*. Hacia el sector negativo del eje se ubican los censos pertenecientes a las raíces con esterilización superficial, caracterizados por las siguientes especies *Fusarium equiseti*, *C. didymum* y *P. notatum*.

Cercanos al 0, (en el cruce del componente 2 con el 4) se encuentran las muestras pertenecientes a los aislamientos sobre partículas (Fig. 17).

Los censos fueron analizados mediante análisis discriminante (AD) utilizando como variable de agrupamiento los muestreos.

El análisis discriminante dio como resultado 2 funciones, las cuales explicaron el 100% de la varianza total. Tabla 9a.

La primera función estuvo asociada con *F. solani*, *P. macrospinoso* (-) y *T. harzianum* (-). La segunda función con Micelio estéril rojizo y *P. macrospinoso*.

La distribución de las muestras en relación a las dos funciones discriminantes (Fig.18) muestra que los censos correspondientes al 1er. Muestreo están asociados a valores positivos de la variable canónica 1 (VC1), los censos del 2do. Muestreo están asociados a valores positivos de VC1 y los censos del 3er. Muestreo a valores negativos de VC1 y VC2.

La clasificación general obtenida del análisis discriminante muestra que el 65,1 % de las muestras estuvieron bien clasificadas. Tabla 9b.

		C 1	C2	C3	C4	C5
X(2)	2	-0.137	0.572	-0.083	-0.240	-0.205
X(3)	3	-0.158	0.093	-0.125	-0.158	-0.215
X(4)	4	-0.224	-0.225	-0.116	-0.461	-0.270
X(5)	5	-0.130	0.037	-0.087	0.418	0.223
X(6)	6	-0.037	-0.009	-0.030	0.027	0.298
X(7)	7	-0.134	-0.318	-0.014	-0.240	-0.347
X(8)	8	-0.037	0.527	-0.042	0.008	0.203
X(9)	9	-0.060	-0.058	0.062	0.569	-0.124
X(10)	10	0.139	0.245	0.163	0.038	-0.029
X(11)	11	-0.088	0.151	-0.047	-0.130	0.655
X(12)	12	0.738	-0.167	0.044	-0.020	-0.201
X(13)	13	-0.082	0.085	-0.049	0.002	0.426
X(14)	14	-0.056	-0.153	-0.026	-0.218	0.544
X(15)	15	-0.049	-0.175	0.113	-0.470	0.199
X(16)	16	0.630	0.029	0.192	-0.308	0.103
X(17)	17	-0.081	-0.034	0.795	0.176	-0.060
X(18)	18	-0.115	-0.222	0.641	-0.253	-0.188
X(19)	19	0.248	0.072	0.741	-0.090	0.056
X(20)	20	0.325	-0.134	-0.229	0.204	-0.176
X(21)	21	-0.191	-0.120	-0.128	0.217	0.063
X(22)	22	-0.091	-0.180	-0.068	-0.024	-0.140
X(23)	23	0.770	-0.033	-0.100	-0.051	-0.035
X(24)	24	-0.095	-0.200	0.001	0.386	-0.069
X(25)	25	-0.149	0.525	-0.062	0.072	-0.141
X(26)	26	-0.072	0.704	-0.039	-0.055	-0.137
X(27)	27	0.239	0.091	0.197	0.226	-0.103
VP		2.035	1.883	1.852	1.637	1.627

Tabla 8. Contribución de las especies al espacio de los componentes.

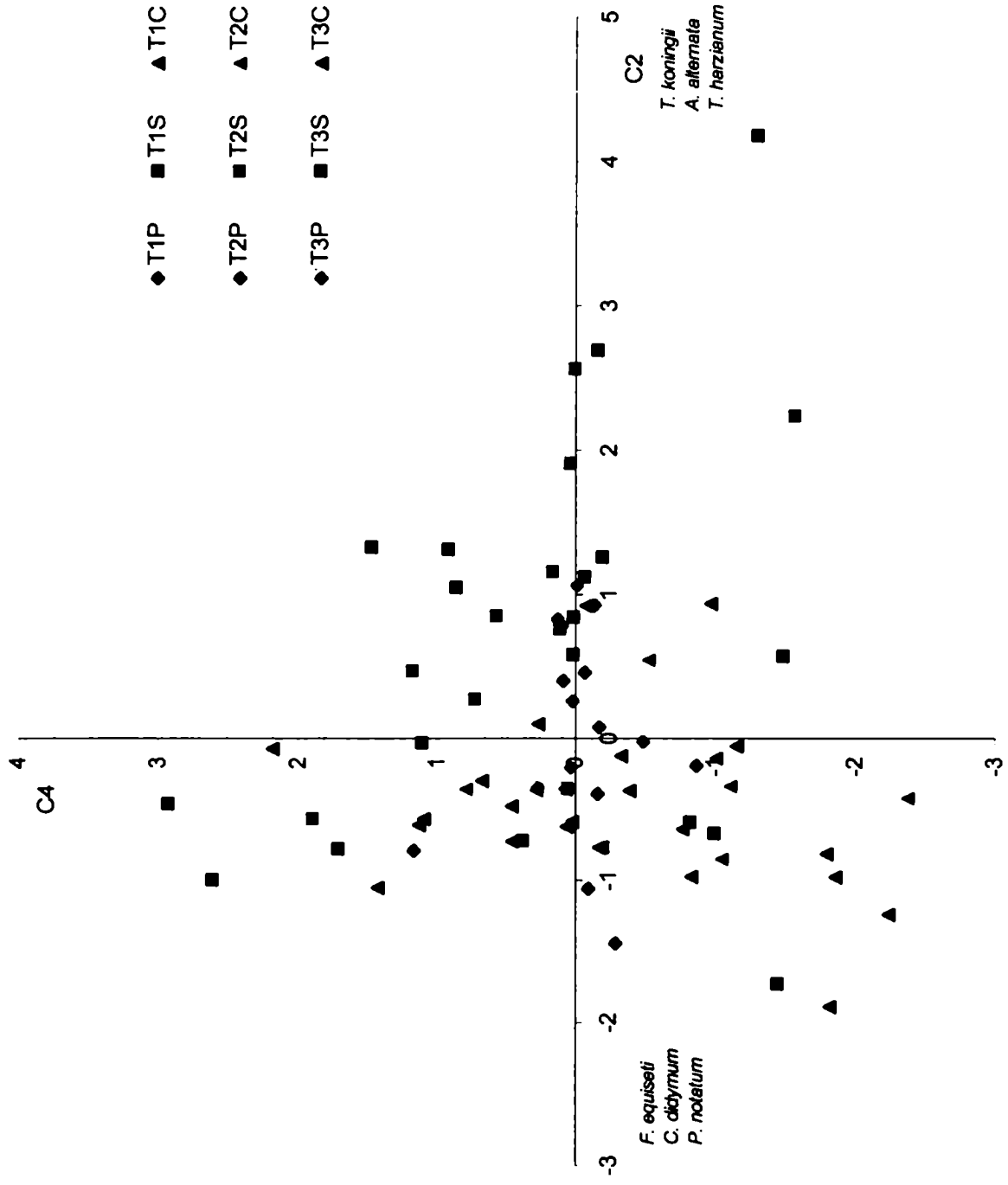


Fig. 17. Distribución de las muestras en el espacio de los componentes C2 y C4 para trigo.

variable	Coeficiente estandarizado para las variables canónicas	
	F1	F2
<i>Cylindrocarpon didymum</i>	0,50583	-0,44464
<i>Fusarium solani</i>	0,64961	-0,19497
Micelio estéril rojizo	-0,27032	0,63354
<i>Periconia macrospinoso</i>	-0,70800	-0,63635
<i>Trichoderma harzianum</i>	-0,68741	0,11619
Varianza explicada acumulada	70	100

Tabla 9a. Coeficiente estandarizado para las variables canónicas. Varianza explicada.

Grupo	% de clasificación correcta	N° de casos clasificados		
		1er. Muestreo	2do. Muestreo	3er. Muestreo
1er. Muestreo	62,1	18	11	0
2do. Muestreo	83,3	2	25	3
3er. Muestreo	48,1	2	12	13
Total	65,1	22	48	16

Tabla 9b. Clasificación del análisis discriminante basado en las frecuencias de los hongos del suelo, usando el muestreo como variable discriminante.

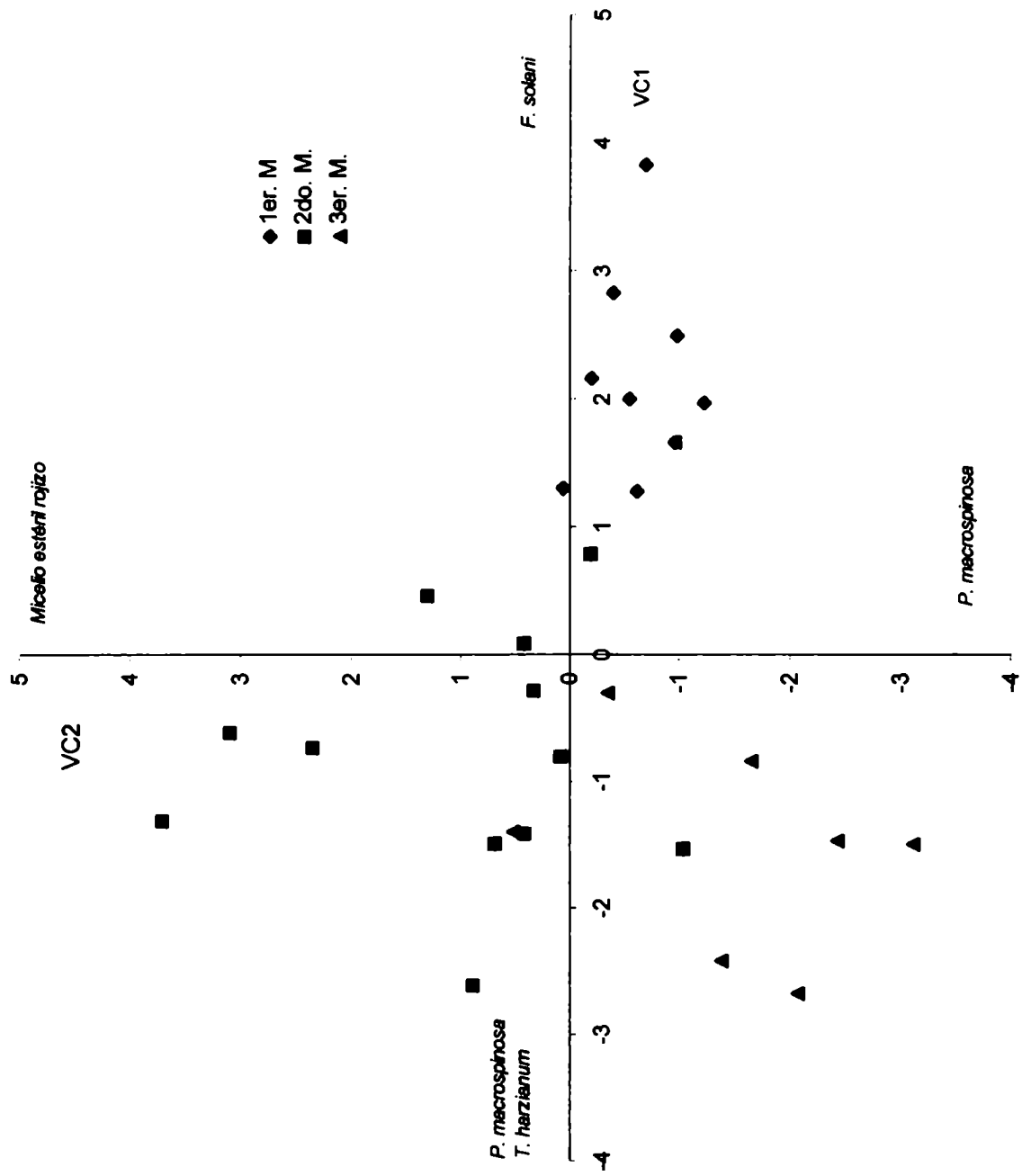


Fig. 18. Análisis de la función discriminante de los datos de frecuencias en el espacio de las variables canónicas (VC1, VC2)

Análisis de los censos por muestreo

En este análisis, puede observarse, que en el 1er. muestreo los primeros 3 componentes explicaron un 67.07% de la varianza total (Tabla 10). El sector positivo del componente 5 segrega los censos correspondientes a las partículas, caracterizados por las especies *Phoma eupyrena*, *Phoma nebulosa* y *Fusarium equiseti*, en el sector negativo se separan los censos de aislamientos sobre raíces con esterilización superficial caracterizados por m. moniliáceo 2, *P. notatum* y *C. didymum*.

Sobre el sector positivo del eje 3 se ubican 6 censos correspondientes a raíces con esterilización superficial y 3 de raíces sin esterilización caracterizados por *F. solani*, *C. obtusisporum* y *T. terricola*. Hacia el sector negativo del eje, caracterizan al mismo, *P. notatum* y *F. equiseti* (Fig. 19).

Los censos fueron analizados mediante análisis discriminante (AD) utilizando como variable de agrupamiento el tipo de aislamiento.

El análisis discriminante dio como una única función que explicó el 100% de la varianza total. Tabla 11a.

La función estuvo asociada con *P. nebulosa* y *A. niger*.

La distribución de las muestras en relación a la función discriminante (Fig.20) muestra que los censos correspondientes a las partículas están asociados a valores positivos de la variable canónica 1 (VC1) y los censos correspondientes a las raíces sin esterilización superficial están asociados a valores negativos de VC1.

La clasificación general obtenida del análisis discriminante muestra que el 58,6 % de las muestras estuvieron bien clasificadas. Tabla 11b.

En el segundo muestreo, en la época de floración de las plántulas de trigo, los primeros 3 componentes explicaron el 67.32% de la varianza total (Tabla 12). Todos los censos pertenecientes a las partículas y a las raíces sin esterilización se encuentran ubicados juntos sobre el sector negativo del componente 1 caracterizado

por *T. koningii* y *C. didymum*. Hacia el sector positivo de este componente se segregan las muestras de raíces con esterilización superficial caracterizados por *Ulocladium chartarum* y m. dematiáceo estéril 1.

Con respecto al componente 3 las muestras de partículas y raíces sin esterilización se ubican cercanas al 0 y hacia el extremo negativo del mismo, caracterizados por *P. eupyrena* y *A. niger*. En el sector positivo se segregan 6 casos de los correspondientes a raíces con esterilización superficial, los que están caracterizados por m. estéril rojizo y *P. verrucosum* var. *corimbyferum*. (Figura 21).

Los censos fueron analizados mediante análisis discriminante (AD) utilizando como variable de agrupamiento el tipo de aislamiento.

El análisis discriminante dio como resultado 2 funciones, las cuales explicaron el 100% de la varianza total. Tabla 13a.

La primera función estuvo asociada con Micelio estéril rojizo (-) y micelio estéril hialino(-). La segunda función con *C. obtusisporum* (-).

La distribución de las muestras en relación a las dos funciones discriminantes (Fig.22) muestra que los censos correspondientes a las partículas están asociados a valores positivos de la variable canónica 1 (VC1), los censos de raíces sin esterilización superficial están asociados a valores positivos de VC1 y valores negativos de VC2 y los censos de las raíces con esterilización superficial a valores negativos de VC2.

La clasificación general obtenida del análisis discriminante muestra que el 83,3 % de las muestras estuvieron bien clasificadas. Tabla 13b.

En el 3er. muestreo se visualiza una segregación de las muestras de partículas de las correspondientes a raíces con y sin esterilización superficial. Los 3 primeros componentes explicaron un 67.95% de la varianza total (Tabla 14).

Del análisis del componente 2 con el 3, los censos de partículas se ubican hacia el sector positivo del C2 caracterizado por *P. eupyrena* e Indeterminado. En el

sector negativo del mismo se ubican los censos correspondientes a raíces con la presencia principalmente de *P. macrospinosa* y m. dematiáceo 1.

Sobre el C3 en el sector positivo se ubican 5 muestras pertenecientes a raíces sin esterilización, 1 a raíz con esterilización y 3 a partículas caracterizadas por *U. chartarum* y *T. koningii*. Hacia el lado negativo del componente se ubican mayormente las muestras de raíces con esterilización con la presencia de *P. macrospinosa* y *C. didymum*. (Figura 23).

Los censos fueron analizados mediante análisis discriminante (AD) utilizando como variable de agrupamiento el tipo de aislamiento.

El análisis discriminante dio como resultado 2 funciones, las cuales explicaron el 100% de la varianza total. Tabla 15a.

La primera función estuvo asociada con *P. macrospinosa* (-) y micelio dematiáceo estéril (-). La segunda función con *T. koningii* (-) y *A. alternata* (-).

La distribución de las muestras en relación a las dos funciones discriminantes (Fig.24) muestra que los censos correspondientes a las partículas están asociados a valores positivos de VC1 y VC2, los censos de raíces sin esterilización superficial están asociados a valores negativos de VC2 y los censos de las raíces con esterilización superficial a valores positivos de VC2.

La clasificación general obtenida del análisis discriminante muestra que el 85,2 % de las muestras estuvieron bien clasificadas. Tabla 15b.

	C1	C2	C3	C4	C5
X(2)	0.936	-0.004	-0.085	-0.025	-0.023
X(3)	-0.045	-0.118	-0.032	-0.011	-0.100
X(4)	-0.295	-0.407	-0.276	-0.145	-0.384
X(5)	-0.049	0.028	0.669	-0.093	-0.013
X(6)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X(7)	-0.195	-0.094	-0.418	-0.239	0.406
X(8)	0.847	-0.044	-0.086	-0.017	-0.056
X(9)	-0.120	0.127	0.784	-0.093	-0.031
X(10)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X(11)	-0.085	-0.029	-0.060	0.947	-0.036
X(12)	-0.180	-0.026	-0.187	-0.238	-0.050
X(13)	-0.063	0.000	-0.081	0.945	-0.002
X(14)	0.000	0.000	-0.000	0.000	0.000
X(15)	-0.041	-0.127	-0.224	-0.094	-0.458
X(16)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X(17)	-0.057	0.965	-0.070	-0.029	-0.038
X(18)	-0.200	0.417	-0.500	-0.234	-0.360
X(19)	-0.070	0.730	-0.261	-0.063	-0.199
X(20)	0.000	0.000	-0.000	-0.000	0.000
X(21)	-0.081	-0.099	-0.184	-0.070	0.614
X(22)	-0.054	-0.034	-0.160	-0.060	0.673
X(23)	-0.000	-0.000	0.000	0.000	0.000
X(24)	-0.063	-0.040	0.567	-0.087	-0.052
X(25)	-0.000	0.000	-0.000	-0.000	-0.000
X(26)	0.936	-0.004	-0.085	-0.025	-0.023
X(27)	-0.009	0.609	0.163	0.023	0.147
VP	2.721	2.246	2.162	2.029	1.566

Tabla 10. Contribución de las especies al espacio de los componentes.

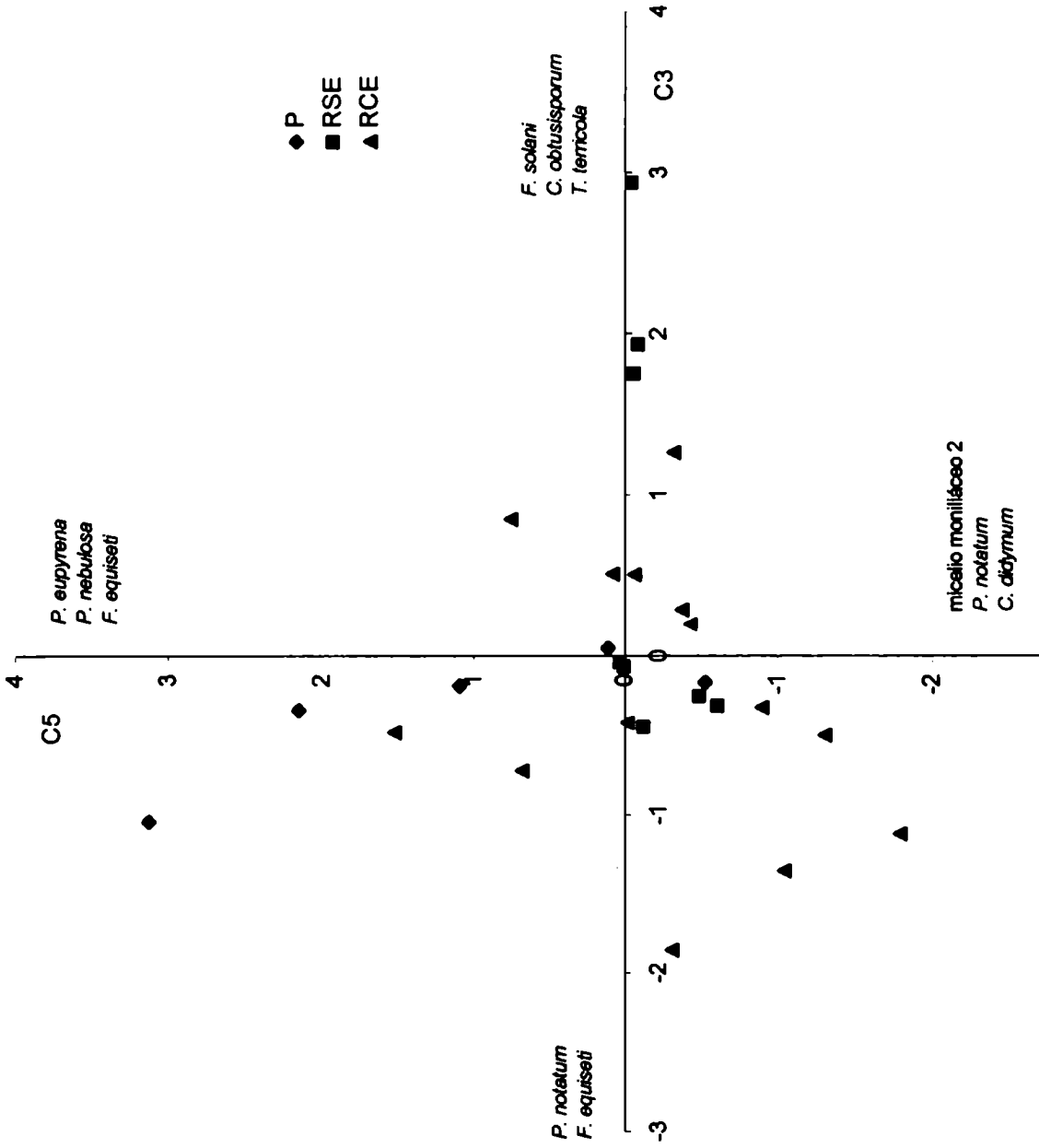


Fig. 19. Distribución de las muestras correspondientes al 1er. Muestreo de trigo en el espacio de los componentes C3 y C5.

variable	Coeficiente estandarizado para las variables canónicas	
	F1	F2
<i>Aspergillus niger</i>	0,80899	0
<i>Phoma nebulosa</i>	0,97878	0
Varianza explicada acumulada	100	100

Tabla 11a. Coeficiente estandarizado para las variables canónicas.
Varianza explicada.

Grupo	% de clasificación correcta	N° de casos clasificados		
		particula	raiz s/est.	raiz c/est.
particula	60	3	0	2
raiz s/est.	0	0	0	10
raiz c/est.	100	0	0	14
Total	58,6	3	0	26

Tabla 11b. Clasificación del análisis discriminante basado en las frecuencias de los hongos del suelo, usando el tipo de aislamiento como variable discriminante.

◆ partícula
■ raíz
s/est.

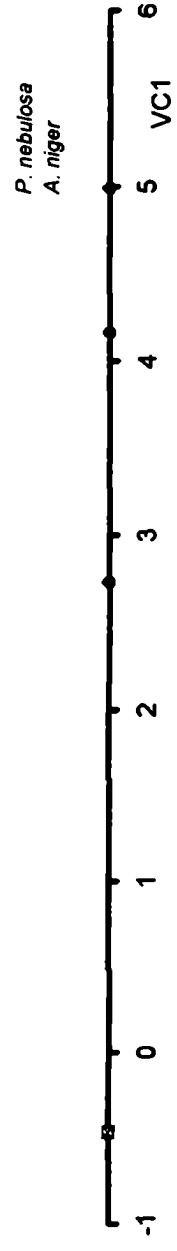


Fig. 20. Análisis de la función discriminante de los datos de frecuencias en el espacio de la variable canónica (VC1)

	C1	C2	C3	C4	C5
X(2)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X(3)	-0.003	-0.195	-0.342	0.055	-0.208
X(4)	-0.281	0.075	0.305	-0.005	-0.379
X(5)	-0.092	-0.235	-0.185	0.785	-0.025
X(6)	-0.057	0.144	-0.005	0.362	-0.053
X(7)	-0.154	-0.063	0.046	-0.113	-0.290
X(8)	-0.086	-0.130	0.155	0.738	0.357
X(9)	-0.101	-0.077	-0.026	-0.092	0.861
X(10)	-0.126	-0.243	0.137	-0.468	0.258
X(11)	-0.022	0.834	-0.173	-0.056	0.029
X(12)	0.796	-0.118	0.392	-0.110	-0.012
X(13)	-0.157	-0.164	0.042	0.401	0.042
X(14)	-0.047	0.823	-0.142	-0.001	-0.019
X(15)	-0.097	0.567	0.205	-0.028	-0.117
X(16)	0.142	0.009	0.867	0.014	-0.163
X(17)	0.000	0.000	-0.000	-0.000	0.000
X(18)	0.000	-0.000	-0.000	-0.000	0.000
X(19)	0.055	-0.116	0.677	0.025	0.041
X(20)	0.732	-0.030	-0.210	-0.091	-0.021
X(21)	-0.056	-0.325	-0.463	0.364	-0.029
X(22)	0.000	-0.000	-0.000	-0.000	-0.000
X(23)	0.770	-0.060	0.227	-0.049	-0.044
X(24)	-0.038	-0.031	-0.083	-0.105	-0.096
X(25)	-0.175	-0.134	-0.061	-0.108	0.791
X(26)	-0.266	-0.347	-0.185	-0.433	-0.110
X(27)	0.827	-0.037	-0.146	-0.065	0.004
VP	2.761	2.205	2.123	2.071	1.905

Tabla 12. Contribución de las especies al espacio de los componentes.

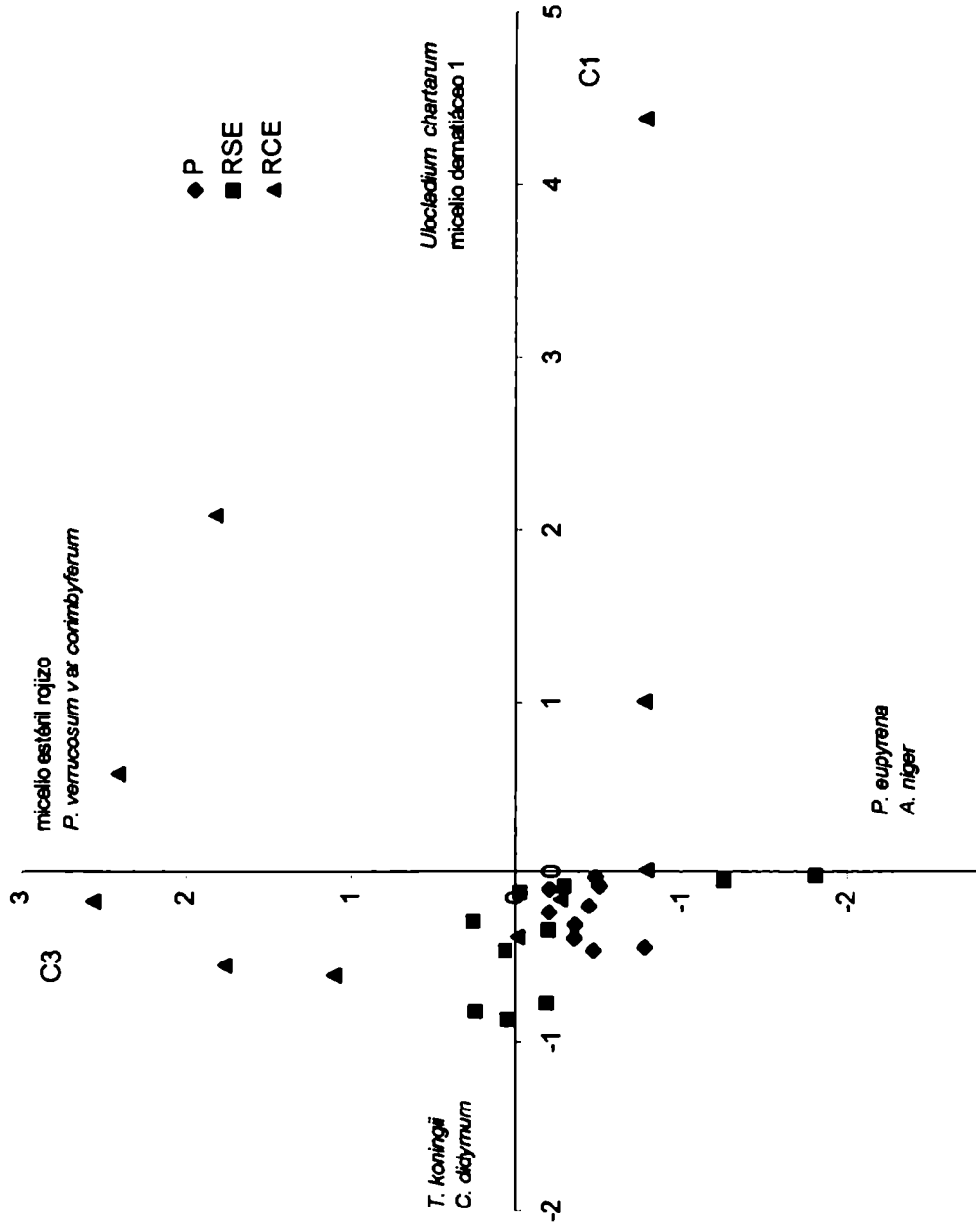


Fig. 20. Distribución de las muestras correspondientes al 2do. Muestreo de trigo en el espacio de los componentes C1 y C3.

variable	Coeficiente estandarizado para las variables canónicas	
	F1	F2
<i>Cylindrocarpon obtusisporum</i>	0,10268	-0,99471
Micelio estéril hialino 1	-2,07792	-0,21449
Micelio estéril rojizo	-2,31145	-0,23859
<i>Periconia macrospinosa</i>	-1,85208	-0,19117
Varianza explicada acumulada	97	100

Tabla 13a. Coeficiente estandarizado para las variables canónicas. Varianza explicada.

Grupo	% de clasificación correcta	N° de casos clasificados		
		partícula	raiz s/est.	raiz c/est.
partícula	100	10	0	0
raiz s/est.	50	5	5	0
raiz c/est.	100	0	0	10
Total	83,3	15	5	10

Tabla 13b. Clasificación del análisis discriminante basado en las frecuencias de los hongos del suelo, usando el tipo de aislamiento como variable discriminante.

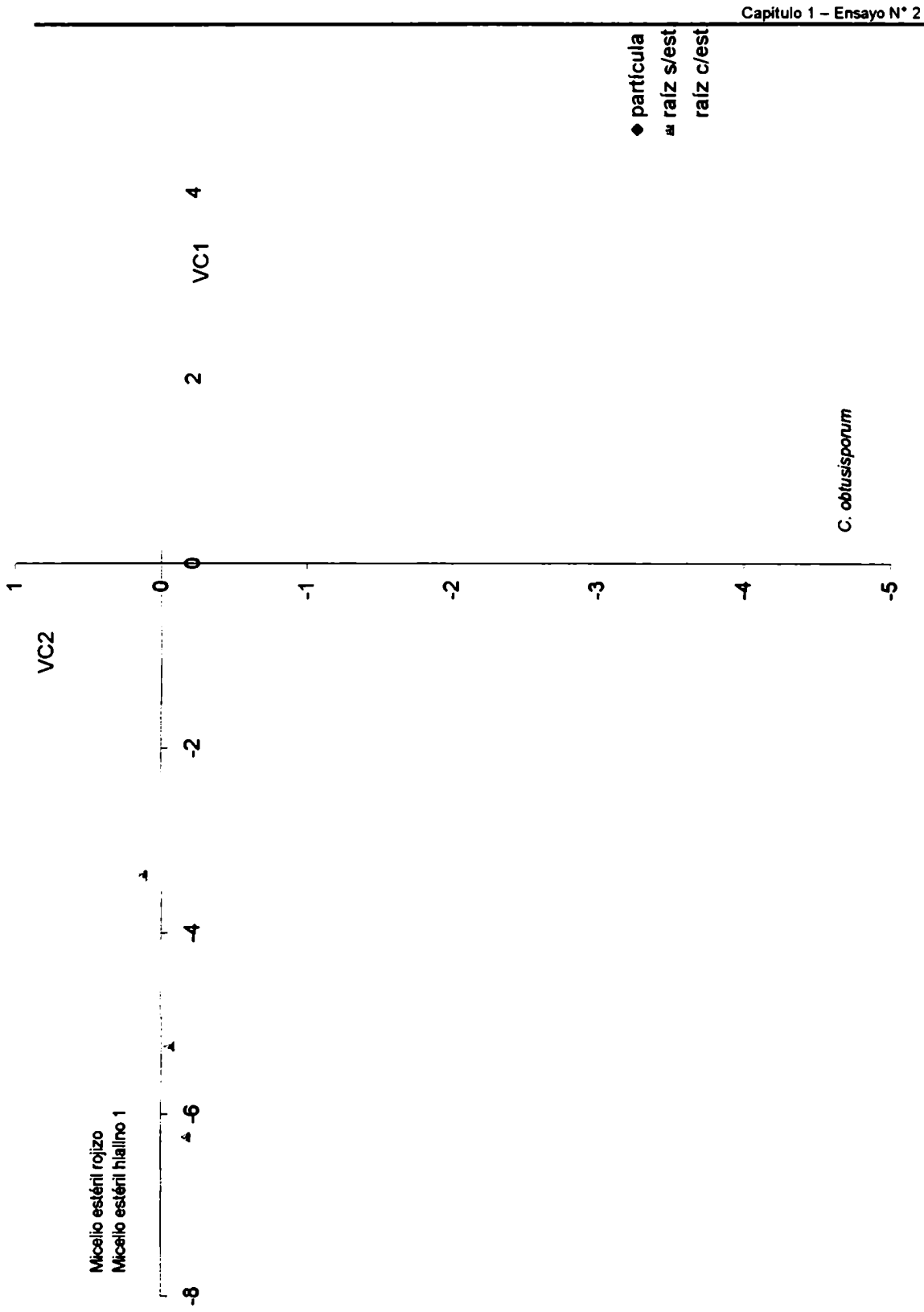


Fig. 22. Análisis de la función discriminante de los datos de frecuencias en el espacio de las variables canónicas (VC1, VC2)

	C1	C2	C3	C4	C5
X(2)	0.813	-0.156	-0.100	-0.248	0.145
X(3)	0.508	-0.033	0.005	-0.311	-0.124
X(4)	0.498	-0.269	-0.320	0.298	-0.471
X(5)	0.042	-0.161	-0.184	0.606	-0.212
X(6)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X(7)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X(8)	-0.056	0.078	0.081	0.797	0.205
X(9)	0.108	-0.258	-0.125	-0.282	0.656
X(10)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X(11)	-0.093	0.776	-0.129	0.020	0.097
X(12)	-0.434	-0.352	-0.151	-0.251	0.023
X(13)	0.076	-0.044	-0.112	-0.105	-0.582
X(14)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X(15)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X(16)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X(17)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X(18)	-0.000	-0.000	0.000	0.000	-0.000
X(19)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X(20)	-0.568	-0.561	-0.374	-0.065	0.223
X(21)	-0.100	0.812	-0.123	-0.204	-0.006
X(22)	-0.000	0.000	0.000	0.000	-0.000
X(23)	0.000	-0.000	0.000	-0.000	-0.000
X(24)	0.000	0.000	-0.000	-0.000	0.000
X(25)	0.667	-0.141	0.177	0.241	0.440
X(26)	0.315	-0.146	0.752	0.224	0.106
X(27)	-0.133	-0.070	0.790	-0.144	-0.219
VP	2.280	1.944	1.597	1.579	1.427

Tabla 14. Contribución de las especies al espacio de los componentes.

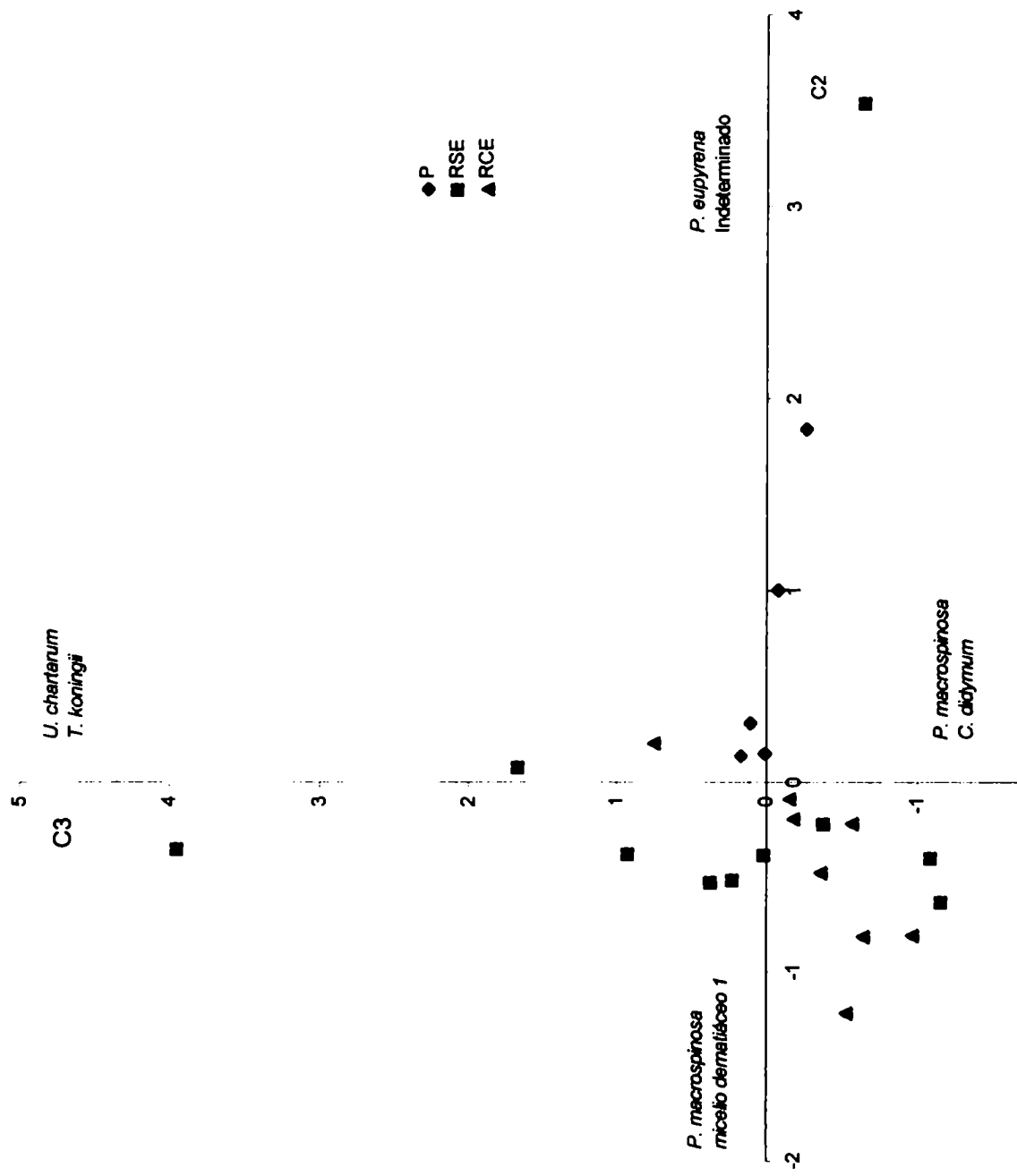


Fig. 21. Distribución de las muestras correspondientes al 3er. Muestreo de trigo en el espacio de los componentes C2 y C3.

variable	Coeficiente estandarizado para las variables canónicas	
	F1	F2
<i>Alternaria alternata</i>	-0,45754	-0,65176
Micelio dematiáceo estéril 2	-0,84128	0,14743
<i>Periconia macrospinosa</i>	-1,35551	0,05339
<i>Trichoderma koningii</i>	-0,61616	-0,85131
Varianza explicada acumulada	68	100

Tabla 15a. Coeficiente estandarizado para las variables canónicas.
Varianza explicada.

Grupo	% de clasificación correcta	N° de casos clasificados		
		partícula	raíz s/est.	raíz c/est.
partícula	100	7	0	0
raíz s/est.	70	1	7	2
raíz c/est.	90	0	1	9
Total	85,2	8	8	11

Tabla 15b. Clasificación del análisis discriminante basado en las frecuencias de los hongos del suelo, usando el tipo de aislamiento como variable discriminante.

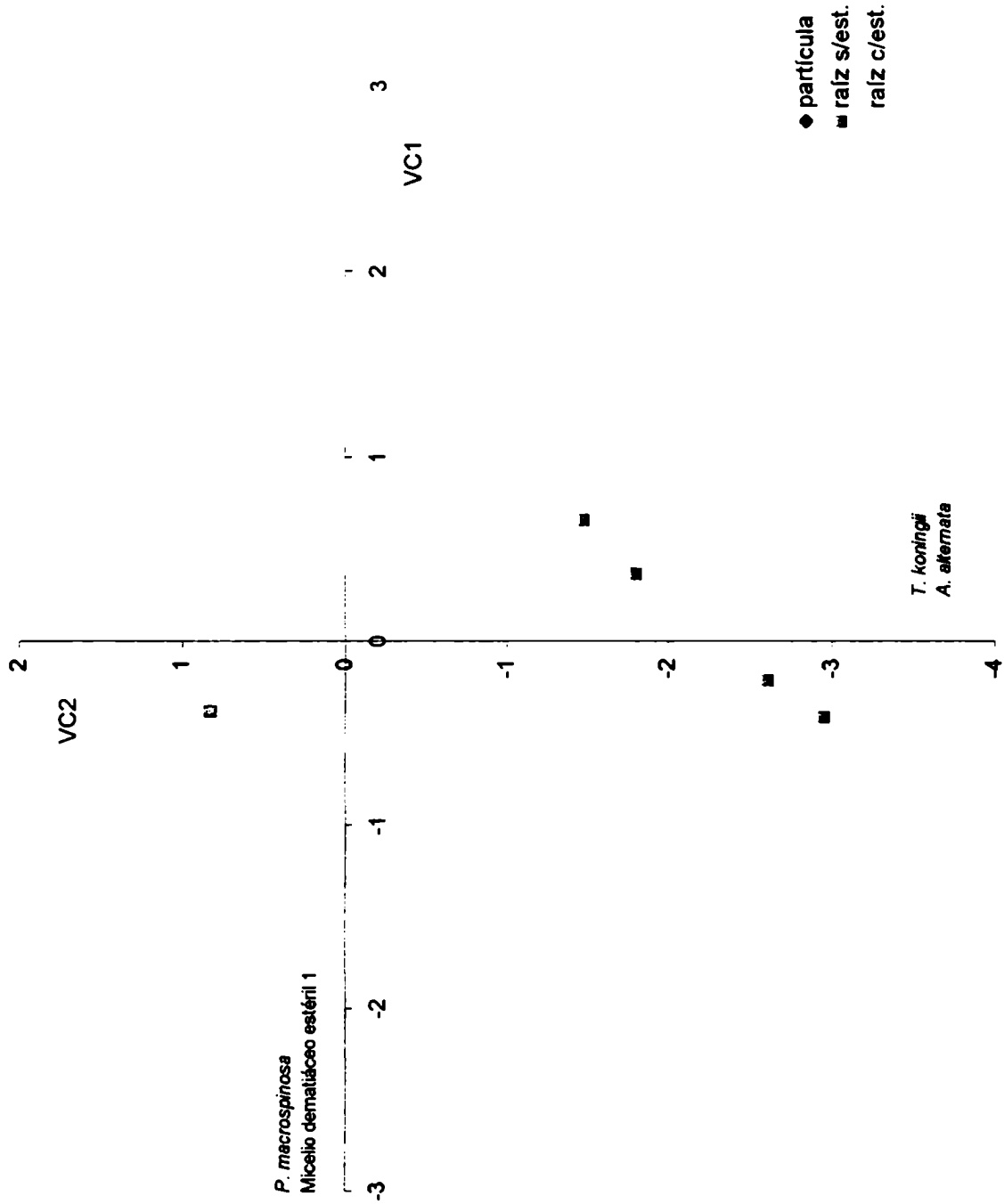


Fig. 23. Análisis de la función discriminante de los datos de frecuencias en el espacio de las variables canónicas (VC1, VC2)

Análisis de las comunidades fúngicas de partículas y raíces sin esterilización superficial

Los primeros 3 componentes explicaron un 65.77% de la varianza total. Tabla 16.

El componente 1 en su sector negativo del eje segrega los censos correspondientes a los muestreos de partículas, caracterizados por *A. niger*, hacia el sector positivo del eje se encuentran 14 muestras que corresponden con los censos de raíces sin esterilización superficial, caracterizados por la presencia de *C. obtusisporum* y *F. oxysporum*. Figura 25.

Hacia el sector positivo del eje 3 se separan la mayoría de las muestras de raíces sin esterilización superficial y 7 de partículas caracterizadas por las especies *T. harzianum* y *A. alternata*. Hacia el extremo negativo del eje pero cercanos al 0 se encuentran las restantes muestras de partículas y raíces sin esterilización caracterizadas por *F. equiseti*.

Los censos fueron analizados mediante análisis discriminante (AD) utilizando como variable de agrupamiento los tipos de aislamientos (partículas y raíces sin esterilización superficial).

El análisis discriminante dio como resultado una única función explicando el 100% de la varianza total. Tabla 17a.

La función estuvo asociada con *C. didymum* (-), *F. oxysporum* (-) y *F. solani* (-).

La distribución de las muestras en relación a la función discriminante (Fig. 26) muestra que los censos correspondientes a las partículas están asociados a valores positivos de VC1 y los censos de raíces sin esterilización superficial están asociados a valores negativos de la misma variable canónica (VC1).

La clasificación general obtenida del análisis discriminante muestra que el 88,5 % de las muestras estuvieron bien clasificadas. Tabla 17b.

	C1	C2	C3	C4	C5
X(2)	-0.278	0.133	0.496	-0.241	0.319
X(3)	-0.478	-0.346	0.223	-0.217	0.107
X(4)	-0.195	-0.040	-0.243	-0.141	0.702
X(5)	0.682	-0.265	0.080	0.192	0.106
X(6)	0.363	-0.064	-0.032	-0.029	0.000
X(7)	-0.132	0.031	-0.539	-0.021	0.141
X(8)	0.528	0.071	0.361	-0.282	0.190
X(9)	-0.019	-0.023	0.294	0.763	-0.018
X(10)	-0.114	0.394	0.070	0.205	-0.237
X(11)	0.005	-0.286	0.025	-0.232	-0.450
X(12)	0.000	-0.000	0.000	0.000	0.000
X(13)	0.372	0.028	0.085	-0.005	0.198
X(14)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X(15)	-0.000	0.000	-0.000	0.000	-0.000
X(16)	-0.000	-0.000	0.000	-0.000	0.000
X(17)	0.000	-0.000	0.000	-0.000	0.000
X(18)	-0.000	0.000	-0.000	-0.000	-0.000
X(19)	0.000	-0.000	0.000	-0.000	0.000
X(20)	0.448	0.109	0.007	-0.148	0.298
X(21)	0.013	-0.578	0.068	-0.148	-0.499
X(22)	-0.079	0.044	-0.465	-0.014	-0.079
X(23)	-0.000	0.000	-0.000	-0.000	-0.000
X(24)	-0.014	-0.033	-0.102	0.643	-0.019
X(25)	-0.143	0.207	0.550	0.195	0.184
X(26)	-0.042	0.703	0.323	-0.256	-0.089
X(27)	0.028	0.506	-0.117	-0.151	-0.325
VP	1.619	1.601	1.534	1.505	1.462

Tabla 16. Contribución de las especies al espacio de los componentes.

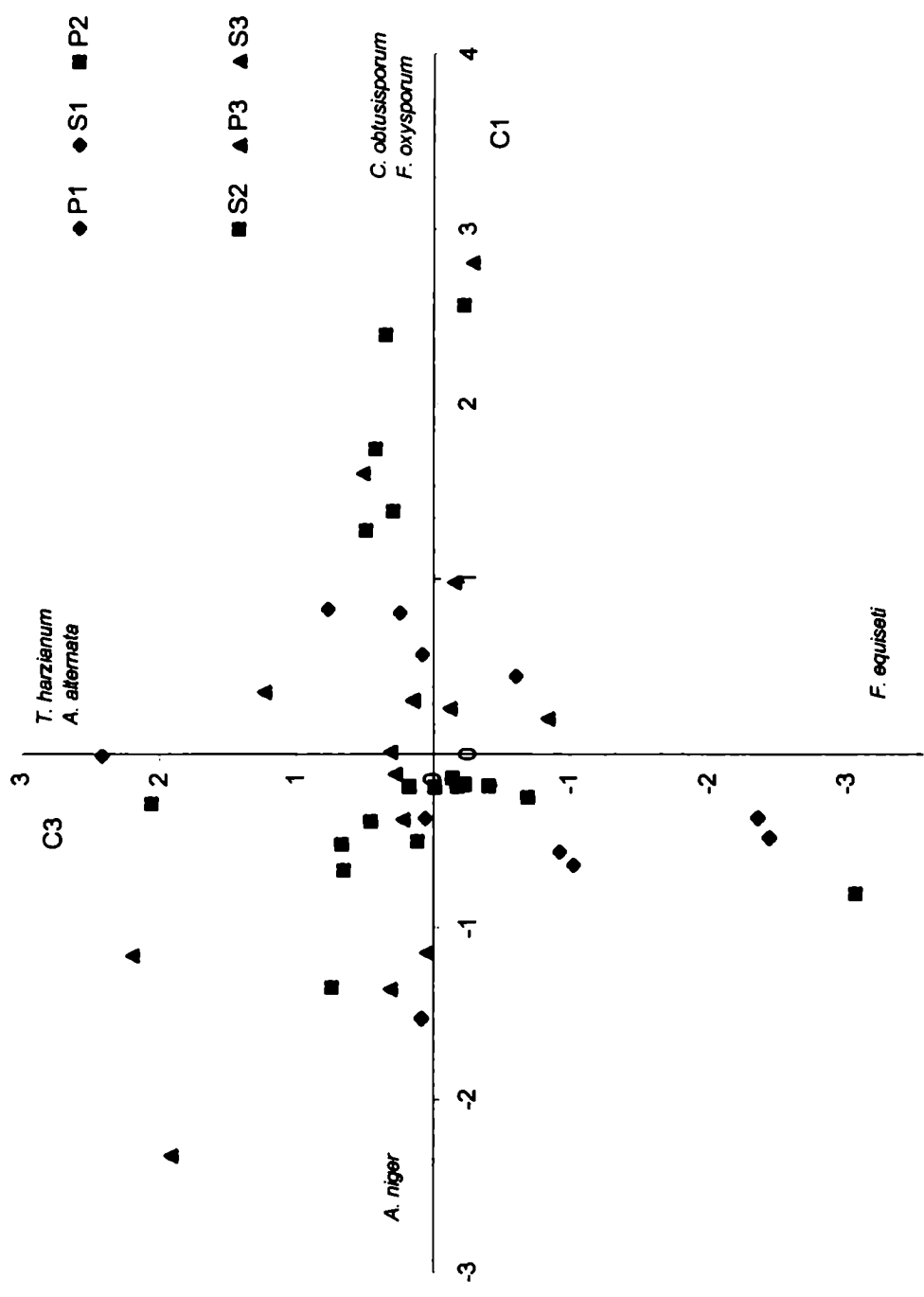


Fig. 23. Distribución de las muestras correspondientes a partículas y raíces sin esterilización superficial de trigo en el espacio de los componentes C1 y C3.

variable	Coeficiente estandarizado para las variables canónicas	
	F1	
<i>Cylindrocarpon didymum</i>	1,17569	
<i>Cylindrocarpon obtusisporum</i>	-0,48010	
<i>Fusarium oxysporum</i>	-0,91668	
<i>Fusarium solani</i>	-0,72212	
<i>Fusarium sp.</i>	-0,53276	
<i>Phoma eupyrena</i>	-0,51629	
<i>Trichoderma koningii</i>	-0,41559	
<i>Ulocladium chartarum</i>	-0,9841	
Varianza explicada acumulada	100	

Tabla 17a. Coeficiente estandarizado para las variables canónicas.
Varianza explicada.

Grupo	% de clasificación correcta	N° de casos clasificados	
		partícula	raiz s/est.
partícula	100	22	0
raiz s/est.	80	6	24
Total	88,5	28	24

Tabla 17b. Clasificación del análisis discriminante basado en las frecuencias de los hongos del suelo, usando el tipo de aislamiento como variable discriminante

C. didymum
F. oxysporum
F. solani

◆ partícula
■ raíz s/est.

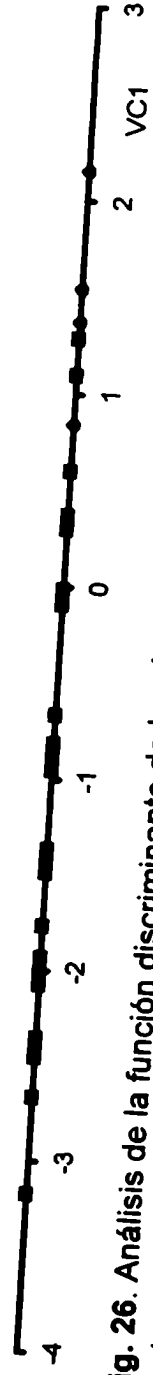


Fig. 26. Análisis de la función discriminante de los datos de frecuencias en el espacio de la variable canónica (VC1)

Análisis de las comunidades fúngicas de las raíces con y sin esterilización superficial

Del análisis de estos censos, surge que los 3 primeros componentes explicaron un 65.67% de la varianza total. Tabla 18.

El componente 1 segrega en su lado negativo del eje casi la totalidad de las muestras correspondientes a las raíces con esterilización superficial, caracterizadas por la presencia de *T. terricola* y *P. macrospinoso*. Hacia el sector positivo del eje se encuentran principalmente las muestras correspondientes a los censos de raíces sin esterilización, caracterizados por las especies de *T. koningii* y *A. alternata*.

Con respecto al eje 5, en su sector negativo se concentra la mayoría de las muestras correspondientes a raíces con y sin esterilización, caracterizadas por la presencia de *C. obtusisporum*. En el sector positivo del eje quedan principalmente las muestras correspondientes a raíces con esterilización superficial, caracterizadas por *C. didymum*. Figura 27.

Los censos fueron analizados mediante análisis discriminante (AD) utilizando como variable de agrupamiento los tipos de aislamientos (raíces con y sin esterilización superficial).

El análisis discriminante dio como resultado una única función explicando el 100% de la varianza total. Tabla 19a.

La función estuvo asociada con *C. obtusisporum* y con micelio estéril hialino 2 (-).

La distribución de las muestras en relación a la función discriminante (Fig.28) muestra que los censos correspondientes a las raíces sin esterilización superficial están asociados a valores positivos de VC1 y los censos de raíces con esterilización superficial están asociados a valores negativos de la misma variable canónica (VC1).

La clasificación general obtenida del análisis discriminante muestra que el 81,3 % de las muestras estuvieron bien clasificadas. Tabla 19b.

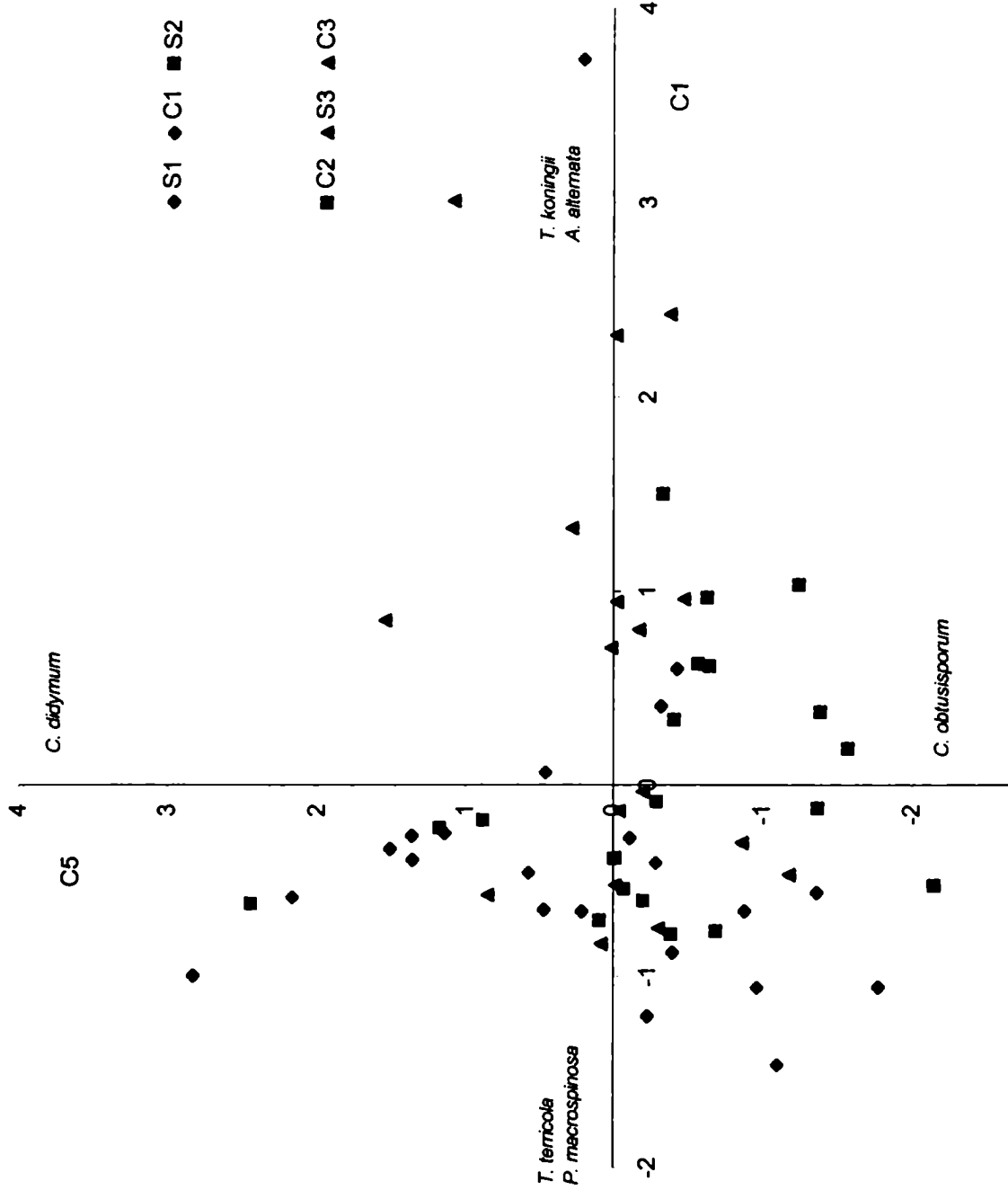


Fig. 25. Distribución de las muestras correspondientes a raíces con y sin esterilización superficial de trigo en el espacio de los componentes C1 y C5.

	C1	C2	C3	C4	C5
X(2)	0.670	-0.047	-0.044	-0.061	0.159
X(3)	0.329	-0.083	-0.033	0.003	0.047
X(4)	-0.065	-0.260	-0.202	0.067	0.682
X(5)	-0.054	-0.247	-0.083	-0.009	-0.486
X(6)	-0.048	-0.045	-0.041	0.215	-0.155
X(7)	-0.134	-0.107	-0.027	-0.079	0.469
X(8)	0.494	0.012	-0.015	0.082	-0.244
X(9)	-0.210	-0.299	0.014	-0.470	-0.320
X(10)	0.187	0.152	0.180	-0.093	-0.092
X(11)	-0.168	-0.056	-0.042	0.645	-0.200
X(12)	-0.252	0.673	-0.033	-0.269	0.087
X(13)	0.043	-0.076	-0.053	0.368	-0.222
X(14)	-0.148	-0.013	-0.038	0.575	-0.067
X(15)	-0.105	0.011	0.087	0.410	0.318
X(16)	-0.043	0.671	0.188	0.137	0.062
X(17)	-0.119	-0.097	0.774	-0.150	-0.036
X(18)	-0.167	-0.089	0.599	-0.011	0.408
X(19)	-0.030	0.296	0.748	0.026	-0.017
X(20)	-0.213	0.216	-0.342	-0.327	-0.021
X(21)	-0.009	-0.177	-0.027	0.111	-0.353
X(22)	0.000	0.000	0.000	-0.000	0.000
X(23)	-0.117	0.733	-0.132	-0.109	-0.047
X(24)	-0.278	-0.272	-0.031	-0.292	-0.170
X(25)	0.557	-0.153	-0.026	-0.179	-0.112
X(26)	0.746	0.020	0.008	-0.119	-0.030
X(27)	0.012	0.198	0.166	-0.243	-0.120
VP	2.081	2.035	1.818	1.784	1.701

Tabla 18. Contribución de las especies al espacio de los componentes.

variable	Coeficiente estandarizado para las variables canónicas	
	F1	
<i>Phoma glomerata</i>	0,56691	
<i>Rhizopus arrhizus</i>	0,78164	
<i>R. arrhizus</i> var. <i>oryzae</i>	0,74353	
<i>Trichoderma koningii</i>	0,45615	
Varianza explicada acumulada	100	

Tabla 19a. Coeficiente estandarizado para las variables canónicas. Varianza explicada.

Grupo	% de clasificación correcta	N° de casos clasificados	
		particula	raiz s/est.
particula	63,3	19	11
raiz s/est.	97,1	1	33
Total	81,3	20	44

Tabla 19b. Clasificación del análisis discriminante basado en las frecuencia de aislamiento de los hongos, usando el tipo de aislamiento como variable discriminante.

◆ partícula
■ raíz s/est.

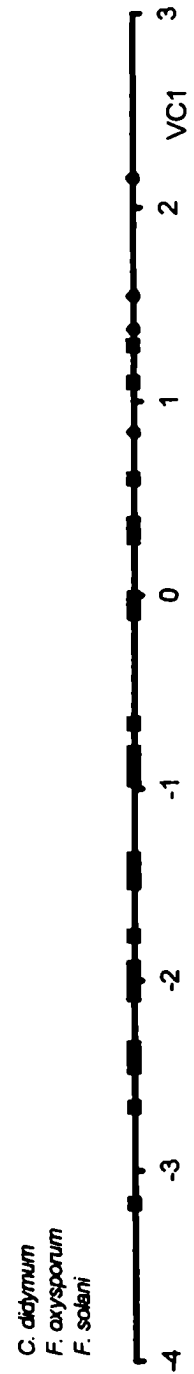


Fig. 28. Análisis de la función discriminante de los datos de frecuencias en el espacio de la variable canónica (VC1)

ENSAYO N°3

OBJETIVO: Aislamiento e identificación de especies activas en un cultivo de soja en maceta.

Materiales y métodos:

Se realizaron tres muestreos durante el mes de noviembre de 1996, uno en estadio de planta joven, a los 21 días, otro en floración, a los 55 días y otro al tiempo de cosecha (fruto maduro), a los 118 días desde la fecha de siembra. Las semillas utilizadas en el ensayo son de soja de primera (*Glycine max* var *sojae*, lote G4656).

La metodología empleada respondió a la misma que se utilizó para el Ensayo 1 y 2, (Fig. 29).

El tratamiento estadístico de los datos fue el mismo que se utilizó en el Ensayo N° 2 y 3, tomando en esta experiencia una matriz básica de datos de 27 especies por 88 casos.

Resultados:

En la curva de lavado de las muestras de rizosfera de soja del 1er. muestreo se determina que con 15 lavados se reduce al mínimo la cantidad de formas resistentes. Figura 30.

En los parámetros medidos se observa que para la longitud de la parte aérea hay diferencias significativas entre los tres muestreos ($F_{2,9} = 110,94$; $p > 0,05$). Se realizaron contrastes de Tukey dando como resultado diferencias significativas entre el 1er., 2do. y 3er. Muestreo ($VC = 4,79$; $6,14$; $p > 0,05$). Fig. 31.

El análisis del porcentaje de humedad del vástago y de las raíces a lo largo de la experiencia mostró diferencias significativas entre los muestreos ($F_{2,6} = 88,62$; $F_{2,6} = 34,07$; $p < 0,05$) respectivamente. Fig. 32 Los contrastes de Tukey realizados

para el porcentaje de humedad de los vástagos dio como resultado diferencias significativas entre los tres muestreos (VC= 5,39; 6,96; $p < 0,05$).

En los contrastes realizados sobre los porcentajes de humedad de las raíces también se encontraron diferencias entre los tres muestreos (VC= 5,46; 7,07; $p < 0,05$).

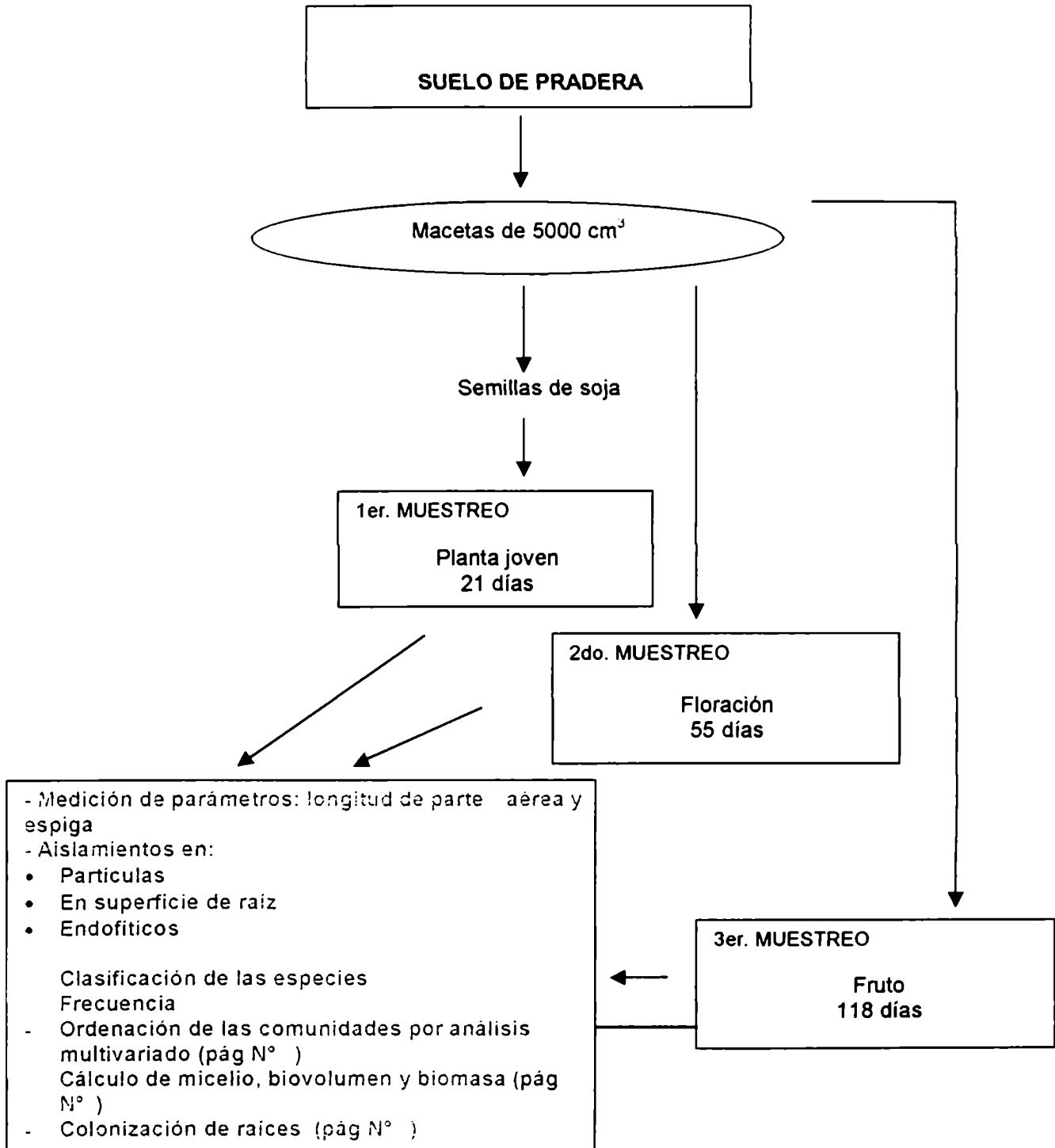


Fig. 29. Esquema de muestreo y determinaciones realizadas sobre soja.

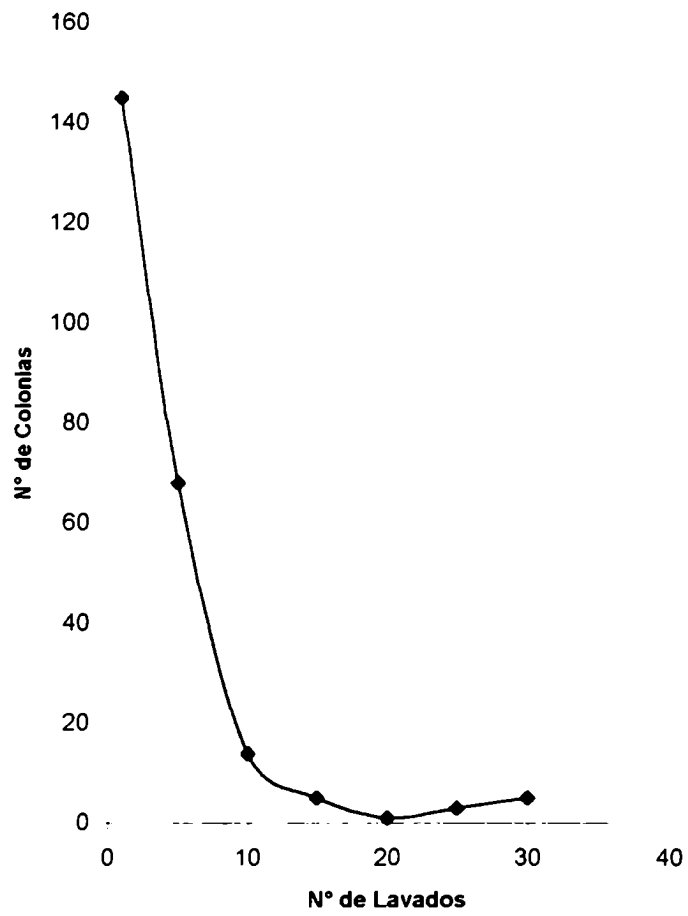


Fig.30. Curva de lavado para la muestra de suelo tomada para la siembra de soja en macetas.

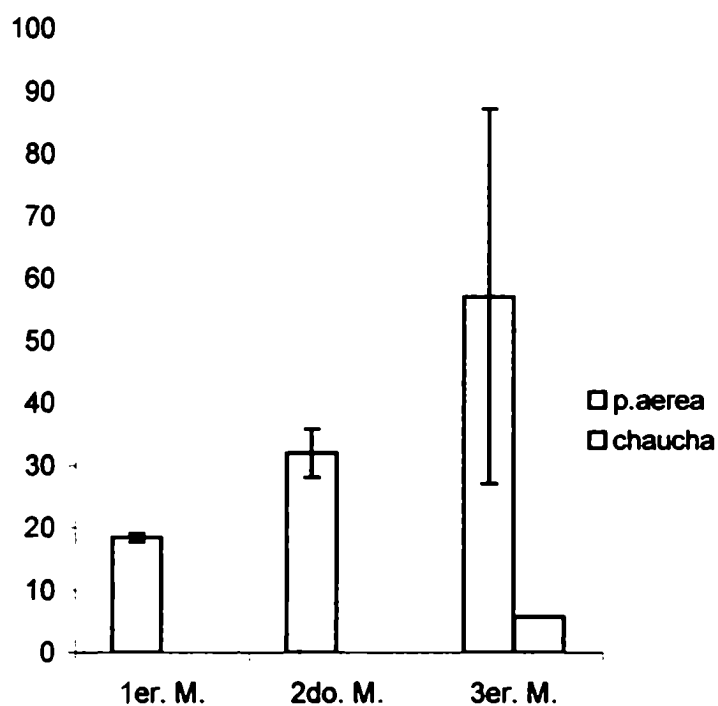


Fig.31. Parámetros de longitud de parte aérea y chauchas (medidos en cm) sobre plantas de soja

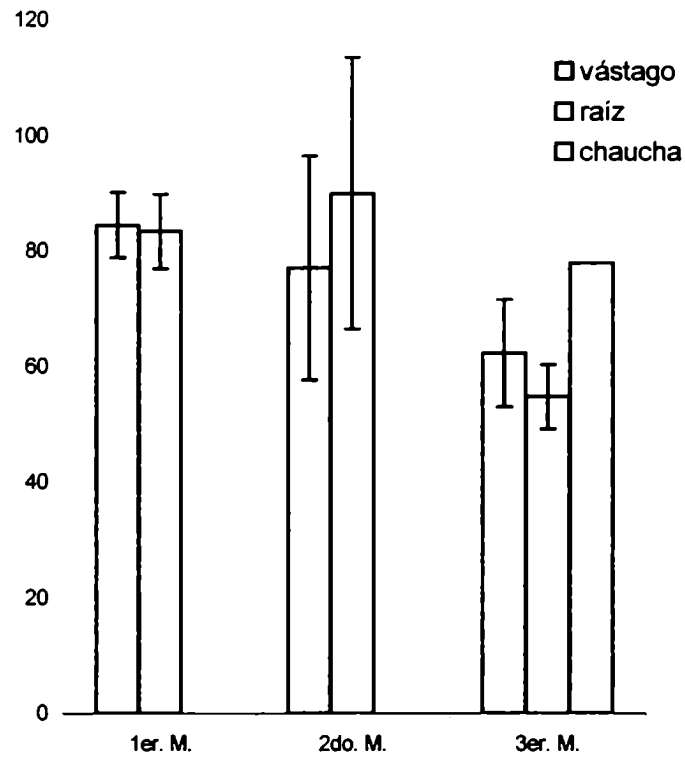


Fig.32. Porcentajes de humedad presentes en vástagos, raíces y y chauchas durante los tres muestreos.

En la Tabla 20 se presentan los resultados de cada especie para cada muestreo y para cada tipo de aislamiento.

En el desarrollo de este ensayo se aislaron 381 cepas que correspondieron a: 128 aislamientos sobre 120 partículas y raíces para el 1er. muestreo, 123 sobre 120 partículas y raíces para el 2do. muestreo y 130 aislamientos sobre 112 partículas y raíces sembradas en el 3er. muestreo.

Se identificaron 42 especies distintas, entre las cuales 27 fueron identificadas a especies y 15 a género. Pertenecieron a los siguientes grupos taxonómicos, 24 Hyphomycetes, 3 Zygomycetes, 3 Ascomycetes, 4 Coelomycetes y el resto se reparten en: 1 Indeterminado, 1 Levadura y 6 micelios estériles. Dentro de los 6 micelios hay 2 micelios dematiáceos estériles, 2 micelios moniliáceos estériles, 1 micelio estéril rojizo y 1 micelio estéril amarillo (Tabla 6).

Las especies aisladas con mayor frecuencia a lo largo de todo el ensayo fueron: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium lateritium*, *Fusarium equiseti*, *Trichoderma koningii* y *Paecilomyces variotii*.

Las especies que se presentaron en baja frecuencia y fueron exclusivas del 1er. muestreo sobre partículas son: *Stachybotrys bisbyi* y *Phoma levellei*. Sobre las raíces con esterilización superficial se registró la presencia de *Alternaria alternata* y *Aspergillus ustus*. Sobre las partículas del 2do. muestreo se aisló *Eupenicillium meridianum* y *Talaromyces sp.*. En las raíces con esterilización superficial se encontró *Aspergillus glaucus* y *Periconia macrospinosa*.

En el último muestreo aparecieron con baja frecuencia, *Arthrinium phaeospermum*, *Chaetomium indicum*, *Cylindrocarpon didymum*, siendo más abundante *Humicola fuscoatra*.

Se presentaron asociaciones a lo largo de los muestreos, tanto sobre partículas como sobre raíces con y sin esterilización superficial (Tabla 21).

Sobre partículas del 1er. muestreo se presentaron asociaciones entre *Fusarium oxysporum* y *P. variotii* y entre *F. oxysporum* y *Aspergillus fumigatus*.

En las partículas del 2do. muestreo las asociaciones fueron entre *T. longibrachiatum* con *T. koningii*, *T. viride* y *F. equiseti*, *F. oxysporum* con el micelio moniliáceo 1 y *F. oxysporum* con micelio moniliáceo 2 y con *Aspergillus sp.*.

En el 3er. muestreo se repite la asociación entre *F. oxysporum* con *P. variotii*.

En las raíces sin esterilización superficial, en el 1er. muestreo se encontró *F. oxysporum* con *P. glomerata*, *T. koningii* con *T. longibrachiatum* y un gran número de *F. oxysporum* con *R. arrhizus* y *Fusarium sp.* con *R. arrhizus*.

En el 2do. muestreo aparecen asociados *P. variotii* con *F. oxysporum*, micelio dematiáceo 1 con *Penicillium sp.*, *F. equiseti* con *Cylindrocarpon sp.* y *R. arrhizus* con *F. lateritium* y con *P. variotii* y por último, un solo aislamiento de *P. variotii*, *F. oxysporum*, *F. lateritium* y *R. arrhizus*.

En el 3er. muestreo se encontró a *P. variotii* asociado a *F. lateritium*, *P. glomerata* a *R. arrhizus* y *R. arrhizus*, *F. oxysporum* con una especie de Mucoral.

Hubo un número importante de asociaciones entre *F. oxysporum* y *T. koningii* y también se encontró *R. arrhizus* con *F. lateritium* y *Fusarium sp.*

En las raíces con esterilización superficial en el 1er. muestreo se presentó el micelio moniliáceo asociado a *Fusarium sp.* y *F. oxysporum* con *T. koningii*.

En el 2do. y 3er. muestreo no se registraron asociaciones .

El mayor número de especies con respecto al número de aislamientos se registró sobre raíces con esterilización superficial del 2do. muestreo, siendo mayor los valores de raíz con esterilización superficial en el 1er. y 2do. muestreo con respecto a las raíces sin esterilización y las partículas y menor con respecto a ellas sobre el 3er. Muestreo. Figura 33

Tabla 20. Frecuencias de aparición de las distintas especies en los muestreos.

	Soja	1° Muestreo			2° Muestreo			3° Muestreo		
		P	S	C	P	S	C	P	S	C
1	Cylindrocarpon sp	0	0	0	0	2,5	0	0	0	2,5
2	Cylindrocarpon dydimum	0	0	0	0	0	0	3,1	0	0
3	Chaetomium indicum	0	0	0	0	0	0	3,1	0	0
4	Aspergillus ustus	0	0	2,5	0	0	0	0	0	0
5	Aspergillus sp	2,5	2,5	0	5	0	0	15,6	0	0
6	Aspergillus niger	2,5	0	2,5	0	0	2,5	0	0	0
7	Aspergillus glaucus	0	0	0	0	0	2,5	0	0	0
8	Aspergillus fumigatus	2,5	0	0	0	5	0	0	2,5	0
9	Arthrinium phaeospermum	0	0	0	0	0	0	6,2	0	0
10	Alternaria alternata	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	Eupenicillium meridianum	0	0	0	2,5	2,5	0	0	0	0
12	Fusarium equiseti	10	0	7,5	5	5	0	0	0	12,5
13	Fusarium lateritium	0	0	17,5	0	15	3,1	0	20	0
14	Fusarium oxysporum	40	50	15	17,5	35	12,5	6,2	42,5	70
15	Fusarium sambucinum	0	0	7,5	5	0	0	0	0	0
16	Fusarium solani	0	2,5	0	0	0	0	0	0	0
17	Fusarium sp	0	0	2,5	0	2,5	2,5	0	2,5	0
18	Humicola fuscoatra	0	0	0	0	0	0	18,7	0	0
19	Indeterminado	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	Levadura	0	0	2,5	2,5	0	5	1,7	0	0
21	Micelio amarillo estéril	0	0	0	0	0	5	0	0	0
22	Micelio dematiáceo estéril 1	5	2,5	0	0	5	2,5	0	0	0
23	Micelio dematiáceo estéril 2	0	2,5	0	0	0	0	1,7	0	0
24	Micelio moniliáceo estéril 1	0	0	7,5	22,5	0	5	1,7	0	0
25	Micelio moniliáceo estéril 3	0	0	2,5	0	0	7,5	1,7	0	0
26	Micelio estéril rojizo	0	0	0	0	1,7	0	0	0	2,5
27	Mucoral	0	2,5	0	0	0	0	0	2,5	0
28	Paecilomyces varioti	35	5	2,5	7,5	20	2,5	28,1	5	5
29	Penicillium sp	0	0	5	0	5	17,5	1,7	0	0
30	Periconia macrospinoso	0	0	0	0	0	7,5	0	0	0
31	Phoma eupyrena	0	0	0	0	2,5	2,5	5	0	0
32	Phoma glomerata	2,5	10	0	0	0	0	0	7,5	0
33	Phoma levellei	2,5	0	0	0	0	0	0	0	0
34	Picnidio	0	0	5	0	0	5	0	0	2,5
35	Rhizopus arrhizus	0	0	0	0	17,5	0	0	7,5	0
36	Rhizopus arrhizus variedad oryzae	2,5	35	0	0	0	0	0	25	0
37	Stachybotrys bisbyi	2,5	0	0	0	0	0	0	0	0
38	Talaromyces sp	0	0	0	2,5	0	0	0	0	0
39	Trichoderma harzianum	0	0	0	0	2,5	0	10	0	0
40	Trichoderma koningii	0	2,5	0	10	0	0	6,2	12,5	0
41	Trichoderma longibrachiatum	0	0	2,5	5	0	0	0	0	0
42	Trichoderma viride	0	0	0	15	0	0	0	0	0
	N° Especies diferentes	11	10	15	12	15	15	16	10	6
	N° Aislamientos	43	46	39	40	47	36	39	53	38
	N° Partículas sembradas	40	40	40	40	40	40	32	40	40

		P / A	
		Trigo	Soja
Micelio dematiáceo estéril 1	micelio dematiáceo estéril, hifas muy articuladas	P	P
Micelio dematiáceo estéril 2	micelio dematiáceo estéril con clamidosporas intercalares de color oscuro y con pared lisa	P	P
Micelio moniliáceo estéril 1	micelio moniliáceo estéril con clamidosporas intercalares y terminales de color dorado y con pared ornamentada	P	P
Micelio moniliáceo estéril 2	micelio moniliáceo estéril	P	A
Micelio moniliáceo estéril 3	micelio moniliáceo estéril con clamidosporas intercalares en cadena intercalares de color oscuro y con pared lisa	A	P
Micelio estéril rojizo	micelio estéril rojizo con pelotas rojas; colonia con micelio aterciopelado gris oscuro , reverso de la colonia bordó oscuro	A	P
Micelio estéril amarillo	micelio amarillo, hifas muy articuladas, con clamidosporas intercalares de color negro	P	P

TABLA 6.Características de los distintos micelios estériles
(P= presencia, A= ausencia)

SOJA	1er. Muestreo			2do. Muestreo			3er. Muestreo		
	P	R.S/E	R.C/E	P	R.S/E	R.C/E	P	R.S/E	R.C/E
Paecilomyces variotii + Fusarium oxysporum	2	0	0	0	1	0	1	0	0
Paecilomyces variotii + Fusarium lateritium	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Fusarium oxysporum + Phoma glomerata	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Trichoderma longibrachyatum + F.oxysporum	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Trichoderma koningii + T. longibrachyatum	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Trichoderma viride + Fusarium equiseti	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Micelio moniliáceo 1+ Fusarium sp	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Micelio estéril hialino + Fusarium oxysporum	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Micelio estéril + Penicillium sp.	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Fusarium equiseti + Rhizopus arrhizus	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fusarium equiseti + Cylindrocarpon sp.	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Phoma glomerata + Rhizopus arrhizus var.oryzae	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Phoma glomerata + R. arrhizus + F. oxysporum	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Phoma glomerata + R. arrhizus + Mucoral	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Fusarium oxysporum + Trichoderma koningii	0	0	1	0	0	0	0	5	0
Fusarium oxysporum + Aspergillus fumigatus	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Fusarium oxysporum + Aspergillus sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Rhizopus arrhizus var.oryzae + F.oxysporum	0	9	0	0	0	0	0	1	0
Rhizopus arrhizus + Fusarium lateritium	0	0	0	0	2	0	0	2	0
Rhizopus arrhizus + Paecilomyces variotii	0	0	0	0	3	0	0	0	0
P. variotii + F.oxysporum + F. lateritium + R.arrhizus	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Rhizopus arrhizus var.oryzae + Fusarium sp	0	9	0	0	0	0	0	2	0

Tabla 21. Asociaciones para soja en los distintos muestreos.

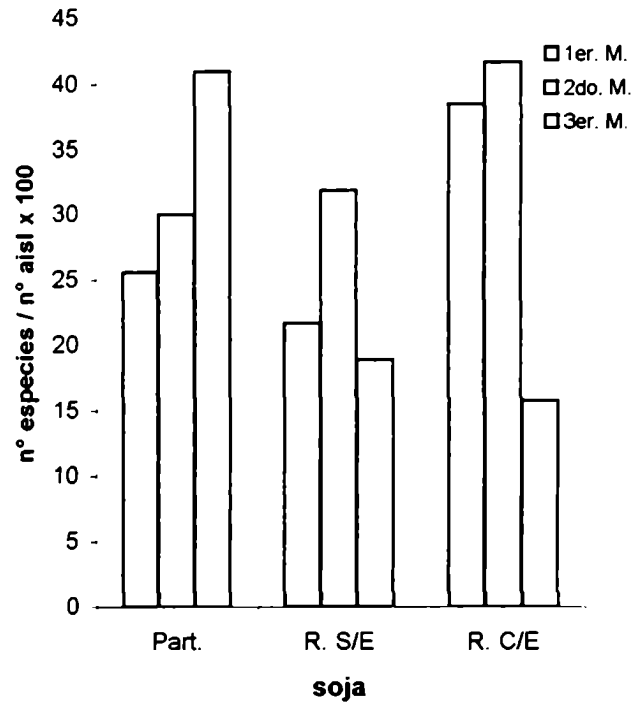


Fig. 33. Diversidad de las especies en los distintos muestreos.
 Part= partícula, R. S/E= raíz sin esterilización superficial, R.C/E= raíz con esterilización superficial.

MATRIZ BASICA DE DATOS PARA SOJA

S1P1 0 0 0.25 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0
S1P2 0 0 0 0 0.5 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
S1P3 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0.75 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
S1P4 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0.75 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
S1P5 0 0 0 0 0.25 0 0.5 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0
S1P6 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
S1P7 0 0.25 0 0.25 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
S1P8 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0.25 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
S1P9 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
S1P10 0 0 0 0 0.25 0 0.5 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
S1S1 0 0 0 0 0 0.75 0 0 0 0.25 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0.75 0 0 0 0
S1S2 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0
S1S3 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0
S1S4 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0
S1S5 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0
S1S6 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0
S1S7 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0
S1S8 0 0 0 0 0 0.75 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.75 0 0 0 0 0
S1S9 0 0 0 0 0 0.75 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.75 0 0 0 0 0
S1S10 0 0 0 0 0 0.75 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.75 0 0 0 0 0
S1C1 0.25 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
S1C2 0 0 0.25 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
S1C3 0 0 0 0 0.25 0.5 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
S1C4 0.25 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0
S1C5 0 0 0 0 0.25 0.25 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
S1C6 0 0 0 0 0.25 0.25 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0
S1C7 0 0 0 0 0.25 0.25 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0
S1C8 0.25 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0
S1C9 0 0 0 0 0.25 0 0.25 0 0 0.25 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0
S1C10 0 0 0 0 0 0.25 0.25 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0
S2P1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
S2P2 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
S2P3 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.5 0
S2P4 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0.25 0

S2P5 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0
S2P6 0 0 0 0 0.25 0.5 0.25 0.5
S2P7 0 0 0 0.25 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25
S2P8 0 0 0 0.25 0 0 0.5 0 0 0 0.25 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0
S2P9 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
S2P10 0 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0.25 0.5 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
S2S1 0 0 0 0 0.25 0.75 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0
S2S2 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0.5 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0
S2S3 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0
S2S4 0 0 0 0 0.25 0 0.5 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
S2S5 0 0.25 0 0 0 0.25 0.5 0 0 0 0 0 0 0.75 0 0 0 0 0.5 0 0.25 0 0
S2S6 0 0 0 0 0 0.5 0.25 0 0.25 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0
S2S7 0 0.25 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0
S2S8 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0
S2S9 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
S2S10 0 0 0 0 0 0.25 0.5 0 0 0 0 0 0 0.25 0.25 0 0 0 0 0 0 0
S2C1 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0
S2C2 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0
S2C3 0 0 0 0 0 0.5 0.25 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
S2C4 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0
S2C5 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0.25 0.25 0 0.25 0 0 0 0 0
S2C6 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0.25 0 0.25 0 0 0 0 0
S2C7 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0.25 0 0 0 0 0 0 0
S2C8 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0
S2C9 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0.25 0.25 0 0 0 0 0 0
S2C10 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0
S3P1 0 0 0 0 0 0 0.2 0 0 0 0 0 0 0 0.6 0 0 0 0 0 0 0 0
S3P2 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.4 0 0 0 0 0 0 0 0.4 0 0 0 0 0.2 0 0
S3P3 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.2 0 0 0 0 0 0 0 0.4 0 0
S3P4 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.4 0 0 0 0 0 0.2 0 0 0 0 0 0 0.2 0 0
S3P5 0 0 0 0.6 0 0 0 0 0 0.4 0 0 0 0 0 0.2 0 0 0 0 0 0 0.2 0 0
S3P6 0 0 0 0 0.2 0.2 0 0 0 0 0 0.2 0 0 0 0 0.2 0 0 0 0 0 0 0 0
S3P7 0 0 0 0.4 0 0 0 0 0 0.2 0 0 0 0 0.2 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
S3P8 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.2 0 0.4 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
S3S1 0 0 0 0 0 0.75 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.5 0 0.5 0 0
S3S2 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0.25 0 0
S3S3 0 0.25 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.5 0.25 0 0 0 0

S3S4 0 0 0 0 0 0.75 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0.25 0 0 0 0
S3S5 0 0 0 0 0 0.75 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0
S3S6 0 0 0 0 0 1 0
S3S7 0 0 0 0 0 0.25 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0.25 0 0 0 0 0.75 0 0 0.5 0 0 0 0
S3S8 0 0 0 0 0 0 0.75 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0
S3S9 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0.25 0 0
S3S10 0 0 0 0 0 0 0.75 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0.25 0 0
S3C1 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
S3C2 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
S3C3 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
S3C4 0 0 0 0 0 0.25 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
S3C5 0 0 0 0 0 0 0.75 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.25 0 0 0 0 0 0
S3C6 0 0 0 0 0 0.25 0 0.75 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
S3C7 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
S3C8 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
S3C9 0 0 0 0 0 0.25 0 0.75 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
S3C10 0 0 0 0 0 0 0.75 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0

REFERENCIAS DE LA MATRIZ BASICA DE DATOS PARA SOJA

	Ej: S1P1
X1: variable identificatoria	
X2: <i>Alternaria alternata</i>	0
X3: <i>Aspergillus fumigatus</i>	0
X4: <i>Aspergillus niger</i>	0.5
X5: <i>Aspergillus sp.</i>	0
X6: <i>Fusarium equiseti</i>	0
X7: <i>Fusarium lateritium</i>	0
X8: <i>Fusarium oxysporum</i>	0.5
X9: <i>Fusarium sambucinum</i>	0
X10: <i>Fusarium sp.</i>	0
X11: <i>Hemicola fuscoatra</i>	0
X12: Levadura	0
X13: Micelio dematiáceo estéril 1	0
X14: Micelio moniliáceo estéril 1	0
X15: Micelio moniliáceo estéril 3	0
X16: Mucoral	0
X17: <i>Paecilomyces variotii</i>	0.5
X18: <i>Penicillium sp.</i>	0
X19: <i>Periconia macrospinoso</i>	0
X20: <i>Phoma eupyrena</i>	0
X21: <i>Phoma glomerata</i>	0.5
X22: Picnidio	0
X23: <i>Rhizopus arrhizus</i>	0
X24: <i>Rhizopus arrhizus var. oryzae</i>	0
X25: <i>Trichoderma harzianum</i>	0
X26: <i>Trichoderma koningii</i>	0
X27: <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0
X28: <i>Trichoderma viride</i>	0

S: soja

i: muestreos 1, 2, y 3.

P: partículas

S: raíces sin esterilización superficial

C: raíces con esterilización superficial

j: submuestras 1, 2, 3,.....10.

Lista de especies fúngicas aisladas de un cultivo de soja (*Glycine max*)
Siglas según Kurk & Ansell (1992).

1 <i>Alternaria alternata</i>	(Fr.) Keissl.
2 <i>Arthrinium phaeospermum</i>	(Corda) M.B. Ellis
3 <i>Aspergillus fumigatus</i>	Fresen
4 <i>Aspergillus glaucus</i>	Link
5 <i>Aspergillus niger</i>	Tiegh.
6 <i>Aspergillus sp.</i>	
7 <i>Aspergillus ustus</i>	(Bain.) Thom & Church.
8 <i>Chaetomium indicum</i>	Corda
9 <i>Cylindrocarpon didymum</i>	
10 <i>Cylindrocarpon sp.</i>	
11 <i>Eupenicillium meridianum</i>	Scott
12 <i>Fusarium equiseti</i>	(Corda) Sacc.
13 <i>Fusarium lateritium</i>	(Nees) emend. Snyder & Hausen
14 <i>Fusarium oxysporum</i>	Schldtl. emend. Snyder & Haus.
15 <i>Fusarium sambucinum</i>	Fuckel
16 <i>Fusarium solani</i>	(Mart.) Sacc.
17 <i>Fusarium sp.</i>	
18 <i>Humicola fuscoatra</i>	Traaen
19 Indeterminado	
20 Levadura	
21 Micelio amarillo estéril	
22 Micelio dematiáceo estéril 1	
23 Micelio dematiáceo estéril 2	
24 Micelio moniliáceo estéril 1	
25 Micelio moniliáceo estéril 3	
26 Micelio estéril rojizo	
27 Mucoral	
28 <i>Paecilomyces variotii</i>	Bain
29 <i>Penicillium sp.</i>	
30 <i>Periconia macrospinoso</i>	Lefevbre & A.G. Johnson
31 <i>Phoma eupyrena</i>	Sacc.
32 <i>Phoma glomerata</i>	(Corda) Wollenw. & Hachapfel
33 <i>Phoma levellei</i>	Boerema & Bollen nom. nov.
34 Picnidio	
35 <i>Rhizopus arrhizus</i>	A. Fisch.
36 <i>Rhizopus arrhizus var. oryzae</i>	
37 <i>Stachybotrys bisbyi</i>	(Srinivasan) Barron
38 <i>Talaromyces sp.</i>	
39 <i>Trichoderma harzianum</i>	Rifai
40 <i>Trichoderma koningii</i>	Oudem.
41 <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Rifai
42 <i>Trichoderma viride</i>	Pers. ex S.F. Gray

Análisis de las comunidades fúngicas en todos los tratamientos

En el análisis de componentes principales derivados del análisis efectuado sobre la matriz de frecuencias (27 especies x 88 censos), los primeros 3 componentes explicaron el 65.63% de la variación total entre los censos en relación a las especies presentes y sus valores de frecuencias.

En la Tabla 22 pueden observarse las contribuciones de las especies a los cinco componentes.

El componente 2 segrega hacia el extremo positivo del eje, 8 censos correspondientes al 2do. muestreo de partículas caracterizado por *T. longibrachiatum* y *T. viride*. Hacia el sector negativo del eje se ubican los censos correspondientes a las muestras del 1er. muestreo de partículas caracterizado por *P. variotii* y *A. fumigatus*.

Cercanos al 0 (en el cruce del componente 2 y 3) se encuentran las muestras correspondientes al 1er. muestreo de raíces sin esterilización superficial. Figura 34.

El eje 3 en su sector positivo junto con muestras del 2do. muestreo de raíces con y sin esterilización superficial, se segregan las muestras del 1er. muestreo de raíces con esterilización superficial caracterizadas por *F. lateritium* y *Fusarium sp.*.

Los censos fueron analizados mediante análisis discriminante (AD) utilizando como variable de agrupamiento los muestreos.

El análisis discriminante dio como resultado 2 funciones, las cuales explicaron el 100% de la varianza total. Tabla 23a.

La primera función estuvo asociada con *Penicillium sp.* y *T. viride* (-). La segunda función con *R. arrhizus*.

La distribución de las muestras en relación a las dos funciones discriminantes (Fig.35) muestra que los censos correspondientes al 1er. Muestreo están asociados a valores negativos de la variable canónica 1 (VC1), los censos del 2do. Muestreo están asociados a valores negativos de VC1 y positivos de VC2 y los censos del 3er. Muestreo a valores negativos de VC1 y VC2.

La clasificación general obtenida del análisis discriminante muestra que el 65,1 % de las muestras estuvieron bien clasificadas. Tabla 23b.

	C1	C2	C3	C4	C5
x(2)	-0.118	0.253	0.104	-0.119	-0.090
X(3)	-0.346	-0.438	0.133	0.296	-0.133
X(4)	0.477	-0.131	-0.058	0.042	0.035
X(5)	0.049	0.128	-0.197	0.537	0.035
X(6)	-0.072	0.091	-0.175	-0.292	-0.401
X(7)	-0.085	-0.215	0.733	-0.023	0.108
X(8)	-0.285	-0.077	-0.419	-0.408	0.333
X(9)	0.131	0.081	0.345	-0.002	-0.095
X(10)	-0.084	0.036	0.712	-0.030	0.049
X(11)	-0.055	0.038	-0.133	0.689	-0.010
X(12)	0.582	0.089	0.070	0.354	0.066
X(13)	-0.058	-0.170	-0.035	-0.189	0.209
X(14)	0.029	0.451	0.182	0.082	-0.074
X(15)	0.334	-0.122	0.028	-0.166	-0.239
X(16)	-0.029	-0.044	-0.023	-0.065	0.721
X(17)	-0.128	-0.465	-0.353	0.095	-0.220
X(18)	0.605	-0.015	0.281	0.009	-0.069
X(19)	0.651	-0.110	-0.058	-0.069	-0.098
X(20)	0.040	-0.115	0.081	0.593	-0.034
X(21)	0.066	-0.089	-0.098	0.021	0.520
X(22)	0.025	0.103	0.383	-0.163	-0.196
X(23)	-0.411	-0.413	0.370	0.074	-0.045
X(24)	-0.203	0.013	-0.055	-0.143	0.695
X(25)	-0.239	-0.348	-0.008	0.409	-0.183
X(26)	-0.138	0.500	-0.205	0.290	0.093
X(27)	-0.228	0.589	-0.053	-0.021	-0.186
X(28)	-0.192	0.590	-0.082	0.042	-0.232
VP	2.129	2.114	2.058	1.991	1.943

Tabla 22. Contribución de las especies al espacio de los componentes.

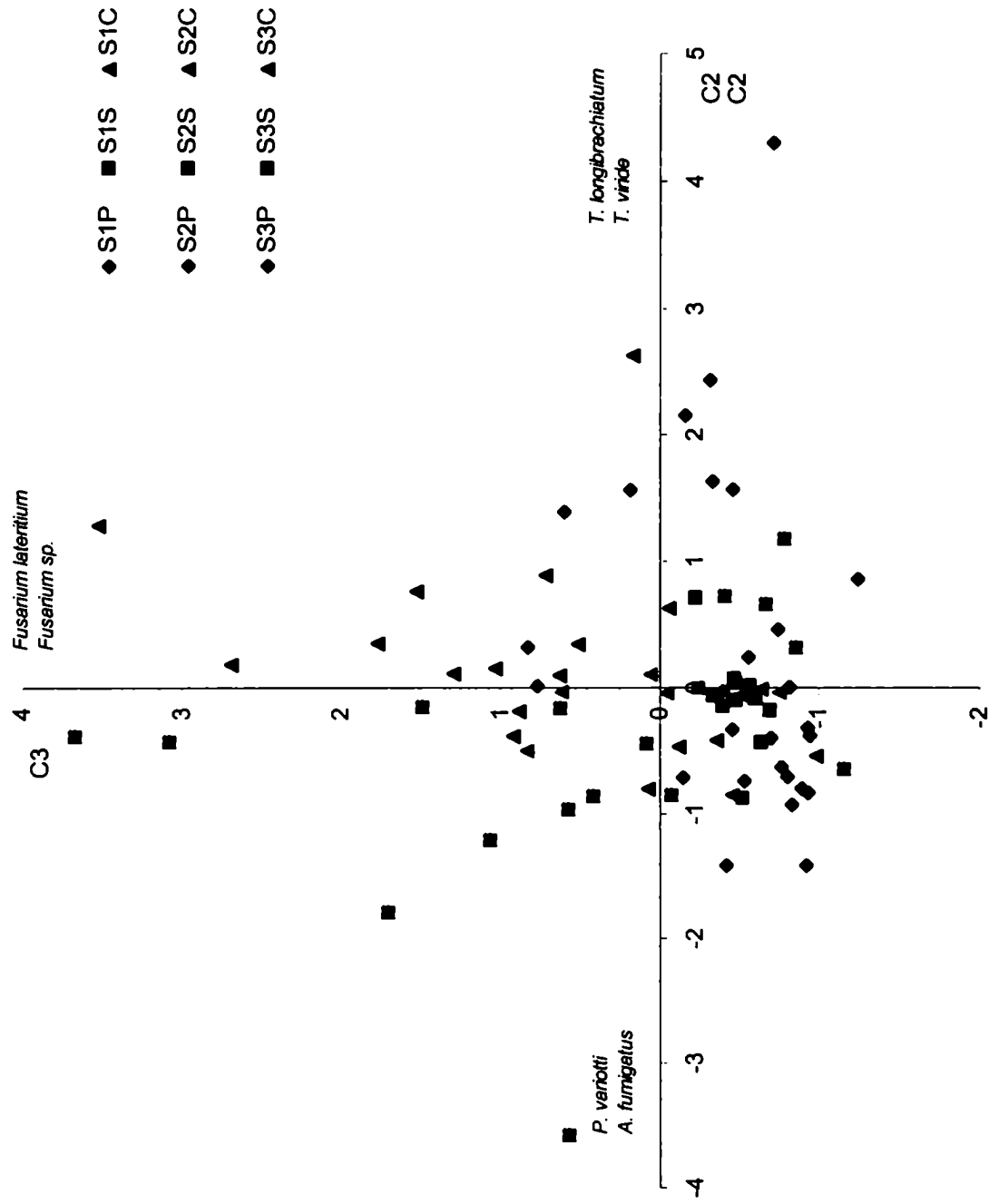


Fig. 32. Distribución de las muestras en el espacio de los componentes C2 y C3 para soja.

variable	coeficiente estandarizado para las variables canónicas	
	F1	F2
<i>Penicillium sp.</i>	-0,83175	0,42173
<i>Rhizopus arrhizus</i>	-0,60384	-0,81856
<i>Trichoderma viride</i>	-0,71330	0,09279
Varianza explicada acumulada	97	100

Tabla 23a . Coeficiente estandarizado para las variables canónicas.
Varianza explicada.

Grupo	% de clasificación correcta	N° de casos clasificados		
		1er. Muestreo	2do. Muestreo	3er. Muestreo
1er. Muestreo	93,3	28	2	0
2do. Muestreo	60	12	18	0
3er. Muestreo	0	25	3	0
Total	65,1	65	23	0

Tabla 23b . Clasificación del análisis discriminante basado en las frecuencias de los hongos del suelo, usando el muestreo como variable discriminante.

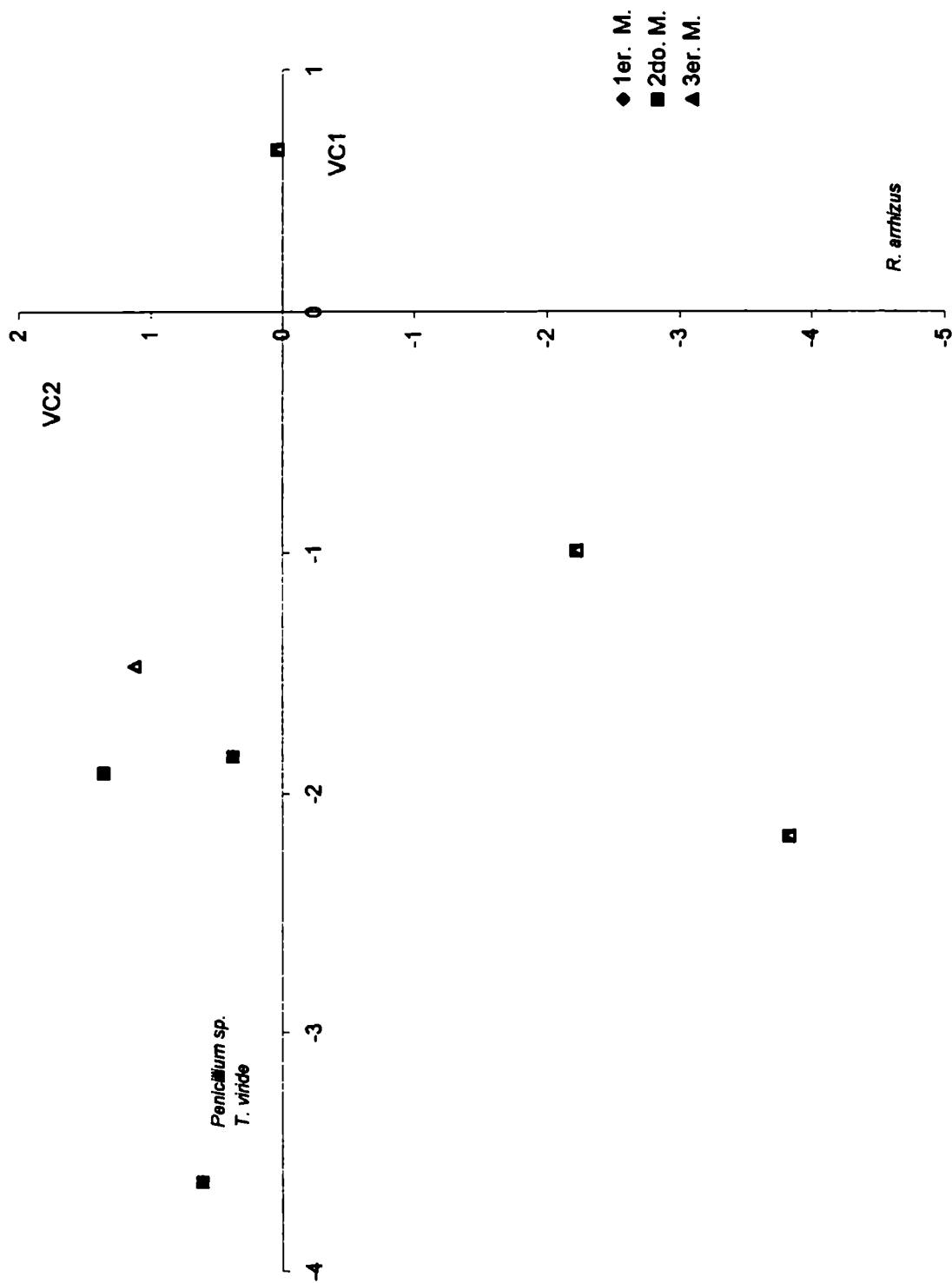


Fig. 35. Análisis de la función discriminante de los datos de frecuencias en el espacio de las variables canónicas (VC1, VC2)

Análisis de los censos por muestreo

Para el 1er. muestreo de soja se observa que los primeros 3 componentes explicaron un 70.51% de la varianza total. Tabla 24.

El componente 1 segrega hacia su sector positivo 6 censos correspondientes a los muestreos de raíces con esterilización superficial caracterizados por la presencia de *Fusarium sp.* y Picnidio; en el sector negativo del eje quedan segregadas todas las muestras correspondientes a los aislamientos sobre partículas y sobre raíces sin esterilización caracterizadas por *F. oxysporum*.

Sobre el sector positivo del eje 2, quedan separadas 6 muestras de raíces con esterilización superficial caracterizadas por la presencia de levadura y *Penicillium sp.*. Figura 36.

Los censos fueron analizados mediante análisis discriminante (AD) utilizando como variable de agrupamiento el tipo de aislamiento.

El análisis discriminante dio como resultado 2 funciones, las cuales explicaron el 100% de la varianza total. Tabla 25a.

La primera función estuvo asociada con *Fusarium sp.* (-), *A. alternata* (-) y *Fusarium sp.* (-). La segunda función con *P. variotii* y *F. equiseti*.

La distribución de las muestras en relación a las dos funciones discriminantes (Fig. 37) muestra que los censos correspondientes a las partículas están asociados a valores positivos de VC1 y VC2, los censos de las raíces sin esterilización superficial están asociados a valores positivos de VC1 y negativos de VC2 y los censos correspondientes a las raíces con esterilización superficial están asociados a valores negativos de VC1.

La clasificación general obtenida del análisis discriminante muestra que el 90 % de las muestras estuvieron bien clasificadas. Tabla 25b.

En el 2do. muestreo un 69.87% de la varianza total fue explicada por los primeros 3 componentes. Tabla 26.

El componente 1 segrega en su sector positivo las muestras correspondientes a raíces sin esterilización caracterizadas por la presencia de *T. harzianum* y *A. fumigatus*. En el sector negativo del eje, se encuentran los censos correspondientes a las partículas y de las raíces con esterilización, todos cercanos al 0 del eje, caracterizados por *Penicillium sp.*. Figura 38.

Sobre el lado positivo del componente 3, quedan segregadas la mitad de las muestras de partículas y de raíces con esterilización, caracterizadas por la presencia de levadura y *A. niger*, mientras que sobre el sector negativo se concentra la mayoría de las muestras de raíces sin esterilización caracterizadas por la presencia de *F. lateritium* y micelio dematiáceo 1.

Los censos fueron analizados mediante análisis discriminante (AD) utilizando como variable de agrupamiento el tipo de aislamiento.

El análisis discriminante dio como resultado 2 funciones, las cuales explicaron el 100% de la varianza total. Tabla 27a.

La primera función estuvo asociada con *Penicillium sp.* (-). La segunda función con *R. arrhizus* (-).

La distribución de las muestras en relación a las dos funciones discriminantes (Fig. 39) muestra que los censos correspondientes a las partículas están asociados a valores positivos de la variable canónica 1 (VC1), los censos correspondientes a las raíces sin esterilización superficial están asociados a valores negativos de VC1 y VC2. Los censos de las raíces con esterilización superficial están asociados a valores positivos de VC2.

La clasificación general obtenida del análisis discriminante muestra que el 73,3 % de las muestras estuvieron bien clasificadas. Tabla 27b.

En el 3er. muestreo los primeros 3 componentes explicaron el 67.03% de la varianza total. Tabla 28.

Sobre el extremo positivo del eje 1 se encuentran solo 3 censos del raíces sin esterilización caracterizados por *R. arrhizus* y *F. lateritium*; hacia el lado negativo del

eje y cercano al 0 se ubican la totalidad de los censos sobre partículas y sobre raíces con esterilización caracterizados por la presencia de *R. arrizus*.

Sobre el lado negativo del componente 2 se concentran todos los censos de partículas y de raíces con esterilización caracterizados por Picnidio, hacia el sector positivo las muestras correspondientes a raíces sin esterilización se encuentran caracterizadas por la presencia de Mucoral y de *P. glomerata*. Figura 40.

Los censos fueron analizados mediante análisis discriminante (AD) utilizando como variable de agrupamiento el tipo de aislamiento.

El análisis discriminante dio como resultado 2 funciones, las cuales explicaron el 100% de la varianza total. Tabla 29a.

La primera función estuvo asociada con *F. oxysporum* (-) y *F. lateritium* (-). La segunda función con *F. oxysporum* (-) y *F. equiseti* (-).

La distribución de las muestras en relación a las dos funciones discriminantes (Fig. 41) muestra que los censos correspondientes a las partículas están asociados a valores positivos de VC1, los censos correspondientes a raíces sin esterilización superficial están asociados a valores negativos de VC1 y positivos de VC2. Los censos de raíces con esterilización superficial están asociados a valores negativos de VC2.

La clasificación general obtenida del análisis discriminante muestra que el 96,4 % de las muestras estuvieron bien clasificadas. Tabla 29b.

	C1	C2	C3	C4	C5
X(2)	-0.005	-0.042	-0.134	0.766	-0.101
X(3)	-0.014	-0.121	-0.205	-0.219	0.574
X(4)	-0.162	-0.024	-0.330	-0.080	-0.026
X(5)	-0.036	-0.142	-0.331	-0.259	0.616
X(6)	0.093	0.020	-0.127	-0.251	-0.574
X(7)	0.208	0.557	-0.310	-0.042	-0.469
X(8)	-0.425	-0.378	0.611	0.186	0.156
X(9)	0.590	0.616	0.029	-0.038	0.146
X(10)	0.910	-0.064	0.102	0.024	0.234
X(11)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X(12)	-0.039	0.903	0.009	-0.004	0.144
X(13)	-0.079	-0.059	0.568	-0.170	0.071
X(14)	0.582	-0.068	0.026	0.625	0.157
X(15)	0.229	-0.137	-0.193	-0.225	-0.572
X(16)	-0.040	-0.018	0.674	-0.140	0.023
X(17)	-0.233	-0.243	-0.342	-0.321	0.424
X(18)	0.038	0.847	-0.068	-0.075	-0.075
X(19)	0.000	0.000	0.000	-0.000	0.000
X(20)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X(21)	-0.202	-0.155	-0.336	-0.110	0.222
X(22)	0.854	0.023	-0.116	-0.041	-0.260
X(23)	-0.000	-0.000	0.000	0.000	0.000
X(24)	-0.191	-0.111	0.763	-0.061	-0.040
X(25)	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.000
X(26)	-0.032	-0.016	-0.083	-0.006	-0.063
X(27)	-0.015	-0.062	-0.062	0.838	0.055
X(28)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
VP	2.702	2.534	2.432	2.128	2.060

Tabla 24. Contribución de las especies al espacio de los componentes.

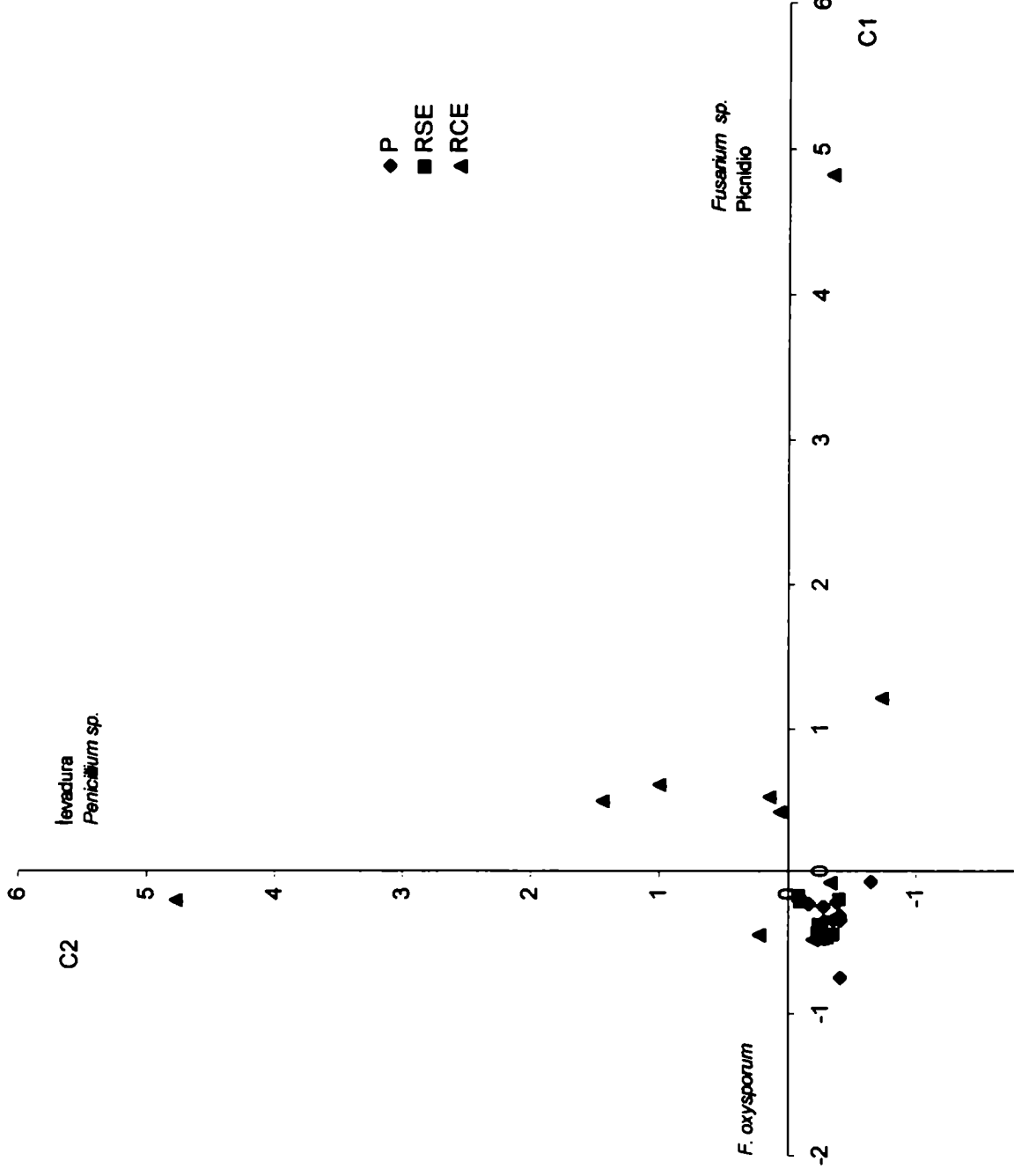


Fig. 34. Distribución de las muestras correspondientes al 1er. Muestreo de soja en el espacio de los componentes C1 y C2.

variable	Coeficiente estandarizado para las variables canónicas	
	F1	F2
<i>Alternaria alternata</i>	-1,33864	0,45033
<i>Fusarium equiseti</i>	-0,05160	0,86401
<i>Fusarium lateritium</i>	-1,71489	0,12634
<i>Fusarium sp.</i>	-1,25056	0,32238
<i>Paecilomyces varioti</i>	0,13007	105,728
Varianza explicada acumulada	89	100

Tabla 25a. Coeficiente estandarizado para las variables canónicas. Varianza explicada.

Grupo	% de clasificación correcta	N° de casos clasificados		
		partícula	raíz s/est.	raíz c/est.
partícula	90	9	1	0
raíz s/est.	80	2	8	0
raíz c/est.	100	0	0	10
Total	90	11	9	10

Tabla 25b. Clasificación del análisis discriminante basado en las frecuencias de los hongos del suelo, usando el tipo de aislamiento como variable discriminante.

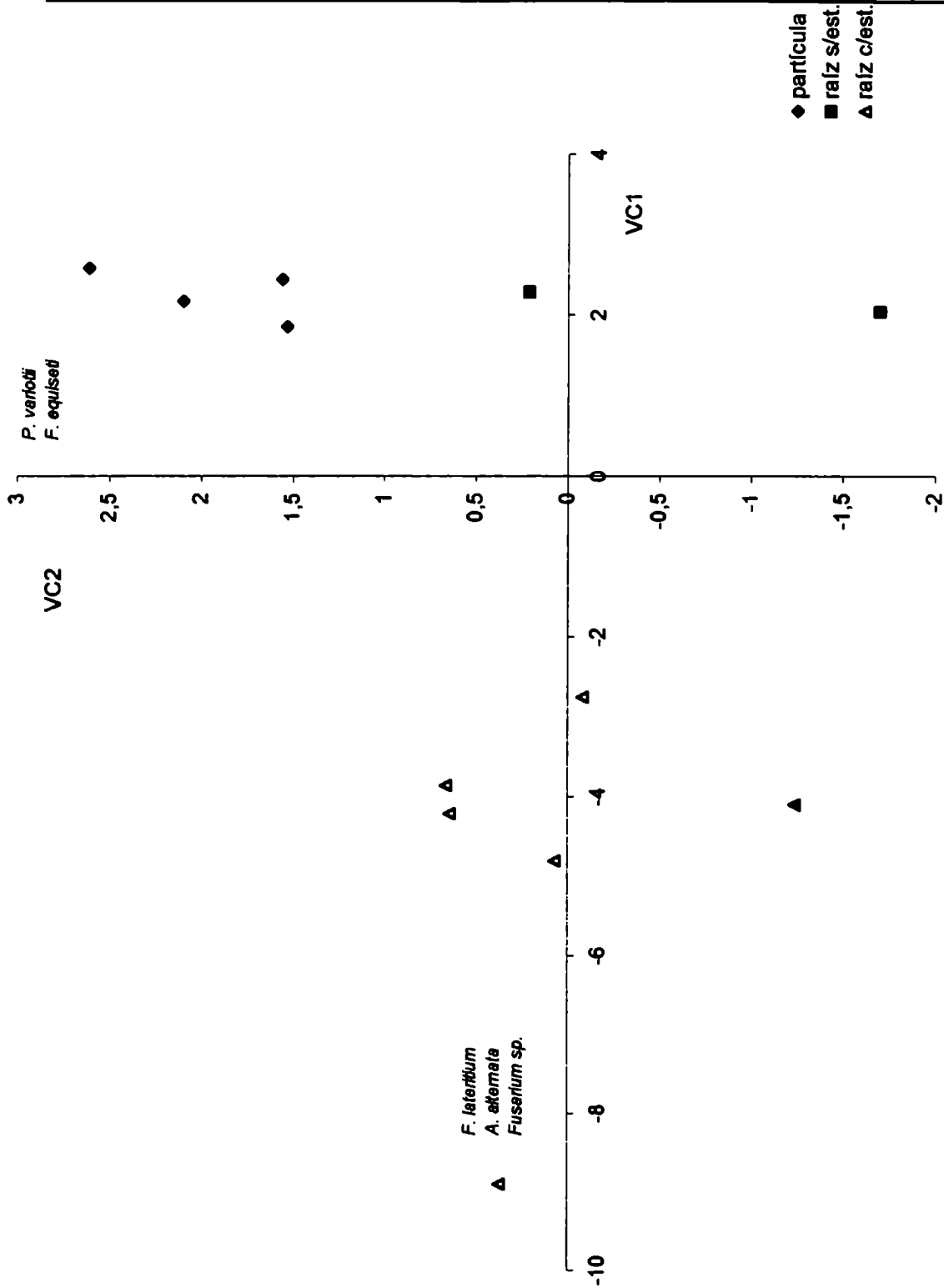


Fig.37. Análisis de la función discriminante de los datos de frecuencias en el espacio de las variables canónicas (VC1, VC2)

	C1	C2	C3	C4	C5
X(2)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X(3)	0.827	0.006	0.174	-0.134	0.265
X(4)	-0.117	-0.153	0.641	-0.249	-0.027
X(5)	-0.071	-0.013	0.242	0.751	0.022
X(6)	-0.008	0.686	-0.145	-0.199	-0.210
X(7)	0.239	-0.295	-0.425	-0.197	0.648
X(8)	0.317	-0.338	-0.281	0.410	-0.044
X(9)	-0.001	-0.023	-0.045	-0.088	-0.334
X(10)	-0.124	-0.176	-0.336	-0.121	0.542
X(11)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X(12)	-0.091	-0.130	0.783	0.162	0.177
X(13)	-0.015	-0.107	-0.406	-0.149	0.027
X(14)	-0.242	0.091	0.117	0.538	-0.063
X(15)	-0.220	-0.109	0.080	-0.359	-0.090
X(16)	0.000	0.000	0.000	-0.000	-0.000
X(17)	0.618	-0.002	-0.139	-0.203	-0.546
X(18)	-0.328	-0.266	0.269	-0.404	0.187
X(19)	-0.237	-0.227	0.512	-0.378	-0.159
X(20)	0.202	0.035	0.407	-0.178	0.487
X(21)	-0.000	-0.000	-0.000	-0.000	0.000
X(22)	-0.001	-0.023	-0.045	-0.088	-0.334
X(23)	0.646	-0.249	-0.254	0.108	0.078
X(24)	-0.000	-0.000	0.000	0.000	-0.000
X(25)	0.863	-0.060	0.058	-0.027	-0.038
X(26)	-0.071	0.636	0.155	0.345	0.112
X(27)	-0.030	0.778	-0.031	-0.028	0.124
X(28)	-0.092	0.844	-0.025	0.130	0.054
VP	2.753	2.686	2.308	1.915	1.732

Tabla 26. Contribución de las especies al espacio de los componentes.

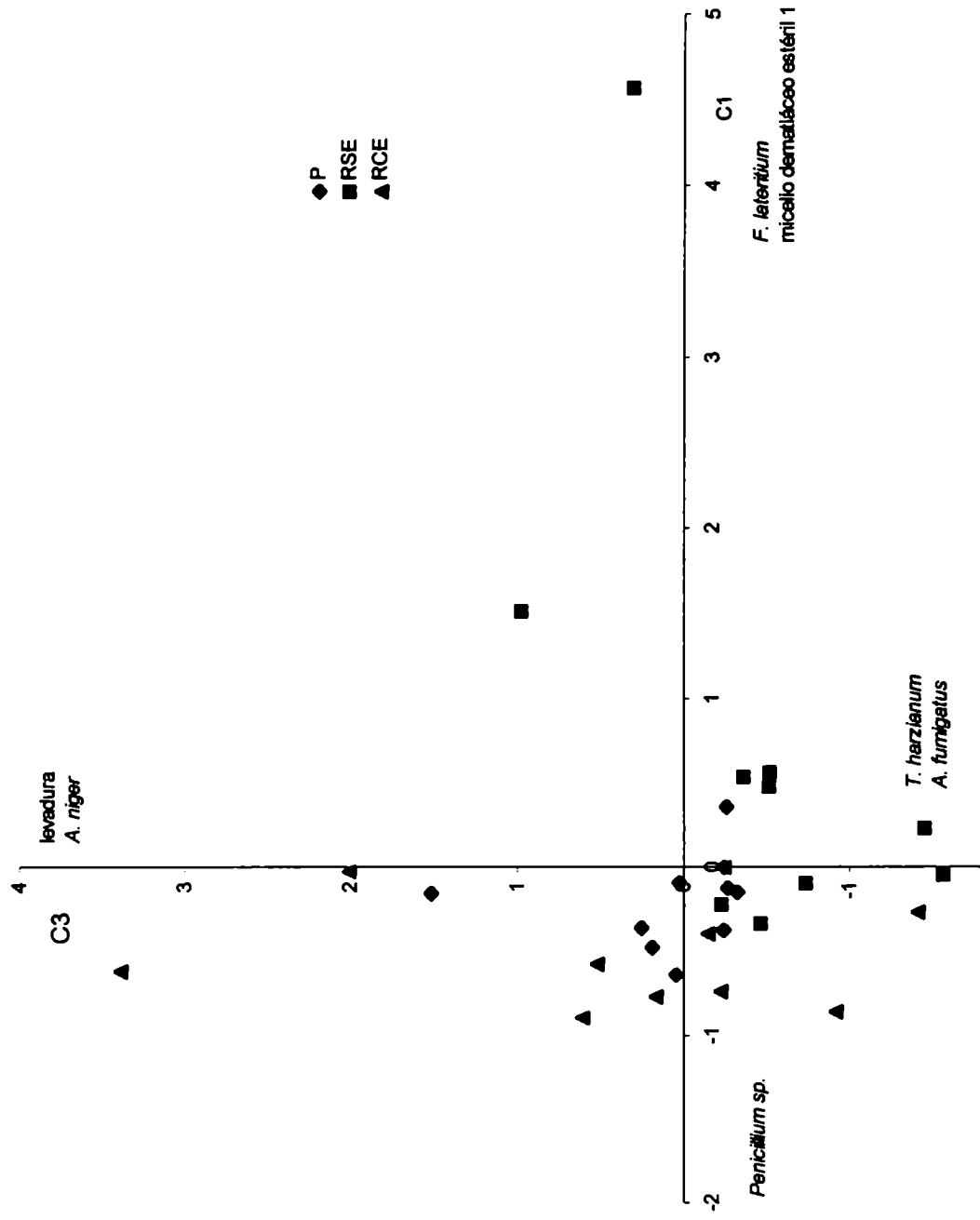


Fig. 35. Distribución de las muestras correspondientes al 2do. Muestreo de soja en el espacio de los componentes C1 y C3.

variable	Coeficiente estandarizado para las variables canónicas	
	F1	F2
<i>Penicillium sp.</i>	-1,03604	0,17526
<i>Rhizopus arrhizus</i>	-0,48492	-0,93218
Varianza explicada acumulada	56	100

Tabla 27a. Coeficiente estandarizado para las variables canónicas.
Varianza explicada.

Grupo	% de clasificación correcta	N° de casos clasificados		
		partícula	raíz s/est.	raíz c/est.
partícula	100	10	0	0
raíz s/est.	50	3	5	2
raíz c/est.	70	3	0	7
Total	73,3	16	5	9

Tabla 27b. Clasificación del análisis discriminante basado en las frecuencias de los hongos del suelo, usando el tipo de aislamiento como variable discriminante.

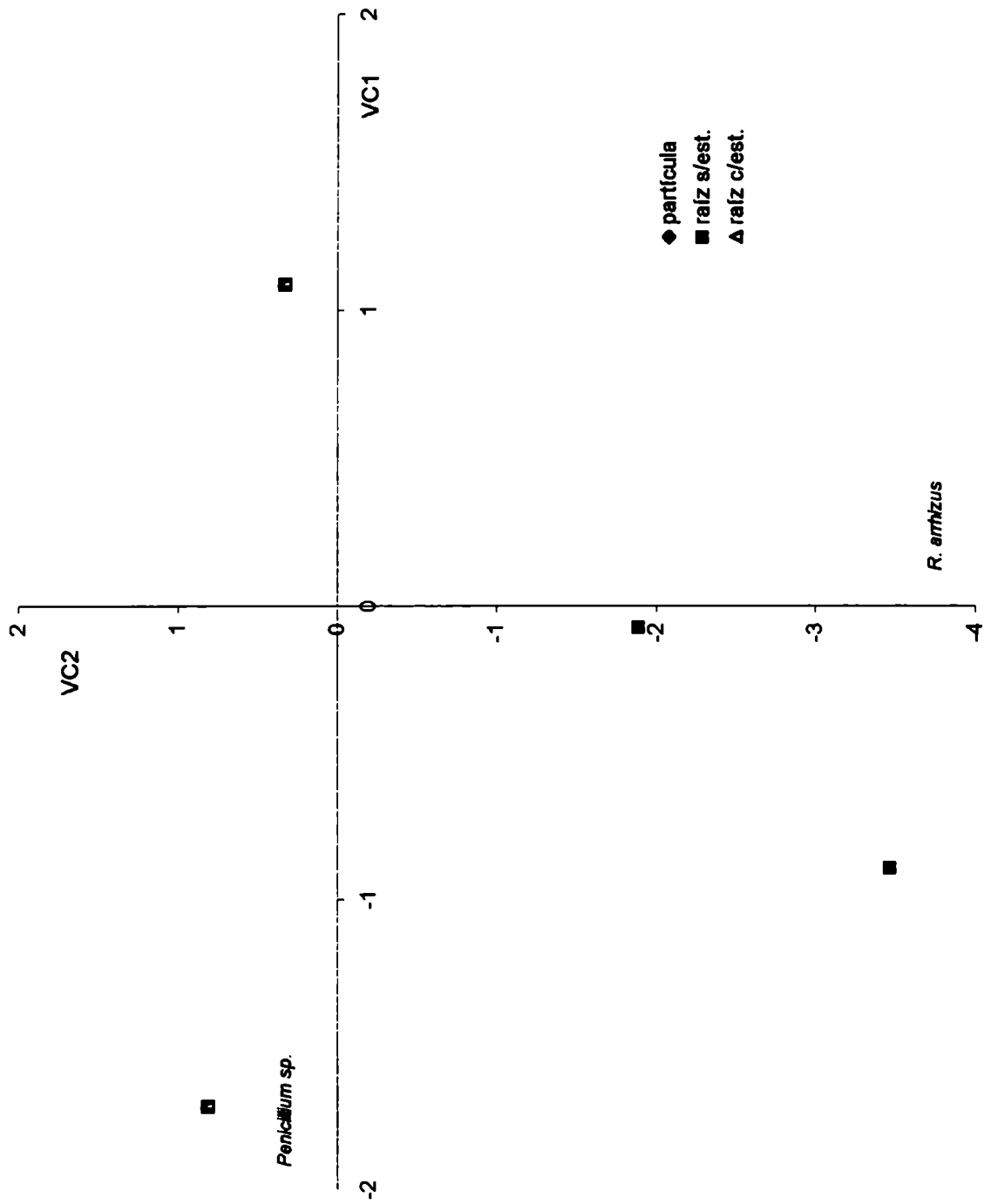


Fig. 39. Análisis de la función discriminante de los datos de frecuencias en el espacio de las variables canónicas (VC1, VC2)

	C1	C2	C3	C4	C5
X(2)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X(3)	0.700	-0.102	-0.019	-0.081	-0.040
X(4)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X(5)	-0.045	-0.117	0.677	-0.068	0.127
X(6)	-0.182	-0.171	0.119	-0.031	-0.255
X(7)	0.739	0.334	-0.051	0.282	-0.023
X(8)	-0.434	-0.099	-0.648	-0.156	-0.461
X(9)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X(10)	0.628	0.034	-0.030	0.047	-0.010
X(11)	-0.090	-0.081	0.209	-0.114	0.785
X(12)	-0.007	-0.110	0.618	0.007	-0.114
X(13)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X(14)	-0.041	-0.005	-0.088	0.964	0.013
X(15)	-0.046	-0.017	0.364	0.023	-0.094
X(16)	-0.050	0.954	0.056	-0.011	-0.029
X(17)	-0.184	0.224	0.732	-0.074	0.004
X(18)	-0.041	-0.005	-0.088	0.964	0.013
X(19)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X(20)	-0.048	-0.050	-0.126	-0.030	0.830
X(21)	-0.050	0.954	0.056	-0.011	-0.029
X(22)	-0.111	-0.119	-0.185	-0.040	-0.113
X(23)	0.937	-0.072	-0.032	-0.046	-0.040
X(24)	0.372	0.595	-0.293	-0.234	-0.125
X(25)	-0.061	-0.046	-0.019	-0.009	0.678
X(26)	-0.118	0.056	-0.119	-0.313	0.089
X(27)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X(28)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
VP	2.755	2.445	2.163	2.153	2.123

Tabla 28. Contribución de las especies al espacio de los componentes.

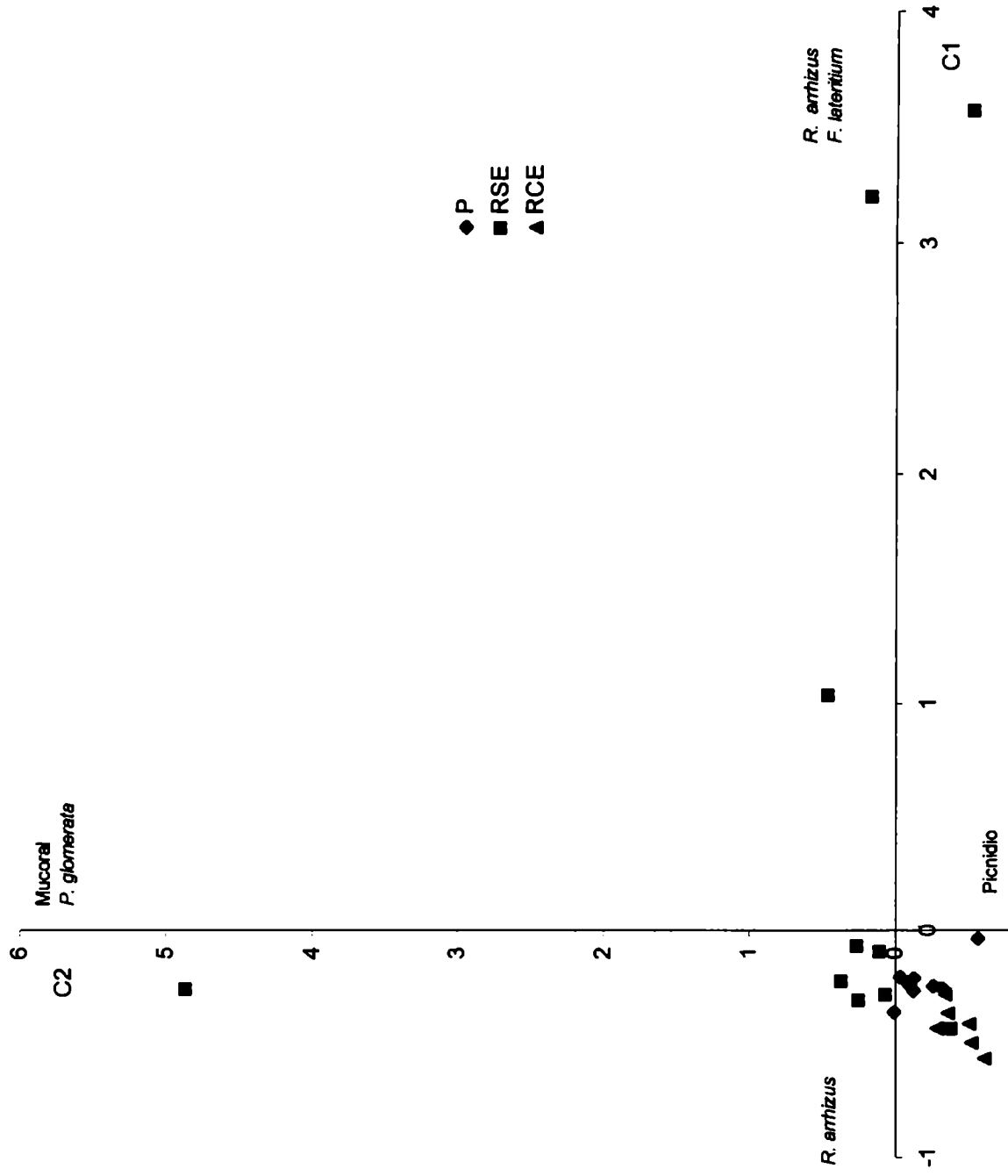


Fig. 36. Distribución de las muestras correspondientes al 3er. Muestreo de soja en el espacio de los componentes C1 y C2.

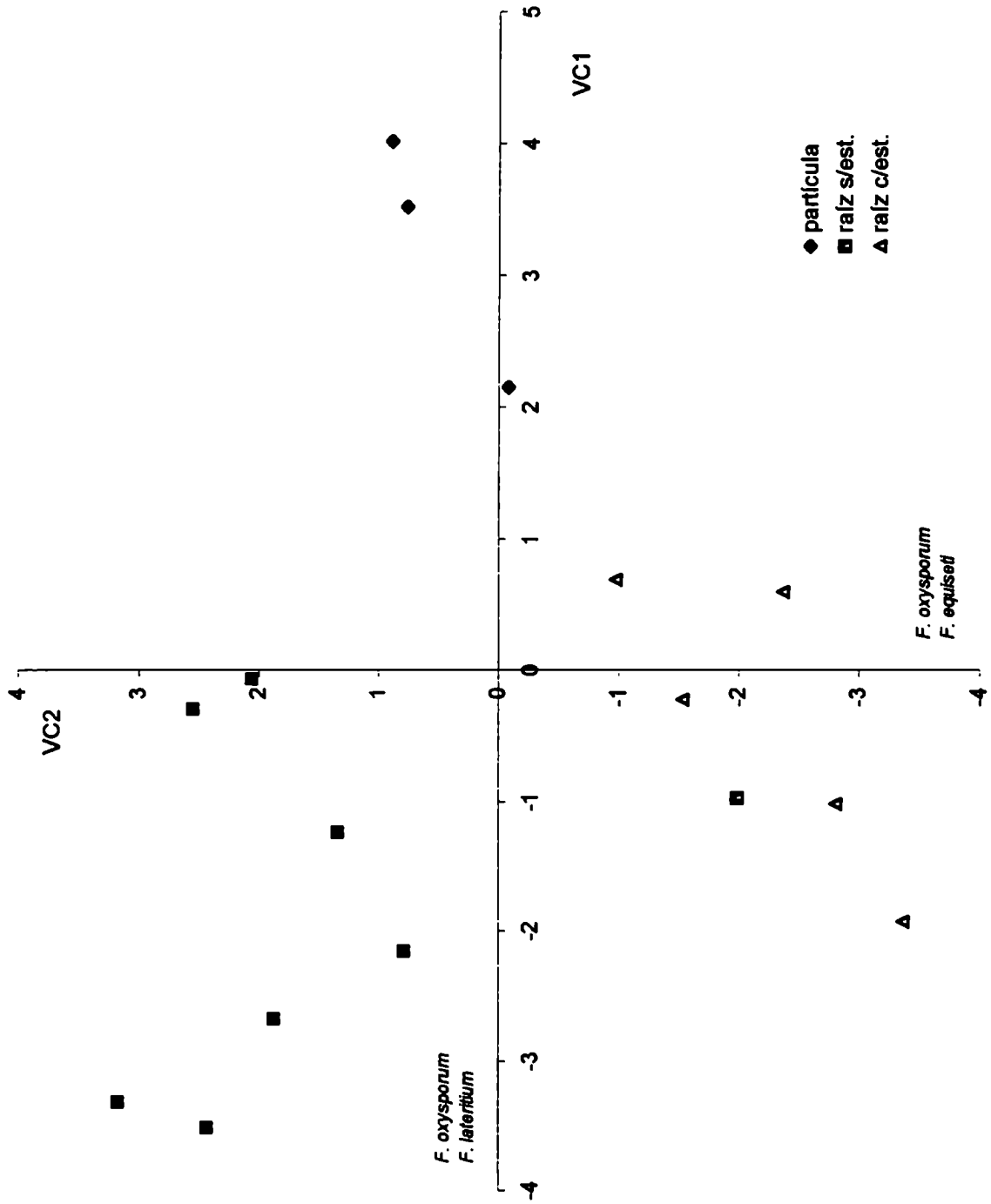


Fig.41. Análisis de la función discriminante de los datos de frecuencias en el espacio de las variables canónicas (VC1, VC2)

Análisis de las comunidades fúngicas de partículas y raíces sin esterilización superficial

Los primeros 3 componentes explicaron un 67.52% de la varianza total. Tabla 30.

El componente 1 en su sector negativo del eje segrega los censos correspondientes a los muestreos de partículas, caracterizados por las especies de *P. glomerata* y *F. oxysporum*; hacia el sector positivo del eje se encuentran 10 muestras que se corresponden con los censos de raíces sin esterilización superficial, caracterizados por la presencia de *F. lateritium* y *R. arrizus*.

Hacia el sector positivo del eje 2 se separan 8 muestras de raíces sin esterilización superficial y 11 de partículas caracterizadas por las especies *T. koningii* y *T. viride*. Hacia el extremo negativo del eje pero cercanos al 0 se encuentran las restantes muestras de partículas y raíces sin esterilización caracterizadas por *P. glomerata*. Figura 42.

Los censos fueron analizados mediante análisis discriminante (AD) utilizando como variable de agrupamiento el tipo de aislamiento (partículas y raíces sin esterilización).

El análisis discriminante dio como resultado una única función que explicó el 100% de la varianza total. Tabla 31a.

La función estuvo asociada con *R. arrizus* y *R. arrizus* var. *oryzae*.

La distribución de las muestras en relación a la función discriminante (Fig. 43) muestra que los censos correspondientes a las partículas están asociados a valores positivos de VC1 y los censos de las raíces sin esterilización superficial están asociados a valores positivos de VC1.

La clasificación general obtenida del análisis discriminante muestra que el 88,5 % de las muestras estuvieron bien clasificadas. Tabla 31b.

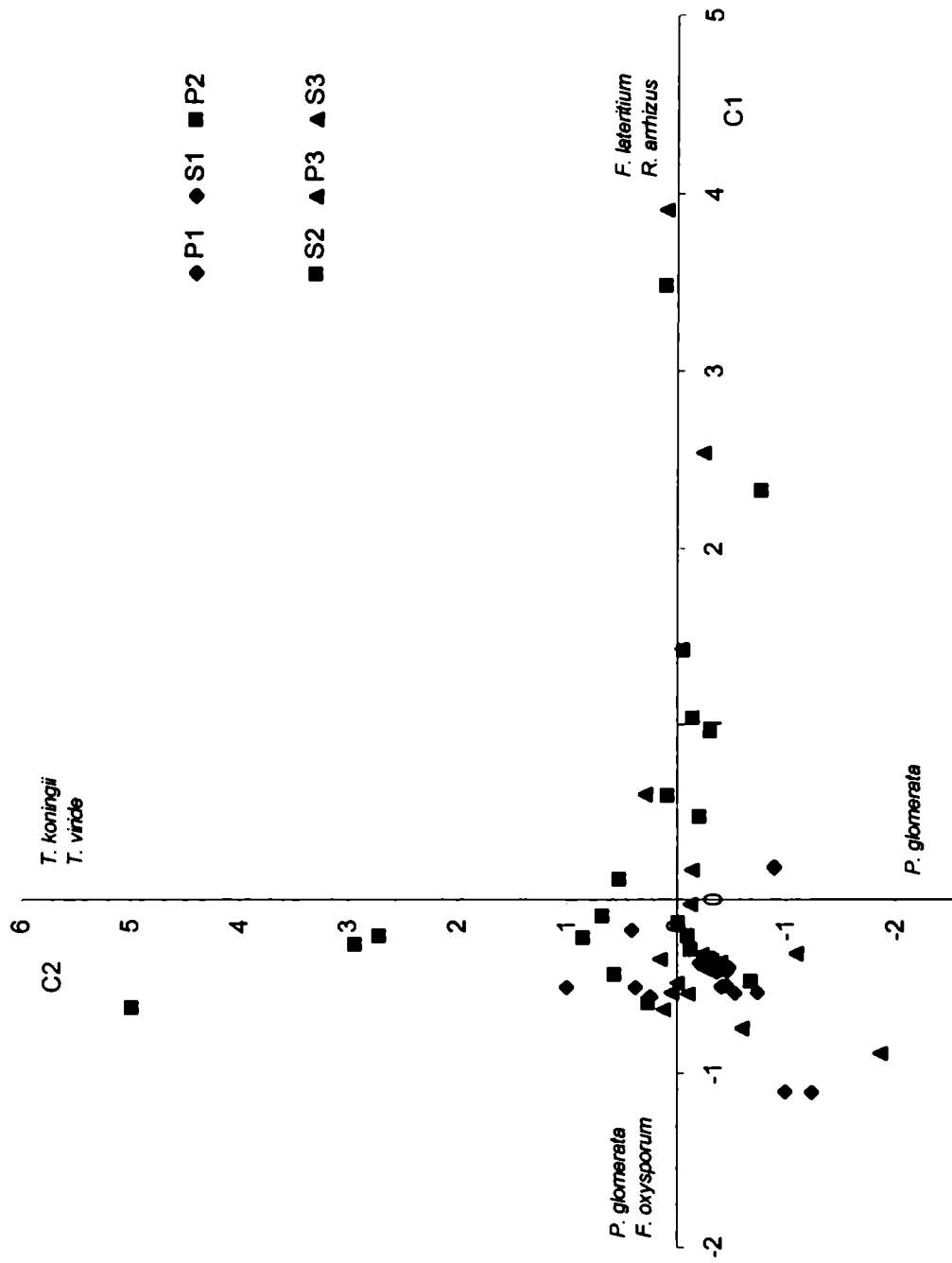


Fig. 40. Distribución de las muestras correspondientes a partículas y raíces sin esterilización superficial de soja en el espacio de los componentes C1 y C2.

variable	Coeficiente estandarizado para las variables canónicas	
	F1	
<i>Penicillium sp.</i>	0,41144	
<i>Phoma glomerata</i>	0,48483	
<i>Rhizopus arrhizus</i>	0,77896	
<i>R. arrhizus var. oryzae</i>	0,90124	
Varianza explicada acumulada	100	

Tabla 31a. Coeficiente estandarizado para las variables canónicas.
Varianza explicada.

Grupo	% de clasificación correcta	N° de casos clasificados	
		partícula	raíz s/est.
partícula	89,3	25	3
raíz s/est.	83,3	5	25
Total	88,5	30	28

Tabla 31b. Clasificación del análisis discriminante basado en las frecuencias de los hongos del suelo, usando el tipo de aislamiento como variable discriminante.

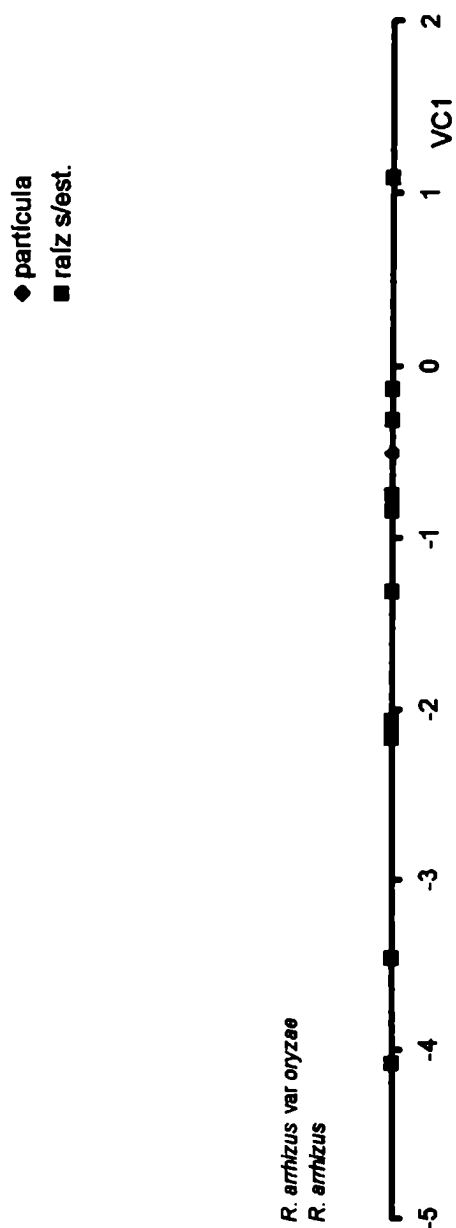


Fig. 43. Análisis de la función discriminante de los datos de frecuencias en el espacio de la variable canónica (VC1)

Análisis de las comunidades fúngicas de las raíces con y sin esterilización superficial

Del análisis de estos censos, surge que los 3 primeros componentes explicaron un 67.77% de la varianza total. Tabla 32.

El componente 3 segrega en su lado negativo del eje casi la totalidad de las muestras correspondientes a las raíces sin esterilización superficial, caracterizadas por la presencia de *F. oxysporum* y *R. arrhizus* var. *oryzae*. Hacia el sector positivo del eje se encuentran principalmente las muestras correspondientes a los censos de raíces con esterilización, caracterizados por las especies de levadura.

Con respecto al eje 3, en su sector negativo se concentra la mayoría de las muestras correspondientes a raíces sin esterilización y la mitad de las muestras de raíces con esterilización, caracterizadas por la presencia de *F. oxysporum*. En el sector positivo del eje quedan el resto de las muestras con esterilización superficial, caracterizadas por las especies de *Fusarium* sp.. Figura 44.

Los censos fueron analizados mediante análisis discriminante (AD) utilizando como variable de agrupamiento el tipo de aislamiento (raíces con y sin esterilización superficial).

El análisis discriminante dio como resultado una única función que explicó el 100% de la varianza total. Tabla 33a.

La función estuvo asociada con *R. arrhizus* y *R. arrhizus* var *oryzae*.

La distribución de las muestras en relación a la función discriminante (Fig. 45) muestra que los censos correspondientes a las raíces sin esterilización están asociados a valores positivos de VC1 y los censos de raíces con esterilización superficial están asociados a valores negativos del mismo eje.

La clasificación general obtenida del análisis discriminante muestra que el 81,3 % de las muestras estuvieron bien clasificadas. Tabla 33b.

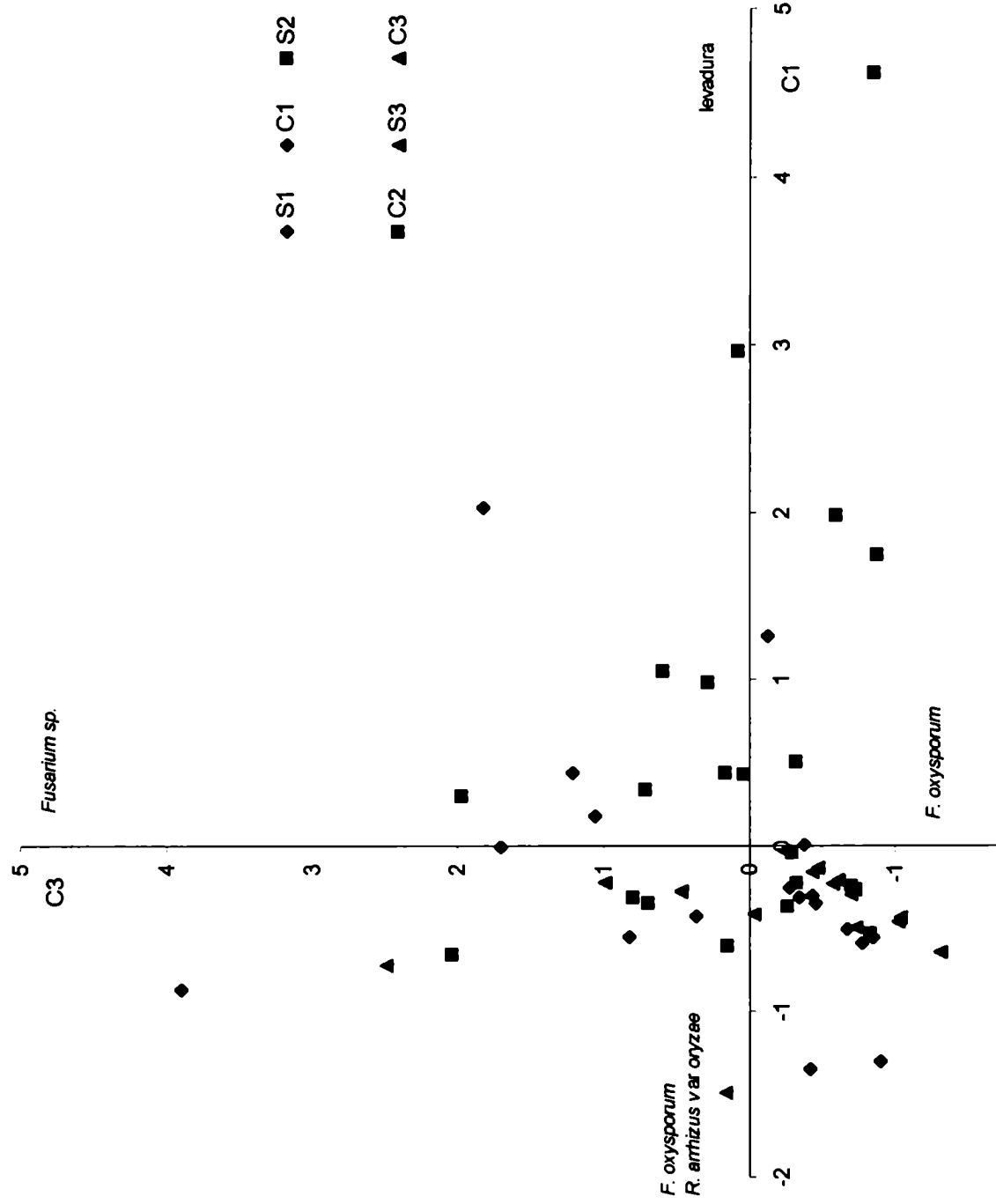


Fig. 42. Distribución de las muestras correspondientes a raíces con y sin esterilización superficial de soja en el espacio de los componentes C1 y C3.

variable	Coeficiente estandarizado para las variables canónicas	
	F1	
<i>Phoma glomerata</i>	0,56691	
<i>Rhizopus arrhizus</i>	0,78164	
<i>R. arrhizus</i> var. <i>oryzae</i>	0,74353	
<i>Trichoderma koningii</i>	0,45615	
Varianza explicada acumulada	100	

Tabla 33a. Coeficiente estandarizado para las variables canónicas.
Varianza explicada.

Grupo	% de clasificación correcta	N° de casos clasificados	
		partícula	raíz s/est.
raíz c/est.	63,3	19	11
raíz s/est.	97,1	1	33
Total	81,3	20	44

Tabla 33b. Clasificación del análisis discriminante basado en las frecuencias de los hongos del suelo, usando el tipo de aislamiento como variable discriminante.

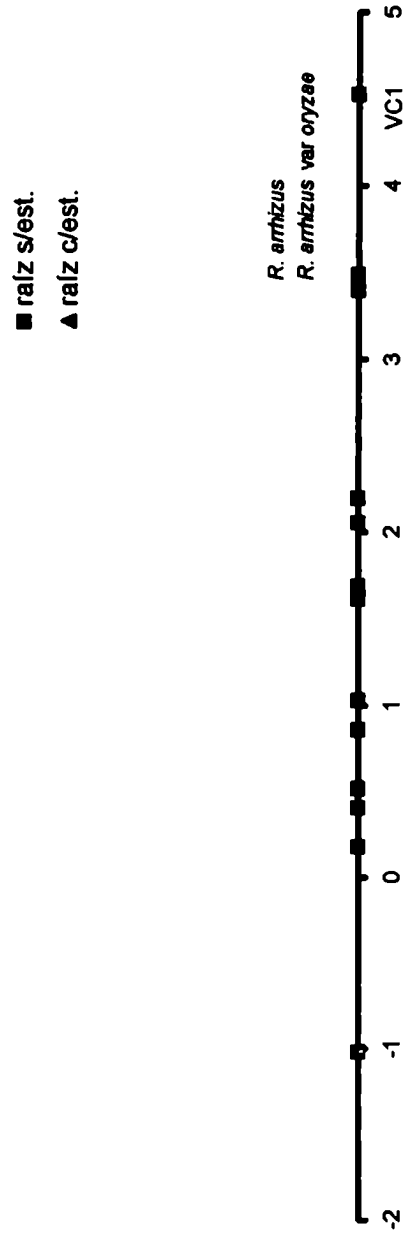


Fig. 45. Análisis de la función discriminante de los datos de frecuencias en el espacio de la variable canónica (VC1)

Discusión
Ensayos Nº 1, 2 y 3

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS N°1, N°2 y N° 3

En los últimos años los estudios de hongos de suelo han vuelto a tomar importancia (Kendrick & Parkinson, 1990; Frankland et al 1990; Seifert, 1990; Parkinson & Coleman, 1991; Parkinson, 1994, Conway et al., 2000).

Los hongos del suelo, su diversidad y distribución son temas que tuvieron su auge en la década del '70 cuando se solucionaron los problemas metodológicos.

Hasta ese momento solo se había usado el método de dilución con y sin agregado de agar cuya principal limitación era la información obtenida. Sólo permitían realizar aislamientos y enumeración de las especies de manera tradicional.

Usualmente no se podía distinguir entre colonias formadas a partir de esporas, de hifas o de propágulos inactivos que germinaban en condiciones adecuadas. Estas listas obtenidas por los métodos tradicionales sólo daban información acerca de las especies presentes y su distribución en el suelo pero no se mencionaba nada acerca de la actividad.

El comienzo de la solución metodológica fue dada por Parkinson & Thomas (1965) quienes propusieron el lavado de partículas por medios mecánicos o manuales, que permitían aislar las especies activas en el momento del muestreo. Posteriormente se ajustó la técnica cambiando el diseño del aparato de lavado, los tiempos necesarios y el número de ellos.

En este trabajo se utilizó esta técnica de aislamiento propuesta por Parkinson (1994).

De los aislamientos así obtenidos se observó que las rizosferas ejercen su efecto sobre la población fúngica del suelo. Los microorganismos que colonizan la rizosfera del cultivo de trigo es diferente en la composición específica ya que se aislaron especies como *A. alternata*, *Chaetomium sp*, *Th. terricola*, *T. flavus*, *T. flavus* y *Ph. eupyrena* lo que permite separarla de las restantes (pastura y soja).

La pastura tiene entre otras especies, leguminosas, las que hacen sentir su efecto sobre la población fúngica quedando estas dos comunidades muy juntas por el método de separación utilizado.

Dix & Webster (1995) concluyen que, los hongos de la rizosfera no tienen requerimientos nutricionales especiales. Estos son satisfechos por las sustancias orgánicas provenientes de la raíz. Esto explica las pequeñas diferencias que existen entre las poblaciones aisladas de un mismo suelo y las diferencias, están dadas por la variación en la frecuencia de aparición de las mismas más que por diferencias absolutas de composición.

Así especies de: *Cylindrocarpon obtusisporum*, *F. oxysporum* y *T. koningii* aparecen en las tres rizosferas, con distintas frecuencias.

Parkinson & Thomas (1965) caracterizaron el suelo rizosférico por la presencia de *Penicillium lilacinum*, *Mucor hiemalis* y varias especies de *Fusarium*. En nuestro lugar de muestreo también encontramos 4 especies distintas de *Trichoderma*. Dix (1964) encontró en la rizosfera de *Phaseolus vulgaris*, *Trichothecium roseum*, *Trichocladium asperum*, especies de *Papulospora*, *Doratomyces stemonitis* y algunas especies de *Penicillium* y varias Mucorales.

Si bien muchas de las especies encontradas por otros autores no fueron aisladas en este trabajo, podemos concluir que existen otras que ocupan el mismo nicho y permiten el desarrollo de comunidades rizosféricas tan eficientes como las ya descritas, lo que se puede corroborar por el alto número de asociaciones fúngicas presentes en la rizosfera de soja.

Los ensayos en maceta permitieron seguir la evolución de la comunidad fúngica en el suelo y en el rizoplano (raíz sin esterilizar = hongos de vida libre) y en los endofitos de raíz (raíz esterilizada).

El segundo muestreo, que coincide con la floración, muestra mayor riqueza específica en los 3 tipos de sustrato, coincidiendo esto, con la mayor actividad de la planta. Esto se traducen en cambios fisiológicos y desarrollo de una microflora diferente. Harley & Waid (1955^a), Waid (1957), Stenton (1958) y Taylor & Parkinson (1961) estudiando el desarrollo de las raíces de *Fagus sylvatica*, *Lolium perenne*,

Pisum sativum y *Vicia faba* respectivamente encontraron que a medida que emergen las raíces la colonización comienza en las partes más viejas estimulada por los exudados de la raíz. En general alrededor de los 6-7 días después de la germinación.

La colonización al principio es escasa luego, aumenta el número de especies, estableciéndose el equilibrio con el suelo circundante (Stenton, 1958).

Al comienzo la radícula está colonizada por *Cladosporium herbarum*, *Alternaria alternata* y otras especies habitantes de la hoja que se encuentran en las cubiertas germinales y normalmente no juegan un papel muy importante ya que son pobres competidoras de los hongos del suelo. Pugh (1967) encontró que se hacían más importantes en suelos pobres como es el caso de las dunas que tienen poco inóculo.

La microflore de superficie de raíz también refleja lo inusual de esta situación ya que aparecen hongos típicos de zonas salinas como *Dendryphiella salina* y *Aschocyttula obiones*. La colonización de las raíces de las plántulas se debe a la invasión progresiva por hongos desde el suelo circundante y es menos importante que lo que se debe al crecimiento de micelio desde las partes viejas ya colonizadas. Las raíces de *Phaseolus vulgaris* siguen un patrón típico que sirve para ilustrar el desarrollo de la comunidad fúngica en las superficies de las raíces. (Dix, 1964).

Estos resultados muestran que los colonizadores tempranos son especies de *Penicillium* (especialmente *P. janthinellum* y *P. lilacinum*, que tiende a ser dominantes en el ápice), especies de *Mucor* y de *Mortierella*, *Trichoderma viride* y *T. koningii*. En las partes más viejas estas especies disminuyen y aumenta *Gliocladium roseum* y las especies de *Fusarium* (especialmente *F. oxysporum*).

Estos últimos constituyentes de la flora fúngica se hacen más importantes a medida que el material de raíz envejece.

En general, la colonización interna de la raíz aumenta con la edad de la misma mientras que la diversidad tiende a decrecer.

Nuestro estudio pone de manifiesto que las especies que se encuentran en las cubiertas seminales y que se aíslan en el primer muestreo con esterilización superficial de la raíz son: *Alternaria tenuissima*, *Cylindrocarpon didymum*, varios

micelios estériles y algunas especies de *Penicillium*. Estas especies son reemplazadas por los habitantes del suelo como son las especies de *Fusarium*, *Phoma*, y algunas Mucorales. Al final del ciclo el número de especies se reduce a 7 y la mayoría de los aislamientos corresponden a *Periconia macrospinosa* característico de los detritos vegetales del suelo.

El rizoplaneo al comienzo está colonizado por pocas especies siendo la más importante en su frecuencia *Cylindrocarpon didymum*. Esta especie es reemplazada por *Cylindrocarpon obtusisporum* y *Phoma eupyrena* en el segundo muestreo y algunas especies de *Trichoderma harzianum* y *T. koningii*. Este último aumenta su frecuencia en el último muestreo.

Investigaciones sobre la colonización en *Phaseolus vulgaris*, en plantas maduras (de más de 190 días) mostraron la asociación de *F. oxysporum* con *G. roseum*. Por último, aumenta la colonización por los micelios estériles dematiáceos y *Cylindrocarpon destructans*, permaneciendo, como especies dominantes hasta completar el ciclo de las plantas.

Los hongos que invaden los ápices en la primera parte difícilmente invaden el tejido cortical, mientras que *C. destructans* y las formas estériles con hifas estériles penetran la corteza.

Penicillium, *Trichoderma*, *Mortierella* y *Mucor* parecen ser parte de un grupo ecológico de invasores casuales de la raíz confinados a la superficie. Estos son rápidamente reemplazados y forman una comunidad estable por un tiempo más o menos corto. Aparentemente juegan un rol poco importante en la descomposición de la raíz.

En el experimento de soja, que por tratarse de una leguminosa podríamos pensar que va a tener una sucesión similar, la raíz, está colonizada en su interior inicialmente por *Alternaria alternata*, algunas especies de *Fusarium* y un picnidio que provienen de las cubiertas seminales. Estos son reemplazados por los micelios estériles, *Fusarium oxysporum* y *Paecilomyces variotii*; completándose la sucesión con un aumento importante en la frecuencia de *Fusarium oxysporum* a expensas de la disminución de las otras especies.

El rizoplasma muestra la siguiente secuencia: *Fusarium oxysporum* es la especie dominante a lo largo del muestreo acompañado por *Rhizopus arrhizus* var. *oryzae* en el primer y tercer muestreo y de *Rhizopus arrhizus* en el segundo. Esta especie de *Fusarium* ha sido caracterizada por aparecer con mucha frecuencia en lugares donde hay siembra de leguminosas, especialmente arvejas (Domsch & Gams, 1969) y soja (Warren & Kommedhal, 1973). Es típico de suelos de lugares cálidos y húmedos a diferencia de lo que ocurre con *Cylindrocarpon*.

Algunos aislamientos de *Penicillium* y *Trichoderma* de la raíz son insensibles a la fungistasis del suelo, Dix y Webster (1995) sugieren que podrían responder a los exudados de la raíz y así explicar su temprana aparición en la misma colonizando los ápices.

Los hongos que reemplazan a los primeros colonizadores son poblaciones residentes de la raíz, formando comunidades semiestables sobre la superficie, penetrando e iniciando la descomposición de los tejidos. Las especies que son verdaderas habitantes de la raíz son tal vez las formas estériles dematiáceas que solamente crecen sobre ellas.

Un gran número de sucesiones fúngicas se han descrito pero todas llegan en el hemisferio norte al mismo patrón:

- 1.- Colonizadores pioneros, que incluyen hongos como *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor* y *Mortierella*.
- 2.- Verdaderos habitantes de la raíces que reemplazan eventualmente a los colonizadores pioneros. Tales como especies de *Fusarium* y *Gliocladium*.
- 3.- Especies estériles, hialinas o dematiáceas acompañadas por *Cylindrocarpon*.

Sobre los cereales y gramíneas, las formas estériles invaden las raíces adelantando la senescencia programada de la corteza radicular (Deacon, 1987)

ENSAYO N°4:

OBJETIVO: Longitud del micelio, biovolumen y biomasa fúngica.

a) Cálculo de peso seco**Materiales y métodos:**

Tanto de las muestras tomadas en el campo (Ensayo N° 1) como las del ensayo N° 2 y N° 3 se tomaron aproximadamente 5 gramos de suelo el que fue pesado y colocado en pesa filtros previamente tarados. Se realizó por triplicado para cada muestra de suelo. Luego fue colocado en una estufa a 105°C hasta peso constante. Se volvió a pesar y se calculó el peso seco de la muestra según la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de humedad} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

$$\text{Peso seco (gr)} = \frac{100 - H}{100}$$

Resultados:

Los resultados se presentan en la Tabla 34. Los valores en cada situación es el promedio de tres repeticiones más la desviación estándar.

Los datos fueron analizados mediante un Anova de un factor, usando el paquete estadístico BIOM (Rohlf, 1982), con tres niveles: 1er. muestreo, 2do. muestreo y 3er. muestreo. En los casos que las diferencias resultaron significativas, se aplicaron contrastes no planeados de Tukey.

En los datos de humedad de las muestras del campo, se observa que el suelo de la pastura (23.7%) fue levemente mayor que las muestras de trigo y de soja. Al aplicar ANOVA de un factor, este resultó que las diferencias no eran significativas entre las 3 muestras ($F_{2,6} = 3.39$, $p > 0.05$).

En el estudio de sucesión fúngica en macetas, el suelo de trigo y de soja tuvieron diferencias significativas entre los 3 muestreos ($F_{2,6} = 14.18$, $p < 0.05$ y $F_{3,6} = 13.88$, $p < 0.05$, respectivamente).

Al realizar contrastes en las muestras de trigo se vio que no hay diferencias significativas entre los valores del 1er. y 3er. muestreo. (V.C.= 2.23, 2.89).

En el suelo de soja los contrastes realizados mostraron que no había diferencias significativas entre la muestra original y el 1er. muestreo y entre el 2do. y 3er. muestreo pero sí entre ambos grupos, (V.C.= 2.97, 3.80 y 4.32).

muestras en macetas	% de humedad	
	trigo	soja
M.O.		18.83 ± 3.25
1er. M.	20.4 ± 4.96	16.00 ± 7.00
2do. M.	14.43 ± 0.82	24.67 ± 4.33
3er. M.	18.6 ± 0.16	24.16 ± 0.72

muestras de campo	% de humedad		
	pastura	trigo	soja
	23.7 ± 0.81	22.15 ± 0.06	21.00 ± 4.00

Tabla 34. Porcentaje de humedad presente en las distintas muestras. Cada valor es la media de tres repeticiones de la humedad ± d.

- a) Cálculo estimativo de metros de micelio por gramo de peso seco de suelo**
i) Para muestra de rizosfera:

Materiales y métodos:

Jones & Mollison (1948) propusieron una metodología para estimar cuantitativamente los microorganismos del suelo; para ello suspendieron una cantidad conocida de suelo en agar agua fundido y una gota de dicha suspensión la hicieron solidificar en un hemocitómetro. La película que se obtuvo se coloreó y montó en forma permanente. Posteriormente se observó al microscopio en cuyo ocular se incorporó un lente provisto con una cuadrícula de 2 mm. En cada una de ellas se realizó un conteo de microorganismos o fragmentos de micelio. También pudieron medir la longitud del micelio con un ocular graduado y cámara clara. Los datos obtenidos se expresaron por gramo de suelo teniendo en cuenta la concentración inicial y el volumen empleado.

Luego Thomas, Nicholas & Parkinson (1965) enunciaron y analizaron las posibles fuentes de error del método anterior, recomendando el uso de una pesa de 5 gramos sobre el cubre del hemocitómetro para evitar que el grosor de la película sea mayor que 0.1 mm y provoque sobrestimaciones de micelio. Nicholas & Parkinson (1967) compararon los diferentes métodos empleados en la determinación de cantidad de micelio en muestras de suelo y concluyeron que el método de la película de agar es el más exacto.

Visser & Parkinson (1975) modificaron el método anterior para su aplicación en estudios de hoja viva u hojarasca, recomendando el empleo de una licuadora a 10.000 rpm durante 3 minutos, con el fin de homogeneizar el material de manera que tanto el micelio interno como el superficial pueda estimarse.

Para evitar la laboriosa medición de filamentos, Olson (1950), propuso un método para estimar la longitud de las algas filamentosas basado en el conteo de las intersecciones de los mismos con una grilla cuadrículada que se incorpora al ocular del microscopio, método que también fue usado para calcular la longitud de micelio.

El método propuesto fue utilizado también por Lodge & Ingham (1991) y Parkinson (1994).

En este ensayo, se pesaron dos gramos de suelo para cada muestra y se los conservó en frascos conteniendo 30 ml de fijador Bouin- Hollander. Estos 30 ml se llevaron a 100ml con agua destilada y homogeneizados en licuadora a 5000 rpm durante cinco minutos. Luego 30 ml de esta suspensión se mezclaron con 30 ml de agar (agar oxoid N°3 al 1,5% en agua) manteniéndose a Baño María a una temperatura de 60°C.

Se prepararon las películas de agar utilizando la mezcla de agar y fijador sobre un hemocitómetro (cámara de Neubauer), colocándole un cubre con una pesa de 5 gr siguiendo el método de Jones & Mollison (1948) y las modificaciones de Thomas, Nicholson & Parkinson (1975) y Domsch et al. (1979), Lodge & Ingham (1991), Parkinson (1994). Luego de solidificadas las películas se montaron con gelatina-glicerina.

Se prepararon 30 películas de agar por muestra, que se tomaron por triplicado. La longitud de micelio se realizó siguiendo el método de la intersección de Olson (1950), utilizando un microscopio con contraste de fase en cuyo ocular se colocó una grilla cuadrada y 400 aumentos. Sobre cada película de agar se hicieron 20 lecturas.

Se hicieron 50 mediciones de diámetros hifales, discriminando entre micelio moniliáceo y micelio dematiáceo.

La fórmula utilizada para el cálculo de metros de micelio para cada muestra fue:

$$\text{Long. de micelio (m)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de cortes} \times \text{Pi}/4 \times \text{valor de 1 div.} \times 10^3}{\text{V. de cámara} \times \text{aumento} \times \frac{\text{peso seco de la muestra}}{\text{Vol. de la solución}}}$$

N° de cortes: n° de intersecciones del micelio tanto con las líneas horizontales como las verticales de la cuadrícula.

Valor de 1 división: 0.02333 mm

Pi/4: constante: 0.786

Volúmen de la cámara: $(0.02333 \times 10)^2 \times 0.1$ mm

Aumento: 400

Resultados:

En la Tabla 35 se graficaron los valores obtenidos de longitud de micelio expresados en metros de micelio por gramo de peso seco de las muestras para cada muestreo. Los valores son el resultado de la media de tres repeticiones con sus respectivos desvíos. La metodología aplicada estima la longitud de micelio total.

Estos datos fueron analizados mediante un Anova de un factor, usando el paquete estadístico BIOM (Rohlf, 1982), con tres niveles: 1er. muestreo, 2do. muestreo y 3er. muestreo; en el caso que las diferencias dieron significativas se aplicó contrastes no planeados de Tukey.

En las muestras de campo, la que registró un mayor valor en los datos de micelio fue la muestra de soja, seguida por la de trigo y por la de pastura. Se evidenciaron diferencias significativas entre las tres muestras ($F_{2,6} = 335.02$, $p < 0.05$). Posteriormente al realizar contrastes entre pares de medias se mantuvo la diferencia significativa entre las muestras ($V.C. = 7.15, 9.26$).

Para la rizosfera de trigo en maceta, hubo diferencias significativas entre los 3 muestreos ($F_{2,6} = 99.46$, $p < 0.05$), los valores fueron en aumento desde el 1er. al 3er. muestreo. Los posteriores contrastes entre pares de medias dieron diferencias significativas entre los 3 muestreos ($V.C. = 5.7, 7.37$).

Para la rizosfera de soja, teniendo en cuenta la muestra original traída del campo de la cual se partió para la siembra, hubo diferencias significativas entre los

4 muestreos. En la muestra original los valores fueron mayores que en el 1er. muestreo y en el 2do. muestreo fue mayor que en el 1er., 3er. y la muestra original ($F_{3,8} = 156.485$, $p < 0.05$). Al realizar contrastes se observa que existen diferencias significativas entre las 4 muestras (V.C. = 4.20, 5.39 y 6.13).

En la Fig. 46 se observa la relación existente entre la longitud de micelio contabilizados en los 3 muestreos para trigo y para soja y el % de aislamientos sobre partículas. No se observó concordancia neta entre la longitud de micelio y el % de aislamientos. Para trigo los valores en los metros de micelio fueron en aumento a lo largo de los muestreos, sin embargo los valores encontrados en el % de aislamientos, sufren una baja en el 3er. muestreo.

Para soja, el % de aislamientos tiene un punto de inflexión en el 2do. muestreo, en el cual se da el mayor valor de micelio.

muestras en macetas	micelio	
	trigo	soja
M.O.		54,13 ± 10,58
1er. M.	59,27 ± 3,16	39,63 ± 11,56
2do. M.	70,87 ± 3,29	85,3 ± 4,69
3er. M.	99,36 ± 32,05	71,87 ± 3,84

muestras de campo	micelio		
	pastura	trigo	soja
	60,37 ± 6,51	87,95 ± 8,26	153,18 ± 46,10

Tabla 35. Longitud del micelio presente en las distintas muestras. Cada valor es la media de tres repeticiones de la longitud del micelio ± d. (mts. micelio / gr. suelo seco ± desvío standart)

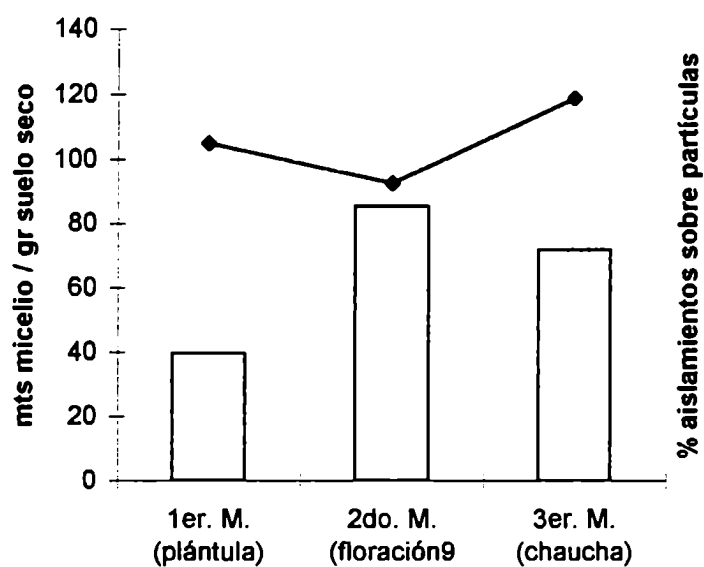
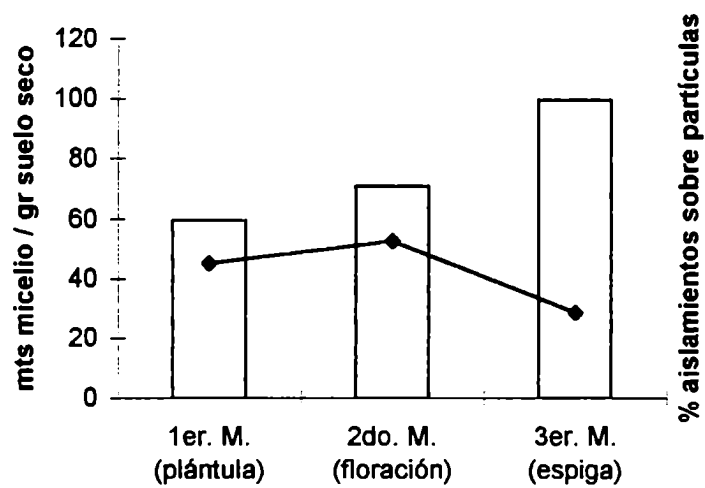


Fig. 46. Relación entre los metros de micelio / gr. suelo seco y el % de humedad del cultivo de trigo y de soja en los tres muestreos.

ii) Cálculo de biovolumen y biomasa

Materiales y métodos:

Al mismo momento que se contabilizó el número de cortes en las placas de agar, también se hicieron 50 mediciones del diámetro hifal para cada muestra. Se calculó el porcentaje de cada diámetro hifal sobre los metros de micelio y así se calcularon parcialmente los valores de biovolumen para cada diámetro. Luego se sumaron los valores parciales para obtener el biovolumen total de cada muestra. Con los datos de longitud de micelio y diámetro hifal se aplicó la siguiente fórmula para biovolumen (Baath & Söderström, 1979), presumiendo que el micelio es un cilindro perfecto:

$$B = \pi \times (\text{diámetro}/2)^2 \times L$$

Para el cálculo de biomasa fúngica se consideró la densidad de los hongos como de 1,1 gr/cm³ por tratarse de especies "autóctonas" y el peso seco igual al 21% según Bakken & Olsen, 1983).

La fórmula es la siguiente:

$$\text{Densidad} = \text{Biomasa} / \text{Biovolumen} \longrightarrow \text{Biomasa} = \text{densidad} \times \text{Biovolumen}$$

Resultados:

Los valores en biovolumen (Tabla 36a) para las muestras de campo tienen sus valores más altos en el cultivo de soja. En las experiencias de trigo en macetas, los valores más altos se registraron en el 3er. Muestreo (0,241 mg / gr de peso seco). Para las muestras de soja, el valor máximo se alcanzó en el 2do. Muestreo. Esta situación se repite en el cálculo de biomasa para todas las muestras (Tabla 36b).

Solo en el 2do. muestreo con un porcentaje del 2% se observaron los micelios dematiáceos.

Se encontraron micelios con más de 3 μm de diámetro a partir del 2do. muestreo, pero en muy baja proporción. En el 2do. muestreo, los micelios dematiáceos estuvieron presentes en un 2% aproximadamente.

Los valores más altos fueron para el intervalo de 1 – 2 μm con un 80%, 75% y 70% para el 1er., 2do. y 3er. muestreo respectivamente.

Se registraron para el 2do. y 3er. muestreo diámetros entre 3 – 4 μm pero en muy baja frecuencia.

En la muestra de suelo de pastura (trébol y festuca) traída del campo, donde luego se sembró soja, se encontró el mayor porcentaje de frecuencias de micelios dematiáceos. Fig. 49.

En el diámetro de 0 – 1 μm se registraron micelios moniliáceos en la muestra original y en el 3er. muestreo en baja frecuencia.

En los diámetros de 1 – 2 μm se observaron valores del 30% en micelios moniliáceos para el 1er. muestreo, 19% para el 2do. muestreo y 23% para el 3er. muestreo.

Solo se encontraron micelios dematiáceos en el 3er. muestreo con un 3% aproximadamente.

Para el diámetro de 2 – 3 μm se encontró un 40% de frecuencias para la muestra original, 33% , 43% y 40% para el 1er., 2do. y 3er. muestreo respectivamente. En este intervalo el mayor porcentaje de micelios dematiáceos se observó en la muestra original con un 18%. El porcentaje más bajo de estos micelios (3%) fue en el 1er. muestreo.

En el diámetro de 3 – 4 μm hubo un alto porcentaje (19%) en la muestra original, 8 – 9% para el 1er. , 2do. y 3er. muestreo.

Para los diámetros de 4 – 5 μm en el 1er. muestreo solo hubo micelios moniliáceos y en la muestra original, en el 2do. y 3er. muestreo los valores fueron disminuyendo desde la muestra original hasta el 3er. muestreo.

Se registró un 6% de micelios dematiáceos para la muestra original, un 5% para el 2do. muestreo y un 3% para el 3er. muestreo.

En los diámetros de 5 –6 μm solo se presentaron micelios dematiáceos en el 3er. muestreo y con baja frecuencia.

En todos los muestreos, desde la muestra original hasta el 3er. muestreo, fueron desde valores de 0 – 5 μm , a excepción del 3er. muestreo que se encontraron diámetros más grandes.

En todos los casos el mayor porcentaje se registró en el diámetro de 2 – 3 μm no siendo este porcentaje tan pronunciado en el 1er. muestreo.

A diferencia con lo ocurrido en las muestras de trigo, en este caso no se encontró un patrón en la distribución de diámetros hifales similar a lo registrado en la soja del campo. Los motivos a evaluar entre otros son: por un lado no se trata del mismo tipo de soja, en un caso es soja de 2da. y en el otro de primera y no tienen una historia de cultivos similares.

En cuanto a los valores hallados de biovolumen y biomasa, estos concuerdan y siguen el mismo ordenamiento que el realizado al analizar los metros de micelio, (Tabla 35).

muestras en macetas	biovolumen	
	trigo	soja
M.O.		0,389
1er. M.	0,129	0,191
2do. M.	0,183	0,564
3er. M.	0,241	0,317

muestras de campo	biovolumen		
	pastura	trigo	soja
	0,131	0,222	0,358

Tabla 36. Biovolumen de las distintas muestras, (mm³).

Según la Fig. 47, el 70% de los diámetros de trigo, soja y pastura se encuentra entre 1 – 2 μm .

En el intervalo de diámetro 0 – 1 μm , los valores de frecuencia son menores al 5% para los 3 cultivos. Solo en la pastura se registró la presencia de micelio dematiáceos con un valor cercano al 5%.

En el diámetro 1 – 2 μm en los 3 casos se presentó el mayor porcentaje de registros de diámetros, siendo distintas las proporciones de micelios dematiáceos y micelios moniliáceos.

En el trigo, los micelios dematiáceos estuvieron presentes en un 35%, en la soja alrededor de un 40% y un 50% en la pastura.

En el diámetro de 2 – 3 μm , se registraron valores cercanos al 30% para trigo, 10% para soja y menos de un 10% para pastura. En este intervalo el mayor porcentaje de micelios dematiáceos se observó en trigo con un 15% aproximadamente.

Solo en soja y en pastura se observaron micelios moniliáceos con un diámetro de 3 – 4 μm , con una mayor frecuencia para pastura (10%).

Los diámetros de micelios moniliáceos de 4 – 5 μm fueron exclusivos de soja y con muy baja frecuencia.

El patrón de distribución de diámetros hifales en el trigo se concentra entre 0 – 3 μm , entre 0 – 5 μm para soja y entre 0 – 4 μm para la pastura.

La mayor presencia de micelios dematiáceos (más de un 50%), se registró en la pastura, distribuidos entre los 0 – 3 μm ; mientras que para trigo y soja se concentró entre 1 – 3 μm .

A lo largo de los muestreos de trigo se mantuvo el patrón de distribución de diámetros hifales presente para la muestra de trigo en tiempo de cosecha en el campo. Fig. 48.

En el intervalo de 0 – 1 μm se registraron valores menores al 5% para el 1er. muestreo, y cercanos a 10% para el 2do. y 3er. muestreo.

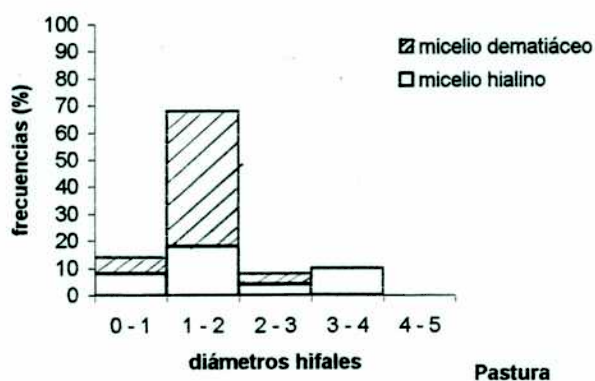
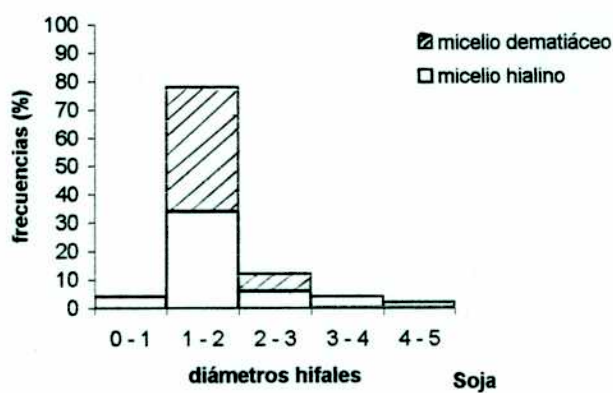
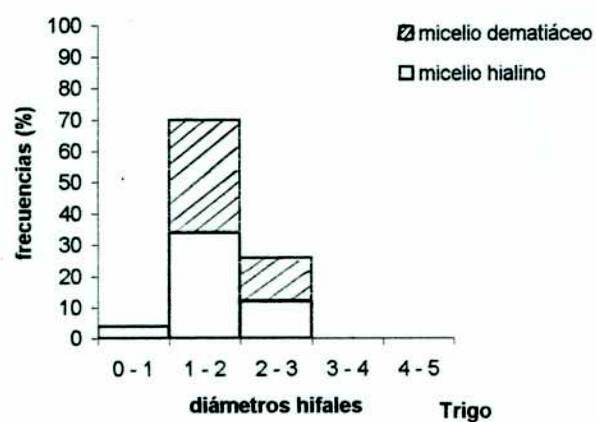


Fig. 47. Distribución en frecuencias de los distintos diámetros hifales para las muestras del campo.

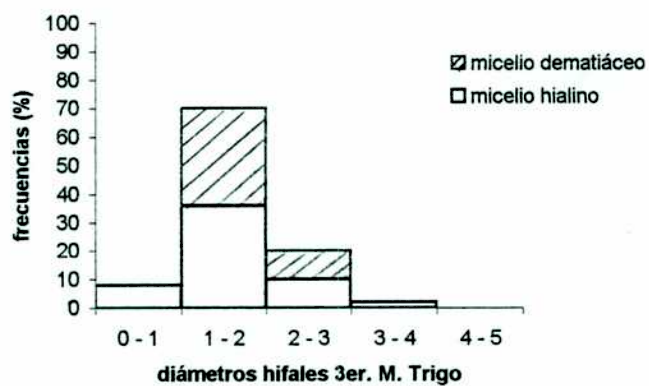
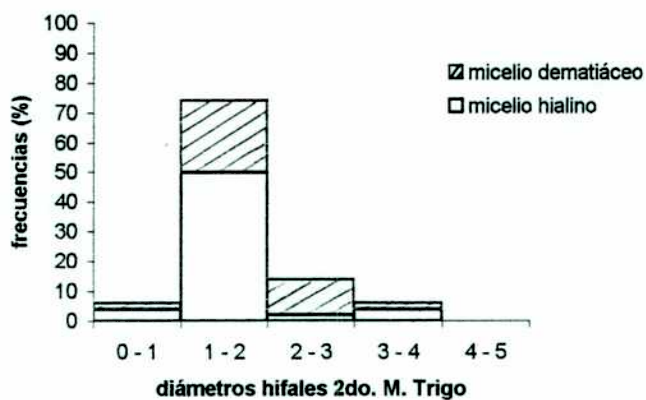
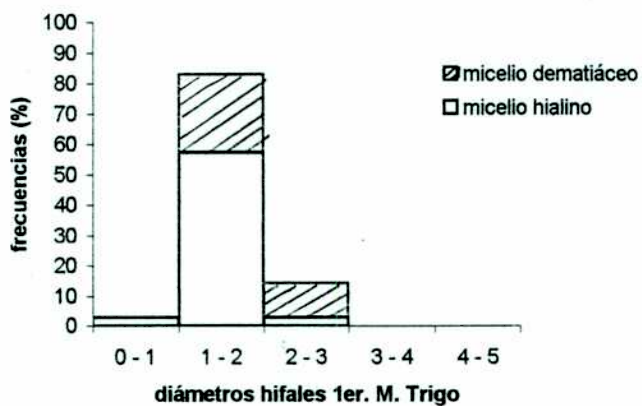


Fig. 48. Distribución en frecuencias de los distintos diámetros hiales para el cultivo de trigo.

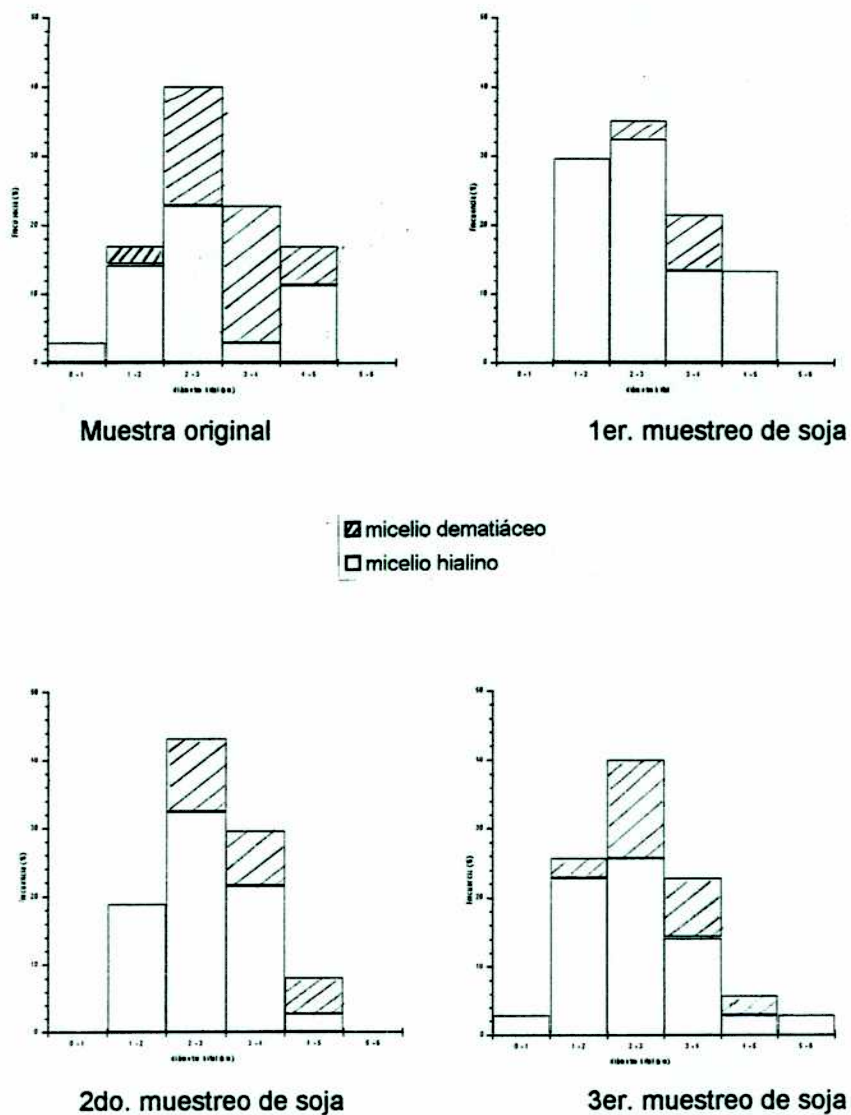


Fig. 49. Distribución en frecuencias de los distintos diámetros hifales para el cultivo de soja.

iii) Colonización de raíces

Materiales y métodos:

Las raíces de los muestreos de plántulas de trigo y de soja fueron conservadas en fijador de Bouin- Hollander hasta el momento de su uso. Luego fueron lavadas bajo el agua de canilla. Posteriormente se las colocó en hidróxido de potasio al 10% durante 48 horas a temperatura ambiente, después fueron lavadas tres veces con agua de canilla, a continuación se colocó ácido clorhídrico 0.1 N por espacio de tres minutos y se lo dejó durante 48 horas en azul de Trypan en ácido láctico, según la técnica descrita por Phillips & Hayman (1970) para la observación de micorizas vesículo-arbusculares.

Posteriormente fueron conservadas en frasquitos con ácido láctico, hasta su observación.

Para cada muestra se dispusieron sobre un portaobjetos trozos de raíz de aproximadamente 1 cm de longitud. Se hicieron sobre ellas 200 lecturas bajo el microscopio con un aumento de 200x. Se contabilizó para cada campo que porcentaje de raíz estaba colonizada por un micelio moniliáceo o dematiáceo tabicado o un micelio vsm con vesículas y arbusculos.

Resultados:

Al realizar un análisis sobre la colonización de las raíces por los hongos (Fig. 50), se encontró para las raíces de trigo al comienzo del muestreo (1er. muestreo), un 60 – 65 % de los 200 campos observados en los cuales no se observó micelio. Este porcentaje fue decreciendo (1 – 6%), en los cuales para cada campo, hubo entre un 10 a un 80% de la longitud de las raíces colonizadas.

Los trozos de raíces colonizadas en un 100%, tuvieron una frecuencia de un 10% de micelios moniliáceos y un 6% de micelios dematiáceos.

En el 2do. muestreo, un 22% de los trozos de raíces no tuvieron colonización fúngica. Se registraron valores entre 2 – 12% de campos con un 5 a 90% de la longitud de raíces colonizadas.

El 48% de los campos se colonizaron en un 100%, con un 43% de micelios moniliáceos y un 5% de VAM.

En el 3er. muestreo, se presentó el porcentaje más bajo de campos sin trozos de raíces colonizadas, hubo un 2% de raíces con un 40% de la longitud por campo colonizada. El mayor porcentaje de frecuencias con un 60% de cada campo colonizado fue de un 10% para los micelios moniliáceos y un 4% para VAM. La mayor presencia de VAM (10%) estuvo en los campos colonizados en un 100%.

En el 1er. y 2do. muestreo de soja se encontró un 38% y 48% respectivamente de trozos de raíces por campo en los que no se observó ningún tipo de colonización. Fig.51.

La colonización de las raíces representada por hifas y expresada en porcentaje por campo fue muy baja en todos los muestreos.

Se encontró micelio de imperfectos en el 3er. muestreo con muy baja frecuencia, colonizando un 60% a 80% de las raíces por campo.

De las raíces colonizadas en un 100% por campo, para el 1er. muestreo el 54% correspondió a la presencia de arbusculos y un 3% a vesículas y arbusculos.

En el 2do. muestreo, los trozos colonizados en un 100% por campo, un 24% correspondió a la presencia de hifas, un 17% a arbusculos y un 8% a hifas, vesículas y arbusculos viejos.

En el 3er. muestreo, en el 96% de los trozos colonizados completamente se presentaron vesículas y cercano al 1% estuvieron presentes las hifas de imperfectos.

A través de los muestreos de soja, se observó un progresivo cambio de arbusculos a vesículas hacia el final del ciclo del cultivo.

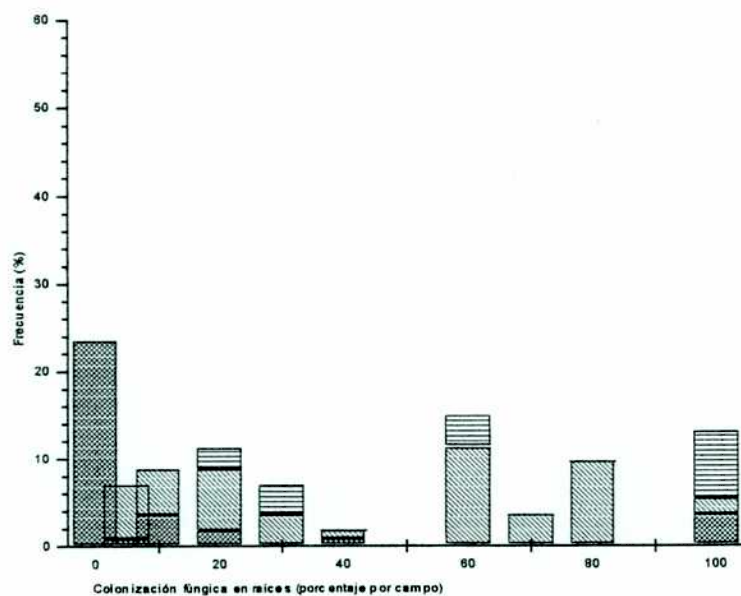
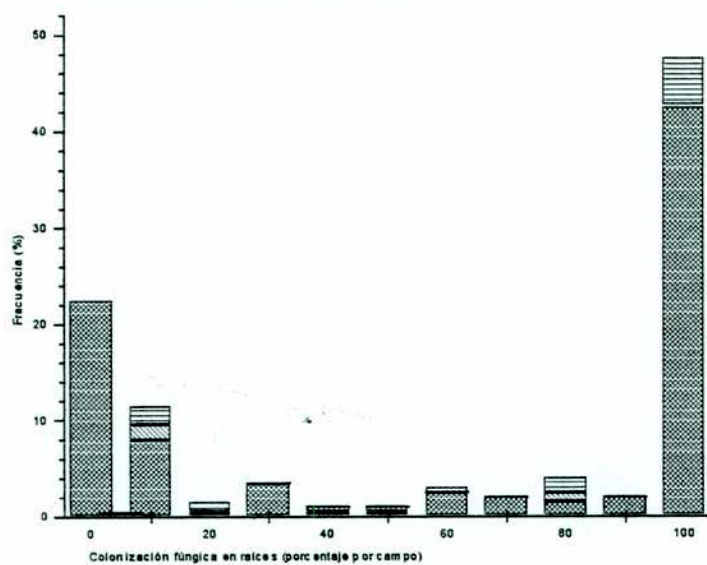
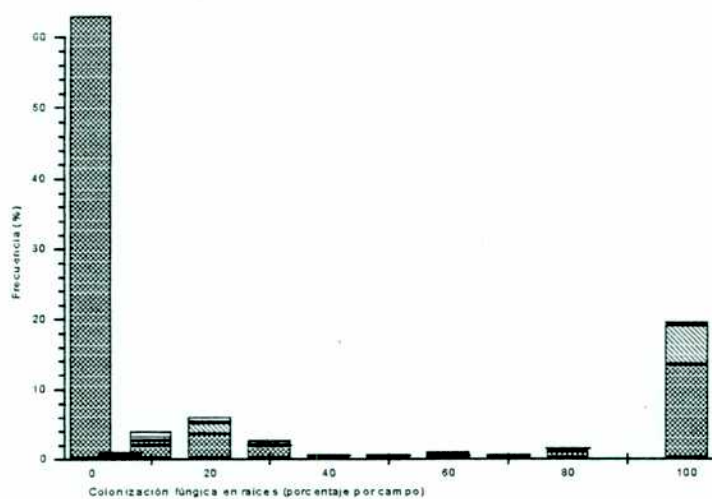


Fig. 50. Porcentaje de la colonización fúngica en raíces de trigo (por campo).

■ micelio hialino. ▨ micelio dematiáceo. ▩ micelio MA.

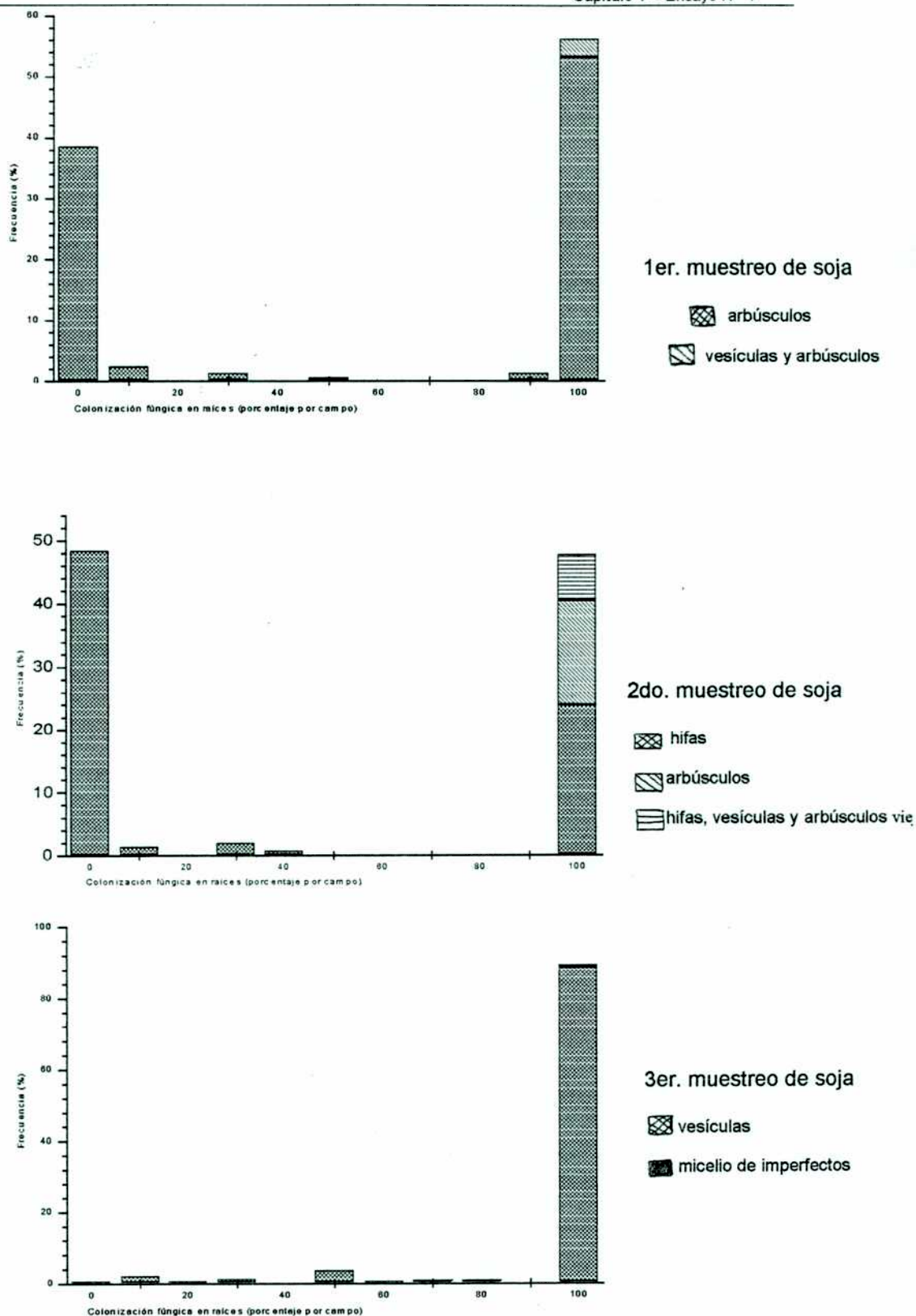


Fig. 51. Porcentaje de la colonización fúngica en raíces de soja (por campo).

Discusión
Ensayo Nº 4

Discusión Ensayo N° 4:

Schnürer et al., (1985) encontraron en suelos arables, que muchas de las hifas observadas están melanizadas y sólo el 15% corresponden a hifas hialinas. En otras investigaciones el porcentaje de estas, fue: 12—16% (Söderström, 1979), 7-32% (Hunt & Fogel, 1983), 34-60% (Hurst & Wagner, 1969). La alta proporción de hifas melanizadas está asociada al bajo nivel de descomposición de estas estructuras (Hurst & Wagner, 1969). Este estudio muestra menores proporciones de hifas dematiáceas, debido a que en el ambiente muestreado la descomposición es mayor, dado que las condiciones ambientales favorecen el proceso de degradación de las hifas.

La media del diámetro hifal encontrado en el estudio de Schnürer et al es de alrededor de 2.4 μm . Bääth & Söderström (1979) encontraron diámetros de 1.7-3.0 μm correlacionado positivamente con la cantidad de materia orgánica. Hunt & Fogel 1983 hallaron diámetros hifales medios de 3.0 μm en los horizontes superiores y 2.7 μm en los horizontes inferiores. Los diámetros hifales medios no son diferentes en suelos arables y en suelos de bosques (Dix & Webster, 1995) .

Los resultados del experimento del muestreo a campo de pradera, trigo y soja muestra un perfil de diámetros con valores máximos en el entorno de 1-2 μm , este valor se mantiene en el experimento de macetas con trigo. En cambio, al usar el suelo de pradera y sembrarlo con soja los diámetros aumentan. Este aumento puede deberse a que en la maceta la cantidad de compuestos nitrogenados provistos por la soja no son arrastrados del sistema, aumentando el efecto de la rizosfera, lo que crea un ambiente propicio para el desarrollo de los micelios de mayor diámetro.

El largo total del micelio decrece con la profundidad del suelo (Schnürer et al., 1985, Bääth & Söderström, 1979; Hunt & Fogel, 1983; Persson et al., 1980). Este es el resultado de la disminución de la materia orgánica y de sustratos carbonados disponibles. Los diámetros medios disminuyen con el contenido de materia orgánica. Las hifas finas dominan en los suelos con poca materia orgánica mientras que en

suelos con agregado de paja y N, el 66% de los diámetros superan los $2\mu\text{m}$ (Schnürer et al., 1985).

Bääth & Söderström (1979) determinaron el diámetro hifal de los horizontes de siete suelos de bosque, encontrando variaciones. Las hifas más finas corresponden a los de los horizontes minerales ($1.3\mu\text{m}$) mientras que en los suelos con más materia orgánica alcanza a $3\mu\text{m}$.

Esta correlación entre tamaño celular y la cantidad de materia orgánica ha sido vista en otros sistemas (Clarholm & Rosswall, 1980). Las células pequeñas tienen una relación superficie volumen que permite un mayor contacto con el medio que las rodea haciéndolas más efectivas en la absorción de nutrientes.

El largo total de las hifas es de aproximadamente la misma magnitud, en todos los suelo arables (Bääth & Söderström, 1980; Domsch et al., 1979; Paul & Johnson, 1977) y las hifas activas se encuentran en mayor proporción en suelos con alta cantidad de materia orgánica.

La cantidad de hifas activas es de alrededor del 2% del total, estos datos coinciden con los de Söderström (1979). Elmholt & Kjøller (1987) encontraron que el suelo de bosque contiene varios centenares de metros por gramo de suelo. En nuestro experimento los valores obtenidos son menores variando entre 60 y 153 metros y corresponde a una biomasa de 0.197 a 0.537 mg / g suelo seco, valores mucho mayores a los encontrados por Elmholt & Kjøller (1987) (0.02-0.1%), ya que ellos encontraron micelio mucho más delgado. Estas hifas tienen un papel importante en el agregado de partículas y el mantenimiento de la estructura del suelo (Lynch & Bragg, 1985).

En nuestro experimento los valores de micelio varían a lo largo del ciclo de la planta. En el trigo aumenta al final del ciclo en cambio en la soja es mayor en el momento de la floración. Estas diferencias pueden deberse a diferencias en la cantidad y calidad de los exudados de las raíces.

Los datos de tinción de raíces muestran que los micelio tabicados correspondientes a los hongos saprobios del suelo invaden las raíces tan pronto éstas ingresan al suelo, en cambio los micelios de los organismos simbióticos tienen

una fase pre-infectiva más larga. Esta situación se ve claramente en las raíces de trigo y también en las de soja alcanzando esta mayor colonización. Peterson (1958), encontró que los micelios oscuros estériles eran importantes en la superficie de las raíces en los primeros 30 días de crecimiento de las plantas y a los 90 días pasaba a ser importante en el suelo no rizosférico debido a que las raíces estaban ya en estado de descomposición. Estos micelios no micorríticos, están presentes en la superficie de las raíces, de los cereales y de los pastos, no conociéndose hasta ahora su función (Dix & Webster, 1995).

Capítulo 2
Estudio de exudados radiculares

ENSAYO N°1: CULTIVO DE PLÁNTULAS DE TRIGO EN MACETAS EN EL CAMPO EXPERIMENTAL DE CIUDAD UNIVERSITARIA

OBJETIVO: Obtención y análisis de exudados radiculares de plántulas de trigo crecidas en macetas con una mezcla de cuarzo y vermiculita en el campo.

a) Obtención de extractos

Materiales y métodos:

La variedad de semillas de trigo usadas fue *Triticum aestivum* variedad Prointa Federal con 85% de poder germinativo.

Se prepararon 17 macetas con una mezcla de cuarzo-vermiculita (1:2). El cuarzo se lavó previamente bajo el agua de la canilla y tuvo un último enjuague con agua destilada. Posteriormente, la mezcla preparada se colocó en bolsas de lienzo y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 1,5 atm. Las semillas de trigo se sembraron en las macetas en setiembre de 1992.

Se sembraron entre 5 y 6 semillas por maceta, las que se regaron quincenalmente con una solución nutritiva Hewitt (ver Anexo) y alternativamente con agua de la canilla. A los 10 días desde la siembra, las plántulas tuvieron un primer raleo, dejando en una segunda etapa de raleo sólo una plántula por maceta.

Luego de 40 días de desarrollo de las plántulas, 50 de estas plántulas se removieron. Se les midió los siguientes parámetros: longitud de la parte aérea, y se calculó el porcentaje de humedad del vástago y de la raíz (por triplicado).

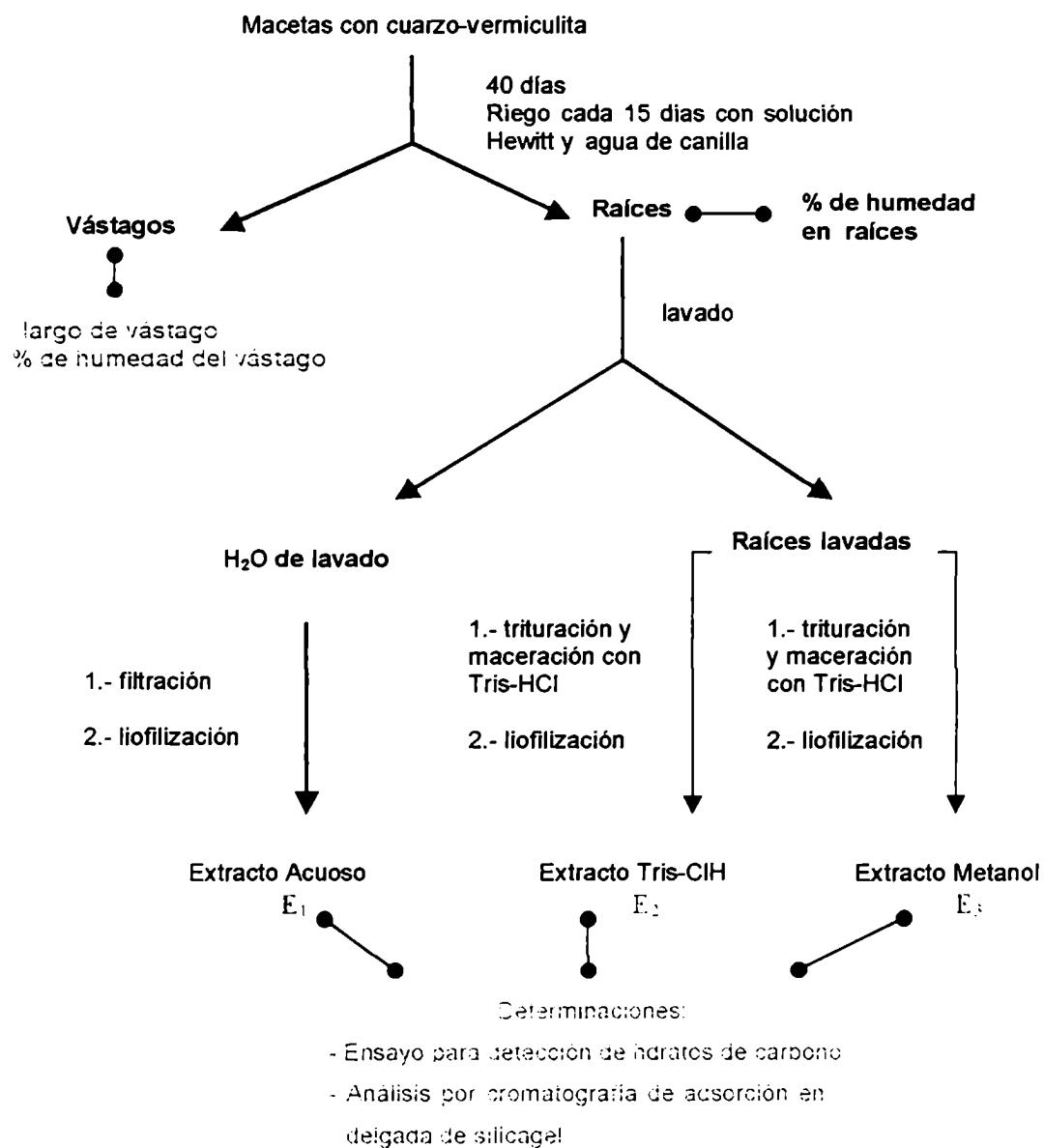


Fig. 52. Obtención de extractos a partir de raíces y agua de lavado de raíces de plántulas de trigo. Ensayos realizados.

Se obtuvieron los siguientes extractos a partir de las raíces de dichas plántulas:

1) Las raíces se enjuagaron en un vaso de precipitado. El agua de lavado con los restos de vermiculita se filtró haciendo vacío con un embudo con papel de filtro. Luego el filtrado resultante se liofilizó. Extracto acuoso (E₁)

El extracto acuoso (E₁) luego de la liofilización se colocó en el rotavapor y se redisolvió en 3 ml de agua destilada.

2) Las raíces enjuagadas se guardaron en cajas de Petri con papel de filtro. Se utilizaron solamente los extremos de las raíces. De las raíces finas y gruesas se cortaron trozos de aproximadamente 2cm del extremo de las mismas.

i) Se pesó 1 gramo de estas raíces y se colocaron en un mortero junto con cuarzo y buffer Tris-ClH 0,1M de pH 7, triturando la muestra hasta obtener una consistencia cremosa.

Un total de 5 ml de esta mezcla fueron centrifugados durante 20 minutos a 10000 rpm. El sobrenadante obtenido se colocó en un erlenmeyer en hielo. Se hicieron dos extracciones más, teniendo finalmente un sobrenadante en Tris-ClH de 15 ml. Extracto Tris- ClH (E₂)

Este sobrenadante obtenido se filtró con papel de filtro Whatman N° 2, se llevó a seco con rotavapor a 40°C. El concentrado se redisolvió en 3 ml de agua destilada.

ii) Otra fracción de 1 gramo de extremos de raíces fue triturado en un mortero con cuarzo y con 1ml de metanol 100% y 5 ml de metanol 70%. Luego la muestra fue sonicada durante 10 minutos y centrifugada durante 20 minutos a 10000 rpm. El precipitado fue redisolto 2 veces más con metanol 70%; obteniendo un sobrenadante en 15 ml de metanol. Extracto Metanol (E₃).

El extracto metanólico (E_3) se filtró con papel de filtro Whatman N° 2 y se llevó a seco con rotavapor a 40°C. El liofilizado se redisolvió con metanol-agua (1:1) hasta un volumen final de 3,8 ml.

Las tres extractos obtenidos (E_1 , E_2 y E_3) se colocaron en tubos Eppendorfs de 1,5 ml y se concentraron en un evaporador de fracciones rotatorio (Savant).

a) Análisis de los extractos

Materiales y Métodos:

i) Detección de hidratos de carbono mediante el ensayo con Difenilamina-anilina:

Se sembró sobre papel de filtro el extracto E_1 . Luego se sembró en el mismo punto el reactivo de difenilamina-anilina y se calentó el papel en estufa a 60°C durante 6-7 minutos.

ii) Detección de aminoácidos:

Se realizó una cromatografía de adsorción en placa delgada (TLC) utilizando una placa de silicagel, 60 Å (0,25 mm de espesor) sobre soporte de aluminio con indicador de fluorescencia (Merck, PF 254). Para el desarrollo se utilizó la técnica ascendente y como solvente, cloroformo-metanol-acetona-agua (25:50:10:3,5), apropiado para la resolución de aminoácidos.

Las muestras E_1 y E_2 se redisolvieron en 50 μ l de agua. La muestra E_3 se disolvió en 50 μ l de metanol-agua (1:1). Se sembraron en la placa 25 μ l de: Tris-ClH, E_1 , E_2 , E_3 y como testigos los siguientes aminoácidos: prolina, glutamina, serina, treonina, valina, tirosina, alanina, leucina, lisina, fenilalanina, tryptofano y cisteína. Se desarrolló la cromatografía durante 2 horas y luego se visualizaron las manchas

por iluminación con luz ultravioleta de 254 nm. Luego se pulverizó la placa con una solución de ninhidrina (hidrato de tricetohidrindeno) 0,25% p/v en acetona y se calentó a 105-110°C durante 10 minutos. Este reactivo es específico para aminocompuestos, los que dan coloración púrpura.

Resultados:

En el primer muestreo de las plántulas en maceta creciendo en cuarzo-vermiculita se registraron valores de $22,86 \text{ cm} \pm 4,04$ de largo para la parte aérea en un estadio de 5 hojas y una humedad del $74,92\% \pm 6,07$ para el vástago y $44,81\% \pm 5,96$ para las raíces.

i) Ensayo de Difenilamina-anilina:

Se desarrolló una mancha en color verde azulado, característico de aldohexosas.

ii) Placa en capa delgada para detección de aminoácidos:

Se observó una fluorescencia intensa en los puntos de siembra de E₁, E₂ y E₃. En los E₂ y E₃ se observaron una gran cantidad de manchas indefinidas. En el E₁ se observaron dos manchas principales con distinta movilidad.

El revelado con ninhidrina mostró, para E₃ (extracto metanólico) un continuo en donde no se llegan a resolver manchas pero la coloración es característica de compuestos aminados. El extracto en buffer Tris-HCl (E₂), no contiene aminoácidos, revela con fluorescencia amarilla igual que la solución del buffer Tris-HCl.

En el extracto E₁ (agua de lavado de las raíces) se distinguen 2 componentes principales (R_f= 0,12 y R_f= 0,24) y un componente en menor proporción (R_f= 0,41).

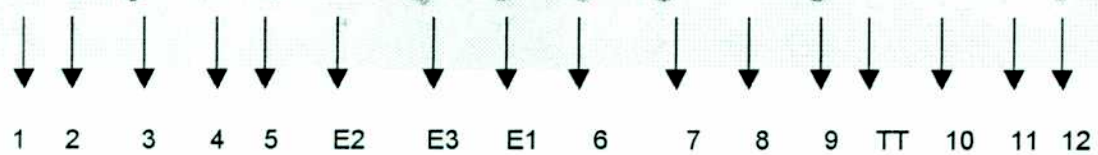


Fig. 53. Cromatografía de adsorción en placa delgada de sílicagel para identificación de aminoácidos en E₁, E₂ y E₃.

Testigos de aminoácidos: 1. prolina, 2. glutamina, 3. serina, 4.- treonina, 5.- valina, 6.- tirosina, 7.- alanina, 8.- leucina, 9.- lisina, 10.- fenilalanina, 11.- tryptofano, 12.- cisteína. Blanco (TT): buffer Tris-HCl. El solvente utilizado fue: cloroformo-metanol-acetona-agua (25:50:10:3,5). Revelado con ninhidrina al 5% en acetona.

El componente de $R_f = 0,12$ presenta la misma movilidad que el aminoácido serina. El componente minoritario tiene una movilidad similar al aminoácido leucina.

Debido a los resultados obtenidos, se diseña una experiencia de cultivo de plántulas de trigo creciendo en un medio nutritivo mineral y en condiciones controladas y de esterilidad. Con este diseño se espera recuperar los exudados en forma pura y sencilla.

Ensayo N° 2: CULTIVO DE PLÁNTULAS DE TRIGO BAJO CONDICIONES CONTROLADAS DE LUZ Y TEMPERATURA.

A) En erlenmeyers con solución nutritiva mineral

Materiales y métodos:

Se utilizó un aparato de cultivo según el utilizado por Prykryl & Vancura (1980), (Figura N° 5) conteniendo una solución nutritiva mineral (ver Anexo).

Las semillas de trigo utilizadas pertenecientes a *Triticum aestivum* var. Prointa Federal, con un poder germinativo del 85%, fueron esterilizadas con alcohol-agua (1:1) durante 1' 30", lavandina-agua (1:1) + Tween 80 (5 gotas) 1' 30" y finalmente alcohol-agua (1:1) 1' 30". Luego se enjuagaron con varios pasajes por agua destilada estéril.

Posteriormente las semillas esterilizadas se pasaron a cajas de Petri con medio agar-malta durante 48 horas para el testeo de contaminación de las mismas.

Los erlenmeyers con 50 ml de solución nutritiva mineral fueron esterilizados en autoclave durante 15 minutos a 1,5 atm. Luego, un promedio de 3 semillas fueron colocadas en cada uno de los mismos y fueron mantenidos en una cámara de cultivo a una temperatura de 26-27°C con períodos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, por espacio de 17 días.

La solución contenida en dos erlenmeyers fue testeada para contaminación, sembrando 1 ml de dicha solución en cajas de Petri con medio agar-malta. Esta prueba fue realizada por triplicado.

Luego el contenido de estos erlenmeyers fue llevado a seco con un rotavapor a 40° C y fue tomado luego con 5 ml de agua destilada.

La muestra se centrifugó obteniendo un sobrenadante (S) y un precipitado (P).

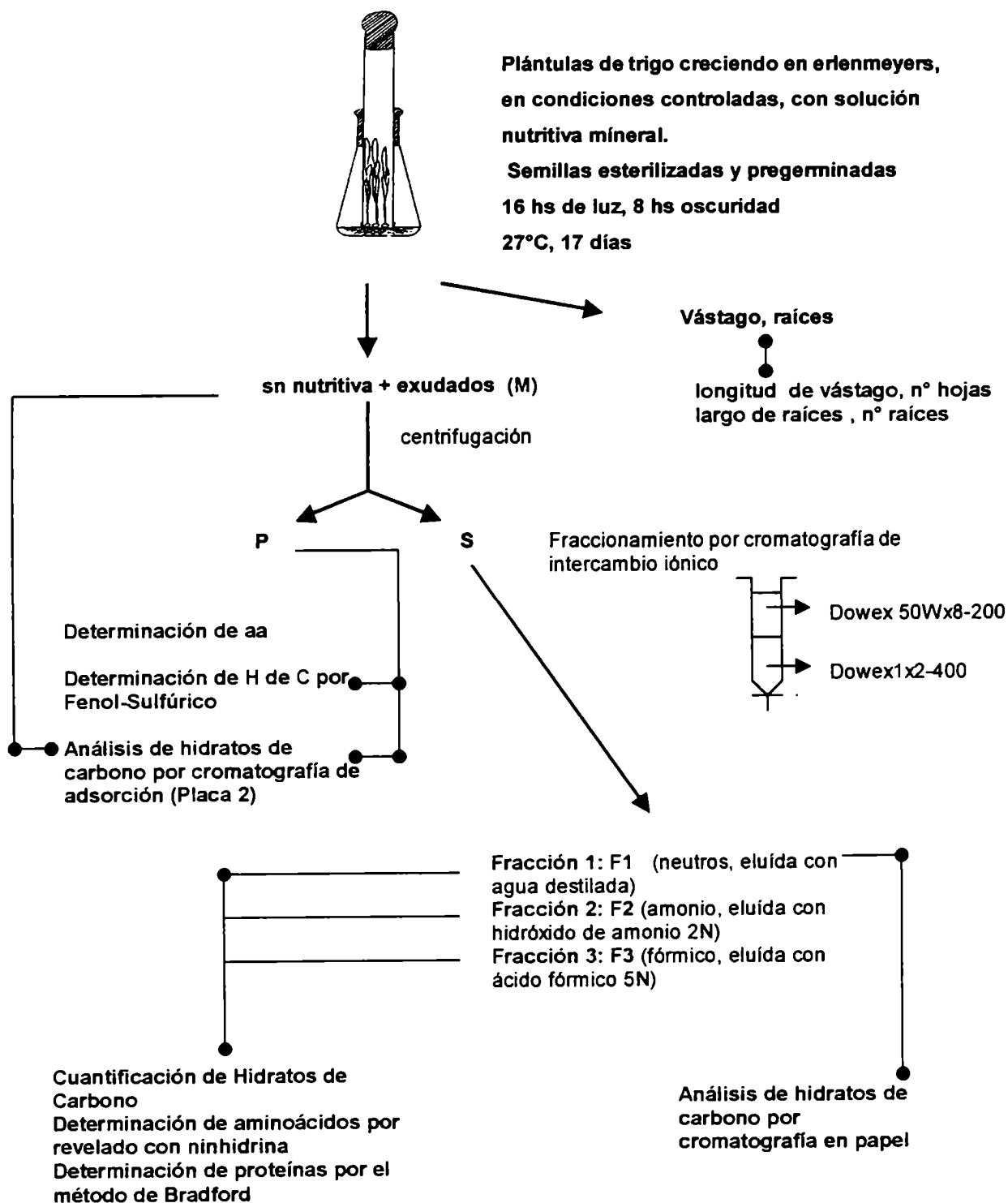


Fig. 54. Ensayos realizados sobre las muestras de exudados obtenidas por crecimiento de plántulas de trigo en erlenmeyers.

Por otra parte se tomaron sobre las plántulas cosechadas, los siguientes parámetros: el largo de vástago, n° de hojas, n° de raíces y largo de raíces.

i) Determinación cuantitativa de hidratos de carbono solubles

Sobre la fracción P se realizó una cuantificación de hidratos de carbono utilizando el método colorimétrico de fenol-ácido sulfúrico, según la técnica descrita por Dubois et al. (1956). Se mezcló 0,5 ml de una solución que contenía entre 5 y 35 μgr de azúcar con 0,5 ml de fenol al 5% (p/v); los blancos se prepararon con 0,5 ml de agua destilada. Luego de agitar se agregaron 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado, desde una bureta de buen flujo y se dejó reposar 10 minutos. Se agitaron los tubos nuevamente y se dejaron 20 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 490 nm, determinándose la cantidad de azúcar en las muestras por referencia a una curva patrón preparada simultáneamente (solución patrón de glucosa, 1mg/ml). Prácticamente todos los azúcares, incluyendo sus derivados, oligo- y polisacáridos, pueden determinarse con esta técnica. Entre los no evaluables cabe mencionar a las hexosaminas y los inosítoles. El error del método es de $\pm 2\%$.

ii) Cromatografía de intercambio iónico sobre la fracción S.

Se armó una columna conteniendo en la parte inferior una resina aniónica Dowex 1X2-400, en forma OH^- (6 cm) y en la parte superior una resina catiónica Dowex 50WX8-200, en forma H^+ (6 cm).

La muestra se disolvió en 2 ml de agua y se sembró en la columna. Se eluyó primero con 15 ml de agua destilada para obtener la fracción de compuestos neutros, luego se eluyó con 15 ml de hidróxido de amonio 2N para la obtención de aminoácidos básicos y finalmente con 15 ml de ácido fórmico para la obtención de aminoazúcares y aminoácidos ácidos.

Las tres fracciones obtenidas fueron concentradas en rotavapor a 40°C y presión reducida.

a) Se realizó una cuantificación de hidratos de carbono por el método de cromatografía de intercambio iónico de las fracciones de agua (F_1), amonio (F_2) y fórmico (F_3).

b) Cromatografía en papel para la fracción 1 (F_1)

La fracción 1, correspondiente a azúcares neutros, se redisolvió en 500 μ l de agua destilada.

Se realizó una cromatografía de partición sobre papel utilizando la técnica descendente y sembrando como testigos: arabinosa, glucosa, m_2 y m_3 (maltooligosacáridos de 2 y 3 unidades de glucosa). Se sembraron 30 μ l de la fracción F_1 . Se utilizó como fase móvil butanol-piridina-agua (6:4:3). La visualización de las manchas se realizó utilizando como revelador nitrato de plata en hidróxido de sodio. El límite de detección del método es de 2 – 20 μ gr.

iii) Las fracciones eluidas de hidróxido de amonio (F_2) y de ácido fórmico (F_3) fueron sembradas en una placa de sílicagel para hacer un ensayo a la gota de detección de aminoácidos. Se sembraron 40 μ l de F_2 , 20 μ l de F_3 , y como testigos soluciones de glucosamina y de prolina.

La visualización de las manchas se realizó utilizando ninhidrina (pág. N° 3, ensayo N° 1).

iii) Se repitió con la réplica (M) una cromatografía de adsorción de azúcares en placa de sílicagel, sembrando 30 μ l de la muestra y utilizando como testigos soluciones de m_2 y m_3 (maltooligosacáridos de 2 y 3 unidades) y

glucosa. Se empleó como fase móvil *n*-propanol-etanol-agua (7:1:2). Se reveló con vapores de yodo. Se realizó un 2do. desarrollo de la misma placa en el mismo solvente y se reveló con sulfato cérico.

v) Con el sobrenadante (S) y el precipitado (P) de esta réplica se hace nuevamente un ensayo a la gota con ninhidrina, sembrando como patrón glucosamina y 20 μ l del sobrenadante (S) y 10 μ l del precipitado (P) disuelto en agua sobre una placa de sílica. Se pulverizó con una solución de ninhidrina, de acuerdo a lo descrito en el Ensayo N° 1, punto ii).

vi) Se preparó una placa de celulosa sembrando glutamina, prolina y 20 μ l del precipitado de la muestra. Se desarrolló con *n*-butanol-acético-agua (5:4:1) como solvente. Se visualizaron las manchas con ninhidrina (Ensayo N° 1 punto ii).

vii) De la réplica del ensayo de obtención de fracciones (F1, F2, F3) por cromatografía de intercambio iónico, se realizó un dosaje de proteínas según el método de Bradford (1976). Se prepararon para la curva de calibración tubos que contenían desde 0,0125 hasta 0,050 mg de proteínas. Se llevaron a 0,02 ml con agua destilada. El blanco se hizo con 200 μ l de agua destilada. Se agregó luego a cada tubo 3 ml del reactivo. De las muestras (sobrenadante (S), precipitado (P), y de las tres fracciones (F₁, F₂ y F₃) eluidas se colocaron 100 μ l, 60 μ l, 200 μ l, 200 μ l y 80 μ l respectivamente, con 3 ml del reactivo. Se midió absorbancia a 590 nm, luego de 2 minutos y antes de 1 hora.

Esta experiencia en el punto i) y ii) fue repetida en dos oportunidades.

Resultados:

En esta experiencia llevada a cabo en los erlenmeyers la longitud promedio alcanzada por los vástagos fue de 23,97 cm \pm 1,59, en un estadio de 3 hojas y un largo total de las raíces de 12,44 cm \pm 2,65 con un número de 5 raíces.

i) y ii) a) Determinación cuantitativa de hidratos de carbono solubles en las distintas muestras.

La curva de regresión obtenida a partir de los valores de absorbancia registrados, fueron:

$y = 0,01723 x$ para la muestra del precipitado $r^2 = 0,96$

$y = 0,01646 x$ para las fracciones $r^2 = 0,99$

Muestra	Valores promedio
Precipitado (P)	0,13 mg / ml
F ₁ (neutros)	0,315 mg / ml
F ₂ (amonio)	0,037 mg / ml
F ₃ (fórmico)	0,46 mg / ml

ii) b) Determinación de Hidratos de Carbono por cromatografía en papel para F₁.

En la cromatografía en papel desarrollada para F₁ (fracción de compuestos neutros) no se detectó ninguna mancha al revelar con nitrato de plata en hidróxido de sodio. El límite de detección del método es de 2 – 20 μ gr.

iii) Determinación de aminoácidos por ensayo a la gota sobre las fracciones F₂ y F₃.

Los compuestos aminados revelados con ninhidrina presentan una coloración purpúrea.

En F₃ se observó un halo color bordó claro, semejante al encontrado en el testigo de glucosamina. El aminoácido prolina dio una mancha amarilla y F₂ presentó un halo levemente rosado.

Este resultado indicó la presencia de aminoácidos básicos y ácidos en las fracciones F₂ y F₃.

iv) Detección de azúcares en una placa de sílicagel, para la muestra M.(F)

Se detectó la presencia de 5 componentes principales en M.

Con movilidad similar a glucosa (m₁) se observaron 2 manchas que no se resolvían totalmente. Un componente con movilidad similar a m₂ y 2 componentes minoritarios: 1 de movilidad intermedia a m₂ y m₃ y otro similar a m₃.

v) Detección de aminoácidos en una placa para la muestra S y P

En el revelado con ninhidrina, en esta placa el sobrenadante (S) dio un halo rosa, el precipitado (P) un halo de color lila y el testigo de glutamina color bordó, indicando la presencia de compuestos aminados.

Detección de aminoácidos en placa de celulosa en la muestra P

No se revelaron manchas, por lo tanto, no se confirmó la presencia de aminoácidos en este ensayo. Probablemente se dispersan entre P y las fracciones F₁, F₂ y F₃ y no se detectan al desarrollar la cromatografía.

vii) Determinación de proteínas por el método de Bradford en F₁, F₂, F₃ y P.

En la cuantificación de proteínas se registraron valores similares de aproximadamente 0,1 mg/ml para P y F₃. Para F₁ y F₂ se determinó ausencia de proteínas.

Para el cálculo del contenido de proteínas se utilizó la siguiente recta de regresión:

$$y = 0,0090 x \quad r^2 = 0,93$$

Muestra	
Precipitado	0,117 mg / ml
F ₁ (neutros)	0 mg / ml
F ₂ (amonio)	0 mg / ml
F ₃ (fórmico)	0,103 mg / ml

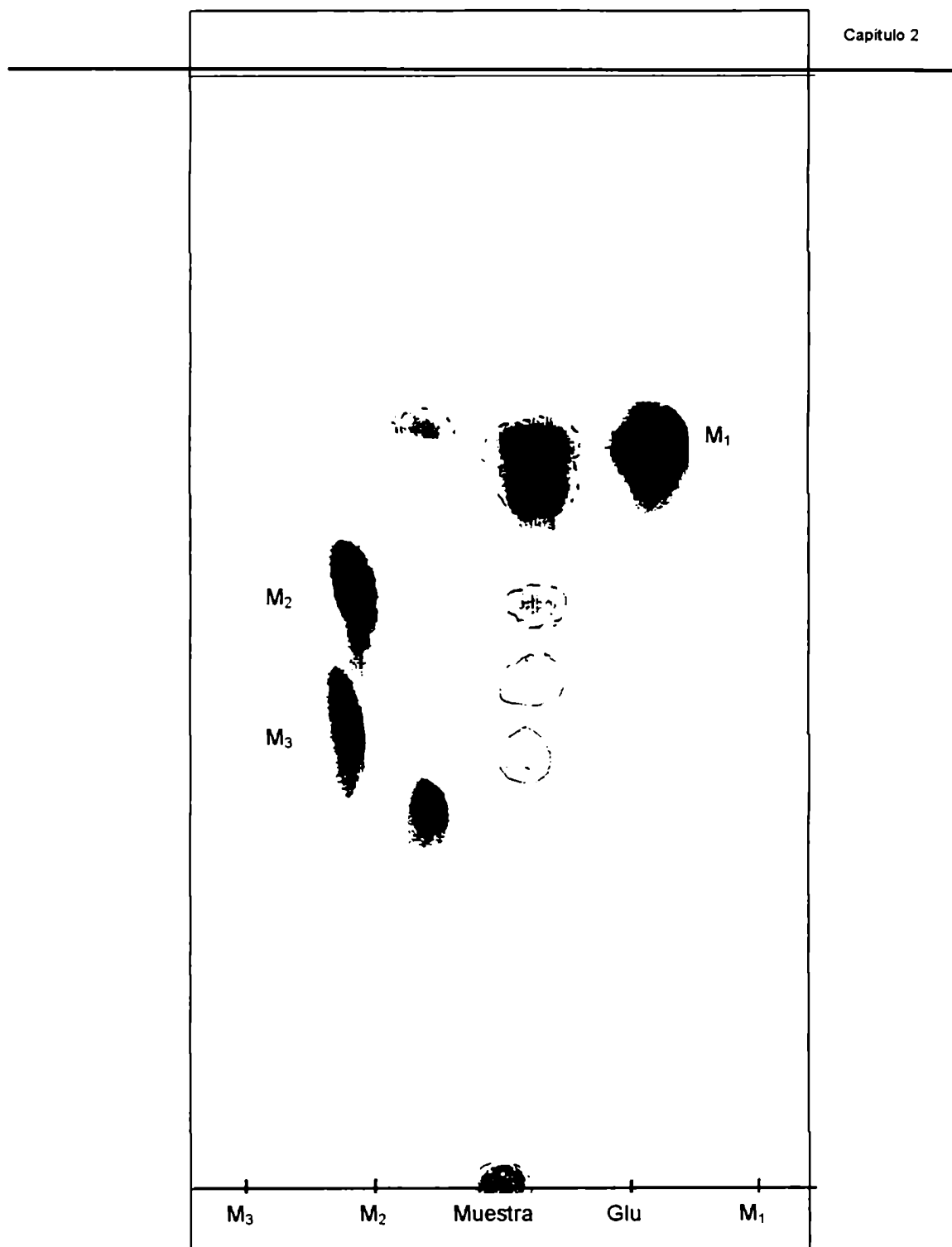


Fig. 55. Cromatograma sobre la muestra M. Testigos de azúcares: m₁: glucosa, m₂, m₃ ("maltooligosacáridos de 2 y 3 unidades de glucosa). Solvente utilizado: n-butanol-acético-agua (5:4:1). Revalado con ninhidrina al 5% en acetona.

2) Determinación de hidratos de carbono, proteínas, flavonoides y fósforo inorgánico en los exudados.

Se midió la cantidad de azúcares y proteínas en todos los muestreos, cada tres días desde la fecha de comienzo de la experiencia, teniendo un total de 4 muestreos para cada cultivo. Esta experiencia se realizó por cuadruplicado.

Tanto para la cuantificación de azúcares como de proteínas se prepararon soluciones de 1mg de exudados / ml de agua destilada a partir de las muestras liofilizadas.

Para la determinación del contenido de fósforo inorgánico y de flavonoides se trabajó con la muestra de 12 días de cultivo de las plántulas (último muestreo).

i.- Determinación cuantitativa de hidratos de carbono.

Materiales y métodos:

Según la técnica de Dubois et al. (1956), descripta anteriormente.

Resultados:

En la **Figura N°7a** se observa la recta de regresión obtenida al realizar la curva de calibración con diluciones adecuadas de una solución patrón de glucosa (1mg/ml).

El gráfico (**Figura N°7,b**) muestra la variación en el contenido de hidratos de carbono en las muestras de exudados de trigo y de soja durante los 12 días de cultivo. En el caso de los exudados de soja se observó un contenido de aproximadamente 10 μg de azúcares (a los 3 días) que disminuyó lentamente durante el resto del tiempo de la experiencia. En los exudados de trigo, la curva presentó un contenido de hidratos de carbono de aproximadamente 25 μgr / mg de

peso seco de raíz (a los 3 días), una depresión a los 6 días de cultivo, alcanzando luego un valor máximo a los 9 días cercano a los 150 μ gr.

Estos mismos perfiles se obtuvieron en las réplicas.

ii.- Determinación cuantitativa de proteínas.

Materiales y métodos:

El contenido proteico se estimó por el método de Lowry et al. (1957), basado en la reacción de la proteína con cobre en medio alcalino y la posterior reducción del reactivo fosfomolibdato-fosfotungstato producida por los residuos tirosina y triptofano presentes en la proteína tratada.

Reactivos: a) solución alcalina de cobre: se prepararon dos soluciones: 1) carbonato de sodio 2% en hidróxido de sodio 0,1 N; 2) sulfato de cobre pentahidratado al 1% y tartrato de sodio y potasio al 2%. La solución alcalina de cobre se preparó en el momento mezclando 10 ml de 1) con 0,1 ml de 2) y 3). Esta solución es estable durante 24 horas.

b) Reactivo de Folin Ciocalteu: este reactivo se prepara por calentamiento a reflujo durante 10 horas de una mezcla de 100 g de tungstato de sodio y 25 g de molibdato de sodio disueltos en 50 ml de ácido fosfórico 85%, 100 ml de ácido clorhídrico (c) y 700 ml de agua. Se agregan luego 150 g de sulfato de litio, 50 ml de agua y unas gotas de bromo; se hierve 15 minutos, se enfría y se lleva a un litro. En las experiencias realizadas se utilizó el reactivo comercial (Merck).

Se agregaron 2 ml de solución alcalina de cobre a 0,4 ml de muestras que contenían entre 60 y 300 μ g de proteína. Se mezcló, se dejó en reposo 10 minutos a temperatura ambiente, se agregó 0,2 ml del reactivo de Folin Ciocalteu y se volvió a

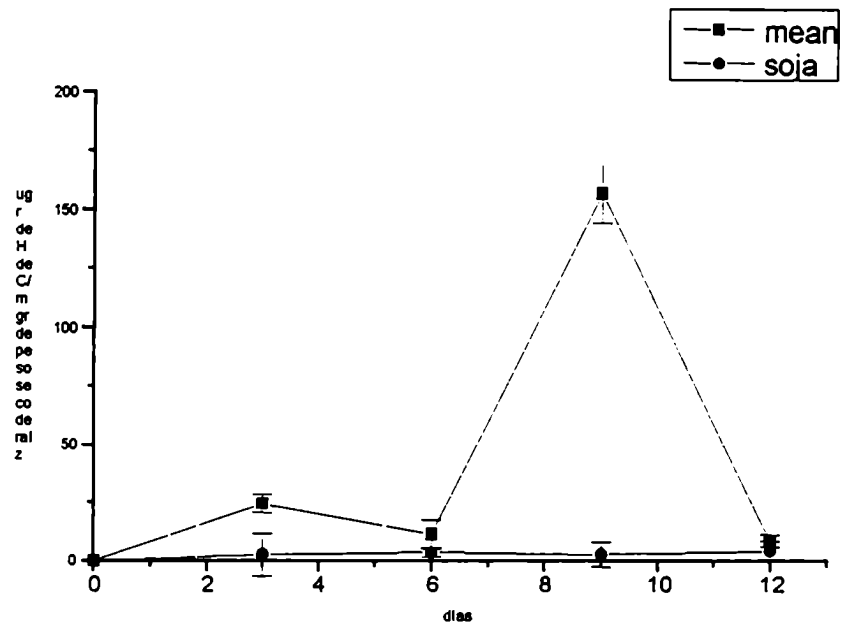


Fig. 57. Curva de hidratos de carbono para soja y trigo.
 $Y = 0,0573x$; $r^2 = 0,93$

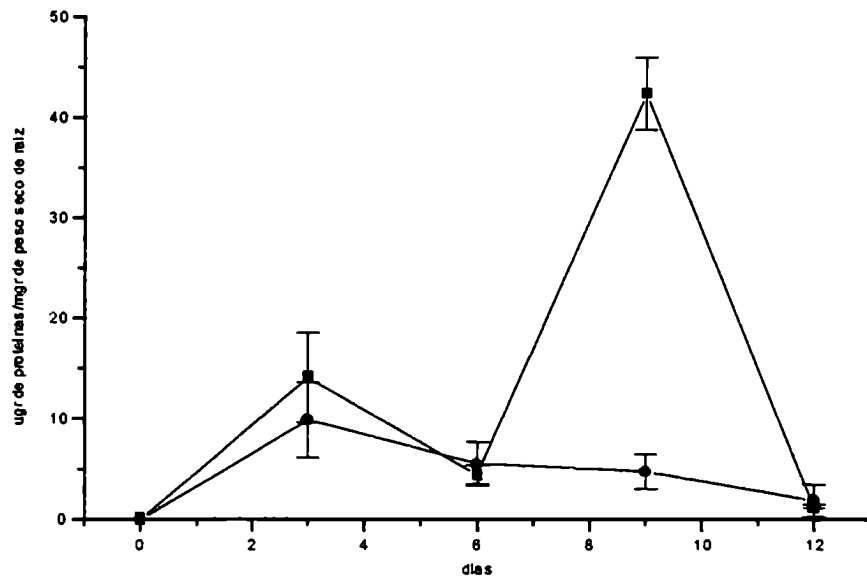


Fig. 58 Curva de proteínas para trigo y soja.
 $Y = 0,0282x; r^2 = 0,98$

Las semillas así esterilizadas, se dejaron por espacio de 24 horas en cajas de Petri con papel de filtro estériles y luego se colocaron en cajas de Petri con medio agar-malta por espacio de 24 horas para el testeo de contaminación.

Se utilizó para el crecimiento de las plántulas en condiciones estériles una solución nutritiva mineral (Prikryl & Vancura, 1980), colocando aproximadamente 10 ml de esta solución en cada tubo. Los tubos así armados se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a 1,5 atm.

Luego, aquellas semillas que no presentaron signos de contaminación fueron colocadas sobre la tira de papel dentro de los tubos e incubadas durante 12 días a 27°C, con ciclos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Se realizaron muestreos a partir del 3er día, por espacio de 12 días, cada 3 días.

Se tomaron por muestreo aproximadamente unos 50 ml de solución nutritiva conteniendo los exudados.

Los exudados así obtenidos, fueron testeados de contaminación colocando 1 ml de éstos en cajas de Petri con agar-malta por espacio de 72 horas, por triplicado. Luego de comprobada la esterilidad de las muestras, éstas se liofilizaron.

Se tomaron también los siguientes parámetros: longitud de la parte aérea y de las raíces al cabo de los 12 días de cultivo y peso seco de las raíces en los cuatro muestreos (3, 6, 9 y 12 días). Los valores de peso seco de raíces de cada muestreo realizado cada 3 días en plántulas de trigo y de soja se utilizaron para el cálculo de mg de hidratos de carbono y de proteínas por mg de peso seco de raíz.

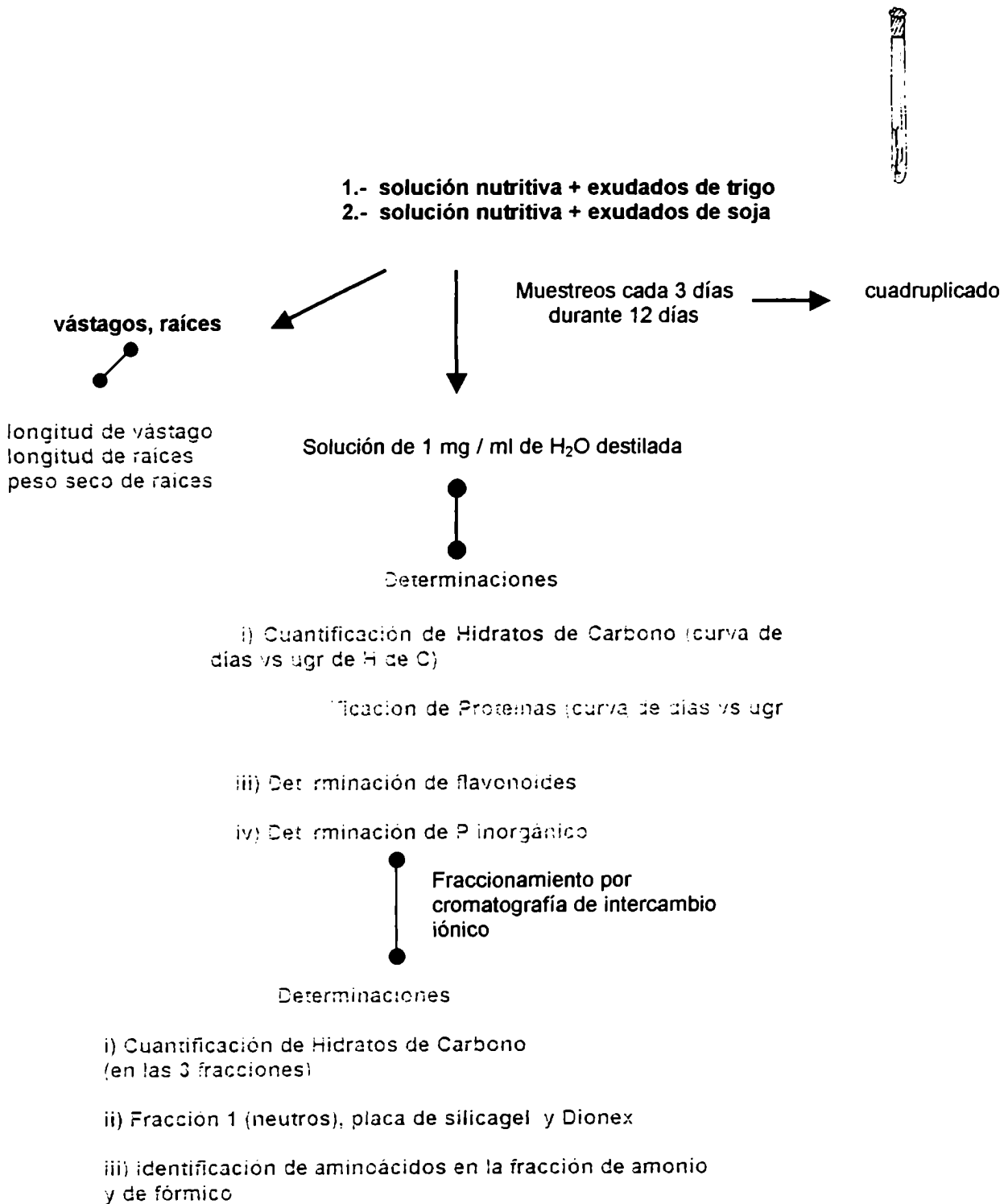


Fig. 56. Determinaciones realizadas sobre exudados de plántulas de trigo y de soja creciendo en condiciones controladas. Solución nutritiva limitante.

mezclar. Luego de 30 minutos se determinó la absorbancia a 660 nm. Como solución patrón se utilizó albúmina bovina (1 mg/ml).

El desarrollo de color depende de cada proteína en particular, siendo ésta la principal desventaja del método. Se midió absorbancia a 660 nm.

Resultados:

En la **Figura N°3a** se observa la recta de regresión correspondiente a la curva de calibración para la cuantificación de proteínas y el contenido de proteínas en los exudados radiculares de trigo y de soja durante un período de 12 días (**figura N°3b**).

En la curva correspondiente a los exudados de trigo se observó un contenido de aproximadamente 13 μgr de proteínas / mg de peso seco de raíz , una disminución a los 6 días de cultivo, alcanzando luego un valor máximo a los 9 días de aproximadamente 25 μgr .

En los exudados de soja, se observó un contenido de aproximadamente 10 μgr / mg de peso seco de raíz (a los 3 días), disminuyendo en forma lenta durante el resto de la experiencia.

iii.- Determinación de flavonoides.

Materiales y métodos:

Se realizaron los espectros UV de barrido en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8451A con arreglo de diodos. Se utilizó una cubeta de cuarzo.

Los espectros se realizaron en soluciones de etanol y etóxido de sodio (0,002M) sobre las muestras de exudados 9 días de cultivo para trigo y 12 días de cultivo para soja.

Para la recuperación de las muestras en solución de etóxido de sodio, éstas se neutralizaron con una resina Dowex50WX-200, previamente lavada con agua destilada y con etanol.

Resultados:

Los espectros mostraron una banda de absorción a $\lambda_{\text{máx}}$ 200 nm, que también se observó en la solución nutritiva, por lo tanto se consideró que no correspondía al aporte de ningún compuesto exudado. De todos modos, se realizaron los espectros en solución de etóxido de sodio para ver si se observaba algún corrimiento característico de los flavonoides, pero no se observó ningún cambio. Se concluyó que las muestras no presentaban flavonoides. El límite de detección del método es de 1 $\mu\text{gr} / \text{ml}$.

iv) Presencia de fósforo inorgánico

Materiales y métodos:

Las determinaciones de fósforo inorgánico se efectuaron según el método propuesto por Chen et al. (1956).

Se prepararon dos soluciones: una solución a) de ácido ascórbico 10%, estable un mes a 4°C; y una solución b) de molibdato de amonio 0.42% en ácido sulfúrico 1N.

El reactivo se preparó mezclando un volumen de solución a) con seis volúmenes de solución b). Se puede mantener un día en baño de hielo.

Se agregaron 2,1 ml del reactivo a 0,9 ml de solución acuosa de fosfato (0.002 – 0.01 μmoles) y se incubó 20 minutos a 45°C o una hora a 37°C. El color es estable durante varias horas y las lecturas son proporcionales a la concentración de

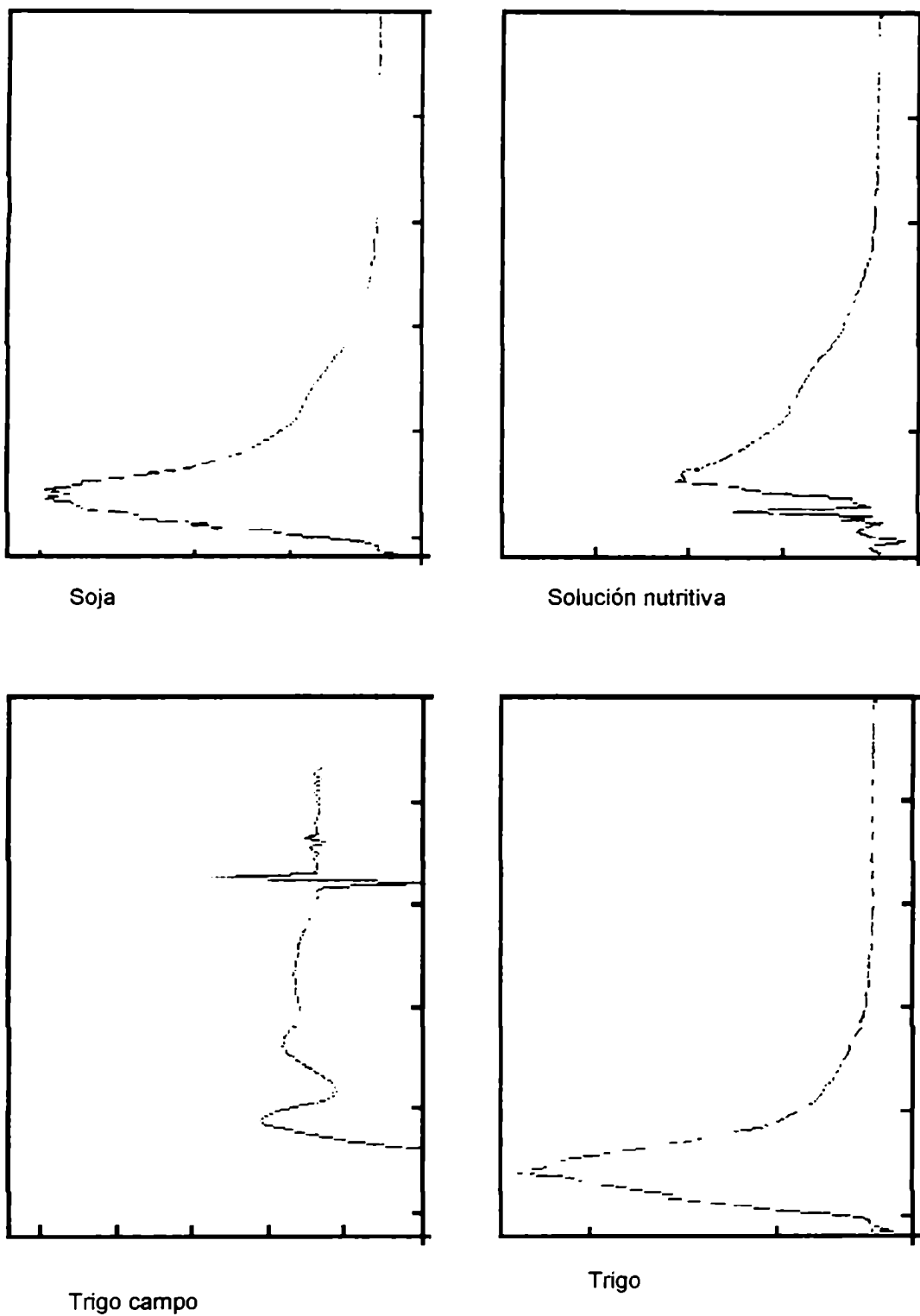


Fig. 59. Espectro de absorción de flavonoides.

fosfato hasta una densidad óptica de 1,8. Como solución patrón se utilizó fosfato monopotásico 0,5 mM/ml. Se determinó la absorbancia a 820 nm.

A partir de la muestra de exudados liofilizada del 3er muestreo de trigo (9 días de cultivo) y el 4to. muestreo de soja (12 días de cultivo) se preparó una solución de 1mg/2ml de agua destilada. Se tomó una alícuota de 0,9 ml de esta muestra para la cuantificación. Al excederse el límite de la escala del espectrofotómetro se realizó una dilución de 1/10.

Resultados:

Las muestras testeadas del 3er M de trigo y del 5to. M de soja dieron el mismo contenido de Pi que la solución nutritiva utilizada para el crecimiento de las plántulas en los tubos.

La recta de regresión utilizada para el cálculo del contenido de P inorgánico fue: $y = 12.3333 x$ $r^2 = 0,83$

Los valores encontrados en la muestra y en la solución nutritiva fueron de 2,76 $\mu\text{gr} / \text{ml}$ de solución. (Figura N°).

3) Identificación de hidratos de carbono y de aminoácidos sobre los eluidos de la cromatografía de intercambio iónico

Materiales y métodos:

Las muestras de exudados de trigo y de soja previamente liofilizadas, se redisolviéron en 3 ml de agua destilada.

Se fraccionaron utilizando columnas de intercambio iónico. Se utilizó una resina fuertemente ácida (catiónica) Dowex 50WX8-200 y una resina fuertemente básica (aniónica) tipo Dowex 1X2-400. La resina Dowex 1X fue llevada a la forma hidroxilo por tratamiento con NaOH 1 N; y la resina Dowex 50 fue lavada con agua destilada. Se llevaron ambas resinas a pH 7. Luego de ésto, se colocaron en minicolumnas en lechos de 1cm de diámetro x 7 cm de largo cada una.

Los componentes neutros fueron eluidos de la columna con 20 ml de agua destilada (flujo de 0,5 ml/minuto).

Luego fueron eluidos los aminoácidos utilizando 20 ml de hidróxido de amonio (NH₄OH) 2 N y por último fueron eluidos los compuestos ácidos: aminoazúcares y ácidos orgánicos con 20 ml de ácido fórmico (HCOOH) 5 N.

Las fracciones obtenidas se liofilizaron.

i) Determinación de hidratos de carbono en las fracciones obtenidas:

Se cuantificó la cantidad de hidratos de carbono presentes en las tres fracciones de las muestras de trigo y de soja mediante la técnica de fenol-ácido sulfúrico (anteriormente descripta).

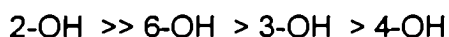
ii) Identificación de hidratos de carbono:

a) Luego de haber detectado principalmente hidratos de carbono en la fracción 1, correspondiente a azúcares neutros, se realizó con la muestra de trigo una placa de sílicagel en la que se sembró en un mismo punto como testigos glucosa, m₂, m₃, m₇ (maltooligosacáridos de 2, 3 y 7 unidades de glucosa) y en otro punto 30 µl de la fracción F₁. Se usó como fase móvil *n*-propanol-etanol-agua (7:1:2) y se visualizaron las manchas por pulverización con una solución de ácido sulfúrico al 5% en etanol.

b) Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución (HPAE-PAD, sistema DIONEX).

Luego de realizada esta placa (a, ii)) se procedió al análisis de las fracciones de azúcares neutros de trigo y de soja a través de un sistema más sensible, el sistema Dionex.

En esta técnica se utilizan resinas de intercambio aniónico fuertemente básicas y eluyentes acuosos de pH elevado, haciendo uso de la leve acidez de los azúcares para su separación. La alta labilidad del H del hidroxilo anomérico, causada por el efecto inductivo del O del anillo, es la principal causa de la acidez de los azúcares. La estabilización del anión por el O anomérico se produce por unión puente de H con el grupo hidroxilo adyacente en C-2. Cuando no existe hidroxilo anomérico, como en el caso de los alditoles o glicósidos, la acidez de los H decrece en el orden:



La leve acidez de los azúcares permite que en determinadas condiciones se encuentren cargados negativamente y puedan interaccionar con una resina con cargas positivas (resina aniónica). En este sistema cromatográfico se utilizan soluciones acuosas de NaOH como solvente de desarrollo, y como variables de fuerza de elución se puede variar la concentración utilizando gradientes lineales o escalonados. Cuando la concentración de NaOH que proporciona una selectividad óptima para algunos analitos no es adecuada para la elución de otros en un tiempo razonable, se agrega un eluyente que se retiene más fuertemente en la columna, como el acetato de sodio.

En esta técnica los materiales de la columna deben ser estables a pH elevado. Resultan adecuadas las resinas del copolímero estireno-divinilbenceno, que tienen un amplio rango de estabilidad con el pH. Recientemente se han desarrollado

resinas peliculares poliméricas no porosas que presentan rápido transporte de masas, rápida difusión, alta estabilidad mecánica.

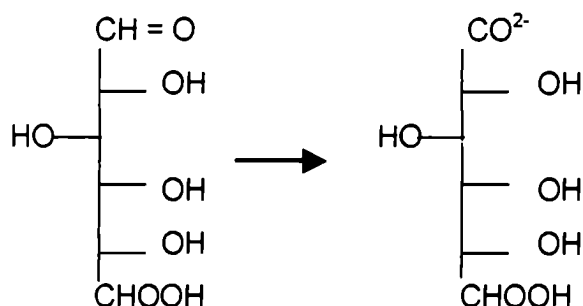
En las resinas existen 3 regiones:

- 1.- Un core inerte, no poroso y mecánicamente estable
- 2.- Una región sulfonada que recubre todo el core
- 3.- Capas externas ligadas en forma permanente de intercambiadores aniónicos (microbead submicrometics) que es donde tiene lugar la cromatografía.

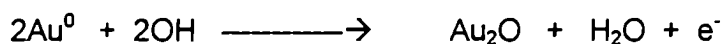
Esta configuración pelicular concentra un elevado número de sitios intercambiadores en una superficie muy delgada sobre el core. Esta forma de empaquetamiento posee una alta capacidad de carga y una baja difusión.

Se ha comprobado que a temperatura ambiente y en cortos tiempos de la cromatografía no tienen lugar las reacciones que experimentan los hidratos de carbono a pH elevado, a saber, epimerizaciones, N-desacetilaciones de azúcares N-acilados y β -eliminaciones.

El sistema de detección utilizado es el de pulso amperométrico. Los eluidos de la columna toman contacto con un electrodo de oro, sobre el cual se aplica una secuencia repetitiva de 3 potenciales E1, E2 y E3, a tiempos determinados t1, t2 y t3. E1 es el potencial al cual se produce la oxidación del aldehído de los hidratos de carbono al anión carboxilato:



El potencial E2 tiene la función de limpiar el electrodo desorbiendo el azúcar a medida que se forma el óxido de oro en la superficie del electrodo.



Por último, para lograr una máxima reactivación es necesario que el óxido de oro se disuelva catódicamente durante el período t3 a un determinado potencial E3. (Posiciones relativas: alditoles, monos.-di, pentosas).

Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detector de pulso amperométrico (HPAE-PAD, sistema DIONEX).

El análisis de los hidratos de carbono se realizó en un sistema Dionex Bio LC equipado con una columna analítica Carbo Pac PA-10 (25 x 0,4 cm) y un detector de pulso amperométrico, cuyos parámetros se fijaron en: E1 0.05V, E2 0.6V, E3 0.6V, t1 480 mseg, t2 300 mseg y t3 240 mseg; rango 2. Se utilizó como sistema de elución programas isocráticos con 100 y 50 mM NaOH. El flujo se fijó en 0.4 ml/min y las muestras se coinyectaron con testigos de glucosa, fructosa, sacarosa, etc., que se detectaron con el detector PAD.

Este sistema permite detectar aproximadamente 70 ngr por análisis (20 µl).

iii) Identificación de aminoácidos en la fracción F₂ y F₃

Con las fracciones de fórmico y de amonio (F₂ y F₃) se preparó una placa de sílica, sembrando en la misma como testigos en un mismo punto: alanina, leucina, lisina; serina con valina, prolina, glutamina, treonina y tirosina. De las muestras se sembraron las fracciones F₂ y F₃ de trigo y de soja. La placa se desarrolló con *n*-propanol-amoniaco-agua (7:1:2) y las manchas se visualizaron por pulverización con ninhidrina al 5% en acetona (pág. N°) y posterior calentamiento.

Resultados:

- i) Determinación cuantitativa de hidratos de carbono en las fracciones F₁, F₂ y F₃

La recta de regresión utilizada para el cálculo de azúcares correspondió a:

$$y = 0,00969 x \quad r^2 = 0,99$$

Fracciones	Trigo	Soja
F1 (Neutros)	207,33 μgr / ml	0 μgr / ml
F2 (Amonio)	0 μgr / ml	0 μgr / ml
F3 (Fórmico)	72,6 μgr / ml	566,6 μgr / ml

Se detectó la presencia de azúcares en la fracción F₁ y F₃ de trigo, teniendo la primera de ellas un contenido mayor. Para las fracciones obtenidas a partir de los exudados de soja, se encontró azúcares solo en la fracción F₃ y con el valor más alto de todas las muestras.

ii) a) Cromatografía de adsorción de hidratos de carbono en F₁ de trigo

En esta placa no se logró visualizar ningún tipo de mancha. Este método detecta cantidades de azúcares entre 2 – 20 µgr.

b) Determinación de hidratos de carbono por cromatografía de intercambio iónico de alta resolución (HPAE-PAD)

Para la muestra de trigo, se observó en la fracción de azúcares neutros (F_{1T}) la presencia de glucosa, sacarosa y fructosa. En la muestra de soja, (F_{1S}) se detectó principalmente la presencia de glucosa.

Al analizar la fracción eluída con ácido fórmico, (F₃), en ambos cultivos se detectó la presencia de numerosos picos de escasa magnitud, con lo que concuerda con el resultado iii), presencia de aminoácidos en esta fracción pero en muy baja cantidad.

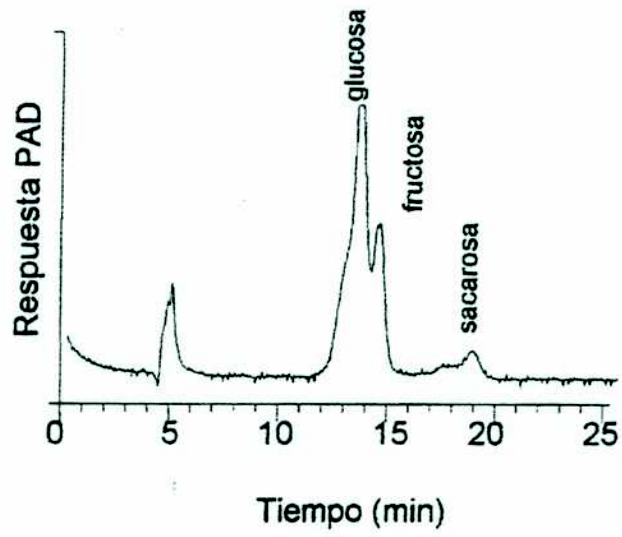
El pico presente a 5 minutos en los cromatogramas corresponde a la solución nutritiva, lo cual fue corroborado por el análisis de ésta.

iii) Placa para detección de aminoácidos

Se detectó una mancha de límites no definidos que indicaría la presencia de varios aminoácidos en las fracciones de amonio y de fórmico de ambos cultivos en baja concentración. No se pudo identificar cuales eran los aminoácidos presentes, debido a la poca cantidad. En la fracción de amonio de soja (F_{2S}) se encuentra una mancha con movilidad similar al aa prolina.

En la fracción de ácido fórmico de soja (F₃) se encuentra una mancha con movilidad similar al testigo de glutamina o prolina o serina.

A.



B.

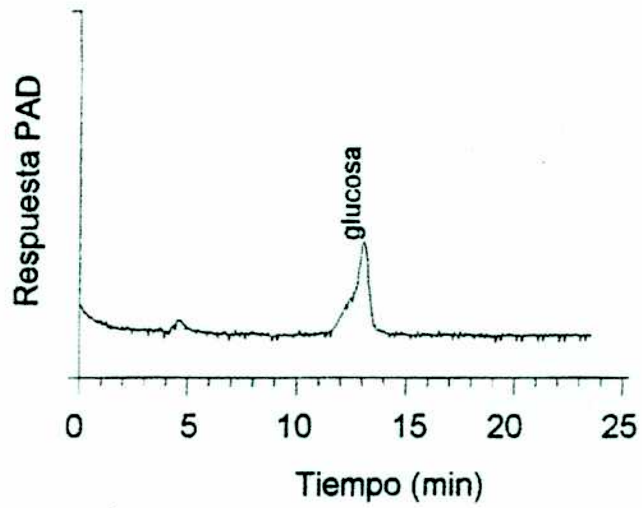


Fig. 60. Cromatografía de intercambio iónico de alta resolución. [(HPAE - PAD). Sistema Dionex]. sobre las fracciones F_{1T} y F_{1S} .

C.

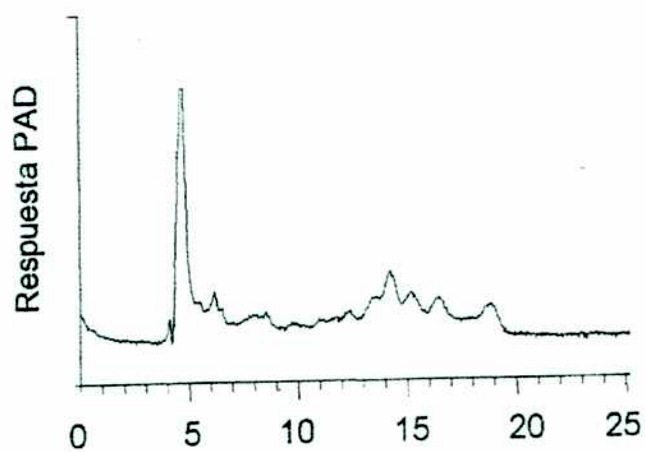


Fig. 60. Cromatografía de intercambio iónico de alta resolución. [(HPAE - PAD). Sistema Dionex]. sobre las fracciones F_{11T} y F_{1S} .

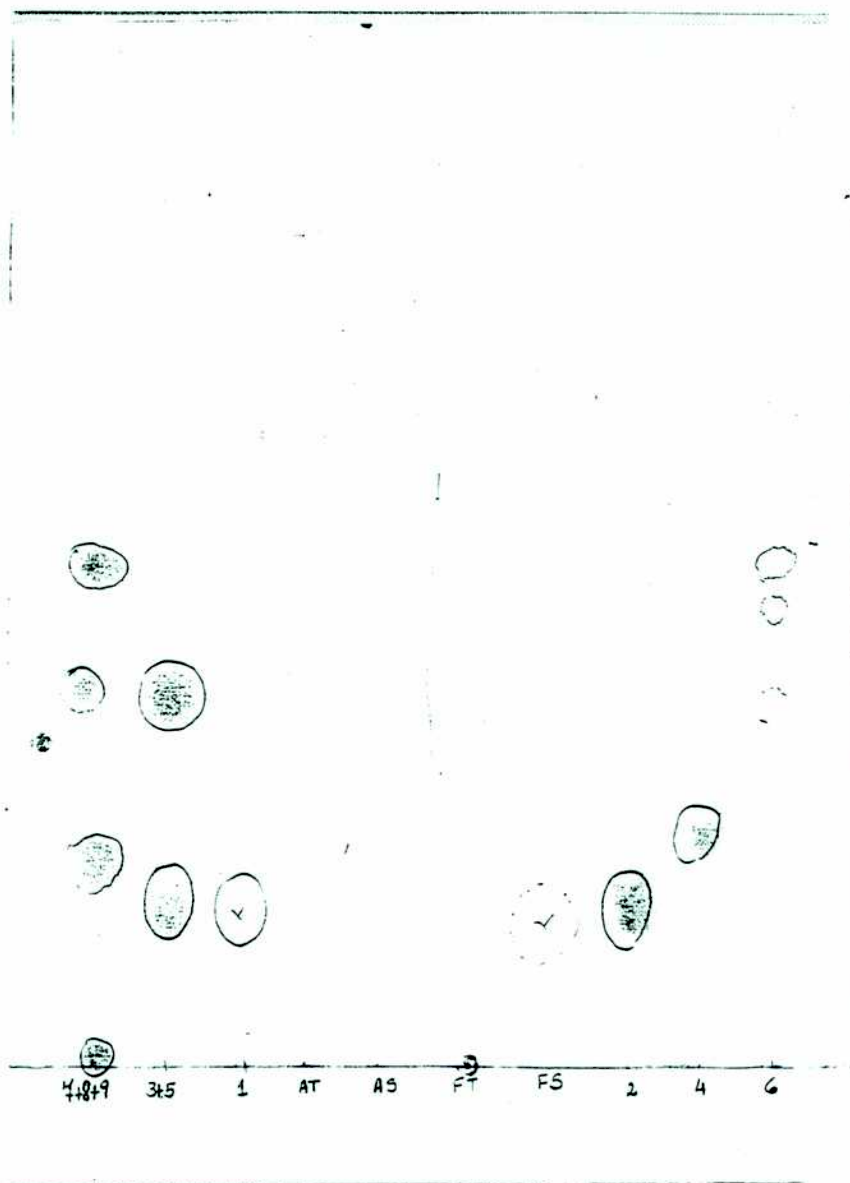


Fig. 61. Placa de sílicagel para aminoácidos. Solvente de corrida: propanol-amoníaco-agua (7:1:2). Revelador de ninhidrina al 5% en acetona
 Testogos de aminoácidos: 1.- prolina, 2.- glutamina, 3.- serina, 4.- treonina, 5.- valina, 6.- tirosina, 7.- alanina, 8.- leucina, 9.- lisina.
 AT: amonio trigo, AS: amonio soja, FT: fórmico trigo, FS: fórmico soja.

Discusión

Es conocido que los resultados de los trabajos realizados sobre el análisis de la composición de los exudados son altamente dependientes del sistema de cultivo de las plántulas y de las condiciones, por ejemplo: la renovación o no del medio nutritivo mineral, la temperatura y luz utilizada y también de la variedad de la especie de semillas utilizadas para el ensayo. Es dificultoso por lo tanto, realizar un análisis de los resultados obtenidos en estas experiencias en comparación con lo estudiado por otros autores. El solo hecho de utilizar un medio líquido para el crecimiento de las plántulas hace que los resultados difieran de aquellos que se puedan estudiar en un medio sólido como el cuarzo o la arena. En este último sistema, la exudación (pérdida de compuestos carbonados) va a ser menor y el sistema va a ofrecer la impedancia mecánica que tendrían esas raíces creciendo en el suelo. (Hodge et al., 1996; Groleau-Renaud, et al., 1998).

Sin embargo, el cultivo en medio líquido ofrece ventajas: es un método donde los exudados pueden recuperarse en forma estéril y sencilla y se evita la absorción de compuestos por los soportes sólidos.

En los sistemas de cultivo utilizados en esta tesis: 1) cultivo de plántulas en macetas, 2) cultivo de plántulas en solución nutritiva en erlenmeyers, 3) sistema de colección de exudados radiculares en tubos, se observó que los parámetros morfológicos de las plántulas no sufrieron modificaciones. Por lo tanto, se puede considerar como válida la elección de un sistema de cultivo más sencillo (sistema 3) que permite evitar la contaminación y recuperar los exudados sin que la calidad de éstos se modifique.

Curl & Truelove en 1986 hicieron una revisión bibliográfica sobre los exudados radiculares, concluyendo que hasta ese momento se habían identificado aproximadamente 10 azúcares y 25 aminoácidos en las distintas especies de plantas estudiadas. Este autor menciona que glucosa y fructosa están generalmente presentes en los exudados de distintas plantas. En un estudio comparativo realizado en trigo y cebada, los azúcares mayoritariamente presentes fueron arabinosa, fructosa y xilosa. Se encontraron también cantidades importantes de ramnosa en trigo y de galactosa en cebada.

Rovira (1956) analizó los exudados radiculares de plántulas de arvejas y avena crecidas en tubos con cuarzo y solución nutritiva en condiciones asépticas. Luego de un período de 10 días de crecimiento, realizó un análisis de aminoácidos por cromatografía. Determinó la presencia de homoserina, glutamina, asparragina y treonina en los exudados de arvejas, y serina, glicina y lisina (absorben al UV) en los exudados de avena. El estudio de azúcares reveló la presencia de cantidades considerables de glucosa y fructosa en ambos cultivos.

En este trabajo de tesis, inicialmente se realizaron los cultivos en macetas con cuarzo-vermiculita (Ensayo N° 1). Las raíces de las plantas así cultivadas se lavaron y sobre este extracto acuoso (E_1) se inició el estudio de los compuestos exudados. Se realizaron estudios de cromatografía de adsorción en capa delgada, que mostraron que el extracto acuoso (E_1) contenía compuestos carbonados con distinta movilidad, particularmente aminoácidos, dado el sistema de revelado utilizado (ninhidrina). En dicho cromatograma (Fig. 53) la mancha de menor movilidad observada (R_f 0,12) es coincidente con el aminoácido serina. El componente minoritario (R_f 0,41), presentó una movilidad similar a leucina. En el caso de E_3 (extracto en metanol de triturado de raíces) no se observaron manchas definidas. El solvente utilizado no logró una buena separación de los compuestos allí presentes, en poca cantidad y gran variedad. En E_2 , el revelado indicó que no contenía compuestos aminados.

Sobre el mismo extracto E_1 se realizó un ensayo cualitativo para la detección de hidratos de carbono (difenilamina-anilina) consistente en la coloración azulada que éstos desarrollan por reacción con el reactivo sobre papel de filtro.

El resultado positivo obtenido en este ensayo, que indica la presencia de hidratos de carbono, junto con la detección de aminoácidos observada en la cromatografía en capa delgada, nos impulsó a realizar estudios que nos permitieran profundizar el conocimiento de la composición de dichos exudados. Sin embargo, para realizar esta tarea fue necesario modificar el sistema de cultivo, adoptando un

sistema de colección de exudados que permitieran resultados reproducibles. Es conocido que los exudados varían en forma cuali y cuantitativa con la temperatura, la luz y la esterilidad del medio de crecimiento. El control de estas tres variables en un sistema de cultivo de plántulas en solución nutritiva estéril y con temperatura y luz controladas para la obtención de exudados radiculares nos permitiría obtener resultados mas reproducibles.

Análisis de los exudados en dos sistemas de cultivo diferentes, en condiciones de esterilidad y con temperatura y luz controladas

A partir de los exudados radiculares obtenidos en un sistema cultivo de plántulas en erlenmeyers con solución nutritiva (Ensayo N° 2a) se realizó una cuantificación de hidratos de carbono. Se observó al centrifugar la muestra y fraccionarla en P y en S, que los hidratos de carbono se encontraban mayoritariamente en S.

Con respecto a las fracciones obtenidas luego de la cromatografía de intercambio iónico, la fracción F₁ (eluída con agua destilada) contenía 315 µgr / ml, F₂ (eluída con hidróxido de amonio) contenía 36,93 µgr / ml y F₃ (eluída con ácido fórmico) 460 µgr / ml.

Al realizar una prueba de detección de aminoácidos por el ensayo a la gota con ninhidrina se observó en la fracción F₃ color similar al desarrollado por un testigo de glucosamina. La fracción F₂ también reveló rosado aunque más claro evidenciando la presencia de aminocompuestos aunque en menor concentración. Por el sistema Se trató de identificar el pico correspondiente a glucosamina por el sistema Dionex (HPAE-PAD, Ensayo N° 2b), pero en F₃ ningún pico era suficientemente coincidente ni intenso como para confirmar su identidad.

Comparando estos valores con los hallados en la cuantificación de las fracciones por el sistema de colección de exudados en tubos, se encontró una mayor concentración en las muestras de F₁, F₂ y F₃ correspondientes al ensayo en el sistema de erlenmeyers, debido a la saturación producida en la solución nutritiva (Přikryl & Vančura, 1980).

Si bien en la literatura correspondiente a trabajos análogos no se realiza el estudio de proteínas en los exudados, consideramos en esta tesis que ensayos químicos para la determinación de éstas, (ensayos de Lowry y Bradford), sería también un aporte valiosos para la caracterización de los mismos.

Con respecto al contenido de proteínas determinado por el método de Bradford, las muestras F₃ y precipitado (P) presentaron valores similares (Ensayo N° 2a). No se detectó proteínas en las fracciones F₁ y F₂ por el método colorimétrico utilizado.

Para las muestras de F₂ y F₃ del sistema de colección de exudados en tubos, (Ensayo N° 2b) se realizó una placa de silicagel para detección de aminoácidos. Las manchas obtenidas fueron muy tenues, por lo que se concluye que si bien se detectó la presencia de algunos aminoácidos, éstos se encuentran en baja concentración.

En los resultados del cromatograma (Fig. 61) realizado en capa delgada de sílicagel para la detección de aminoácidos (Ensayo N° 2b) se encontró: para la fracción F₃ de trigo no hay manchas nítidas y para la fracción F₃ de soja los componentes tienen una movilidad similar a la de los testigos de glutamina o prolina o serina. En las muestras F₂ de trigo y de soja no se detectaron manchas nítidas. La mancha F₂ de soja tiene una movilidad similar al testigo de prolina.

Las diferencias obtenidas entre los dos sistemas de colección de exudados (mayores concentraciones de hidratos de carbono y de aminoácidos en 2^a con respecto de 2b) concuerda con lo observado por Přikryl & Vančura (1980), quienes mencionan la saturación de la solución nutritiva, lo que produce la detención o disminución de la exudación radicular. Ellos en su experiencia, al renovar el medio nutritivo lograban estimular la exudación de las raíces de plántulas de trigo.

Por otra parte, Ritcher et al. en 1968, utilizando un sistema de colección de exudados de flujo continuo, encontraron que en los primeros 10 días de cultivo las plántulas de alfalfa exudaron principalmente serina, glicina, alanina, ornitina y lisina.

Vančura & Hánzliková en 1972 estudiaron el espectro de azúcares y aminoácidos en exudados de semillas y plántulas de trigo, pepino, cebada y poroto.

En trigo encontraron ribosa, xilosa, arabinosa y fructosa en ambos estadios, mientras que algunos oligosacáridos y maltosa, galactosa y ramnosa fueron exclusivos de los exudados de plántulas. En soja en el estadio de plántula se encontró celobiosa y desoxiribosa. En esta tesis, en el ensayo con erlenmeyers (Ensayo N° 2a), por cromatografía realizada sobre papel (para M) se detectó la presencia de componentes con movilidad similar a glucosa, m_2 y m_3 .

En F_2 y F_3 (Ensayo N° 2a) no se pudieron identificar los hidratos de carbono presentes, a pesar de que el análisis por el método de fenol-ácido sulfúrico indicaba la presencia de éstos. Por ello se decidió, con las muestras obtenidas a partir del ensayo N° 2b recurrir al análisis de los hidratos de carbono por medio de la técnica de Dionex (HPAE-PAD) que es altamente sensible y permite detectar 70 ngr por análisis (20 μ l).

En el ensayo realizado en tubos (Ensayo N° 2b), el estudio de los hidratos de carbono por el sistema Dionex (HPAE-PAD) reveló la presencia de glucosa en los exudados de soja, y de glucosa, sacarosa y fructosa en los de trigo.

Smith en 1976, estudiando exudados radiculares de especies forestales, describió la presencia de glucosa, fructosa, ribosa y sacarosa en *Betula alleghaniensis*, glucosa y fructosa en *Fagus grandifolia* y glucosa, fructosa y sacarosa en *Acer saccharum*.

Krafczyk et al. en 1984, trabajaron con exudados radiculares de plántulas de maíz en condiciones de esterilidad y no esterilidad en solución nutritiva. El estudio de los exudados radiculares en condiciones de asepsia indicó un alto contenido en glucosa, arabinosa y fructosa; en cambio, en condiciones no estériles, las cantidades de monosacáridos disminuyeron debido a que éstos fueron preferencialmente metabolizados por los microorganismos. Los valores de sacarosa fueron similares en ambos tratamientos.

Moody et al. en 1988, estudiaron el mucilago secretado por las raíces hacia su superficie. Ellos encontraron que en plántulas de trigo, los componentes monosacáridicos mayoritariamente fueron arabinosa, xilosa, glucosa y galactosa. En

Discusión

este mucílago detectaron también cantidades significativas de glicina, alanina, leucina, valina, prolina, glutamina, serina, treonina, lisina y asparagina.

Vančura & Hánzliková (1972) también detectaron la presencia de glutamina, serina, glicina, ácido aspártico, treonina y ácido glutámico, tanto en los exudados de trigo como en los exudados de poroto. Cisteína, lisina, asparagina y β -alanina se encontraron solo en trigo y ornitina y arginina exclusivamente en soja.

Bokhari et al. en 1979 encontraron luego de 30 días de cultivo de plantas de blue gramma (pastura), cantidades de 9,7 mg de azúcares / g de peso seco y 4,4 mg / gr de peso seco de aminoácidos libres.

Krafczyk et al. en 1984, trabajando con plántulas de maíz en condiciones de esterilidad e hidroponia (300 ml de solución mineral), luego de 40 días de cultivo, contabilizaron 14,28 mg de hidratos de carbono / g de peso seco de raíz y 0,360 mg de aminoácidos / g de peso seco de raíz, siendo éstos principalmente glutamina, asparagina y alanina.

D'Arcy, en 1982, estudió la cinética de la exudación de compuestos fenólicos, aminoácidos y azúcares en soja. Encontró valores de 27.7 μ gr / planta para los aminoácidos y 288 μ gr / planta para los azúcares, durante los primeros días de cultivo. La cinética de la curva mostrada en dicho trabajo es similar a la encontrada en el presente estudio (Fig 57b) donde se observan valores bajos de aproximadamente 10 μ gr / mg de peso seco de raíz, que se mantienen constantes a través de los días. Sin embargo, resulta muy diferente la variación del contenido de hidratos de carbono en los exudados de trigo (Fig. 57,b) donde se observaron valores de hasta 150 μ gr / mg de peso seco de raíz a los 9 días que descienden a 10 μ gr / mg de peso seco de raíz a los 12 días. Esto, en medio estéril podría estar señalando la existencia de algún proceso metabólico, por ejemplo de reabsorción.

Jones & Darrah en 1993 analizaron el proceso de exudación y reabsorción de componentes exudados por raíces de maíz. Concluyeron que la pérdida de azúcares es un proceso pasivo, con lo cual la exudación resulta no estar espacialmente restringida a las regiones apicales de las raíces como lo había propuesto Trofymov (1987). La reabsorción de componentes, en cambio, está dada por un mecanismo de potencial de membrana.

Los estudios realizados permitieron establecer diferencias cuali y cuantitativas en la composición de los exudados obtenidos a partir de soja y de trigo. Basados en estas diferencias se planteó un estudio de interacción entre los hongos saprobios aislados de la rizosfera y el rizoplasma de ambos cultivos con los exudados estudiados según se describe en el Capítulo N° 3.

De los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que, a partir del estudio preliminar de exudados radiculares de plántulas de trigo en macetas se detectó la presencia de azúcares y aminoácidos en la fracción del agua de lavado de las raíces.

Al cambiar por un sistema de cultivo en erlenmeyers, los parámetros de crecimiento no sufrieron variación. En cuanto al análisis de la solución nutritiva + los exudados (M), se detectó la presencia de hidratos de carbono.

La muestra fue centrifugada y se obtuvo un sobrenadante (S) y un precipitado (P). Sobre el precipitado (P) se detectaron aminoácidos. Al desarrollar esta fracción en una placa de celulosa, no se visualizaron manchas, probablemente por la baja cantidad en que estaban presentes.

Se realizó con el sobrenadante (S) una cromatografía de intercambio iónico, obteniéndose una fracción neutra (F_1), una fracción básicos (F_2) y otra básica (F_3). Se observó la presencia de azúcares principalmente en F_1 y proteínas en la fracción P y F_3 .

Debido a la evidencia de azúcares en F_1 , se desarrolló una placa de silicagel, en la que no se visualizó ninguna mancha.

Al cambiar nuevamente de sistema (sistema de colección de exudados en erlenmeyers) por otro más sencillo y eficiente para mantener la esterilidad dentro del mismo (colección en sistema de tubos), se comprueba que los valores en los parámetros morfológicos son coincidentes a los encontrados en los ensayos de macetas y de erlenmeyers.

En este sistema de tubos no se detectaron flavonoides ni fósforo inorgánico dentro de los límites de detección de los métodos utilizados.

El análisis de hidratos de carbono en fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio iónico (F_1 , F_2 y F_3), mostró, al igual que en los sistemas anteriores, que la fracción F_1 de trigo es la que registró mayores contenidos. En los exudados de soja, la presencia de azúcares se observó en la fracción F_3 .

En el análisis de hidratos de carbono por cromatografía en capa delgada de F_1 en placa de sílicagel, no se visualizó ninguna mancha, por lo que se decidió utilizar un método más sensible para la identificación de azúcares, (HPAE-PAD). En la fracción F_{1S} se detectó glucosa y en la fracción F_{1T} se detectó glucosa, fructosa y sacarosa.

Las fracciones F_3 de trigo y de soja una vez más se caracterizaron por la presencia de aminoácidos en baja cantidad. La fracción F_{3S} presentó en su análisis por cromatografía en capa delgada un componente con movilidad similar a prolina, serina o glutamina.

Capítulo 3

*Respuesta de los hongos saprobios a
exudados de trigo y soja*

Ensayo N° 1: Respuesta de saprobios aislados de trigo y de soja a exudados de ambos cultivos.

Materiales y Métodos:

Se tomaron seis cepas aisladas de rizosfera de trigo y de soja durante los primeros muestreos de cada uno de ellos.

A partir de la muestra de trigo se eligió 1 especie aislada a partir de raíces esterilizadas superficialmente del 2do. Muestreo.

i) *Colletotrichum gloeosporioides*

A partir de la muestra de soja se eligieron 5 especies:

- i) *Alternaria alternata*
- ii) Micelio dematiáceo estéril
- iii) Micelio moniliáceo estéril con clamidosporas
- iv) *Fusarium oxysporum*
- v) Micelio estéril rojizo

Alternaria alternata y el micelio estéril rojizo fueron aislados a partir de raíces con esterilización superficial del 1er. Muestreo. El micelio dematiáceo estéril se aisló de raíces con esterilización superficial del 2do. Muestreo.

A partir de partículas se aisló: *Fusarium oxysporum* del 1er. Muestreo y el micelio moniliáceo estéril con clamidosporas del 2do. Muestreo.

La cepa de *Fusarium oxysporum* se aisló a partir de la rizosfera de soja de segunda traída del campo, la segunda a partir de raíces sin esterilización superficial y el tercero a partir de raíces con esterilización superficial.

tratamiento con exudados de soja y de agar – agua, y de estos dos grupos con respecto al tratamiento de agar – malta.

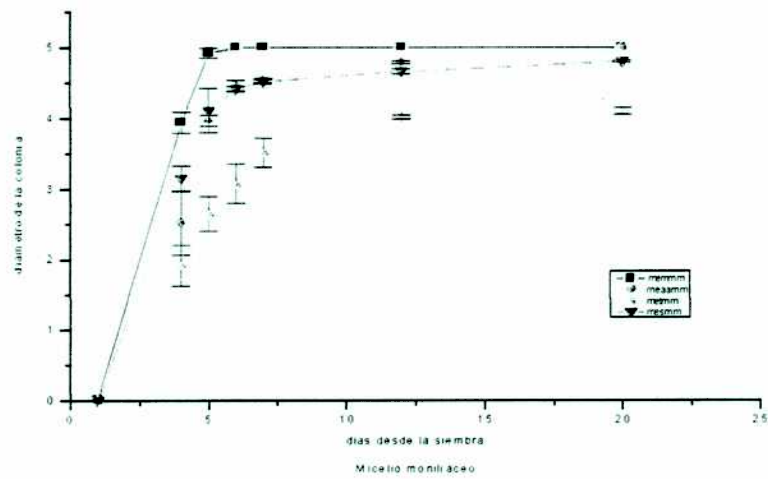
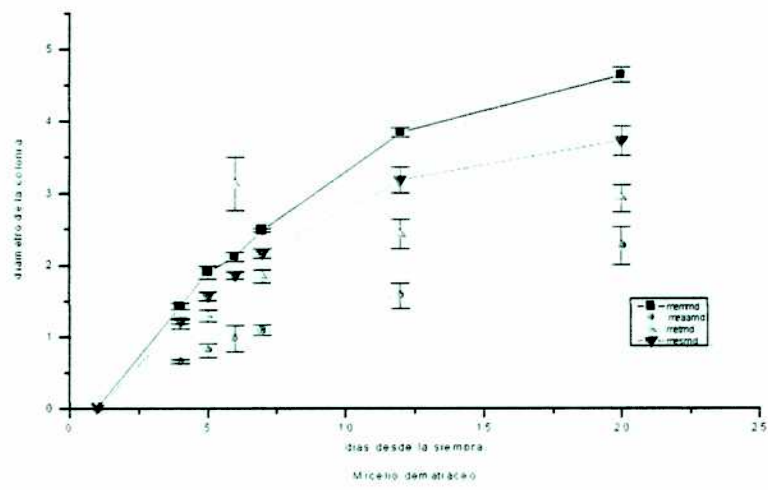
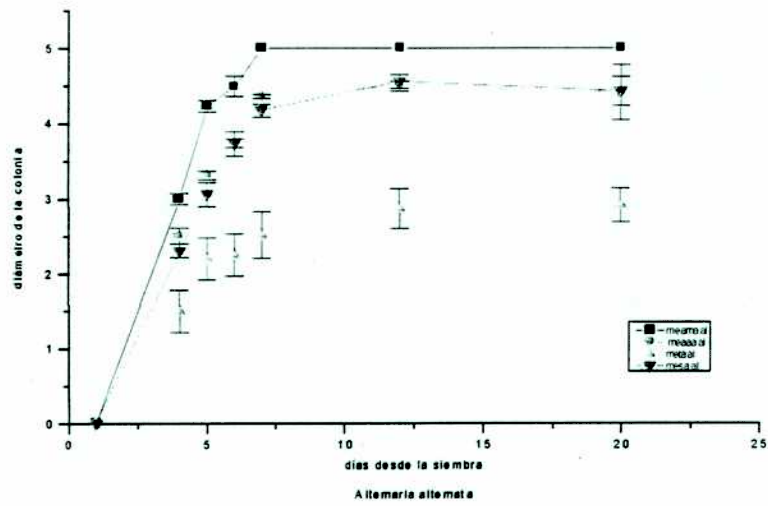
En el caso del micelio dematiáceo estéril hubo diferencias significativas entre todos los tratamientos. Por lo tanto, este saprobio estaría respondiendo en distinta forma a los exudados de trigo y a los de soja. Son más altos los valores de crecimiento para soja.

Para el caso del micelio moniliáceo no hubo diferencias significativas entre el tratamiento con exudados de soja, el de agar – agua y el de agar – extracto de malta. Hubo diferencias significativas entre este grupo y el tratamiento de exudados de trigo, en el cual los valores de crecimiento fue menor.

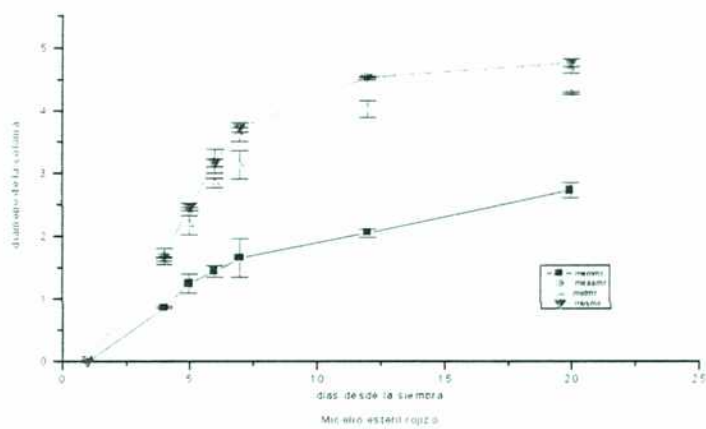
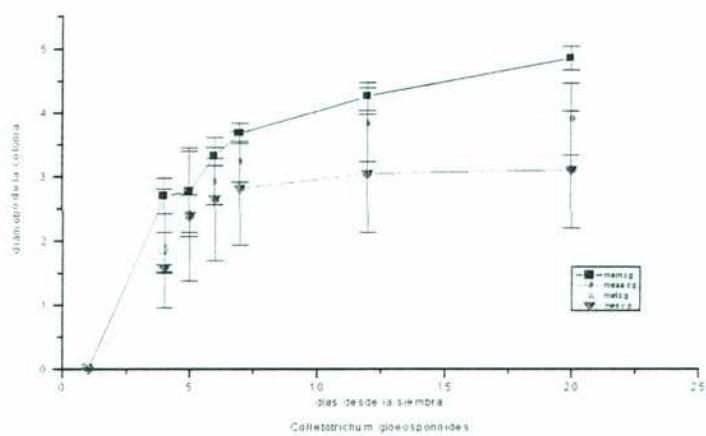
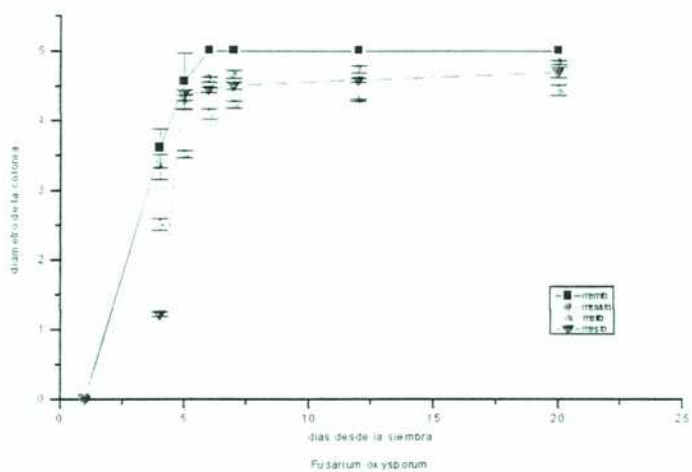
Para *Fusarium oxysporum* se presentaron diferencias significativas entre todos los tratamientos. Los valores medios en el tratamiento con exudados de soja fueron levemente más altos que los de agar – agua y exudados de trigo y más bajo que el tratamiento con malta.

En el micelio estéril rojizo no hubo diferencias significativas entre los tratamientos de agar – agua y de exudados de soja, pero si fueron significativamente diferentes a los tratamientos de agar – malta y exudados de trigo; ambos con valores más bajos de crecimiento.

Capítulo 3



Capitulo 3



Discusión

DISCUSION DE EXUDADOS FRENTE A HONGOS

Los hongos ensayados mostraron un comportamiento diferente de acuerdo con el aislamiento estudiado. Las cepas que provienen del interior de la raíz tienen una disminución importante del crecimiento con el agregado de los exudados. Esto es más importante en micelio moniliáceo y *Colletotrichum gloeosporioides*. Estos hongos se encuentran colonizando el tejido de la raíz quedando confinados a este lugar por efecto de los exudados.

El micelio estéril dematiáceo aislado del suelo necesita agregado de sustancias orgánicas para su crecimiento, exhibe su mayor diámetro en medio con extracto de malta que es un medio muy completo y permite el crecimiento de un número importante de hongos; en agar agua, el crecimiento es menor. Su comportamiento es estrictamente saprofítico.

El micelio estéril rojizo típico del rizoplasma ve estimulado su crecimiento por el agregado de los exudados, lo que explica su distribución.

Hay evidencia de que las leguminosas exudan mayor cantidad de aminoácidos que el trigo (Grayston et al., 1998) y de acuerdo con las necesidades de los microorganismos, éstos se verán estimulados por el agregado de estas sustancias. Las diferencias en las utilidades de los compuestos producidos por las plantas sólo puede deberse a la presencia de diferentes especies de microorganismos. La diversidad de los hongos asociados con las plantas puede deberse exclusivamente a este factor. La literatura pone en evidencia que las plantas producen espectros distintos, este trabajo pone en evidencia la posibilidad de los organismos saprobios de aprovechar diferencialmente los compuestos disponibles.

Las sustancias producidas por la raíz junto con las que producen los microorganismos como producto de su metabolismo serían las responsables de la distribución de los hongos en el tejido cortical, el rizoplasma y la rizosfera de las plantas.

Conclusiones

1) De los aislamientos obtenidos por lavado se observó que las rizoferas ejercen efecto sobre la población fúngica del suelo.

Los microorganismos que colonizan la rizósfera del cultivo de trigo son diferentes en composición específica a aquellos aislados de las rizósferas de pastura y soja, que se encuentran especies como *A. alternata*, *Chaetomium sp*, *Th. Terricola*, *T. flavus*, *T. flavus* y *Ph. eupyrena*.

La pastura tiene entre otras especies, leguminosas, que hacen sentir su efecto sobre la población fúngica quedando estas dos comunidades muy juntas por el método de separación utilizado.

2) Los hongos de la rizosfera no tienen requerimientos nutricionales especiales. Estos son satisfechos por las sustancias orgánicas provenientes de la raíz esto explica las pequeñas diferencias que existen entre las poblaciones aisladas de un mismo suelo y la diferencias están dadas por la variación en la frecuencia de las mismas mas que por diferencias absolutas de composición.

Así especies de *Cylindrocarpon obtusisporum*, *F. oxysporum* y *T. koningii* aparecen en las tres rizosferas, con distintas frecuencias.

Si bien muchas de las especies encontradas por otros autores no fueron aisladas en este trabajo, podemos concluir que existen otras que ocupan el mismo nicho y permiten el desarrollo de comunidades rizosféricas tan eficiente como las ya descritas lo que se puede corroborar por el alto número de asociaciones fúngicas presentes en la rizósfera de soja.

3) Los ensayos en maceta permitieron seguir la evolución de la comunidad fúngica en el suelo y en el rizoplano (raíz sin esterilizar= hongos de vida libre) y en los endofitos de raíz (raíz esterilizada).

La mayor riqueza específica coincide con la floración 3 tipos de sustrato (rizoplano, rizósfera y partículas del suelo circundante), coincidiendo esto con la mayor actividad de la planta que se traducen en cambios fisiológicos y que desarrollan una microflora diferente.

4) A medida que crecen las raíces o aparecen raíces secundarias comienza la colonización desde las partes mas viejas, estimulada por los exudados de las porciones mas jóvenes de la raíz. Al principio es escasa, luego aumenta el número de especies, estableciéndose el equilibrio con el suelo circundante .

Al germinar, la radícula está colonizada por *Cladosporium herbarum*, *Alternaria alternata* y otras especies habitantes normales de la parte aérea, que se encuentran en las cubiertas germinales y normalmente no juegan un papel muy importante ya que son pobres competidoras de los hongos del suelo. La colonización de las raíces de las plántulas se debe a la invasión progresiva por hongos desde el suelo circundante.

5) Nuestro estudio pone de manifiesto que las especies que se encuentran en las cubiertas seminales y que se aíslan en el primer muestreo con esterilización superficial de la raíz de trigo son: *Alternaria tenuissima*, *Cylindrocarpon didymum*, varios micelios estériles y algunas especies de *Penicillium*. Estas especies son reemplazadas por los habitantes del suelo como son las especies de *Fusarium*, *Phoma*, y algunas Mucorales. Al final del ciclo el número de especies se reduce a 7 y la mayoría de los aislamientos corresponden a *Periconia macrospinosa* característico de los detritos vegetales del suelo.

El rizoplano al comienzo está colonizado por pocas especies siendo la mas importante en su frecuencia *Cylindrocarpon didymum*. Siendo reemplazado por *Cylindrocarpon obtusisporum* y *Phoma eupyrena* en el segundo muestreo y algunas especies de

Trichoderma harzianum y *T. koningii*. Este último aumenta su frecuencia en el último muestreo.

6) En el experimento de soja la raíz, está colonizada en su interior inicialmente por *Alternaria alternata*, algunas especies de *Fusarium* y un picnidio que provienen de las cubiertas seminales. Estos hongos son reemplazados por los micelios estériles *Fusarium oxysporum* y *Paecilomyces variotii*, completándose la sucesión con un aumento importante en la frecuencia de *Fusarium oxysporum* a expensas de la disminución de las otras especies.

El rizoplano muestra la siguiente secuencia *Fusarium oxysporum* es a lo largo del muestreo la especie dominante acompañado por *Rhizopus arrhizus* var. *oryzae* en el primer y tercer muestreo y de *Rhizopus arrhizus* en el segundo. Esta especie de *Fusarium* es característica de los lugares donde se siembran leguminosas especialmente arvejas y soja siendo típica de suelos de lugares cálidos y húmedos a diferencia de lo que ocurre con *Cylindrocarpon* que es característico de lugares fríos y mas secos.

Algunas cepas de *Penicillium* y *Trichoderma* de la raíz son insensibles a la fungistasis del suelo, pudiendo responder a los exudados de la raíz y así explicar su temprana aparición en la misma colonizando los ápices.

Los hongos que reemplazan los primeros colonizadores son las poblaciones residentes de la raíz, forman comunidades semiestables sobre la superficie, penetran e inician la descomposición de los tejidos. Las especies que son verdaderas habitantes de la raíz son tal vez las formas estériles dematiáceas que solamente crecen sobre ellas.

7) En suelos cultivados muchas de las hifas observadas están melanizadas. En general la alta proporción de estas están asociadas al bajo nivel de descomposición de estas estructuras.

En este estudio encontramos menores proporciones de hifas dematiáceas, debido que las condiciones ambientales favorecen el proceso de descomposición de las hifas.

En suelos de pradera, trigo y soja el perfil de diámetros muestra máximos en el entorno de 1-2 (µm, este valor se mantiene en el experimento de macetas con trigo. En cambio, al usar el suelo de pradera y sembrarlo con soja los diámetros aumentan. Este aumento puede deberse a que en la maceta la cantidad de compuestos nitrogenados provistos por la soja no son arrastrados del sistema, aumentando el efecto de la rizosfera, lo que crea un ambiente propicio para el desarrollo de los micelios de mayor diámetro ya que los diámetros medios disminuyen con el contenido de materia orgánica. Las células pequeñas tienen una relación superficie volumen que permite un mayor contacto con el medio que las rodea haciéndolas más efectivas en la absorción de nutrientes.

8) En este experimento los valores de biomasa miceliana varían a lo largo del ciclo de la planta. En el trigo aumenta al final del ciclo en cambio en la soja es mayor en el momento de la floración. Estas diferencias pueden deberse a diferencias en la cantidad y calidad de los exudados de las raíces.

9) Los datos de tinción de raíces muestran que los micelios tabicados correspondientes a los hongos saprobios del suelo invaden las raíces tan pronto éstas ingresan al suelo, en cambio los micelios de los organismos simbióticos tienen una fase pre-infectiva más larga. Esta situación se ve claramente en las raíces de trigo y también en las de soja alcanzando esta mayor colonización.

10) De los ensayos realizados en este trabajo se puede concluir que, los exudados radiculares de plántulas de trigo y soja en macetas así como de los otros sistemas de recolección utilizados contienen azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa en trigo y sólo

glucosa en soja) y aminoácidos (prolina, serina y glutamina). No se detectaron flavonoides ni fósforo inorgánico con los métodos utilizados.

11) Los hongos ensayados mostraron un comportamiento diferente de acuerdo con el aislamiento estudiado. Las cepas que provienen del interior de la raíz tienen una disminución importante del crecimiento con el agregado de los exudados. Esto es más importante en micelio moniliáceo y *Colletotrichum gloeosporioides*. Estos hongos se encuentran colonizando el tejido de la raíz quedando confinados a este lugar por efecto de los exudados.

El micelio estéril dematiáceo aislado del suelo necesita agregado de sustancias orgánicas para su crecimiento, exhibe su mayor diámetro en medio con extracto de malta que es un medio muy completo y permite el crecimiento de un número importante de hongos; en agar agua, el crecimiento es menor. Su comportamiento es estrictamente saprofítico.

El micelio estéril rojizo típico del rizoplano ve estimulado su crecimiento por el agregado de los exudados, lo que explica su distribución.

Las diferencias en las utilidades de los compuestos producidos por las plantas determina la presencia de diferentes especies de microorganismos. La diversidad de los hongos asociados con las plantas puede deberse exclusivamente a este factor. Las plantas producen espectros distintos de sustancias y este trabajo pone en evidencia la posibilidad de los organismos saprobios de aprovechar diferencialmente los compuestos disponibles.

Las sustancias producidas por la raíz junto con las que producen los microorganismos como producto de su metabolismo serían las responsables de la distribución de los hongos en el tejido cortical, el rizoplano y la rizosfera de las plantas.

Bibliografia

1. Adams, T.J.H., Todd, N.K. & Rayner, A.D.M. 1981. Antagonism between dikaryous of *Piptoporus betulinus*. *Trans. of the British Mycological Society* 76: 510 – 513.
2. Alexander, M. 1977. *Introduction to Soil Microbiology*. John Wiley & Sons, New York. pp. 467.
3. Asai, T. 1944. Die bedeutung der mikorrhiza für das pflanzenleben. *Japanese Journal of Botany* 12: 359 – 408.
4. Azcón-Aguilar, C. & Bago, B. 1994. Physiological characteristics of the host plant promoting an undisturbed functioning of the mycorrhizal symbiosis. *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on sustainable Agriculture and Natural Ecosystems* (Ed. by S. Gianinazzi & H. Schüepp), pp. 47 – 60.
5. Azcón-Aguilar, C. & Barea, J.M. 1992. Interactions between mycorrhizal fungi and other rhizosphere microorganisms. *Mycorrhizal Functioning: An Integrative Plant-Fungal Process* (Ed. by M.J. Allen), pp. 163 – 168. Chapman & Hall, New York.
6. Bääth, E. & Söderström, B. 1979. The significance of hyphal diameter in calculation of fungal biovolumen. *Oikos* 33: 11-14.
7. Bääth, E. & Söderström, B. 1980. Comparison of the agar-film and membrane-filter methods for the estimation of hyphal lengths in soil, with particular reference to the effects of magnification. *Soil Biol. & Biochem.* 12: 385-387.
8. Balabsuramanian, A. & Rangaswami, G. 1969. Studies on the influence of foliar nutrient sprays on the root exudation pattern in four crop plants. *Plant & Soil* 30: 210 – 220.
9. Balandreau, J. & Knowles, R. 1978. The rhizosphere. Pages 243 – 268 in: *Interactions Between Non-Pathogenic Soil Microorganisms and Plants*. Y.R. Dommergues and S.V. Krupa, eds. Elsevier, Amsterdam.
10. Bakken, L.R. & Olsen, R.A. 1983. Buoyant densities and dry-matter contents of microorganisms: Conversion of a measured biovolume into biomass. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1188-1195.

11. Bansal, M. & Mukerji, K.G. 1994. Root exudates in rhizosphere biology. *In: Mukerji, K.G., Singh, V.P. (eds). Concepts in applied microbiology and biotechnology. Aditya Books, New Dehli, India, pp. 98 – 120.*
12. Barber, D.A. & Gunn, K.B. 1974. The effect of mechanical forces on the exudation of organic substances by the roots of cereal plants grown under sterile conditions. *New Phytol. 73: 39 – 45.*
13. Barber, D.A. & Martin, J.K. 1976. The release of organic substances by cereal roots into soil. *New Phytol. 76: 69 – 80.*
14. Barea, J.M. 1998. Biología de la rizosfera. *Investigación y Ciencia, pp. 74 – 81.*
15. Barron, G.L.. 1972. The genera of hyphomycetes from soil. *R.E. Krieger Publishing Co. Inc. New York. USA.*
16. Beck, S.M. & Gilmour, C.M. 1983. Role of wheat root exudates in associative nitrogen fixation. *Soil Biol. & Biochem. 15: 33 – 38.*
17. Benizri, E., Coutade, A. & Guckert, A. 1995. Fate of two microorganisms in maize simulated rhizosphere under hydroponic and sterile conditions. *Soil Biol. & Biochem. Vol 27 N° 1: 71 – 77.*
18. Bethlenfalvay, G.J. & Schüepp, H. 1994. Arbuscular mycorrhizas and agrosystem stability. *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems (Ed. by S. Gianinazzi & Schüepp), pp. 117 – 131. ALS, Birkhäuser, Basel.*
19. Beute, M.K. & Lockwood, J.L. 1968. Mechanism of increased root rot in virus-infected peas. *Phytopathology 58: 1643 – 1651.*
20. Bissett, J. & Widden, P. 1972. An automatic multichamber soil-washing apparatus for removing fungal spores from soil. *Can. J. Microbiol. 18: 1399-1409.*
21. Bokhari, U.G., Coleman, D.C. & Rubink, A. 1979. Chemistry of root exudates and rhizosphere soils of prairie plants. *Canadian Journal of Botany Vol 57, N° 13, pp. 1473-1477.*

-
22. Bolton, H., Fredrickson, J.K. & Elliot, L.F. 1992. Microbial ecology of the rhizosphere. In *Soil Microbial Ecology*. Ed. F.B. Metting, pp. 27-63. Marcel Dekker, New York.
 23. Booth, C. 1966. The genus *Cylindrocarpon*. *Mycol. Pap.* 104: 1-56.
 24. Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. *C.M.I. Kew. Ingleterra*.
 25. Bottomley, P.J. 1998. Chapter 8. Microbial Ecology. *Principles and Applications of Soil Microbiology*. D.M. Sylvia, J.J. Fuhrmann, P.G. Hartel, D.A. Zuberer.
 26. Bowen, G.D. 1968. Phosphate uptake by mycorrhizas and uninfected roots of *Pinus radiata* in relation to root distribution. *Trans. 9th. Int. Congr. Soil Sci., Adelaide 2*: 219 – 228.
 27. Bowen, G.D. 1980. Misconceptions, concepts and approaches in rhizosphere biology. In *Contemporary Microbial Ecology* (D.C. Ellwood, J.N. Hedger, N.J. Latham & J.K. Lynch, Eds), pp. 283 – 304. Academic Press, New York.
 28. Bowen, G.D. & Rovira, A.D. 1973. Are modelling approaches useful in rhizosphere biology?. *Bull. Ecol. Res. Commun. Stockholm* 17: 443 – 450.
 29. Bowen, G.D. & Rovira, A.D. 1976. Microbial colonization of plant roots. *Annual Review of Phytopathology* 14: 121 – 144.
 30. Bowen, G.D. & Rovira, A.D. 1991. The rhizosphere, the hidden half of the hidden half. In *Plant Roots, the Hidden Half*, ed. Y. Waisel, A. Eshel & U. Kafkafi, pp. 641-69. Marcel Dekker, New York.
 29. Bowen, G.D. & Theodorou, C. 1973. Growth of ectomycorrhizal fungi round seeds and roots. In *Ectomycorrhizae, Their Ecology and Physiology*, ed. G.C. Marks, T.T. Kozlowski, pp. 107 – 150. New York. Academic.
 31. Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
 32. Campbell, R. 1985. *Plant Microbiology*. Arnold. London.
 33. Chang, C.W. & Bandurski, R.S. 1964 . Exocellular enzymes of corn roots. *Plant Physiol.* 39: 60-64.

-
34. Chen, P.S., Toribara, T.Y. & Warnes, H. 1956. *Anal. Chem.* 2, p.1756.
35. Clarholm, M. 1985. Interactions of bacteria, protozoa and plants leading to mineralization of soil nitrogen. *Soil Biol. & Biochem.* 17: 181 – 187.
36. Clarholm, M. & Rosswall, T. 1980. Biomass and turnover of bacteria in a forest soil and a peat. *Soil Biol. & Biochem.* 12: 49-57.
37. Coleman, D.C., Cole, C.V., Anderson, R.V., Blaha, M., Campion, M.K., Clarholm, M., Elliott, E.T., Hunt, H.W., Shaefer, B., Sinclair, J. 1977. An analysis of rhizosphere-saprophage interactions in terrestrial ecosystems. *Swedish Natural Science Research Council Stockholm. Ecol. Bull. N° 25*, 299 – 309.
38. Coleman, D.C., Reid, C.P.P. & Cole C.V. 1983. Biological strategies of nutrient cycling in soil systems. *Advances in Ecological Research* 13: 1 – 57.
39. Conway, D.R., Frankland J.C., Saunders V.A. & Wilson D.R. 2000. Effects of elevated atmospheric CO₂ on fungal competition and decomposition of *Fraxinus excelsior* litter in laboratory microcosms. *Mycological Research vol 104, Part 2*, pp. 187-197.
40. Curl, E.A. & Truelove, B. 1986. *The Rhizosphere. Springer – Verlag, Berlin.*
41. Dahm, H. 1984a. Generic composition and physiological and cultural properties of heterotrophic bacteria isolated from soil, rhizosphere and mycorrhizosphere of pine (*Pinus silvestris* L.). *Acta Microbiologica Polonica* 33: 147 – 156.
42. Dahm, H. 1984b. Metabolic activity of bacteria isolated from soil, rhizosphere and mycorrhizosphere of pine (*Pinus silvestris* L.). *Acta Microbiologica Polonica* 33: 157 – 162.
43. Darbyshire, J.F. & Greaves, M.P. 1973. Bacteria and protozoa i the rhizosphere. *Pestic. Sci.* 4: 349 – 360.
44. D'Arcy, A.L. 1982. Etude des exsudats racinaires de Soja et de Lentille. I. Cinetique d'exsudation des composés phénoliques, des amino acides et des sucres, au cours des premiers jours de la vie des plantules. *Plant & Soil* 68: 399-403.

-
45. Deacon, J.W. 1987. Programmed cortical senescence: a basis for understanding root infection. *In: Fungal Infection of Plants*, (eds. G.F. Pegg & R.G. Ayres). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 285-297.
46. Dix, N.J. 1964. Colonization and decay of bean roots. *Trans. of the British Mycological Society*, 47: 285 – 292.
47. Dix, N.J. & J. Webster. 1995. Fungal Ecology. Chapman Hall. London. pp. 549.
48. Dixon, R.A., Dey, P.M., & Lamb, C.J.. 1983. Phytoalexins: Enzymology and molecular biology. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 55: 1 – 136.
49. Dominguez, Xorge A..1973. Métodos de investigación en Fitoquímica. Editorial Limusa S.A. México. Cap. 6. pp. 81 – 89.
50. Domsch, K.H. & Gams, W. 1969. Variability and potential of a soil fungus population to dempose pectin, xylan and carboxymethyl-cellulose. *Soil Biol. & Biochem.* 1: 29-36.
51. Domsch, K.H., Beck, T., Anderson, J.P.E., Söderström, B., Parkinson, D. & Trolldenier. G. 1979. A comparison of methods for a soil microbial population and biomass studies. *Z. Pflanzenernachr. Bodenkd.* 142: 520-533.
52. Domsch, K.H., Gams, W. & Anderson, T.H. 1980. *Compendium of soil fungi. Vol I y II. Academic Press. Londres. Inglaterra.*
53. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, p. 350.
54. Ebel, J. & Hahlbrock, K. 1982. Biosynthesis. Pages 641 – 679. *In: The Flavonoids, Advances in Research. J.B. Harborne & T.J. Mabry, eds. Chapman & Hall, New York.*
55. Ecker, J.R. & Davis, R.W. 1987. Plant defense genes are regulated by ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5202 – 5206.
56. Elad, Y. & Baker, R. 1985. The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamidospore germination of *Fusarium spp.* *Phytopathology* 75: 1053 – 1059.

-
57. Ellis, M.B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. *C.M.I. Kew. Surrey. Inglaterra*.
58. Ellis, M.B. 1976. Dematiaceous Hyphomycetes. *C.M.I. Kew. Surrey. Inglaterra*.
59. Elkan, G.H. 1962. Comparison of rhizosphere microorganisms of genetically related nodulating and non-nodulating soya bean lines. *Can. J. Microbiol. Vol. 8: 79 – 87*.
60. Elmholt, S. & Kjøller, A. 1987. Measurement of the length of fungal hyphae by the membrane filter technique as a method for comparing fungal occurrence in cultivated field soils. *Soil Biol. & Biochem. 19: 679-682*.
61. Esau, K. 1982. Anatomía de las plantas con semillas. *Editorial Hemisferio Sur. S.A. pp. 512*.
62. Fitter, A.H. & Garbaye, J. 1994. Interaction between mycorrhizal fungi and other soil organisms. *Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry (Ed. by A.D. Robson, L.K. Abbott & N. Malajczuk), pp. 123 – 132. Kluwer Academic, Dordrecht*.
63. Fletcher, M., Latham, M.J., Lynch, J.M. & Rutter, P.R. 1980. The characteristics of interfaces and their roles in microbial attachment. *In Microbial Adhesion to Surfaces, pp. 67 – 78. Eds. R.C.W. Berkeley, J.M. Lynch, J. Melling, P.R. Rutter and B. Vincent. Chichester: Ellis Horwood*.
64. Foster, R.C. & Rovira, A.D. 1976. Ultrastructure of the wheat rhizosphere. *New Phytol. 76: 343 – 352*.
65. Foster, R.C., Rovira, A.D., Cock, T.W. 1983. Ultrastructure of the Root-Soil Interface. *St. Paul, Minn: Am. Phytopathol. Soc. pp. 157*.
66. Fracchia, S., Mujica, M.T., García-Romera, García Garrido, Martín, J., Ocampo, J.A. & Godeas, A.M. 1998. Interactions between saprotrophic *Fusarium* strains and arbuscular Mycorrhizas of Soybean Plants. *Plant & Soil 200: 131-137*.
67. Fracchia, S., García-Romera, I., Godeas, A. & Ocampo, J.A. 2000. Effect of the saprophytic fungus *Fusarium oxysporum* on arbuscular mycorrhizal colonization and growth of plants in greenhouse and field trials. *Plant & Soil 00: 1-10*.

-
68. Frankland, J.C., Dighton, J. & Boddy, L. 1990. Methods for studying fungi in soil and forest litter. *In: R. Grigorova & J.R. Norris (ed.). Methods in microbiology. Vol 22. pp. 343-404. Techniques in microbial ecology. Academic Press, New York.*
69. French, R.C. 1985. The bioregulatory action of flavor compounds on fungal spores and other propagules. *Annual Review of Phytopathology 23: 173-199.*
70. Gadgil, R.L. & Gadgil, P.D. 1975. Suppression of litter decomposition by mycorrhizal roots of *Pinus radiata*. *N.Z.J. For. Sci. Vol. 5: 33 – 41.*
71. Gadgil, P.D. 1965. Distribution of fungi on living roots of certain Gramineae and the effect of root decomposition on soil structure. *Plant & Soil 22: 239 – 259.*
72. García-Romera, I., García Garrida, J.M., Martín, J., Fracchia, S., Mujica, M.T., Godeas, A. & Ocampo, J.A. 1998. *Symbiosis 24: 235-246.*
73. Gaskins, M.H., Albrecht, S.L. & Hubbell, D.H. 1985. Rhizosphere bacteria and their use to increase plant productivity: a review. *Agriculture, Ecosystems and the Environment 12: 99 – 116.*
74. Geinsman. 1962. The chemistry of flavonoids compounds. pp. 503.
75. Godeas, A.M., Fracchia, S., Mujica, M.T. & Ocampo, J.A. 1999. Influence of soil impoverishment on the interaction between *Glomus mosseae* and saprobe fungi. *Mycorrhiza 9: 185-189.*
76. Graham, J.H., Leonard, R.T. & Menge, J.A. 1981. Membrane mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. *Plant Physiol. 68: 548 – 552.*
77. Grayston, S.J., Wang, S., Campbell, C.D. & Edwards, A.C. 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol. & Biochem. Vol. 30 N° 3, pp. 369-378.*
78. Greaves, M.P. & Darbyshire, J.F. 1975. Microbial decomposition of plant roots. *In Biodegradation et Humification, pp. 108-111 (G. Kilbertus, O. Reisinger, A. Mourey & J.A. Cancela da Fonseca, Eds.). Pierron Sarreguemines.*

-
79. Griffin, G.J., Hale, M.G. & Shay, F.J. 1976. Nature and quantity of sloughed organic matter produced by roots of axenic peanut plants. *Soil Biol. & Biochem.* 8: 29 – 32.
80. Groleau-Renaud, V., Plantureux, S. & Guckert, A. 1998. Influence of plant morphology on root exudation of maize subjected to mechanical impedance in hydroponic conditions. *Plant & Soil* 201: 231-239.
81. Hahlbrock, K. & Grisebach, H. 1979. Enzymatic control in the biosynthesis of lignin and flavonoids. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30: 105 – 130.
82. Hale, M.G., Foy, C.L. & Shay, F.J. 1971. Factors affecting root exudation. *Adv. Agron.* 23: 89 – 109.
83. Hale, M.G. & Moore, L.D. 1979. Factors affecting root exudation. II. 1970 – 1978. *Adv. Agron.* 31: 93 – 124.
84. Hale, M.G., Moore, L.D. & Griffin, G.J. 1978. Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants. In: *Ecology of Root Pathogens* (eds Y.R. Dommergues and S.V. Krupa), Elsevier, New York.
85. Hale, M.G., Moore, L.D. & Griffin, G.D. 1981. Factors affecting root exudation and significance for the rhizosphere ecosystems. In: *Biological and Chemical Interactions in the Rhizosphere*, Symp. Proc. Ecol. Res. Comm., Swed. Nat. Sci. Res. Council., Stockholm, pp. 43-71.
86. Harborne, J.B. 1957. Comparative biochemistry of the flavonoids pp. 574.
87. Harley, J.L. & Smith, S.E. 1983. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, New York.
88. Harley, J.L. & Waid, J.S. 1955^a. A method of studying active mycelia on living roots and other surfaces in the soil. *Trans. of the British Mycological Society*, 38: 104 - 118.
73. Harris, J.R. 1958. The role of calcium in the nodulation of legumes. *Univ. of Nottingham Symposium and colloquium on "The nutrition of legumes"*.
74. Hawes, M.C. 1990. Living plant cells released from the root cap: A regulator of microbial populations in the rhizosphere?. *Plant & Soil* 129: 19-27.

-
75. Haystead, A. & Marriott, C. 1979. Transfer of legume nitrogen to associated grass. *Soil Biol. Biochem.* 11: 99 – 104.
76. Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C. & Pegel, D.N. 1995. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. *Eighth Edition. International Mycological Institute. CAB International. Inghilterra.*
77. Hepper, C.M. & Jakobsen, I. 1983. Hyphal growth from spores of the mycorrhizal fungus *Glomus caledonius*: effect of amino acids. *Soil Biol. & Biochem.* Vol 15. Nro. 1: 55 – 58.
78. Hering, T.F. 1965. An automatic soil-washing apparatus for fungal isolation. *Plant & Soil* 25: 195-200.
79. Hiltner, L. 1904. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbacterbiologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundungung und Brache. *Arb. Dtsch. Landw. Ver.* 98: 59 - 78.
80. Hodge, A., Grayston, S.J. & Ord, B.G. 1996. A novel method for characterisation and quantification of root exudates. *Plant & Soil* 184: 97-104.
81. Hodge, A. & Millard, P. 1998. Effect of elevated CO₂ on carbon partitioning and exudate release from *Plantago lanceolata* seedlings. *Physiologia Plantarum* 103: 280 – 286.
82. Hodge, A., Paterson, E., Grayston, S.J., Campbell, C.D., Ord, B.G. & Killham, K. 1998. Characterisation and microbial utilisation of exudate material from the rhizosphere of *Lolium perenne* grown under CO₂ enrichment. *Soil Biol. Biochem.* Vol. 30 N° 8/9 pp.1033-1043.
83. Hunt, G.A. & Fogel, R. 1983. Fungal hyphal dynamics in a western Oregon Douglas-fir stand. *Soil Biol. & Biochem.* 15: 641-649.
84. Hurst, H.M. & Wagner, G.H. 1969. Decomposition of ¹⁴C-labelled cell wall and cytoplasmic fractions from hyaline and melanic fungi. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 33: 707-711.

-
85. Ingham, R.E., Trofymow, J.A., Ingham, E.R. & Coleman, D.C. 1985. Interactions of bacteria, fungi and their nematode grazers: effects on nutrient cycling and plant growth. *Ecological Monographs* 55: 119 – 140.
 86. Jackson, R.M. 1957. Fungistasis as a factor in the rhizosphere phenomenon. *Nature*, 180: 96 - 97.
 87. Jacobs, M. & Rubery, P.H. 1988. Naturally occurring auxin transport regulators. *Science* 241: 346 – 349.
 88. Janse, J.M. 1896. Les endophytes radicaux des quelques plantes Javanaises. *Annales du Jardin Botanique Buitenzorg* 14: 53 – 212.
 89. Jenkinson, D.S., Ladd, J.N. & Rayner, J.H. 1980. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: Soil Bioch. (E.A. Paul and J.N. Ladd, Eds.), pp. 415-471. Dekker, N. York.
 90. Jenkinson, D.S. 1977. Studies of decomposition of plant materials in soil. V. The effects of plant cover and soil type on the loss of carbon from C-labelled ryegrass decomposing under field conditions. *J. Soil Sci.* Vol. 28: 424 – 434.
 91. Jenny, H. & Grossenbacher, K.A. 1963. Root-soil boundary zones as seen in the electron microscope. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 27: 273 – 277.
 92. Jensen, W.A. & Mc Laren, A.D. 1960. Uptake of proteins by plant cells. The possible occurrence of pinocytosis in plants. *Exp. Cell. Res.* 19: 414-417.
 93. Jones, D.L. & Darrah, P.R. 1993. Re-sorption of organic compounds by roots of *Zea mays* L. and its consequences in the rhizosphere. II. Experimental and model evidence for simultaneous exudation and re-sorption of soluble C compounds. *Plant & Soil* 153: 47 – 59.
 94. Jones, P.C.T. & Mollison, J.E. 1948. A technique for the quantitative estimation of soil microorganisms. *J. Gen. Microbiol.* 2: 54-69.
 95. Jones, F.R. 1924. A mycorrhizal fungus in the roots of legumes and some other plants. *Journal of Agriculture Research* 29: 459 – 470.
 96. Katznelson, H., J.W. Rouatt, & Payne, T.M.B. 1955. The liberation of amino acids and reducing compounds by plant roots. *Plant & Soil* 7: 35 – 48.

-
97. Kemble, A.R. & Macpherson, H.T. 1954. Liberation of amino acids in perennial rye grass during wilting. *Bioch. J.* 58: 46-49.
 98. Kenkel, N. & Booth, T. 1992. Multivariate analysis in fungal ecology. *En: The fungal community : its organisation and role in the ecosystem. 2da. Ed. Editores: G.C. Carroll & D.T. Wicklow. Dekker. Nueva York.*
 99. Killham, K. 1995. Soil Ecology. *Cambridge University Press. pp. 242.*
 100. Kirk, P.M. & Ansell, A.E. 1992. Authors of fungal names. pp. 95. *CAB International. Wallingford, U.K.*
 101. Kloepper, J.W., Schippers, B. & Bakker, P.A.H.M. 1992. Proposed elimination of the term Endorhizosphere. *Phytopathology vol. 82 N° 7, pp. 726-727.*
 102. Köeppen. 1931. "Grundriss der Klimakunde". *Berlin und Leipzig. Walter de Gruyter Co. XII + 388 pp, 28 fig.*
 103. Krafczyk, G., Trolldenier, G. & H. Beringer. 1984. Soluble root exudates of maize: Influence of potassium supply and rhizosphere microorganisms. *Soil Biol. Biochem. Vol 16 N° 4: 315 – 322.*
 104. Krasilnikov, N.A. 1958. "Soil Microorganisms and Higher Plants", Academy of Sciences, Moscow, (English translation).
 105. Last, F.T. & Price, D. 1969. Yeast associated with living plants and their environs. *In The Yeasts, vol 1, (eds A.H. Rose and J.S. Harrison), Academic Press, London, pp. 181 – 218.*
 106. Lawton; M.A. & Lamb, C.J. 1987. Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitor, wounding and infection. *Mol. Cell. Biol. 7: 335 – 341.*
 107. Lee, B.K.H. & Baker, G.E. 1973. Fungi associated with the roots of red mangrove, *Rhizophora mangle*. *Mycologia 65: 894.*
 108. Leppard, G.G., Ramamoorthy, S. 1975. The aggregation of the wheat rhizoplane fibrils and the accumulation of soil bound cations. *Can. J. Bot. 53: 1729 – 1735.*

-
109. Linderman, R.G. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. *Mycorrhizae in Sustainable Agriculture* (Ed. by G.J. Bethlenfalvay & R.G. Linderman), pp. 45 – 70. ASA Special Publication, Madison, WI.
 110. Lochhead, A.G. 1957. Qualitative studies of soil micro-organisms: XV. Capability of the predominant bacterial flora for synthesis of various growth factors. *Soil Sci.* 84: 395.
 111. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall; R.J.. 1951. *J. Biol. Chem.* 193: p. 265.
 112. Lynch, J.M..1981. Promotion and inhibition of soil aggregate stabilization by soil microorganisms. *J. Gen. Microbiol.* 126: 371 – 375.
 113. Lynch, J.M. & Bragg, E.. 1985. Microorganisms and soil aggregate stability. *Advances in Soil Science* 2: 133-171.
 114. Lynch, J.M., Ellis, F.B. Harper, S.H.T. & Christian, D.G. 1980. The effect of straw on the establishment and growth of winter cereals. *Agric. Environ.* 5, 321 – 328.
 115. Lynch, J.M. & Whipps, J.M. 1990. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant & Soil* 129: 1 – 10.
 116. Lodge, D.J. & Ingham, E.R. 1991. A comparison of agar film techniques for estimating fungal biovolumes in litter and soil. *Agr. Ecosystems Environ.* 34: 131-144.
 117. Mabry, T.J., Markham, K.R. & Thomas, M.B. 1970. "The systematic identification of flavonoids". Springer-Verlag. New York Inc. 354 pp.
 118. Marinos, N.G. 1962. Studies on submicroscopic aspects of mineral deficiencies. I. Calcium deficiency in the shoot apex of barley. *Am. J. Bot.* 49: 834-841.
 119. Martin, J.K.1977. Factors influencing the loss of organic carbon from wheat roots. *Soil Biol. Biochem.* 9: 1 – 17.
 120. Mc Dougall, B.M. 1968. *Trans. 9th. Int. Congr. Soil Sci. Adelaide. Vol II*, pp. 647.

-
121. Mc Dougall, B.M. & Rovira, A.D. 1970. Sites of exudation of ^{14}C -labelled compounds from wheat roots. *New Phytol.* 69: 999 – 1003.
122. McKee, I.F. & Woodward, F.I. 1994. CO_2 enrichment responses of wheat: interactions with temperature, nitrate and phosphate. *New Phytol.* 127: 447-453.
123. Meiners, S., Gharyal, P.K. & Schindler, M. 1991. Permeabilization of the plasmalemma and wall of soybean root cells to macromolecules. *Planta* 184: 443 – 447.
124. Moghimi, A., Tate, M.E., Oades, J.M. 1978 b. Characterization of rhizosphere products especially 2-ketogluconic acid. *Soil Biol. & Biochem.* 10: 283 – 287.
125. Moody, S.F., Clarke, A.E. & Bacic, A. 1988. Structural analysis of secreted slime from wheat and cowpea roots. *Phytochemistry Vol 27, N° 9, pp. 2857-2861.*
126. Nakas, J.P. & Klein, D.A. 1980. Mineralization capacity of bacteria and fungi from the rhizosphere-rhizoplane of semiarid grassland. *Applied and Environment Microbiology* 39: 113 – 117.
127. Newman, E.I.. 1985. The rhizosphere: Carbon sources and microbial populations. In A.E. Fitter (ed.), *Ecological Interactions in Soil: Plants, Microbes, and Animals.* pp. 107 – 121. Blackwell Scientific Publications. Boston.
128. Newman, E.I., Campbell, R., Christie, P., Heap, A.J. & R.A. Lawley. 1979. Root microorganisms in mixtures and monocultures of grassland plants. *The Soil-Root Interface.* Edited by J.L. Harley & R. Scott Russell. *New Phytologist* by Academic Press. London. pp. 161-173.
129. Newman, E.I., Heap, A.J., R.A. Lawley. 1981. Abundance of mycorrhizas and root surface microorganisms of *Plantago lanceolata* in relation to soil and vegetation. A multivariate approach. *New Phytol.* 89: 95 – 108.
130. Newman, E.I. & Watson, A.. 1977. Microbial abundance in the rhizosphere: A computer model. *Plant & Soil* 48: 17 – 56.
131. Nicholas, D.P. & Parkinson, D. 1967. A comparison of methods for assessing the amount of fungal mycelium in soil samples. *Pedobiología, Bd. 7: 23-41.*

-
132. Norby, R.J., O'Neill, E.G. & Luxmoore, R.J. 1986. Effects of atmospheric CO₂ enrichment on the growth and mineral nutrition of *Quercus alba* seedlings in nutrient –poor soil. *Plant Physiology* 82: 83-89.
133. Nye, P.H. & Tinker, P.B. 1977. Solute movement in the soil-root system. Univ. Calif. Press, Berkeley.
134. Old, K.M. & Nicholson, T.H. 1975. Electron microscopical studies of the microflora of roots of sand dune grasses. *New Phytol.* 74: 51 – 58.
135. Olson, F.C.W. 1950. Quantitative estimates of filamentous algae. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 69: 272-279.
136. Papavizas, G.C. & Kovacs, M.F.Jr. 1972. Stimulation of spore germination of *Thielaviopsis basicola* by fatty acids from rhizosphere soil. *Phytopathology*, 62, 688.
137. Parkinson, D. 1994. Methods of soil analysis . *Soil Sci. Soc. Am. Book Series. Editor J.M. Bigham. pp. 1121.*
138. Parkinson, D. & Coleman, D.C. 1991. Microbial communities, activity and biomass. *Agric. Ecosystems Environ.* 34: 3-33.
139. Parkinson, D., Taylor, G.S. & Pearson, R. 1963. Studies on fungi in the root region. I. The development of fungi on young roots. *Plant & Soil* 19: 332.
140. Parkinson, D. & Thomas, A. 1965. A comparison of methods for isolation of fungi from rhizospheres. *Canadian Journal of Microbiology*, 1: 1001 – 1008.
141. Parkinson, D. & Williams, S.T. 1951. A method for isolating fungi from soil microhabitats. *Plant & Soil* 13: 347-355.
142. Paul, E.A. & Johnson, R.L. 1977. Microscopic counting and adenosine 5'-triphosphate measurement in determining microbial growth in soils. *Applied and Environmental Microbiology* 34: 263-269.
143. Paul, E.A. & Voroney, R.P. 1980. Nutrient and energy flow through soil microbial biomass. In *Contemporary Microbial Ecology* (eds. D.C. Ellwood, J.N.

- Hedger, M.J. Latham, J.M. Lynch & J.H. Slater), Academic Press, London. pp. 215-237.
144. Paulitz, T.C. & Linderman, R.G. 1991. Mycorrhizal interactions with soil organisms. In: Arora D.K., Raj, B., Mukerji, K.G.; Knudson, G.R. (eds). *Soil and plants. (Handbook of applied mycology, vol 1) Dekker, New York, pp 77 – 129.*
145. Pearson, R. & Parkinson, D. 1961. The sites of excretion of ninhydrin-positive substances by broad bean seedlings. *Plant & Soil 13: 391 – 396.*
146. Persson, T., Bääth, E., Clarholm M., Lundkvist H., Söderström, B.E., Sohlenius B. 1980. Trophic structure, biomass dynamics and carbon metabolism of soil organisms in a Scots pine forest. In: Persson T. (ed). *Structure and function of northern coniferous forests – an ecosystem study. Ecol. Bull. (Stockholm) 32: 419-459.*
147. Peters, N.k. & Verma, D.P.S. 1990. Phenolic Compounds as Regulators of Gene Expression in Plant-Microbe Interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions. Vol 3, N° 1, pp. 4-8.*
148. Peterson, E.A. 1958. Observations on fungi associated with plant roots. *Canadian Journal of Microbiology 4: 257 – 265.*
149. Phillips, J.M. & Hayman, D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans.of British Mycological Society 55: 158-161.*
150. Polonenko, D.R., Dumbroff, E.B., Mayfield, C.I. 1983. Microbial responses to salt-induced osmotic stress. III. Effects of stress on metabolites in the roots, shoots and rhizosphere of barley. *Plant & Soil 73: 211 – 225.*
151. Příklad, Z. & Vančura, V. 1980. Root exudates of plants. VI. Wheat root exudation as dependent on growth, concentration gradient of exudates and the presence of bacteria. *Plant & Soil 57: 69 – 83.*
152. Pugh, G.J.F. 1963. Terrestrial fungi in developing coastal soils, in *Soil Organisms, Doeksen, J. And van der Drift, J., Eds., North-Holland, Amsterdam, 439.*

-
153. Pugh, G.J.F. 1967. Root colonization by fungi. *In: Progress in Soil Biology*, (eds. O. Graff & J.E. Satchell), North Holland, Amsterdam, pp. 21-26.
154. Puppi, G., Azcón, R. & Höflich, G. 1994. Management of positive interactions of arbuscular mycorrhizal fungi with essential groups of soil microorganisms. *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems* (Ed. by S. Gianinazzi & H. Schüepp), pp. 201 – 215. ALS, Birkhäuser, Basel.
155. Rambelli, A. 1973. The rhizosphere of mycorrhizae. *In: Ectomycorrhizae* (Ed. by G.C. Marks & T.T. Kozlowski), pp. 299 – 350. Academic Press, New York.
156. Raper, K.B. & Fennel, D.I. 1965. *The Genus Aspergillus*. Williams & Wilkins Company. Baltimore. USA.
157. Raper, K.B. & Thom, Ch. 1948. *A manual of Penicillia*. Williams & Wilkins Co., Baltimore. New York. USA.
158. Reid, J.B. & Goss, M.J. 1982 . Suppression of decomposition of C¹⁴-labelled plant roots in the presence of living roots of maize and perennial ryegrass. *Journal of Soil Science*, 33, 387-395.
159. Richards, B.N. 1972. *Introduction to the Soil Ecosystem*. Longmans. Harlow.
160. Ritcher, M., Wilms, W. & Scheffer, F. 1968. Determination of root exudates in a sterile continuous flow culture. I. The culture method. *Plant Physiol.* 43: 1741-1746.
161. Rifai, M.A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Pap.* 116: 1-56.
162. Riviere, J. 1960. Etude de la rhizosphere du blé. *Ann. Agron.* 11: 397 – 440.
163. Rohlf, F.J. 1982. A package of Statistical Programs to accompany the text *Biometry*. State University of New York.
164. Rouatt, J.W., Peterson, E.A., Katznelson, H. 1963. Microorganisms in the root zone in relation to temperature. *Can. J. Microbiol.* 9: 227 – 236.
165. Rovira, A.D. 1956. A study of the development of the root surface microflora during the initial stages of plant growth. *J. Appl. Bacteriol.* 19: 72 – 79.

-
166. Rovira, A.D. 1959. Root excretions in relation to rhizosphere effect. IV. Influence of plant species, age of plant, light, temperature and calcium nutrition on exudation. *Plant & Soil* 11: 53 – 64.
167. Rovira, A.D. 1965a. Plant root exudates and their influence upon soil microorganisms. In: Baker, K.F., Snyder, W.C. (eds). *Ecology of soil-borne plant pathogens*. Univ. Calif. Press, Berkeley, pp. 170 – 186.
155. Rovira, A.D. 1969. Plant root exudates. *Botanical Reviews*. 35: 35-58.
168. Rovira, A.D. 1973. Zones of exudation along plant roots and spatial distribution of microorganisms in the rhizosphere. *Pesticide Science*, 4: 361 – 366.
169. Rovira, A.D. 1985. Manipulation of the rhizosphere microflora to increase plant production. In *Reviews of Rural Science 6: Biotechnology and Recombinant DNA Technology in the Animal Production Industries*. Eds. R.A. Leng, J.S.F. Barker, D.B. Adams & K.J. Hutchinson. Pp. 185-197. University New England Press.
170. Rovira, A.D. 1991. Rhizosphere research, 85 years of progress and frustration. In: *The Rhizosphere and Plant Growth* (D. L. Keister and P.B. Cregan, Eds), pp. 3 – 13. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
171. Rovira, A.D. & Davey, C.B. 1974. Biology of the rhizosphere. In *The Plant Root and Its Environment* (E.W. Carson, Ed.), pp. 153 – 204. University of Virginia Press, Charlottesville.
172. Rovira, A.D., Foster, R.C., Martín, J.K. 1979. Note on terminology. Origin, nature and nomenclature of the organic materials in the rhizosphere. *The Soil-Root Interface*. Edited by J.L. Harley & R.Scott Russell. *New Phytologist* by Academic Press, London. pp. 1-4.
173. Rovira, A.D. & Mc Dougall, B.M. 1965. Carbon-14 labelled photosynthate in wheat root exudates. *Nature*. 207: 1104-1105. London.

-
174. Rovira, A.D. & Mc Dougall, B.M. 1967. Microbiological and biochemical aspects of the rhizosphere. *In Soil Biochemistry (A.D. McLaren & G.H. Peterson, Eds)*, pp. 417 – 463. Marcell Dekker, New York.
153. Rovira, A.D., Newman, E.I., Bowen, H.J., Campbell, R. 1974. Quantitative assessment of the rhizoplane microflora by direct microscopy. *Soil Biol. Biochem.* 6: 211 – 216.
156. Sarkar, A.N., Jenkins, D.A. & Wyn Jones, R.G. 1979. Modifications to mechanical and mineralogical composition of soil within the rhizosphere. *The Soil-Root Interface, edited by J.L. Harley & R.Scott Russell. Academic Press.*
157. Sauerbeck, D. & Johnen, B. 1977. Root formation and decomposition during plant growth. *In Soil Organic Matter Studies, vol1, pp. 141-148. Proceedings IAEA/FAO/SSF Symposium, Braunschweig 1976.*
158. Schnürer, J., Clarholm, M. & Rosswall, T. 1985. Fungi, bacteria and protozoa in soil four arable cropping systems. *In: Fungi in arable soil. Their role in carbon and nitrogen cycling. Department of Microbiology. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. Sweden. Sveriges Lantbruksuniversitet, pp. 18.*
159. Schroth, M.N. & Hancock, J.G. 1981. "Selected topics in biological control". *Ann. Rev. Microbiol. vol 35, 453-476.*
160. Schroth, M.N. & Snyder, W.C. 1961. Effect of host exudates on chlamyospore germination of the bean root rot fungus, *Fusarium solani* f. *phaseoli*. *Phytopathology* 77: 1057 – 1061.
161. Scott, F.M., Hamner, K.C., Baker, E. & Bowler, E. 1958. Electron microscope studies of the epidermis of *Allium cepa*. *L. Am. J. Bot.* 45: 449 – 461.
162. Seifert, K.A. 1990. Isolation of filamentous fungi. pp. 21-51. *In: D.P. Labeda (ed.). Isolation of biotechnological organisms from nature. MC Graw-Hill. Publ. Co., New York.*
163. Shay, F.J. & Hale, M.G. 1973. Effect of low levels of calcium on exudation of sugars and sugar derivatives from intact peanut roots under axenic conditions. *Plant Physiol.* 51: 1061 – 1063.

-
164. Sherwood, J.E. & Klein, D.A. 1981. Antibiotic-resistant *Arthrobacter sp.* and *Pseudomonas sp.* responses in the rhizosphere of blue grama after herbage removal. *Plant & Soil* 62: 91 – 96.
165. Simeoni, L.A., Lindsay, W.L. & Baker, R. 1987. Critical iron level associated with biological control of *Fusarium* wilt. *Phyt.* 77: 1057 – 1061.
166. Slater, J.H. 1978. The role of microbial communities in the natural environment. In: *The Oil Industry and Microbial Ecosystems*, Chater, K.W.A. and Somerville, H.J. (eds), Heyden and Son Ltd., pp. 137 – 153.
167. Smith, S.E., Gianinazzi-Pearson, V., Koide, R. & Cairney, J.W.G. 1994. Nutrient transport in mycorrhizas: structure, physiology and consequences for efficiency of the symbiosis. *Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry* (Ed. by A.D. Robson, L.K. Abbott & N. Malajczuk), pp. 103 – 113. Kluwer Academic, Dordrecht.
168. Smith, W. 1976. Character and significance of forest tree root exudates. *Ecology* 57: 324-331.
169. Smith, J.D. 1980. Is biological control of *Marasmius oreades* fairy ring possible?. *Plant Disease*, 64: 348 – 355.
170. Söderström, B.E. 1979. Seasonal fluctuations of active fungal biomass in horizons of a podzolized pine-forest soil in Central Sweden. *Soil Biol. & Biochem.* 11: 149-154.
171. Stenton, H. 1958. Colonization of roots of *Pisum sativum* by fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 41: 74 – 80.
172. Stevenson, F.J. 1982. Humus chemistry. *Wiley-Interscience*. New York.
173. Stolk, A. & Samson, R.A. 1972. The genus *Talaromyces*. Studies on *Talaromyces* and related genera. 2. *Stud. Mycol. Baarn* 2: 1-65.
174. Stotzky, G. & Schenck, S. 1976. Volatile organic compounds and microorganism. *CRC Critical Reviews in Microbiology* 4: 333-382.
175. Sutton, B.C. 1980. The Coelomycetes Fungi Imperfecti with Pycnidia Acervuli and Stromata. *C.M.I. Kew. Surrey. Inghlaterra*.

-
176. Tan, K.H. & Nopamornbodi, O. 1981. Electron microbeam analysis and scanning electron microscopy of soil-root interfaces. *Soil Sci.* 131: 100 – 106.
177. Taylor, G.S. & Parkinson, D. 1961. The growth of saprophytic fungi on root surfaces. *Plant & Soil* 15: 261-267.
178. Thomas, A., Nicholas, D.P. & Parkinson, D. 1975. Modifications of agar film technique for assaying lengths of mycelium in soil. *Nature*, London. 105-205.
179. Thompson, L.K. & Hale, M.G. 1983. Effects of kinetin in the rooting medium on root exudation of free fatty acids and sterols from roots of *Arachis hypogaea* L. "Argentine" under axenic conditions. *Soil Biol. & Biochem.* 15: 125-126.
180. Thompson, G.B. & Drake, B.G. 1994. Insects and fungi on a C₃ sedge and a C₄ grass exposed to elevated atmospheric CO₂ concentrations in open-top chambers in the field. *Plant, Cell and Environment* 17: 1161-1167.
181. Thornton, D.R. 1965. Amino acid analysis of fresh leaf litter and the nitrogen nutrition of some aquatic hyphomycetes. *Canadian Journal of Microbiology*, 11: 657 – 662.
182. Timonin, M.I. & Lochhead, A.G. 1948. Distribution of microorganisms in the rhizosphere root system. *Transactions of the Royal Society of Canada*, 42: 175 – 181.
183. Tisdall, J.M. & Oades, J.M. 1979. Stabilization of soil aggregates by the root systems of ryegrass. *Aust. J. Soil Res.* 17: 429 – 441.
184. Tisdall, J.M. & Oades, J.M. 1982. Organic matter and water-stable aggregates in soils. *J. Soil Sci.* 33: 141 – 163.
185. Toennies, G. & Kolls, J.J. 1951. *Anal. Chem.* 23: p. 823.
186. Trevelyan, W.E., Procter, D.P. & Harrison, J.S. 1950. *Nature* 166: p. 444.
187. Trofymow, J.A., Coleman, D.C. & Cambardella, C. 1987. Rates of rhizodeposition and ammonium depletion in the rhizosphere of axenic oat roots. *Plant & Soil* 97: 333 – 344.
188. Trolldenier, G. 1967. Vergleich zwischen fluoreszenzmikroskopischer Direktzählung, Plattengußverfahren und Membranfiltermethode bei

- Rhizosphärenuntersuchungen. In *Beiträge zur Bodenbiologie* (D. Graff & J.E. Satchell. Eds), pp. 59 – 71. Friedrich Vieweg, Braunschweig.
189. Trolldenier, G. 1971. Einfluss der Kalium und Stickstoffernährung von Weizen auf die Bakterien besiedlung der Rhizosphäre. *Lanw. Forsch.*, vol 2b: 33 – 46.
190. van Veen, J.A., Liljeroth, E., Lekkerkerk, L.J.A. & van de Geijn, S.C. 1991. Carbon fluxes in plant-soil systems at elevated atmospheric CO₂ levels. *Ecol. Appl.* 1: 175 – 181.
191. van Veen, J.A., Merckx, R. & van de Geijn, S.C. 1989. Plant and soil related controls of the flow of carbon from roots through the soil microbial biomass. *Plant & Soil* 115: 179 – 188.
192. van Vuurde, J.W.L., Kruyswyk, C.J., Schippers, B.. 1979a. pp. 229-234. In *Soil-Borne Plant Pathogens*, ed. B. Schippers, W. Gams. London Academic.
193. van Vuurde, J.W.L. & Schippers, B.. 1979b. Bacterial colonization of seminal wheat roots. *Soil Biol. & Biochem.* Vol 12: 59-565.
194. Vančura, V. & Hánzliková, A. 1972. Root exudates of plants. IV. Differences in chemical composition of seed and seedlings exudates. *Plant & Soil* 36, 271 – 282.
195. Vančura, V. 1964 . Root exudates of plants. I. Analysis of root exudates of barley and wheat in their phases of growth. *Plant & Soil* 21, 231 – 248.
196. Vančura, V., Přikryl, Z., Kalachova, L. & Wurst, M. 1977. Some quantitative aspects of root exudation. In *Soil Organisms as Components of Ecosuystems*. *Ecol. Bull. Stockholm* 25: 381 – 386.
197. Vančura, V. 1967. Root exudates of plants. III. Effect of temperature and “cold shock” on the exudation of various compound from seeds and seedlings of maize and cucumber. *Plant & Soil* 27, 319 – 328.
198. Virtanen, A.I., Laine, T. & Hansen, S.V. 1936. Excretion of amino acids from the root nodules of leguminous plants. *Nature (London)* 137:277.
199. Visser, S. & Parkinson, D. 1975. Fungal succession on aspen poplar leaf litter. *Can. Jour. Bot.* 53: 1640-1651.

-
200. von Arx, J.A. 1974. The genera of fungi sporulating in pure culture. 2nd. Ed. Editor: J. Cramer. Vaduz. Alemania.
201. von Arx, J.A. 1981. The genera of fungi sporulating in pure culture. 3th. Ed. Editor: J. Cramer. Vaduz. Alemania.
202. Waid, J.S. 1957. Distribution of fungi within decomposing tissues of rye grass roots. *Trans. of British. Mycolgical. Society* 40: 391-406.
203. Waid, J.S. 1974. Decomposition of roots. In: *Biology of Plant Litter Decomposition*, vol 1, pp. 175 – 211. (C.H. Dickinson and G.J.F. Pugh, Eds.) Academic Press, New York.
204. Wallace, R.H. & Lochhead, A.G. 1950. "Qualitative studies of soil organisms". IX. Amino acid requirements of rhizosphere bacteria". *Can. J. Res. C28*, 1-6.
205. Warren, H.L. & Hommedahl, T. 1973. Fusarium species in roots and soil associated with monoculture of soybeans in Minnesota. *Pl. Dis. Reprtr.* 57: 912-914.
206. Whitfield, F.B., Shea, S.R., Gillen, K.J. & Shaw, K.J. 1981. Volatile components from the rotos of *Acacia pulchella* R.Br. and their effect on *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Australian Journal of Botany* 29: 195-208.
207. Williams, S.T., Parkinson, D. & Burges, N.A. 1965. An examination to several soils. *Plant & Soil* 22: 167-186.
208. Winogradsky, S. 1924. Sur la microflore autochtone de la terre arable. *C.r. hebdom. séanc. Acad. Sci., Paris* 178, 1236 – 1239.
209. Wollum, A.G. II. 1998. Introduction and Historical Perspective. Chapter 1. *Principles and Applications of Soil Microbiology*. D.M. Sylvia, J.J. Fuhrmann, P.G. Hartel, D.A. Zuberer.
210. Zagallo, A.C. & Katznelson, H. 1957. Metabolic activity of bacterial isolates from wheat rhizospheres and control soil. *J. Bacteriol.*, vol 73: 760 – 764.

211. Zycha, H., Siepmann, R. & Linnemann, G. 1969. Mucorales. Eine Beschreibung aller Gattungen und Arten dieser Pilzgruppe. pp. 355. Lehre: J. Cramer.

Anexos

Medios de cultivo, soluciones y fijadores para muestras

Agar-agua (AA): agar 15 gr; agua destilada 1000 cm³.

Agar extracto de malta (ME): extracto de malta 12,5 gr; agar 15 gr; peptona 3,9 gr; agua destilada 1000 cm³.

Agar papa glucosado (APG): papa 300 gr; glucosa 10 gr; agar 15 gr; agua destilada 1000 cm³.

Czapek Dox Agar (Cz): NO₃Na 3 gr; PO₄HK₂ 1gr; SO₄Mg 0,5 gr; ClK 0,5 gr; SO₄Fe.7H₂O solución al 1% 1 ml; sacarosa 30 gr; agar 15 gr; agua destilada 1000 cm³.

Solución de antibióticos: estreptomicina 0,5 gr; clorhidrato de tetraciclina 0,25 gr; agua destilada 100 ml. Se incorpora 1 ml cada 100 ml de medio.

Fijador de Bouin-Hollander: ácido picrico saturado 75 ml; formaldehído (solución al 40%) 25 ml; ácido acético glacial 5 ml.

Solución nutritiva Hewitt: NO₃K (3,03%) 5 ml; (NO₃)₂Ca (7,08%) 10 ml; SO₄Mg.7H₂O (1,84%) 10 ml; EDTA Fe (II), (0,25%) 5 ml; SO₄Mn.7H₂O (0,22%) 0,5 ml; SO₄Cu.5H₂O (0,24%) 0,05 ml; SO₄Zn.2H₂O (0,29%) 0,05 ml; BO₃H₃ (1,86%) 0,05 ml; (NH₄)Mo₇O₂₄.4 H₂O (0,03%) 0,05 ml; agua destilada 970 cm³. Se agrega 0,060 gr PO₄H₂K por litro de solución. Se ajusta el pH a 7 con una solución de NaOH 10%.

Solución nutritiva Přikryl & Vančura (1980): 0,333 gr (NO₃)₂Ca; 0,040 gr SO₄Mg; 0,063 gr NO₃K; 0,060 gr PO₄H₂K, 0,00025 gr (SO₄)₃ Fe; 0,0001 gr SO₄Zn; 0,0001 gr BO₃H₃; agua destilada 1000 cm³. El pH de la solución es ajustado luego de la esterilización a pH 7,2-7,4.

Identificación taxonómica de las especies fúngicas

Para la identificación de la micoflora presente en las distintas muestras se consultó entre otros: Barron, 1972; Booth (1966, 1971); Domsch et al., 1980; Ellis (1971, 1976); Hawksworth et al., 1995; Raper & Fennel, 1965; Raper & Thom, 1948; Rifai, 1969; Stolk & Samson, 1972; Sutton, 1980; Von Arx (1974, 1981); Zycha, 1969.

Reactivos para revelado de cromatogramas

Reactivos para revelado de hidratos de carbono

Reactivo de difenilamina-alanina: 4 gr de anilina; 4 gr de difenilamina y 20 ml de ácido fosfórico (85%) en 200 ml de acetona.

Revelador nitrato de plata en NaOH (Trevelyan et al., 1950):

Se diluye 0,1 ml de solución saturada de nitrato de plata formado por adición de la mínima cantidad de agua. Los cromatogramas se sumergen en dicha solución y se secan a temperatura ambiente y se pulverizaron con solución de NaOH 2N en etanol 50%. Los azúcares reductores, polialcoholes y aminoazúcares aparecen como manchas de color marrón oscuro. El exceso de óxido de plata se remueve por inmersión en una solución acuosa de tiosulfato de sodio 5%. La cantidad mínima detectable de azúcares reductores es de 2 – 20 µgr.

La solución saturada de AgNO₃ se prepara con H₂O casi hirviendo y luego se deja enfriar con hielo.

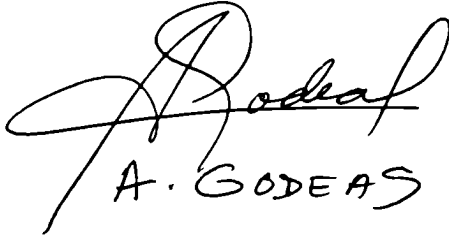
Reactivo de ácido sulfúrico en etanol:


Reactivos para revelado de aminoácidos

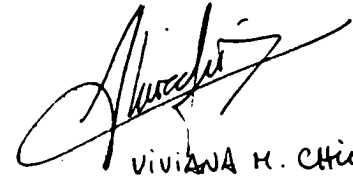
Reactivo de ninhidrina (Toennies & Kolls, 1951): solución de ninhidrina 0,25 % p/v en acetona, conteniendo 0,01% de piridina. Los cromatogramas se calientan a 100°C por 10 minutos. Los compuestos aminados presentan una coloración púrpura.

Reactivo sulfato cérico (Mo/Ce): SO₄H₂ 10%; (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O 0,04 M; Ce(SO₄)₂ 3 mM. Los cromatogramas se calientan a 200°C hasta la aparición de manchas de color azul.

Reactivo de Bradford (1976) para detección de proteínas: 40 mg de Coomasie Brilliant Blue G 250 + 50 ml etanol + 100 ml ácido fosfórico 85%. Llevar a 1000 cm³ con agua destilada.


A. GODEAS


C. MARINO


VIVIANA H. CHIOCCHIO