

# Dirección General de Educación Superior Tecnológica

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE LA ZONA MAYA

Aislamiento y reproducción de hongo micorriza arbuscular  
(*Glomus intraradices*) en plantas de maíz (*Zea mays*).

Informe final de residencia que presenta el c:

Enrique Sosa Matías

Número de control:

09870069

Carrera:

Ingeniería en Agronomía

Juan Sarabia Quintana Roo

Enero 2014



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

SEP

## INSTITUTO TECNOLÓGICO DE LA ZONA MAYA

El Comité de revisión para Residencia Profesional del estudiante de la carrera de Ingeniero Agrónomo, Tec. Enrique Sosa Matías; aprobado por la Academia del Instituto Tecnológico de la Zona Maya integrado por; el asesor interno M.C Laura Isabel Sansores Lara, el asesor externo el M.C Pablo Santiago Sánchez Azcorra y el revisor el ING. José Antonio Santamaría Mex; habiéndose reunido a fin de evaluar el trabajo "Aislamiento y reproducción de hongo micorriza arbuscular (*Glomus intraradices*) en plantas de maíz (*Zea mays*)".

Que presenta como requisito parcial para acreditar la asignatura de Residencia Profesional de acuerdo al Lineamiento vigente para este plan de estudios, dan fé de la acreditación satisfactoria del mismo y firman de conformidad.

### ATENTAMENTE


Asesor Interno

  
\_\_\_\_\_  
M.C. Laura Isabel Sansores Lara.

Asesor Externo

  
\_\_\_\_\_  
M.C. Pablo Santiago Azcorra Sánchez.

Revisor

  
\_\_\_\_\_  
ING. José Antonio Santamaría Mex.

Juan Sarabia, Quintana Roo, Junio, 2014.

CONTENIDO	pagina
1) OBJETIVOS. ....	5
2) JUSTIFICACIÓN ACADEMICA. ....	6
3) INTRODUCCIÓN. ....	8
3.1 planteamiento del problema.	
4) ANTECEDENTES. ....	12
4.1 Las micorrizas	
4.2 Definición de micorriza.	
4.3 Tipos de micorrizas.	
4.4 Clasificación de las micorrizas.	
4.5 Evolución de las micorrizas arbusculares.	
4.6 Las micorrizas arbusculares.	
4.7 Utilización y efectividad de las micorrizas vesículo - arbusculares.	
4.8 Importancia de las micorrizas.	
4.9 Proceso de infección de la micorriza.	
4.10 función de las micorriza	
5) MATERIALES Y MÉTODOS. ....	19
5.1 Material a utilizar en aislamiento y reproducción.	
5.2 Metodología a seguir en aislamiento de micorrizas arbusculares	
5.3 Pasos a seguir en la preparación del medio de cultivo.	
5.4 Preparación de interface con las esporas.	
5.5 Pasos a seguir de la interface.	
5.6 Aislamiento de micorriza arbuscular ( <i>Glomus intraradices</i> ).	
5.7 Aislamiento en cajas petri.	
5.8 Aislamiento en tubos de ensayo.	
5.9 Pasos a seguir en aislamiento.	
5.10 Metodología en la reproducción de hongos micorriza en plantas de maíz.	
6) RESULTADO Y DISCUSIONES. ....	31
7) CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES. ....	33

**Lista de figuras** **pagina**

**Figura 1: Elaboración de las interfaces químicas..... 22**

**Figura 2: esporas examinadas de la interface MAT1..... 24**

**Figura 3: Primer aislamiento donde se compararon las interfaces..... 25**

**Figura 4: segundo aislamiento para comprobar el método de siembra..... 26**

## 1. OBJETIVOS

### Objetivo general

- Reproducir el hongo micorriza de la especie (***Glomus Intraradices***) en plantas de maíz (***Zea Mays***).

### Objetivos específicos

- Aislar al hongo micorriza en un medio de cultivo comercial tipo sabouraud a base de un biofertilizante comercial para su estudio.
- Inocular las esporas del hongo micorriza arbuscular en semillas de maíz para su multiplicación.

## 2. JUSTIFICACION ACADEMICA.

Con el objetivo de cumplir con los requisitos para la titulación de la carrera de ingeniería en agronomía el cual marca el curso, por tal motivo se llevó a cabo en el **INSTITUTO TECNOLÓGICO DE LA ZONA MAYA (ITZM)**, específicamente en el laboratorio de control biológico. Ubicado en el Ejido Juan Sarabia municipio de Othón P. Blanco del Estado de Quintana Roo el proyecto de residencia profesional que lleva por título: **Aislamiento y reproducción de hongo micorriza arbuscular (*Glomus intraradices*) en plantas de maíz (*Zea mays*).**

La residencia profesional es necesaria como futuro profesionalista en el campo de la Ingeniería en agronomía ya que se adquiere la experiencia necesaria para utilizar en un futuro, esta servirá ya que en un futuro al integrarme, al área laboral se requiere de toda esta experiencia adquirida, Ya que será en el ámbito laboral donde se verá reflejado el conocimiento adquirido en los años de estudio en el plantel, También cabe mencionar que la aplicación de los conocimientos que con el paso del tiempo obtuve en las diferentes prácticas y materias que fueron impartidas serán los cimientos de mi formación como ingeniero en agronomía, ya que algún día Será necesaria la aplicación de gran parte de los conocimientos adquiridos en el instituto, a lo largo de mi formación como Ingeniero.

Por ultimo sobre la justificación de mayor importancia en mi investigación es la influencia que ejercen las micorrizas en la planta que puede ser usado como alternativa en la fertilización de los cultivos para poder generar una visión entre los productores que los hongos micorrizas son una alternativa viable de bajo costo que mejorar y proteger sus cultivos.

En este sentido se profundizó en las investigaciones tanto a nivel laboratorio como en campo de tal forma que el uso y aplicación pueda ser considerada como una alternativa de fertilización. Es necesario tener disponible los insumos en la producción agrícola, el contar con una colección de esporas de hongos micorrizas nos servirá para ser utilizada en los cultivos, al mismo tiempo que se reproducen las micorrizas, las cuales pueden ser comercializadas una vez finalizado el ciclo productivo del cultivo.

### 3. INTRODUCCIÓN

El desarrollo económico y social de las poblaciones conlleva a la necesidad de mejorar los sistemas de abastecimiento de alimentos. Por un lado, el desarrollo agrícola y pecuario demanda un incremento en la producción con el objeto de obtener mayores ganancias, y satisfacer, al mismo tiempo, los requerimientos nutricionales necesarios de la población. Esto ha requerido del uso de agroquímicos con el propósito de aumentar la producción. El manejo en las prácticas de la aplicación de agroquímicos puede ocasionar serios problemas a la salud de la población ocupacionalmente expuesta.

(<http://www.rlc.fao.org/es/publicaciones/agricultura-organica>)

La agricultura orgánica sostenible, plantea desafíos nuevos a los países y sus instituciones especialmente en la posibilidad de contribuir a la calidad del medio ambiente, la generación de ingresos y la seguridad alimentaria. En la actualidad en los países europeos y de América Latina, existe una alta demanda por los productos orgánicos (Fraire, 2002).

El cultivo de maíz es un producto agroindustrial que presenta buena aceptación y demanda. En los últimos años los productores han sufrido pérdidas en las plantaciones debido a los elevados costos de insumos, bajo nivel tecnológico, deficiencia de nutrimento en las plantaciones, altas incidencias de plagas y enfermedades dañinas (Barreras, 2007).

En la actualidad es necesario buscar tecnologías nuevas e innovadoras que estén al alcance de los productores, que permitan minimizar costos de producción e incrementar la productividad del cultivo mediante la agricultura alternativa y reactivar las plantaciones mediante la reconversión de maíz tradicional a la producción orgánica competitiva. (<http://www.fao.org/3/a-w2698s.pdf>)

Se denomina micorriza a los órganos formados por la raíz de una planta y el micelio de un hongo (*myces-rhiza*). Se realiza por simbiosis de tipo mutualista. Funciona como una extensión del sistema



radical y permite absorción de nutrientes de poca movilidad en el suelo como P, N, Zn, y Cu.  
(<http://www.izt.uam.mx/cosmosecm/MICORRIZAS.html>)

Esta asociación es utilizada por la mayor parte de las plantas vasculares y puede ser utilizada como una alternativa viable en la agricultura orgánica sustentable, el utilizar micorrizas como un biorregulador de crecimiento permite que la planta absorba nutrientes no asimilables y a bajas concentraciones en el suelo a cambio la planta aporta hidratos de carbono y vitaminas al hongo. Esta simbiosis genera beneficio a los productores que lo utilizan, ya que la aplicación de fertilizante será menor, reduciendo los costos en la producción y dejando libre su producto de químicos contribuyendo con el medio ambiente.

(<http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/revista/81/pdfs/micorriza.pdf>)

La influencia de estos hongos en el crecimiento de las plantas afecta también su interacción con otros microorganismos tanto benéficos como patógenos. La colonización de las raíces por los hongo micorriza arbuscular (HMA) cambia en la planta aspectos relacionados con su fisiología como es la fotosíntesis, la producción de fitohormonas (citocininas y giberelinas) en la rizosfera.

(<http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/revista/81/pdfs/micorriza.pdf>)

El microambiente de la rizosfera y los organismos que la habitan, son diferentes al resto del suelo de la micorrizosfera, que es la zona de influencia por la micorriza arbuscular (MA), su comunidad microbiana es diferente al resto, ya que los hongos usan parte de los exudados y así modifican las funciones de la raíz.

(<http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/revista/81/pdfs/micorriza.pdf>)

Entre los beneficios que generan las micorrizas se pueden clasificar en 5 categorías:

- Inducen relaciones hormonales que producen que las raíces alimentadoras permanezcan fisiológicamente activas por periodos mayores que las raíces no micorrizadas.
- Incrementan la tolerancia de las plantas a temperatura del suelo y acidez extrema causada por la presencia del Al, Mg y S.
- Incrementa la captación de las plantas de agua y nutrientes como P, N, K, Ca del suelo.
- Proveen protección contra ciertos hongos patógenos y nematodos.
- Incrementa el área fisiológicamente activa en las raíces.

(<http://www.monografias.com/trabajos72/micorrizas-alternativa-ecologicaagricultura-sostenible/micorrizas-alternativa-ecologica-agricultura-sostenible2.shtml>)

### 3.1 Planteamiento del problema

Se ha observado en diferentes investigaciones que la planta de maíz responde efectivamente a la simbiosis del hongo micorriza sobre todo la especie (*Glomus intraradices*). (<http://www.siac.org.mx/fichas/19%20Tamps%20Sorgo%20VF.pdf>)

Es por esto que se propone como cultivo trampa para determinar si la simbiosis con la planta anfitrión maíz es positiva logrando la multiplicación de las esporas en la rizosfera de la planta.

El hongo arbuscular se sabe que es un organismo de simbiosis obligada y necesita de una planta para poder sobrevivir, Se determinara cuánto tiempo duran las esporas vivas del hongo en un medio comercial a una temperatura ambiente, verificando que el hongo aislado puede ser usado para inoculo en muchas otras plantas logrando tener la efectividad deseada.

Con esto se pretende mitigar en gran medida los daños ocasionados con la excesiva fertilización de los cultivos en especial en el cultivo maíz, pero al mismo tiempo producir alimento suficiente para la comunidad reduciendo en gran medida los costos en la fertilización siendo esto una actividad productiva sustentable y amigable con el medio ambiente.

## **4. ANTECEDENTES**

### **4.1. Las micorrizas.**

Se conoce con el nombre de micorriza a la asociación mutualista establecida entre las raíces de la mayoría de las plantas y ciertos hongos del suelo. Se trata de una simbiosis prácticamente universal, no sólo porque casi todas las especies vegetales son susceptibles de ser micorrizadas sino también porque puede estar presente en la mayoría de los hábitats naturales.

Las micorrizas son tan antiguas como las propias plantas y se conoce su existencia desde hace más de cien años; estimándose que aproximadamente el 95% de las especies vegetales conocidas establecen de forma natural y constante este tipo de simbiosis con hongos del suelo (Hernández, 2001).

### **4.2 Definición de Micorriza.**

Etimológicamente, la palabra se ha formado del término griego “mykos” (hongo) y del vocablo latino “Rhiza” (raíz). El término micorriza, cuyo significado literal es hongo - raíz, se aplicó por primera vez a las asociaciones que se establecen entre plantas terrestres y determinados hongos del suelo, siendo descrito por el patólogo alemán Albert Bernard Frank en 1885 (Frank, 1885).

### **4.3 Tipos de micorrizas.**

Las plantas terrestres en su mayoría presentan micorrizas, y lo más probable es que las restantes descendan de plantas micorrizadas que han perdido secundariamente esta característica. En el caso de los hongos, la mayor parte de las 5000 especies identificadas en las micorrizas pertenece a

la división Basidiomycota, mientras que en casos más excepcionales se observan integrantes de Ascomycota. La tercera división que se ha observado formando micorrizas es Glomeromycota, un grupo que, de hecho, sólo se conoce en asociación micorrizógena y cuyos integrantes mueren cuando se le priva de la presencia de raíces.

<http://es.wikipedia.org/wiki/Micorriza>

#### **4.4 Clasificación de las micorrizas.**

Los hongos micorrizógenos es uno de los microorganismos beneficiosos más estudiados y empleados en la actualidad. Son tantas las especies, cepas existentes, y tan diversas sus formas de actuar en la planta y en el suelo, que se puede asegurar que están presentes en casi todas las especies vegetales y los suelos agrícolas existentes en el mundo. Estos microorganismos, que por naturaleza son microorganismos del suelo, el hombre ha logrado aislarlos y reproducirlos de manera vertiginosa, convirtiéndolos en un gran aliado del productor y de personas que lo emplean para diferentes fines y propósitos naturales y ecológicos.

(<http://www.monografias.com/trabajos-pdf2/tipos-mico>)

Existe una amplia gama de interrelaciones entre especies de microorganismos en los ecosistemas, tales como sinérgicas, antagónicas, de competencia física y bioquímica, moduladas por múltiples y complejos factores bióticos y abióticos. En la rizosfera, uno de los principales sitios donde se presentan microorganismos, específicamente, funcionales, como fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fosfatos, promotores del crecimiento vegetal, biocontroladores y especies patogénicas, normalmente, compiten por el espacio y por nutrientes. Estas interrelaciones entre microorganismos inciden en la interacción suelo-planta-microorganismos-ambiente y repercuten, de forma directa, en el crecimiento y en el desarrollo de las especies vegetales.

(<http://www.monografias.com/trabajos-pdf2/tipos-mico>)

Se pueden distinguir tres grupos fundamentales según la estructura de la micorriza formada: Ectomicorrizas o formadoras de manto; Ectendomicorrizas, que incluye Arbutoides y Monotropoides;

y las Endomicorrizas, caracterizadas por la colonización intracelular del hongo, y que a su vez se subdividen en Ericoides, Orquidoides y Arbusculares (Read, 1999).

#### **4.5 Evolución de las micorrizas arbusculares**

Se estima que cerca de un 95% de las especies de plantas superiores pertenece a familias característicamente micotróficas, es decir que se asocian con hongos (Trappe, 1987), pero existen abundantes reportes de micorrizas arbusculares que ocurren también en pteridofitas (helechos) y en plantas no vasculares como las briofitas sensu lato (briofitas en sentido laxo) (Scagel *et al.*, 1982; Brown, 1982; Bonfante-Fasolo, 1984), lo cual indica que la micotrofia pudo haberse desarrollado tempranamente en la evolución vegetal confiriendo a las plantas ventajas adaptativas importantes. Tres hipótesis apoyan esta aseveración:

- a) Las micorrizas causadas por ascos y basidiomicetos son un tipo de simbiosis más avanzada que la formada por los zigomicetos, ya que se encuentra más tardíamente en el registro fósil y se relaciona con taxa de hospederos más avanzados;
- b) La capacidad de las plantas para establecer o no la asociación con el hongo, es decir de ser micotróficas facultativas, se presenta principalmente en vegetales con un tipo de raíz “graminoide” que exhibe un buen desarrollo de pelos radicales y ausencia frecuente de colonización fúngica;
- c) Las plantas vasculares terrestres evolucionaron a través de asociaciones tróficas con hongos primitivos y actualmente están progresando evolutivamente mediante otros tipos de asociaciones fúngicas más avanzadas hacia una independencia final del hongo (Trappe, 1987).

#### **4.6. Las micorrizas arbusculares**

El tipo de asociación hongo-raíz más extendido en la naturaleza tal vez sea la llamada endomicorrizas o micorriza arbuscular, formada por ciertos zigomicetos, los cuales no desarrollan red de Hartig y colonizan intracelularmente la corteza de la raíz por medio de estructuras especializadas denominadas arbusculos, que actúan como órganos de intercambio de nutrimentos entre la célula vegetal y el huésped. Algunos géneros de estos hongos forman también otro tipo de estructuras

llamadas vesículas, compuestas principalmente por lípidos. Estas vesículas están presentes intercelularmente en la corteza de la raíz y se consideran reservorios de nutrimentos para el hongo. La presencia tanto de arbusculos como de vesículas dio lugar a que la simbiosis se conociera originalmente como vesículo-arbuscular (V-A), sin embargo, no todas las especies de hongos forman vesículas, por lo que en la actualidad la asociación se conoce como micorriza arbuscular (MA).

(<http://www.redalyc.org/pdf/104/10414307.pdf>).

#### **4.7. Utilización y efectividad de las micorrizas vesículo - arbusculares**

La utilización de las micorrizas como biofertilizante no implica que se pueda dejar de fertilizar, sino que la fertilización se hace más eficiente y puede disminuirse la dosis a aplicar desde comúnmente 50 - 80 % y en ocasiones hasta un 100 %. Se plantea que de las cantidades de fertilizantes aplicadas, sólo se aprovecha un 20 %, y el resto normalmente se filtra o se lixivia sin remedio; con la aplicación de las micorrizas, puede ser recuperado por las plantas un porcentaje mucho mayor; ya que un pelo radical, puede poner a disposición de una raicilla, los nutrientes y el agua que se encuentra hasta 2 mm de la epidermis, las hifas del micelio extra mátrico de las MVA pueden hacerlo hasta 80 mm, lo que representa para la misma raicilla la posibilidad de explorar un volumen de suelo hasta 40 veces mayor (Pérez *et al.*, 2000).

El beneficio reportado por el uso de las asociaciones micorrízicas vesículo – arbusculares en el crecimiento de las plantas resulta espectacular, particularmente en suelos tropicales, deficientes en fósforo (P) asimilable y en donde el potencial de explotación de éstas es mucho mayor que en regiones de clima templado (Fredeen *et al.*, 1989; Sieverding, 1991).

#### **4.8 Importancia de las micorrizas**

Las micorrizas cumplen una función esencial en el ecosistema terrestre, desempeñando una serie de funciones para la salud de muchas plantas y cultivos. La función del hongo es colonizar biográficamente la corteza de una raíz determinada, sin causarle daño alguno, sino que se integra llegando a formar parte de ella. A su vez, el hongo también coloniza el suelo que rodea la raíz

mediante su micelio externo, de manera que ayuda al huésped a adquirir nutrientes minerales y agua. Aunque la simbiosis hongo – planta se encuentra muy extendida en todo el ecosistema terrestre, ya que el 90- 95% de las plantas superiores se encuentran micorrizadas; la degradación del planeta, el uso indiscriminado de sustancias químicas por el hombre, las actividades agrícolas como la labranza, la aplicación indiscriminada de fertilizantes y de agroquímicos etc., producen severas alteraciones en las micorrizas y su funcionamiento (Johnson y Pflieger, 1992)

La producción a gran escala de inóculos de hongos MA se inició en los años 80 – 90s, habiendo en la actualidad un amplio número de compañías registradas para este fin en todo el mundo (Dalpe y Monreal, 2003). Los sistemas de producción han evolucionado considerablemente en los últimos años, de tecnologías relativamente simples a otras más complejas, como los métodos *in vitro*. Actualmente, el inóculo es producido para propósitos comerciales de diversas maneras.

#### **4.9 Proceso de infección de la micorriza**

La infección o colonización de una raíz por parte de un hongo micorrizógeno es un proceso que involucra una secuencia de etapas reguladas de una precisa interacción entre endosimbionte y hospedero. La pre-infección está asociada a la actividad de los propágulos infectivos presentes en el suelo que circunda la raíz. Dichos propágulos pueden ser esporas o micelios fúngicos. Este último, generalmente se encuentra vinculado a raicillas de plantas vivas o segmentos de raíz infectada.

<http://www.agro.uba.ar/agro/ced/microbiologia/clases/micorrizas/clases/clase3.htm>

La penetración se inicia con la formación de un “punto de entrada” que se caracteriza por el desarrollo de un abultamiento o apresorio en el punto de contacto sobre la superficie de la raíz. Cada espora genera un solo punto de entrada, mientras que un segmento de raíz puede eventualmente generar más de uno. No es del todo claro si el mecanismo de penetración está mediado por un evento enzimático, por un evento mecánico o por una combinación de ambos.

<http://www.agro.uba.ar/agro/ced/microbiologia/clases/micorrizas/clases/clase3.htm>

Una vez que penetre el hongo se asegura un proceso proliferativo que conduce al establecimiento de una unidad de colonización que se puede extender hasta un centímetro de distancia a partir del punto de penetración. El avance de la infección está restringido a la epidermis y el parénquima



cortical. La unidad de colonización avanza mediante el crecimiento de hifas aseptadas que se extienden por entre las células corticales y que generan estructuras características como los arbuscúlos y las vesículas. Algunas semanas después iniciada la infección, el hongo está en condiciones de esporular, lo cual supeditado a las condiciones ambientales del suelo en particular la humedad parece ser un factor regulador de importancia, ya que se ha visto que el estrés hídrico en el suelo dispara la esporulación (Guerrero, *et al.*, 1996)

#### **4.10. Función de las micorrizas**

En esta simbiosis de tipo mutualista, el hongo suministra a la planta compuestos inorgánicos (sales minerales) que esta necesita para su nutrición (micotrofia) y la planta aporta al hongo heterótrofo los compuestos orgánicos. Por este motivo, las micorrizas desarrollan un papel fundamental en el desarrollo y mantenimiento de muchos ecosistemas, por lo que se puede encontrar en todos los suelos y en todos los climas terrestres. Debido a la función que ejercen las micorrizas, como protectoras de los cultivos, es posible reducir los fertilizantes y los fitofármacos en aquellas plantas que las posean. (<http://www.tusplantas.com/contenidos/diseño/index.cfm?p=2>), (<http://www.mailxmail.com/curso/vida/jardines/capitulo19.ht>)

El establecimiento de estas asociaciones implica la creación de fuertes interdependencias, tanto es así que el hongo pasa a ser una parte más del sistema radical, tan perfectamente integrado en el mismo que se ve muy dificultado o incluso imposibilitando su desarrollo sin el curso de su planta hospedadora, y esta puede tener un rango de dependencia del hongo, que va desde absoluto hasta relativo en mayor y menor grado (<http://www.encuentros.uma.es/encuentros55/micorrizas.html>).

Las MA se encuentran en la mayoría de suelos, aunque no necesariamente puede existir esta perfecta simbiosis en los vegetales. Para que este notable el fenómeno se produzca en plenitud, es necesario favorecer al hongo permitiendo que sus esporas colonicen las raíces de las plantas. Los implementos de labranza sacuden al suelo y lo dejan expuesto a la luz solar y a la deshidratación, lo que termina por destruir las esporas del hongo y su ambiente

(<http://www.unne.edu.ar/cyt/2002/05-agrarias/A-049.pdf>).

Los factores que afectan la respuesta de las plantas a la colonización por hongos micorríticos incluyendo la dependencia del cultivo huésped de micorrizas, el estado de nutrientes del suelo, y el

inoculo potencial de estos microorganismos. Las prácticas de manejo de cultivo, la rotación y el barbecho pueden afectar a las poblaciones de hongos micorríticos adversamente en el campo (<http://www.unne.edu.ar/cyt/2002/05-agrarias/A-049.pdf>).

La mejor forma de estimular esta acción simbiótica es dejar al suelo siempre protegido con cubierta vegetal, lo que se logra dejando de labrar y manejando eficientemente los rastrojos, muchas veces es preferible ofrecer al suelo mejores condiciones ambientales que forzar su inoculación con individuos benéficos. Donde el potencial de inóculo nativo es bajo o ineficaz, las estrategias de inoculación pueden ser útiles

(<http://www.unne.edu.ar/cyt/2002/05-agrarias/A-049.pdf>)

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Material a utilizar en aislamiento y reproducción.

- Medio de cultivo tipo sabouraud.
- Balanza digital.
- Pala.
- Agua purificada.
- Matraz Erlenmeyer.
- Plancha de laboratorio y agitador magnético.
- Cajas Petri y Tubos de ensayo.
- Autoclave y placa calefactora.
- Esporas de micorrizas (glomus intraradices).
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml.
- Agua esterilizada.
- Tween 80.
- Solución de sacarosa al 72%
- Micropipeta de 20 a 200  $\mu$ l.
- Mechero.
- Alcohol al 70 % y Cloro al 5 %
- Haza de siembra de cristal.
- Vaso precipitado 250 ml.
- 3 cajas Petri.
- 10 tubos de ensayo.
- Biofertilizante a base de HMA.
- Sustrato y Semillas de maíz.

## **5.2 Metodología a seguir en aislamiento de micorrizas arbusculares.**

El experimento se realizó entre los meses de abril y junio del 2014 en el laboratorio de control biológico en el Instituto Tecnológico de la Zona Maya (**ITZM**) Ubicado en el km 21 carretera federal Escárcega –Campeche, en el ejido Juan Sarabia, en el estado de Quintana Roo.

Para realizar el aislamiento de la cepa (***Glomus intraradices***) se elabora una interface con las esporas obtenidas de polvo rizosférico y raíces molidas de un biofertilizante comercial, para ser inoculadas en un medio de cultivo comercial a base de agar y peptonas, para esto se tendrá que realizar la preparación del medio así como la esterilización del mismo, igualmente del material a utilizar en el aislamiento.

El objetivo principal en el aislamiento es identificar y analizar las esporas en el microscopio mediante, la estructura y su coloración. También se podrá descubrir el tiempo de vida del hongo en el medio de cultivo sin presencia de la planta anfitrión (host). Para el aislamiento y la reproducción de esporas endomicorrizas arbusculares se utilizó el método de tamizado y decantación del manual de agro microbiología (Ferrera-Cerrato *et al.*, 1993). Con una pequeña modificación, ya que el material biológico o cepa a reproducir no se aisló de un suelo con hongos nativos de ningún cultivo, facilitando el no tener que realizar el muestreo ni tampoco el tamizado de las muestras haciendo más fácil el aislamiento.

### **5.3 Pasos a seguir en la preparación del medio de cultivo.**

Paso 1.- Llenar el matraz con 500 ml de agua purificada y agregar 1ml de germicida.

Paso 2.- Pesar el medio de cultivo en la báscula aproximadamente 32.5 gramos luego agregar el medio y el agua homogenizar moviendo el matraz en círculos.

Paso 3.- Conectar la plancha, luego poner el matraz sobre la plancha y agregar la mosquita cubriendo con el algodón la boquilla. Dejar que se homogenice de 10 a 12 R.P.M y que caliente a 200 grados centígrados hasta en contra su punto de ebullición. Es importante no dejar más tiempo ya que esto podría generar que se caramelice el medio de cultivo.

Paso 4.- Se retira de la plancha el medio dejando reposar previamente se mete a la autoclave para su esterilización, luego es dosificado en cristalería previamente desinfectada, dejar que el medio solidifique para su próxima utilización.

#### 5. 4 Preparación de *interface con las esporas.*

El objetivo de la preparación de la interface química fue de dispersar las esporas lo más posible por la interface, para que las esporas floten por la solución mientras el sedimento cae al fondo del matraz para poder extraer las esporas con la micro pipeta y así poder germinar las mismas en un medio de cultivo estéril y sólido. Se realizó una prueba para determinar que interface daba un mayor rango de colonización en el medio de cultivo, para esto se determinó realizar dos interfaces químicas para poder comprobar en cual existe un mejor germinación de las esporas.



Figura 1: Elaboración de las interfaces químicas.

## 5.5 Pasos a seguir de la interface:

- Agregar las esporas al matraz Erlenmeyer previamente esterilizado aproximadamente dónde se marca los 70 ml.
- Agregar 50 ml de agua esterilizada para homogenizar la interface, también se vierte 50 ml de solución de sacarosa al 72% en la interface.
- Con la plancha y el agitador magnético colocado en el matraz se mezcla la interface de 9 a 10 R.P.M, este proceso es necesario ya que las esporas se obtendrán de un biofertilizante en polvo y es necesario separar las esporas del sedimento para que se dispersen por toda la solución.
- Por último se deja reposar la solución en un periodo de 24 a 48 horas a temperatura ambiente, para que el sólido se asiente y las esporas se dispersen por el medio líquido para su próxima extracción.

## 5.6 Aislamiento de micorriza arbuscular (*Glomus intraradices*).

Se realizó el aislamiento en el medio de cultivo, se requiere de la mayor higiene posible, tanto en las áreas del laboratorio, al igual que en el lugar donde se realizara la inoculación, así como del material a utilizar, ya que la contaminación del medio de cultivo puede ser un factor que retrase el aislamiento.

El aislamiento fue realizado con las interfaces químicas elaboradas a base del biofertilizante comercial, cabe mencionar que estas interfaces fueron examinadas bajo el microscopio con los objetivos secos 20 X, 40X Y 60X. Se realizó la observación de las dos interfaces químicas con el objetivo de observar el crecimiento de las esporas en un medio líquido y para determinar si existe germinación en las esporas en el medio líquido.

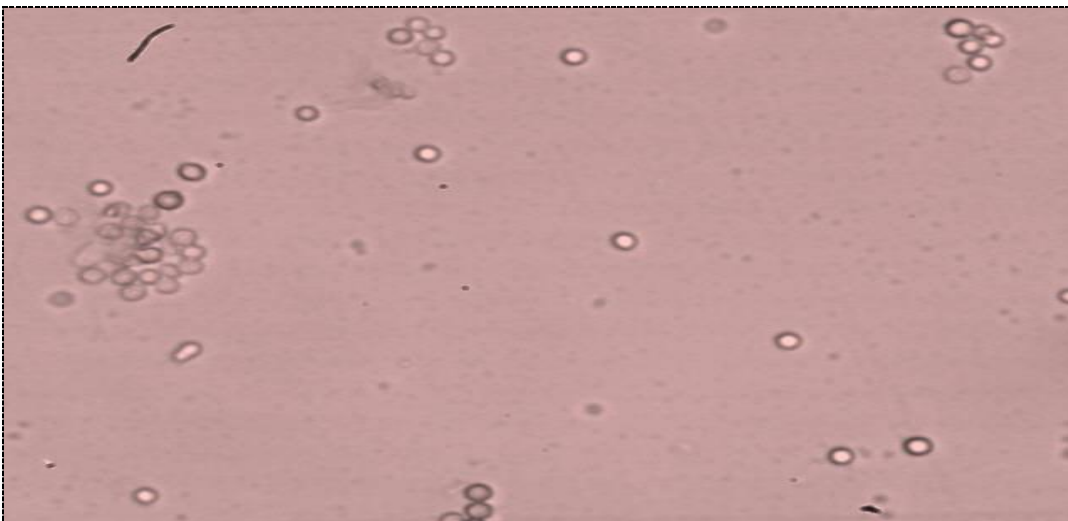


Figura 2: esporas examinadas de la interface MAT1



## 5. 7 Aislamiento en cajas petri.

Para poder realizar el aislamiento e inoculación del medio de cultivo con las esporas para su germinación se extrae a aproximadamente 20  $\mu$ l de la interface previamente preparada para esto se preparó la interface en 2 matraz Erlenmeyer de 250 ml a los cuales se le asignaron las claves MAT1 Y MAT2, que se refieren a micorrizas arbusculares tipo 1 y micorrizas arbusculares tipo 2, esto no quiere decir que sea dos especies diferente de micorrizas sino que hace referencia del tipo de método a utilizar en su elaboración.

También servirá para poder sembrar en las cajas Petri e identificar cual dio mejor resultado, una mayor propagación de las esporas y un menor grado de contaminación.



Figura 3: Primer aislamiento donde se compararon las interfaces.

## 5.8 Aislamiento en tubos de ensayo.

Una vez sembradas las 3 cajas de Petri se realizara una identificación procurando que no exista algún otro microorganismo presente en las cajas que pueda ver a simple vista, es muy importante evitar que no exista señal de que tiene algún tipo de contaminación de alguna otro microorganismo.

Para esto se realizó una segunda siembra tratando de reducir lo más posible la contaminación elevando el grado de pureza del producto final.

La siembra se realiza en dos formas con micro pipeta y el haza de siembra por el método de zigzag, con el objeto de identificar cual tiene un mayor y más rápido Crecimiento en el medio de cultivo de tipo inclinado en 10 tubos de ensayo, los cuales serán 5 con micro pipeta y 5 con el haza de siembra.



Figura 4: segundo aislamiento para comprobar el método de siembra.

## 5.9 Pasos a seguir en aislamiento.

- Se realizó una desinfección en el área a trabajar con cloro al 5 % y alcohol al 70% para evitar una contaminación a la hora de sembrar las esporas en el medio de cultivo.
- Se tomó el matraz con la interface en el área desinfectada, se enciende el mechero acercando el matraz para evitar que al momento de abrir la interface y extraer la solución con esporas se contamine con algún otro microorganismo.
- Con mucha precaución al igual que con los matraz las cajas Petri se acercaran al mechero al momento de su inoculación depositando aproximadamente 20  $\mu\text{l}$  repitiendo esto 4 veces lo que nos garantiza que abra un total de 80  $\mu\text{l}$  en cada tubo de ensayo.
- Mover la solución con esporas dentro de los tubos para que se disperse por todo el medio teniendo un mayor grado de colonización de las esporas en el medio.
- Por último se deja en reposo a temperatura ambiente para poder darle seguimiento a su crecimiento y determinar si existe viabilidad en las esporas y hacer un análisis de su morfología y la estructura de las esporas en el microscopio.

## **5. 10 Metodología en la reproducción de hongos micorriza en plantas de maíz.**

Realizada la primera parte de la investigación donde se manipularon las esporas se procede a la inoculación de las semillas con la misma especie de esporas analizada en el microscopio para proseguir con la siguiente parte del proceso de producción que se enfoca en la multiplicación del inóculo, esto se realizó con el fin de poder identificar las esporas.

Procurando cumplir con los objetivos de reproducir las esporas en plantas de maíz, no debe existir ninguna otra presencia que pueda contaminar la siguiente fase de la investigación, ya que se determinó trabajar solo con la especie (*Glomus intraradices*) lo cual debe ser un mono cultivo de solo esa cepa. Se inoculan las semillas con toda la higiene posible y se depositan en un sustrato previamente esterilizado. Tener en cuenta que este tipo de micorrizas requiere de una planta anfitrión, ya que esta pertenece a una simbiosis obligada. En esta investigación se usó semillas de maíz para la experimentación, las semillas de maíz fueron inoculadas con la misma especie de esporas analizadas en la primera parte de la investigación.

Se usaron gramíneas porque estas plantas se asocian con este tipo de hongos una vez que una especie de hongo invade es muy difícil que otro hongo se manifieste en esa misma planta, en estudios anteriores se demostró que la eficiencia con ese tipo de plantas es positiva y puede ser utilizada en la fertilización de cultivos como es el caso del maíz reduciendo los porcentajes en su fertilización.

### 5.11 Pasos a seguir en inoculación de la semilla de maíz.

- Se procedió a lavar y desinfectar las semillas con hipoclorito de sodio para evitar la contaminación de algún otro microorganismo que no sea de nuestro interés evitando la contaminación.
- Es importante dejar remojar las semillas en agua aproximadamente por 48 horas para poder tener un mayor grado de germinación
- En este paso se procede a unir y mezclar las semillas con el hongo a reproducir lo que se conoce como inoculación.
- El último paso es depositar la semilla donde se dese germinar para poder darle seguimiento a la reproducción de las esporas, esto se puede realizar en macetas en un invernadero o en cultivos trampa a cielo abierto solo que la probabilidad que exista un grado de contaminación siempre está presente, ya que en el suelo pueden existir otros tipos de esporas, es por eso muy importante desinfectar o darle tratamiento al suelo antes de sembrar las semillas inoculadas.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSION

### 6.1 AISLAMIENTO

Las primeras cajas Petri donde se inoculo las interfaces **MAT1 Y MAT2**, en la primera interface se agregó sacarosa al 72 % y a la segunda no se agregó la sacarosa esto para comprobar en cual existía mayor y rápida propagación de las esporas, hay que mencionar que al momento de inocular las cajas Petri se obtuvo mejor resultado tanto en el crecimiento como menor contaminación en la interface a la cual no se agregó sacarosa en este caso MAT1, se logró observar que existió un crecimiento más rápido en los tubos de ensayo con el método de zigzag, cabe mencionar que los tubos de ensayos fueron inoculados con la caja Petri en donde se obtuvo mejor respuesta. Es importante mencionar que el aislamiento y reproducción en medios de cultivo de tipo sabouraud, en este tipo de esporas solo dura de 3 a 5 días de vida, ya que por ser un organismo el cual comparte una simbiosis obligada y requiere de la planta para sobrevivir después de este tiempo la espora muere dando paso a otros microorganismos que compitan por colonizar el medio de cultivo. Este corto tiempo donde el hongo empieza a formar estructura y colonizar el medio es ideal para poder extraer las esporas y examinarlas. También se puede inocular las semillas en ese corto tiempo con los mismos tubos de ensayo antes de que las esporas pierdan su periodo de vida en el medio de cultivo que es aproximadamente de una semana, ya que algunos tubos de ensayo solo duraron de 7 días como máximo con las esporas viables.

1. **MAT1 (MICORIZA ARBUSCULAR TIPO 1)= con sacarosa al 72 %.**
2. **MAT2 (MICORRIZA ARBUSCULAR TIPO 2)= sin sacarosa al 72 %.**

## 6.2 REPRODUCCION

La reproducción en este tipo de espora se realiza mediante el cultivo trampa, el cual ayuda al hongo a sobrevivir mientras le proporciona a la planta una mayor absorción de nutrientes, mayor actividad fisiológica en la raíz y creando cierta tolerancia a condiciones extremas.

Las esporas aisladas en los tubos de ensayo sirvieron para inocular las plantas de maíz y comprobar si eran efectivas para inocular a las plantas, para esto se agregó dispersante y agua destilada a los tubos de ensayo, luego se procedió a inocular las plantas con las esporas, el dispersante y el agua destilada.

El objetivo principal del proyecto es reproducir la espora micorriza arbuscular (*glomus intraradices*) en la planta de maíz, en este proyecto no se miden las variables de respuesta, las cuales proporcionan el comportamiento de la planta-suelo-microorganismo-ambiente, mostrando la eficiencia que tiene el microorganismo en la planta de maíz, ya que nuestro objetivo es producir la mayor cantidad de HMA (Hongo micorriza arbuscular) sin medir los efectos producidos por el microorganismo.

La prioridad es la multiplicación de la mayor cantidad de propagulo infecciosos en la rizosfera y en las raíces de la planta para tener disponible esporas para ser usada en los cultivos como un biofertilizante.

Se pretendió realizar la germinación de las semillas de maíz en macetas en el laboratorio pero las condiciones no eran adecuadas y la semilla no germinó, luego se procedió a realizar otra inoculación con el mismo tipo de hongo pero para esto se dispuso de un parcela a cielo abierto en el ITZM para poder medir los efectos de la micorrización.

## 7. CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

Para finalizar en la reproducción y aislamiento del hongo micorriza arbuscular (HMA) *glomus intraradices* es necesario esperar que el cultivo se termine su ciclo productivo para obtener la colección de esporas para poder realizar inoculaciones a los diferentes cultivos de interés, teniendo el propagulo disponible para utilizar y comercializar.

Para poder comercializar el propagulo se requerirá de una evaluación constante de la cepa así como es su efectividad en la planta y el conteo de esporas por gramo de producto, esto es una alternativa que puede mitigar en gran medida la utilización de fertilizantes, obteniendo mejores resultados en la cosecha y minimizar los costos de producción en los cultivos.

Es necesaria la obtención de propagulo como las raíces infectadas con el hongo ya que es de nuestro interés por que servirán para poder evaluar la cepa con variables como es el grado de inefectividad y el porcentaje de infección del hongo en la planta, esto podría ser un buen trabajo de tesis medir las variables de decisión de efectividad, es necesario tener en cuenta la interacción del microorganismo en el ambiente así como la respuesta de la planta al microorganismo y el ambiente donde interactúen.

La utilización del hongo micorrizas es una alternativa viable en producciones autosustentables con un cierto grado orgánico, donde el principal objetivo en la aplicación de microorganismos es mejorar el aprovechamiento de los nutrimentos disponibles en el suelo, mejorar la calidad de nuestro producto y proteger a la planta dando fuerza y vitalidad en sus actividades fisiológicas, con esto nosotros podemos realizar la aplicación mínima de fertilizante para obtener los beneficios de una fertilización con alto grado de concentración, la cual nunca aplicamos pero con el hecho de hacer uso de los microorganismo se obtendrán los resultados de una buena producción como si estuviéramos usado grandes cantidades de fertilizantes. Estos microorganismos pueden hacer más eficientes los cultivos, se requiere que las esporas tengan un porcentaje de viabilidad para poder propagarse a la planta, ya que el hongo puede estar presente en la rizosfera pero la planta puede generar mecanismos que eviten que el hongo se propague por el sistema cortical de la raíz; existen plantas en las cuales la asociación simbiótica no ocurre, ya que alguno de los simbioses no tiene la capacidad de generar la simbiosis.



Es importante saber qué tipo de planta anfitrión (host) usar para la reproducción de las esporas, en este caso yo recomendaría los pasto o algún otra planta de fácil reproducción vegetativa, si la intención es producir el micelio a costos muy bajos de producción, pero sin contar con el beneficio de la cosecha que obtendríamos si utilizáramos alguna gramínea como el maíz.

La recomendación es que los hongos micorrizas pueden ser usados en la fertilización de los cultivos para disminuir la fertilización y son una alternativa en suelos deficientes en fósforo para poder aprovechar al máximo las concentraciones de este nutrimento.

## 8. BIBLIOGRAFIA

Ferrera-Cerrato, R., González Ch., M.C.A., y Rodríguez M, M.N. 1993. Manual de Agromicrobiología. Trillas. México. p. 142. (3)

(<http://www.monografias.com/trabajos-pdf2/tipos-micorrizas/tipos-micorrizas.pdf>.)

(<http://invam.wvu.edu/methods/spores/enumeration-of-spores>.)

(<http://www.tusplantas.com/contenidos/diseño/index.cfm?p=2>)

(<http://www.mailxmail.com/curso/vida/jardines/capitulo19.ht>)

(<http://www.encuentros.uma.es/encuentros55/micorrizas.html>)

(<http://www.unne.edu.ar/cyt/2002/05-agrarias/A-049.pdf>)

(<http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/revista/81/pdf>)

(<http://www.monografias.com/trabajos-pdf4/multiplicacion-hongos-ma-nativos-cultivo-cacao/multiplicacion-hongos-ma-nativos-cultivo-cacao.pdf>.)

(<http://www.rlc.fao.org/es/publicaciones/agricultura-organica>)

(<http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/revista/81/pdfs/micorriza.pdf>)