

**Tecnológico Nacional de México
Instituto Tecnológico de la Zona Maya**

**CARACTERIZACIÓN DE LOS HONGOS MICORRIZICOS
ARBUSCULARES DE LEUCAENA (*Leucaena leucocephala*
Lam.) UNA ESPECIE CON POTENCIAL FORRAJERO**

**Informe Técnico de Residencia Profesional
que presenta el C.**

ABISAI RUEDA MENDEZ

N° de Control 11870074

Carrera: Ingeniería en Agronomía

Asesor Interno: Dr. Iván Oros Ortega

Juan Sarabia, Quintana Roo

Diciembre 2015

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE LA ZONA MAYA

El Comité de revisión para Residencia Profesional del estudiante de la carrera de **INGENIERÍA EN AGRONOMÍA, ABISAI RUEDA MENDEZ**; aprobado por la Academia del Instituto Tecnológico de la Zona Maya integrado por; el asesor interno **DR. IVÁN OROS ORTEGA**, el asesor externo el **DR. FERNANDO CASANOVA LUGO**, habiéndose reunido a fin de evaluar el trabajo titulado **CARACTERIZACIÓN DE LOS HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES DE LEUCAENA (*Leucaena leucocephala* Lam.) UNA ESPECIE CON POTENCIAL FORRAJERO** 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



Dr. Iván Oros Ortega

Asesor Externo



Dr. Fernando Casanova Lugo

Juan Sarabia, Quintana Roo, Diciembre, 2015.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II JUSTIFICACIÓN	3
III DESCRIPCIÓN DEL LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL PROYECTO.....	5
3.1 Ubicación y descripción del área de estudio	5
3.2 Clima.....	5
IV OBJETIVOS.....	6
4.1 General	6
4.2 Específicos	6
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
5.2 Colonización micorrizica	8
5.3 Diseño experimental utilizado	10
5.4 Preparación de los cultivos trampa	10
VII. PROBLEMAS RESUELTOS Y LIMITANTES	15
VIII COMPETENCIAS APLICADAS O DESARROLLADAS	16
IX. CONCLUSIONES	17
X. RECOMENDACIONES.....	18
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
XII. ANEXOS.....	20

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Porcentaje de colonización en raíces de <i>Leucaena leucocephala</i> en sistema silvopastoril asociada con dos pasto.....	12

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ubicación del área de estudio	7
Figura 2. Colecta de las raíces de <i>L. leucocephala</i> en dos sistemas silvopastoriles.....	8
Figura 3. A): esporas B): esporas intrarradicales . C) esporas intrarradicales D) esporas intarradicales .E) esporas e hifas F): hifas. G) esporas e hifas H): vesículas .I) esporas intrarradicales.....	13
Figura 4. a) arbusculo b) hifas c) esporas d) hifa e) y f) vesicula.....	14

I. INTRODUCCIÓN

El incremento de la población mundial y la correspondiente necesidad de productos agrícolas han estimulado la necesidad de aumentar la productividad de forrajes y cultivos (Cantrell y Linderman, 2001). En muchas áreas, especialmente en las regiones áridas y semiáridas, la producción animal está limitada por una amplia deficiencia de proteínas, particularmente en regiones con sequía prolongada cuando la calidad del forraje es más baja. Las leguminosas proveen nitrógeno al sistema suelo, el cual es tomado por las plantas y transformado a proteínas las que al ser consumidas por los animales incrementan la producción de carne, sin necesidad de aplicar fertilización química (Stamford *et al.*, 1997; 2000).

La península de Yucatán posee una gran variedad de especies arbóreas que presentan características adecuadas para ser incorporadas en los sistemas de producción animal; sin embargo aunque el uso del follaje de estas especies en la alimentación de rumiantes es una práctica conocida por los productores su aprovechamiento es limitado (Benavides, 1993).

Tomando en cuenta la importancia que la *Leucaena* tiene como planta forrajera y su transformación a proteína animal para consumo humano y el tener una raíz pivotante (Suárez, 1994), la hace un modelo de estudio importante para continuar el estudio de su relación con las bacterias nitrificadora y hongos micorrízicos arbusculares (HMA) (Morton y Benny, 1990), además de que el uso de estos microorganismos permite lograr una agricultura sostenible que resulta práctica y económica, y también favorece el reciclaje de nutrientes para mejorar la fertilidad del suelo, por lo tanto, se convierte en una alternativa para contribuir al establecimiento de sistemas de producción sostenibles, competitivos y rentables (Molina *et al.*, 2005).

Los HMA forman abundantes hifas externas y estimulan el desarrollo de las raíces con lo que aumenta la capacidad del sistema radical para absorber y traslocar elementos, principalmente el fósforo, lo que mejora el crecimiento de la planta (Daniels-Hylton y Ahmad, 1994). Las leguminosas y los pastos que crecen en

condición natural o de cultivo generalmente establecen asociación con HMA (Saif, 1987; Khasa et al., 1992).

II JUSTIFICACIÓN

En las regiones tropicales predominan los sistemas tradicionales de producción animal de doble propósito; éstos se caracterizan por ser principalmente de pastoreo extensivo con monocultivo de gramíneas, los cuales producen bajos rendimientos de forraje y son de deficiente calidad, sobre todo en la época de secas. Aunado a ello, dichos sistemas están asociados con problemas de deforestación, degradación del suelo, escasez del agua, alteraciones en el clima y baja productividad (Bellido et al., 2001; Quero et al., 2007).

A lo anterior se añade el hecho de que los sistemas ganaderos en monocultivo son los principales responsables en el cambio del uso del suelo (deforestación), y así contribuyen al 9% de las emisiones de dióxido de carbono (CO₂) que producen el efecto invernadero, asociado al cambio climático (Steinfeld *et al.*, 2006). El CO₂ se libera principalmente, cuando las áreas boscosas son convertidas en pastizales o en tierras cultivables para la producción de alimentos, incluyendo los granos para la elaboración de concentrados (Soussana, 2008).

Una alternativa sería un sistema silvopastoril (SSP) es aquel uso de la tierra y tecnologías en que leñosas perennes (árboles, arbustos, palmas y otros) son deliberadamente combinados en la misma unidad de manejo con plantas herbáceas (cultivos, pasturas) y/o animales, incluso en la misma forma de arreglo espacial o secuencia temporal, y en que hay interacciones tanto ecológicas como económicas entre los diferentes componentes (Young, 1987).

Los sistemas agroforestales y otros sistemas basados en árboles son reconocidos como más eficientes en el ciclo de nutrientes que muchos otros sistemas, porque la presencia del componente leñoso sugiere efectos beneficiosos sobre el suelo. Estas leñosas perennes tienen, teóricamente, sistemas radiculares más extensos y profundos que las plantas herbáceas, puesto que tienen un potencial para capturar y reciclar una gran cantidad de nutrimentos. La contribución de la hojarasca a la superficie del suelo es probablemente mayor que aquella de las plantas herbáceas (petit-aldana *et al.*, 2009).

Actualmente son bien conocidos de los HMA los cuales comprenden la mayor absorción de elementos pocos móviles del suelo como son: el fosforo el cobre o zinc Por parte de las plantas micorrizadas en comparación de las no micorrizadas (Smith y Read ,2007).

III DESCRIPCIÓN DEL LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL PROYECTO

3.1 Ubicación y descripción del área de estudio

El estudio se realizó en el laboratorio de control biológico en el área de organismos simbióticos del Instituto Tecnológico de la Zona Maya, ubicado en el Ejido Juan Sarabia, en el Municipio de Othón P. Blanco, en las coordenadas geográficas 18° 30' 58" Latitud Norte y 88° 29' 19" Longitud Oeste

3.2Clima

De acuerdo al sistema de Koopen modificado para climas tropicales y subtropicales de México, en el estado se identifican los climas cálido subhúmedo con lluvias en verano A (w) en la parte continental y el clima cálido húmedo con abundantes lluvias en verano A (m). El clima del estado es cálido (temperatura media anual de 27°C; en verano alcanza hasta 35°C) húmedo (lluvias en verano y parte del otoño). El periodo de secas es a partir del mes de noviembre-abril (García, 1983).

La precipitación anual pluvial varía de 1100 a 1500 mm como promedio. La temperatura pluvial anual fluctúa entre 26°C como máxima y 10°C como mínima, con extremos de 36°C en los meses más calurosos. La evaporación media anual varía entre los 1100 y los 1400mm, llegando en ocasiones a superar la precipitación.

IV OBJETIVOS

4.1 General

Aislar y determinar la diversidad de estructuras de hongos micorrízicos arbusculares en *Leucaena* (***Leucaena leucocephala* Lam.**) a través de establecimiento de cultivos trampa.

4.2 Específicos

- Establecer cultivos trampa de *Leucaena* (***Leucaena leucocephala* Lam.**)
- Determinar la colonización de estructuras micorrízicas en las raíces de cultivos trampas de suelo colectados en plantas de *Leucaena* (***Leucaena leucocephala* Lam.**)

V. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el Instituto Tecnológico de la Zona Maya Ejido Juan Sarabia, carretera Chetumal – Escárcega kilómetro 21.5, en las coordenadas 18°30'6.027" N Y 88°28'53.609"



Figura 1. Ubicación del área de estudio.

Establecimientos de los cultivos trampa: Los materiales que se montaron para realizar el experimento son los siguientes que se mencionan a continuación:

- 1) costales
- 2) cubetas
- 3) Arena
- 4) Pala
- 5) Bolsas
- 6) Autoclave
- 7) Semilla de sorgo(1.200g)
- 8) Cernido Ponerlo a manera de párrafo

5.1. Metodología utilizada

Se consiguió el material que ocuparíamos para nuestro experimento y después procedimos a llenar la arena en 2 costales de 25 kilos cada costal, se colectó arena el día 20 de agosto en el Ejido de Álvaro obregón como primer punto, se coló para eliminar la presencia de gravilla y se embolsaron en 23 bolsas para su esterilización.

Se llenó de agua destilada el autoclave hasta el nivel de los sensores de después se metieron las bolsas y se programó automáticamente a 120 C durante 20 minutos.

Las muestras recolectadas de raíces del árbol de *Leucaena* se tomaron raíces de aproximadamente de 15 cm de distancia del árbol de *Leucaena* y fueron trasladadas al laboratorio del instituto tecnológico de la zona maya para su montaje en cultivos trampa.



Figura 2. Colecta de las raíces de *L. leucocephala* en dos sistemas silvopastoriles.

5.2 Colonización micorrizica

Para determinar la presencia de los hongos micorrízicos arbusculares en las raíces de las plantas de sorgo inoculadas con suelo de árboles de *Leucaena* y cuantificar la colonización de éstas, se utilizó la coloración de las estructuras de los hongos dentro de la raíz, su observación al microscopio y el conteo de la infección. Para esta evaluación se utilizó el método Philips y Hayman (1970). Este procedimiento consistió en clarear y teñir las raíces, posteriormente montarlas en portaobjetos y observarlas al microscopio. Este método permitió evaluar el porcentaje de estructuras de la micorriza: vesículas, hifas y arbusculos dentro de la raíz.

Las raíces de sorgo se separaron del sustrato y lavaron con agua corriente, cortadas en fragmentos con el fin de tomar una muestra representativa. Cada muestra fue colocada en frascos de vidrio para tinción. El método de tinción de raíces consistió en el clareo, blanqueo, acidificación, tinción, decoloración y montaje de raíces.

Clareo: las raíces libres de sustrato se colocaron en un frasco de vidrio y se añadió KOH (hidróxido de potasio al 10%) de tal forma que quedaran cubiertas. Posteriormente se colocaron en la autoclave a 10 libras de presión durante 10 minutos. Posteriormente las raíces se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de KOH. Este proceso se repitió las veces necesarias.

Blanqueo: una vez que la solución de KOH presentó un color claro, se eliminó el exceso de esa solución y se agregó peróxido de hidrogeno (agua oxigenada) durante cinco minutos. Posteriormente, las raíces se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de peróxido.

Acidificación: una vez lavada las raíces se les adicionó una solución de HCl al 10% (ácido clorhídrico) por 3 minutos, con el fin de favorecer la acción del colorante.

Tinción: pasado el tiempo de contacto con el HCl, se eliminó el exceso de este sin efectuar el lavado. Los frascos que contenían las raíces se cubrieron con la solución colorante (se aplicó el colorante azul de tripano al 0.05% en lactoglicerol), colocándolas en el autoclave a 10 libras por 10 minutos.

Decoloración: el colorante se eliminó y las raíces se decoloraron con lacto glicerol limpio, para eliminar posibles residuos de azul tripano.

Montaje de raíces: después de la tinción, las raíces se colocaron en cajas de Petri con suficiente lacto glicerol. Se tomaron 20 segmentos de raíces de 1 cm de longitud y se colocaron de forma paralela en le portaobjetos colocándose sobre estos una o dos gotas de lacto glicerol. Posteriormente se colocó el cubreobjetos, quedando listas las laminillas para su observación al microscopio, con el objetivo de 40 X. en total se hicieron 3 observaciones equidistantes por laminilla.

El porcentaje de infección se determinó con base a los segmentos totales colonizados por el hongo, así como su relación con los segmentos con presencia de arbusculos y vesículas según el caso el porcentaje de infección se calculó con la base de la siguiente formula:

$$\% \text{ infección} = \frac{\text{No. de segmentos observados}}{\text{No. de segmentos colonizados}} \times 100$$

5.3 Diseño experimental utilizado

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar, el factor de estudio fueron dos tipos de sistemas silvopastoriles, se consideraron un sistema silvopastoril Leucaena con zacate estrella y Leucaena con zacate monbaza. Los árboles fueron seleccionados aleatoriamente. Los arboles seleccionados se encuentran dentro de los terrenos del ITZM, una vez ubicados los árboles a estudiar se colectaron núcleos de suelo a 20 centímetros de la planta de Leucaena.

5.4 Preparación de los cultivos trampa

El muestreo se realizó en agosto 2015 en el ITZM. En cada sitio de estudio se colectaron 4 muestras de suelo cada una en puntos marcados al azar dentro del sitio se integró una muestra mixta completamente homogenizada. Antes de tomar la muestra de suelo se eliminó la materia orgánica de los 20 cm superiores del suelo. Se colocaron en macetas las muestras traídas de campo mezcladas 1:1 con arena esterilizada y posteriormente se colocaron 110 gramos de semilla de sorgo (*Sorghum vulgare* L.) que fue seleccionado como una planta trampa debido a su temprana colonización micorrizica y alta supervivencia. A los tres meses después de la siembra se tomaron muestras de raíz para medir la colonización micorrizica (Guadarrama-Chávez *et al.*, 2007).

VI.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis micorrizico en las muestras tomadas en dos sistemas silvopastoriles fue en promedio del 60% en *Leucaena* con zacate estrella y del 56% en *Leucaena* con monbaza como se muestra en la tabla 1 y de estructuras observadas es alto .

Cuadro 1. Porcentaje de colonización en raíces de *Leucaena leucocephala* en sistema silvopastoril asociada con dos pastos.

Sistemas silvopastoriles	Porcentaje de colonización (n= 9)
<i>Leucaena</i> con pasto estrella	60%
<i>Leucaena</i> con pasto monbaza	56%

La presencia de hongos micorrizicos arbusculares es abundante en las raíces de *Leucaena* del ITZM.

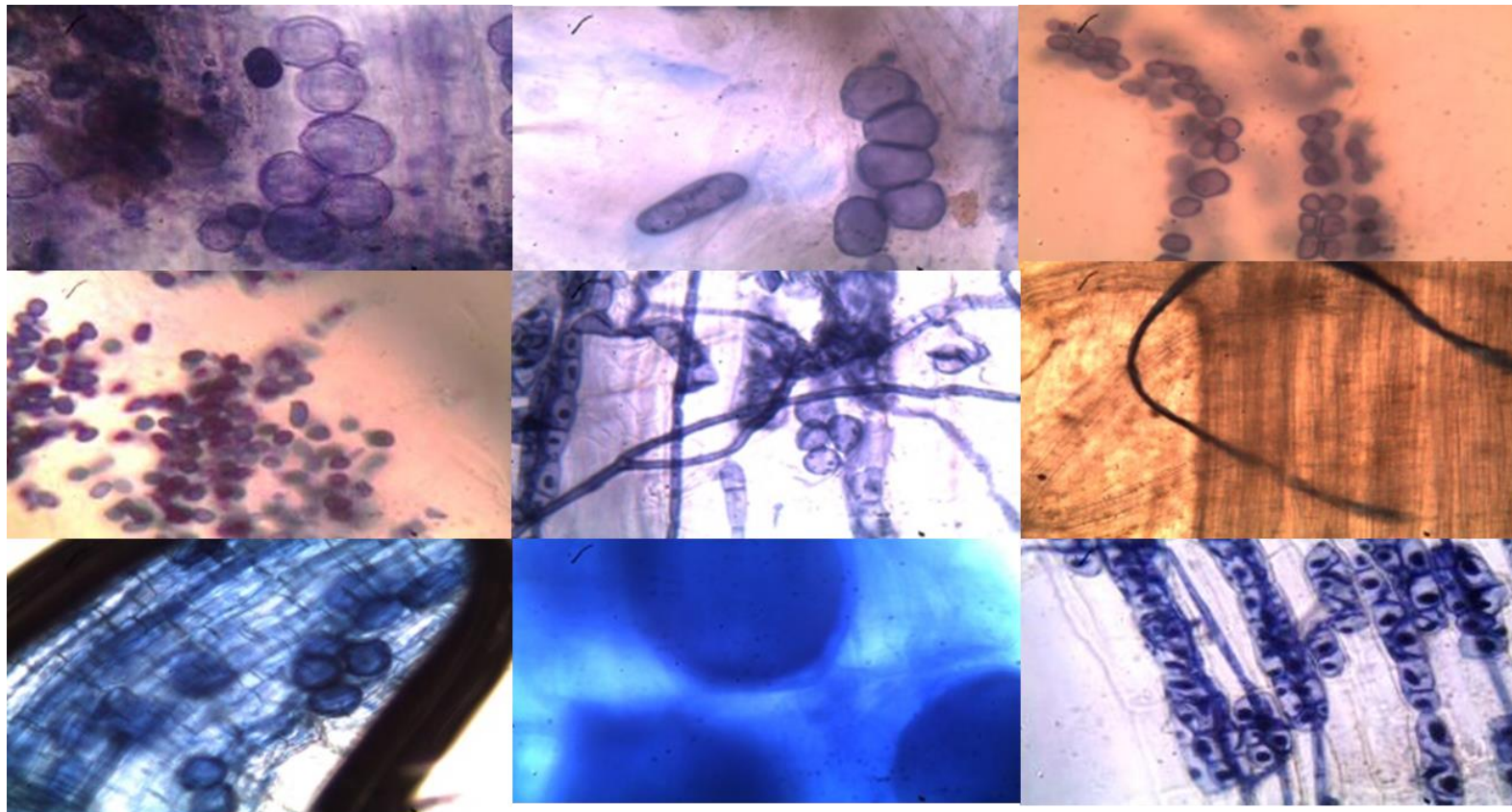


Figura 3. A): esporas B): esporas intrarradicales . C) esporas intrarradicales . D) esporas intarradicales .E) esporas e hifas F): hifas. G) esporas e hifas H): vesículas .I) esporas intrarradicales

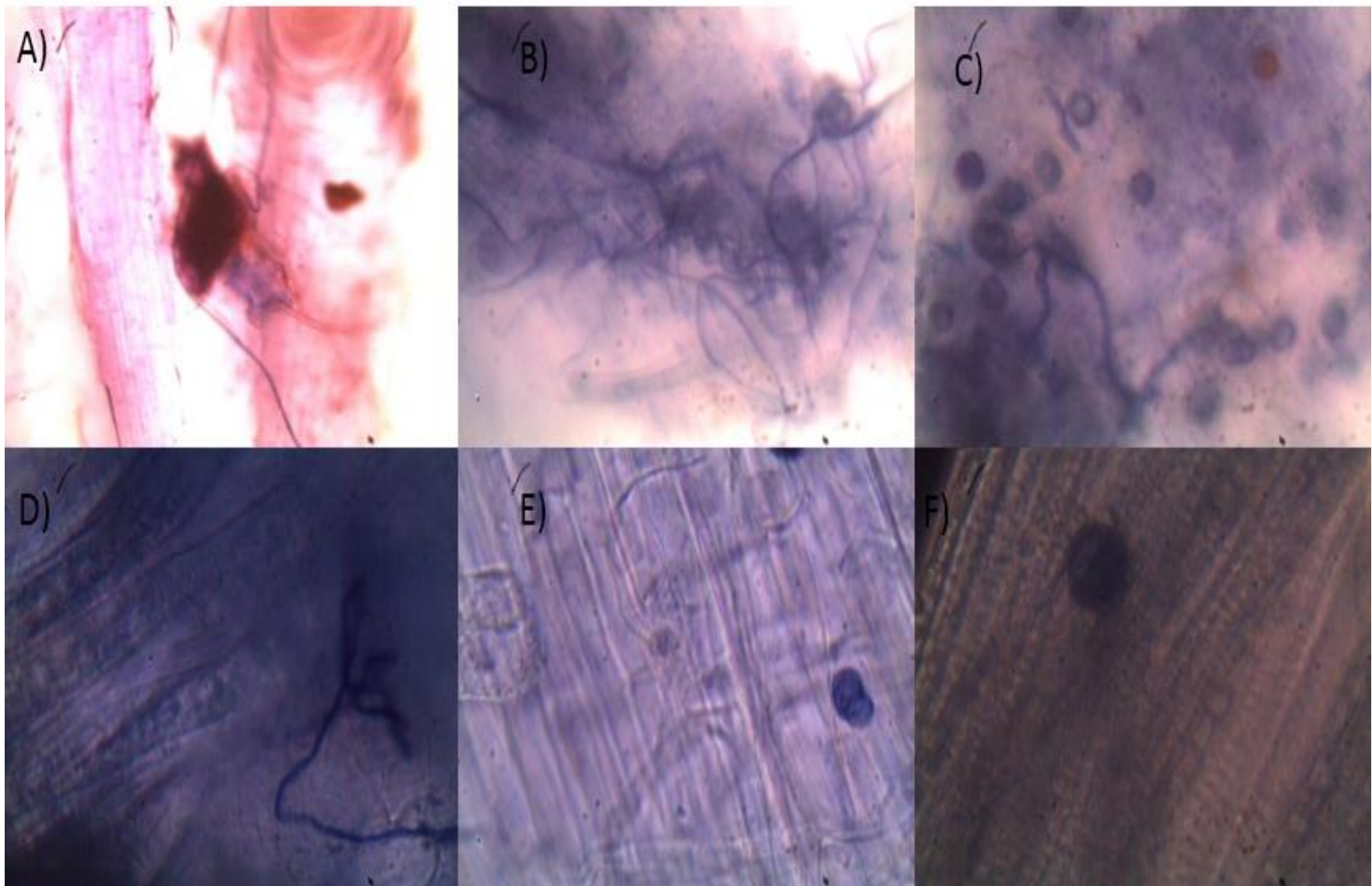


Figura 4. A) ARBUSCULO B) HIFAS C) ESPORAS D) HIFA E) y F) VESICUA

En los ecosistemas y agro ecosistemas, los HMA, son de gran importancia debido a que mediante la simbiosis las plantas pueden obtener nutrientes minerales del suelo, mejorar su tolerancia a estreses bióticos y abióticos, reducir competencia entre plantas mediante la transferencia de carbono a través de la red de hifas extra radical (Simard et al., 1997; Simard y Durall, 2004) y modular la diversidad y productividad de plantas (Van der Heijden et al., 1998). Dado que la simbiosis es un proceso recíproco planta-hongo, es importante conocer también el papel de la comunidad de plantas en la estructura y diversidad de la comunidad de HFMA (Burrows y Pflieger, 2002).

La inoculación con hongos formadores de micorrizas son conocidos por incrementar el crecimiento de muchas especies de plantas. Es atribuido un incremento en la toma de nutrientes, especialmente los de difusión limitada tales como: P, Zn, Cu, etc.; producción de sustancias promotoras de crecimientos, tolerancia a estrés hídricos; salinidad, estrés por trasplante; resistencia a plantas por fitopatógenos e interacción sinérgica con otros microorganismos benéficos del suelo (Azcón y Barea, 1996; boby, et al; 2008).

Los HMA interactúan con una amplia diversidad de microorganismos del suelo en las raíces, en la rizosfera y en la masa del suelo. La interacción puede inhibir o estimular, aunque estos hongos no pueden fijar biológicamente el nitrógeno atmosférico, incrementan la fijación de este compuesto porque interactúan positivamente con los fijadores de nitrógenos (Barea *et al.*, 1992).

VII. PROBLEMAS RESUELTOS Y LIMITANTES

Como pioneros en el área de micorrizas arbusculares en el instituto tecnológico de la zona maya se encontraron que tipos de estructuras de HMA hay en el cultivo de Leucaena con ello se comprobó la importancia que tiene los HMA al tener la simbiosis con la planta con ello la planta le aporta azúcares al hongo y este a su vez le aporta nutrimentos que le hace tener mayor follaje con lo que se ve reflejado en el consumo de proteínas que capta de esta planta.

Esta planta no es de uso tradicional, pero se intenta innovar por su alto contenido de proteína que contiene la planta y esta a su vez se ve reflejado en su condición corporal del rumiante.

Algunas limitantes que tuvimos al desarrollar el presente proyecto fue el tiempo ya que para poder iniciar con los estudios tuvimos que esperar tres meses desde la plantación hasta que la planta llegara una edad media.

Además nos hizo falta la centrifuga de suelos para continuar con la siguiente fase del proyecto que consistía en extraer las esporas observadas en las muestras.

Otra de las limitantes que tuvimos fue la falta de reactivos para trabajar ya que con los que contábamos eran muy limitados.

VIII COMPETENCIAS APLICADAS O DESARROLLADAS

Desarrollar el proceso productivo agropecuario con un enfoque holístico y sustentable de los recursos disponibles.

Generar, adoptar y transferir tecnologías apropiadas a las necesidades del entorno.

Integrar los sistemas de producción a cadenas productivas para generar valor agregado.

Operar y administrar empresas propias o en sociedad a fin de lograr el uso eficiente de los recursos y la generación de empleo

IX. CONCLUSIONES

Se determinó la riqueza de estructuras de HMA en las raíces de plantas de Leucaena tales como hifas, esporas vesículas y arbusculos.

Encontramos que hubo un mayor % de HMA en el tipo de sistema silvopastoril de Leucaena con sácate estrella sin embargo hace falta determinar otras muestras para concluir los análisis estadísticos.

Se encontró una alta colonización de HMA en planta de Leucaena por lo que deben tener una alta funcionalidad en la captación de nutrimentos tales como N y P, e incrementa la calidad nutritiva al establecer una planta forrajera como la Leucaena.

X. RECOMENDACIONES

Se debe considerar la forma de garantizar la conservación del suelo como un recurso natural vivo. Que sirve de sustento para las plantas, tanto aquellas de importancia agrícola y forrajeras.

Se debe reconocer la importancia de los HMA, considerando como uno de los mayores organismos del suelo en aportar en el desempeño de la dinámica nutricional de las plantas, dentro de los procesos de solubilación, mineralización, inmovilización, humidificación entre otros.

Es necesario un estudio más afondo incluyendo las nuevas técnicas en el análisis de la diversidad, para tener una idea más clara de las especies existentes en los suelos de la península de Yucatán y de esta manera aportar en el desarrollo de la silvicultura.

El empleo de los hongos micorrizicos arbusculares es significativo para mejorar el desarrollo y disponibilidad del fosforo P, N, y K para los cultivos. Para esto el agricultor puede mediante técnicas sencillas y de bajo presupuesto aislar y multiplicar micorrizas nativas, para usarse en los cultivos, es recomendable realizar la inoculación de las plantas en las etapas iniciales como son la siembra o en el trasplante.

La producción y aplicación de los inóculos que faciliten que los hongos micorrizicos se asocien con las plantas de interés forrajera, ayudando a la obtención de plantas micorrizadas para su futuro uso sin necesitar de aplicación completa de fertilizante químico.

Realizar un diseño de las formas tradicionales de producción empezando con un mejor aprovechamiento del recurso del suelo en donde se incluyen a los hongos micorrizicos arbusculares como un gran aporte en el avance y desarrollo de los sistemas silvopastoriles en la obtención de proteína animal.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ferrera-Cerrato R., Alarcón A., (2007). Microbiología agrícola (1ª ed.).
- Ojeda, L., Furrázola, E., Hernández, C. (2014), Micorrizas arbusculares en leguminosas de la empresa pecuaria El Tablón, 392-398.
- Flores-Bello, M., Aguilar-Espinosa, S., García Calvario, R., Zamora Cruz, A., Farías-Larios, J., López-Aguirre, J. G. (2008) Inoculación con hongos micorrízicos arbusculares y el crecimiento de plántulas de *Leucaena*, 127.
- Petit-Aldana, J., Casanova-Lugo, F., Solorio-Sánchez, F., J. (2009) Asociación de especies forrajeras para mejorar la productividad y el reciclaje de nutrimentos, 115.
- Cuenca, G., Cáceres, A., Oirdobro, G., Hasmy, Z., Urdaneta, C. (2007) Las micorrizas arbusculares como alternativa para una agricultura sustentable en áreas tropicales, 23-29.
- Zárate S. (1987). Publicado en: *Phytologia* 63(4): 304-306. 1987.

XII. ANEXOS

