



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

Área temática:
Fisiología y Genética Vegetal

Diversidad de los Hongos Micorrízicos Arbusculares asociados a plantas de aguacate (*Persea americana* Mill.), en un agroecosistema del Estado de Michoacán.

Que como requisito para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta:

BIÓL. NÚRIA GÓMEZ DORANTES

Directores de tesis:

DR.MIGUEL MARTÍNEZ TRUJILLO

DRA.YAZMÍN CARREÓN ABUD



Morelia Mich., Junio de 2009

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL **LABORATORIO DE GENÉTICA Y MICROBIOLOGÍA** DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA ASESORÍA DEL **DR. MIGUEL MARTÍNEZ TRUJILLO** Y LA **DRA. YAZMÍN CARREÓN ABUD**, CON EL APOYO DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA Y EL CONSEJO ESTATAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA.





	Página
ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
CAPÍTULO I. RESUMEN	1
CAPITULO II. INTRODUCCIÓN	2
2.1 Cultivo de aguacate en el Estado de Michoacán de Ocampo, México.....	2
2.1.1 Características generales e importancia del cultivo.....	2
2.2 Simbiosis Micorrízica.....	4
2.2.1 Generalidades.....	4
2.3 La Micorriza Arbuscular.....	4
2.3.1 Filogenia y taxonomía.....	5
2.3.2 Estructuras formadas en la MA y proceso de colonización...	8
2.3.3 Importancia de la MA.....	10
2.3.4 Herramientas moleculares en el estudio de la MA.....	14
2.4 Importancia de la Micorriza Arbuscular en los huertos de aguacate...	15
	16
CAPÍTULO III. HIPÓTESIS	19
CAPÍTULO IV. OBJETIVOS	20
CAPÍTULO V. RESULTADOS	21
5.1 Diversidad de hongos micorrízicos arbusculares asociados a plantas de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) en un huerto del Estado de Michoacán, México.....	21
5.1.1a Resumen.....	21
5.1.1b Abstract.....	21
5.1.2 Introducción.....	22
	26



5.1.3 Materiales y métodos.....	26
5.1.3.1 Sitio de estudio.....	27
5.1.3.2 Muestreo de suelo.....	27
5.1.3.3 Aislamiento y cuantificación de esporas.....	28
5.1.3.4 Identificación taxonómica de los HMA.....	29
5.1.3.5 Cultivos trampa.....	29
5.1.4 Resultados y discusión.....	31
5.1.4.1 Conteo de esporas.....	41
5.1.4.2 Identificación de especies y morfotipos.....	42
5.1.5 Conclusiones.....	
5.1.6 Literatura citada.....	
5.2 Estandarización de la extracción y amplificación de ADN de hongos micorrízicos arbusculares en raíces de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.).....	45
5.2.1a Resumen.....	45
5.2.1b Abstract.....	45
5.2.2 Introducción.....	46
5.2.3 Materiales y métodos.....	53
5.2.3.1 Sitio de estudio.....	53
5.2.3.2 Muestreo de raíces.....	53
5.2.3.3 Evaluación de la colonización micorrízica.....	54
5.2.3.4 Tinción de raíces.....	54
5.2.3.5 Determinación del porcentaje de colonización.....	55
5.2.3.6 Análisis estadístico.....	55
5.2.3.7 Extracción de ADN a partir de raíces colonizadas.....	
5.2.3.8 Evaluación molecular de los HMA presentes en las raíces.....	56
5.2.3.9 Condiciones de PCR.....	57
5.2.3.10 Electroforesis en geles de agarosa.....	58
5.2.3.11 Purificación de los productos de PCR.....	59
5.2.3.12 Análisis de las secuencias.....	59
5.2.4 Resultados y discusión.....	59
5.2.4.1 Evaluación de la colonización micorrízica.....	59
5.2.4.2 Extracción de ADN de raíces.....	64
5.2.4.3 Amplificación del ADN.....	65
5.2.4.4 Obtención de las secuencias.....	69
5.2.5 Conclusiones.....	70
	71



5.1.6 Literatura citada.....	76
CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN GENERAL.....	
CAPÍTULO VII. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.....	82
CAPÍTULO VIII. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA.....	84
ANEXOS.....	92



ÍNDICE DE CUADROS	Página
Cuadro 1. Antecedentes de la evolución de los hongos micorrízicos arbusculares y ectomicorrízicos	7
Cuadro 2. Clasificación taxonómica de los hongos micorrízicos arbusculares	9
Cuadro 3. Porcentaje de esporas por especie presentes en el suelo de la huerta	31
Cuadro 4. Especies de HMA aisladas a partir del suelo directo de la huerta de aguacate.....	33
Cuadro 5. Especies de HMA encontradas a partir de cultivos trampa	36
Cuadro 6. Diferentes oligonucleótidos utilizados en las distintas PCR, secuencias nucleotídicas y condiciones de amplificación.....	58



ÍNDICE DE FIGURAS	Página
Figura 1. Generalidades del Aguacate.....	3
Figura 2. Tipos de micorriza.....	6
Figura 3. Filogenia propuesta para los HMA basada en un consenso de caracteres morfológicos y secuencias moleculares de la Subunidad Pequeña (SSU) del ARNr	9
Figura 4. Esporas de hongo micorrízico arbuscular.	11
Figura 5. Características morfológicas relevantes del metabolismo de los hongos micorrízicos arbusculares.....	13
Figura 6. Localización del sitio de Estudio.....	26
Figura 7. Porcentaje de esporas de 5 géneros de hongos micorrizógenos presentes en el suelo de la huerta de aguacate.....	30
Figura 8. Especies pertenecientes al género Scutellospora	37
Figura 9. Especies pertenecientes al género Acaulospora	38
Figura 10. <i>Gigaspora aff. decipiens</i>	40
Figura 11. Especies pertenecientes al género Glomus	40
Figura 12. <i>Pacispora</i>	41
Figura 13. Genes ribosomales y sus espacios interunidades, espacios intergénicos y dominios de la subunidad grande.....	51
Figura 14. Localización del sitio de Estudio	53
Figura 15. Diagrama de la localización de los primers usados y sus respectivas secuencias en el ADN ribosomal 18S.....	56
Figura 16. Porcentajes de colonización encontrados en los árboles en los diferentes muestreos	61
Figura 17. Alta colonización micorrízica al interior de las raíces de aguacate	61



Figura 18. Estructuras características de la micorriza arbuscular.	62
Figura 19. Anatomía de raíces de aguacate.....	63
Figura 20. Evaluación de la colonización micorrízica por estructuras...	64
Figura 21. Estandarización de la extracción de ADN genómico en los árboles de aguacate.....	65
Figura 22. Amplificación realizada con la pareja de oligonucleótidos NS31-ITS4.....	66
Figura 23. . Productos obtenidos en PCR anidada utilizando las parejas de oligonucleótidos NS31-AM1.....	67
Figura 24. Productos obtenidos en PCR anidada utilizando las parejas de oligonucleótidos NS31-VAACAU	68



I. RESUMEN

Se realizó un estudio para identificar las especies de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) asociados al suelo y al interior de las raíces de plantas de aguacate (*Persea americana* Mill.) en una huerta denominada las Parrillas en la región aguacatera del Estado de Michoacán, México. Cinco árboles de aguacate establecidos en un diseño completamente al azar fueron muestreados, mostrando altos porcentajes de colonización micorrízica al interior de las raíces (>94%) sin presentar diferencias significativas en la colonización (ANOVA $p > 0.05$). Mediante análisis morfológicos tradicionales se identificaron 16 especies de HMA correspondientes a 5 géneros presentes directamente en la rizosfera, destacando los géneros *Scutellospora* y *Acaulospora* al presentar el mayor número de especies mientras que *Glomus geosporum* y *Glomus rubiforme* fueron las especies más abundantes. La técnica molecular empleada basada en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), con el uso de primers específicos para las regiones del ADN ribosomal, permitió la identificación de *G. geosporum* al interior de las raíces de aguacate altamente colonizadas.

Palabras clave: *Persea americana* Mill., *Micorriza arbuscular*, *diversidad*.

ABSTRACT

A study was conducted to identify the species of arbuscular mycorrhizal fungi (HMA) associated with soil and inside the roots of avocado plants (*Persea americana* Mill) in an orchard known as "Las Parrillas" in the state of Michoacan, Mexico. Five avocado trees in a completely randomized design were sampled, showing higher percentages of mycorrhizal colonization within the roots (>94%), with no significant differences between them (ANOVA $p > 0.05$). Using traditional morphological analysis 16 species from 5 HMA genera were identified directly from the the rhizosphere, *Scutellospora* and *Acaulospora* showed the highest number of species while *Glomus geosporum* and *Glomus rubiforme* were the most abundant species. The molecular technique based on the Polymerase Chain Reaction (PCR) using specific primers for the ribosomal DNA region, allowed the identification of *G. geosporum* inside the roots of avocado highly colonized.

Keywords: *Persea americana* Mill., *Micorhyiza arbuscular*, *G. geosporum*, *diversity*.

Diversidad de los Hongos Micorrizicos Arbusculares asociados a plantas de aguacate (*Persea americana* Mill.), en un agroecosistema del Estado de Michoacán.



II. INTRODUCCIÓN

2.1 Cultivo de aguacate en el Estado de Michoacán de Ocampo, México.

2.1.1 Características generales e importancia del cultivo

El origen del aguacate en náhuatl es “ahucaquahuitl” de “ahuacátl”, nombre del fruto y “quahuitl” que significa árbol. De la palabra “ahuacátl” se han derivado los nombres con los que actualmente se conoce a esa fruta en algunos países. Los españoles lo convirtieron en ahucate o aguacate y de ahí los ingleses y norteamericanos formaron la palabra avocado; los franceses avocat, los alemanes avocado y los portugueses abacate. En Sudamérica es conocido como palta, los mayas lo llamaban “on” y “okh”, los totonacas “cucata”, los zapotecas “yasu” e “isu”, mientras que los purhépechas “cupanda” (Gómez, 1984; Teliz, *et al.*, 2000; Sánchez, *et al.*, 2002, citados en Bárcenas y Aguirre, 2005). El nombre científico del aguacate es *Persea gratissima* Gaertn, también llamada *Persea americana* Mill (Cronquist, 1981).

El aguacate es un árbol perteneciente al género *Persea* dentro de la familia botánica Lauraceae. Actualmente el género *Persea* contiene alrededor de 85 especies, y la mayoría se encuentran desde el sur de los Estados Unidos de Norteamérica (*Persea borbonia*) hasta Chile (*Persea lingue*). Sólo son las excepciones *Persea indica* que se encuentra en las Islas Canarias (España) y probablemente otras del sur de Asia que se piensa pertenecen a *Persea*. Es un árbol de hojas persistentes que se cultiva en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Se reconocen tres razas ecológicas de aguacate; Mexicana, Guatemalteca y Antillana (Barrientos y López, 2001) (Fig. 1).

El origen y área de domesticación del aguacate tuvo lugar en las partes altas del centro y este de México y partes altas de Guatemala. La evidencia más



antigua del consumo de esta fruta data de 10 000 años a.c. y fue encontrada en una cueva localizada en Coxcatlán, Puebla (Sánchez, *et al.*, 2002 citados en Bárcenas y Aguirre, 2005).

Nombre científico: *Persea americana mill.*
Familia botánica: Lauráceas
Antecedentes: Originario de México, y luego se difundió hasta las Antillas.
Descripción: Árbol extremadamente vigoroso (tronco potente con ramificaciones Vigorosas), pudiendo alcanzar hasta 30 m de altura. Sistema Radicular bastante superficial. Árbol perennifolio, hojas alternas, pedunculadas, muy brillantes, flores perfectas en racimos subterminales.
Industrialización: Elaboración de champú, cosméticos y aceite



Figura 1. Generalidades del Aguacate (*Persea Americana Mill.*)

En cuanto a los requerimientos agroecológicos del cultivo es importante destacar la necesidad de establecer los huertos preferentemente en terrenos arenosos o franco arenosos con buen drenaje con un pH de 5.5 – 6.5, abundante materia orgánica, se deben evitar los terrenos muy pesados, superficiales y mal drenados o con napas freáticas superficiales. El clima debe ser Tropical a subtropical con una precipitación pluvial de 1,400 a 1,800 mm al año bien distribuidos, temperatura óptima de 17°C a 29°C y humedad relativa de 75-80% a una altura promedio de 2000 m.s.n.m. El cultivo adecuado requiere de un mínimo de 1500 horas-luz/año (SAGARPA, 2008).

México es el principal productor, exportador y consumidor de aguacate en el mundo. La producción nacional es de un millón de toneladas anuales en promedio, de este total, 200 mil toneladas que representan 20 por ciento se exportan, las cuales generan ingresos superiores a los 400 millones de dólares anuales (SAGARPA, 2008), siendo Michoacán uno de los estados más importantes en el cultivo. En Michoacán, el aguacate se encuentra establecido en una franja que

Diversidad de los Hongos Micorrizicos Arbusculares asociados a plantas de aguacate (*Persea americana Mill.*), en un agroecosistema del Estado de Michoacán.



abarca 30 municipios en los que se cultivan más de 90 mil hectáreas de aguacate de la variedad Hass; en esta entidad existen 22 mil productores de aguacate de los cuales 51 por ciento son pequeños productores; 37 por ciento, ejidatarios y 12 por ciento son comuneros (SAGARPA, 2008). Los 22 municipios en donde el cultivo es importante, están establecidos en 94,045.09 ha, entre los 1100 y los 2900 msnm, en 10 climas diferentes; pero la mayor superficie (74,463.15 ha) se localiza entre los 1600 y 2100 msnm (Lara *et al.*, 2005, citada en Bárcenas, *et al.*, 2007). De esta manera en el Estado el aguacate genera aproximadamente 250 mil empleos directos e indirectos. Esta actividad, por lo tanto, contribuye significativamente a detener la migración del estado de Michoacán hacia Estados Unidos. Los municipios que se beneficiarán con la exportación de aguacate son los siguientes: Acuitzio, Apatzingán, Ario de Rosales, Los Reyes, Nuevo Parangaricutiro, Peribán, Salvador Escalante, Tacámbaro, Tancítaro, Taretan, Tinguindín y Uruapan (SAGARPA, 2008).

2.2 Simbiosis Micorrízica

2.2.1 Generalidades

El término **micorriza**, de origen griego (*Mykes* = hongo y *Rhizos* = raíces), debe entenderse como la estructura especializada con diversas funciones, la cual se origina al asociarse, en forma mutualista, diversos grupos de hongos específicos con el sistema radical de las plantas (Alarcón, 2007). Los hongos pueden ser tanto micro como macroscópicos y se establecen en las raíces, que pueden ser las raíces propiamente dichas de las plantas vasculares (gimnospermas y angiospermas), el gametofito hipogeo de muchas briofitas y helechos, así como los esporofitos de muchos helechos de tal modo que, la nutrición de la mayoría de las plantas vasculares y briofitas, está directamente relacionada con la nutrición de tales hongos, este fenómeno es conocido como *micotrofia* (Román, 2003). En



cuanto a los hongos involucrados están los basidiomicetes, ascomicetes, zigomicetes, glomeromicetes y deuteromicetes (Álvarez y Monroy, 2008).

En 1885 el botánico alemán Albert Berthhard Frank, observó por primera vez a las micorrizas y las bautizó como tales mientras trabajaba con varios árboles frutales. Posteriormente, en 1900 el francés Bernard descubrió su papel determinante en la supervivencia y desarrollo de las orquídeas. A partir de 1910 se extendió con relativa rapidez su estudio, aunque solamente en plantas utilizadas en la agricultura y la jardinería (Smith y Read, 1997).

Es posible que un mismo hongo forme la asociación micorrízica con más de una planta a la vez, estableciéndose de esta manera una conexión entre plantas de distintas especies, así mismo, se ha visto que varias especies de hongos pueden micorrizar una misma planta al mismo tiempo (Smith y Read, 1997). Es importante señalar que durante el incremento del desarrollo vegetal los hongos micorrízicos no actúan solos sino que, lo hacen junto a otros organismos rizosféricos, tales como bacterias y diminutos invertebrados (Linderman, 1992).

2.3 La Micorriza Arbuscular

En la naturaleza pueden reconocerse diversos tipos de micorriza, las cuales se presentan en el ecosistema en función de características relacionadas con la presencia de fósforo y nitrógeno, tanto orgánico como inorgánico, y su relación con el tipo de vegetación dominante, así como por las estructuras que forman. Dentro de estos se encuentran: a) micorriza arbuscular, b) ectomicorriza, c) micorriza orquideoide, d) micorriza ericoide, e) micorriza monotropoide y f) micorriza arbutoide (Fig. 2). De estos tipos las más importantes desde el punto de vista aplicativo en los sistemas agrícolas y forestales son la micorriza arbuscular y la ectomicorriza (Alarcón, 2007).



La micorriza arbuscular (MA) es aquella que se forman de la asociación los hongos micorrizógenos pertenecientes al Phylum Glomeromycota con las raíces de al menos el 80% de las familias de plantas vasculares (Smith y Read, 1997).

Uno de los aspectos más importantes que confiere especial importancia al estudio de la MA es sin duda su contribución a la evolución de las plantas ya que se han encontrado estructuras fúngicas fosilizadas del tipo de los arbusculos. Estas evidencias datan de 400 millones de años atrás, particularmente en el período Devónico (cuadro 1). Sin embargo, recientemente, Redecker, *et al.* (2002) describieron un nuevo género y especie *Palaeoglomus grayi*, a partir de muestras fósiles que datan del periodo Ordovícico (455-460 ma). Lo anterior permite suponer que la colonización y evolución de las plantas en la tierra fue factible gracias a la co-evolución entre ellas y los HMA (Simon, *et al.*, 1993).

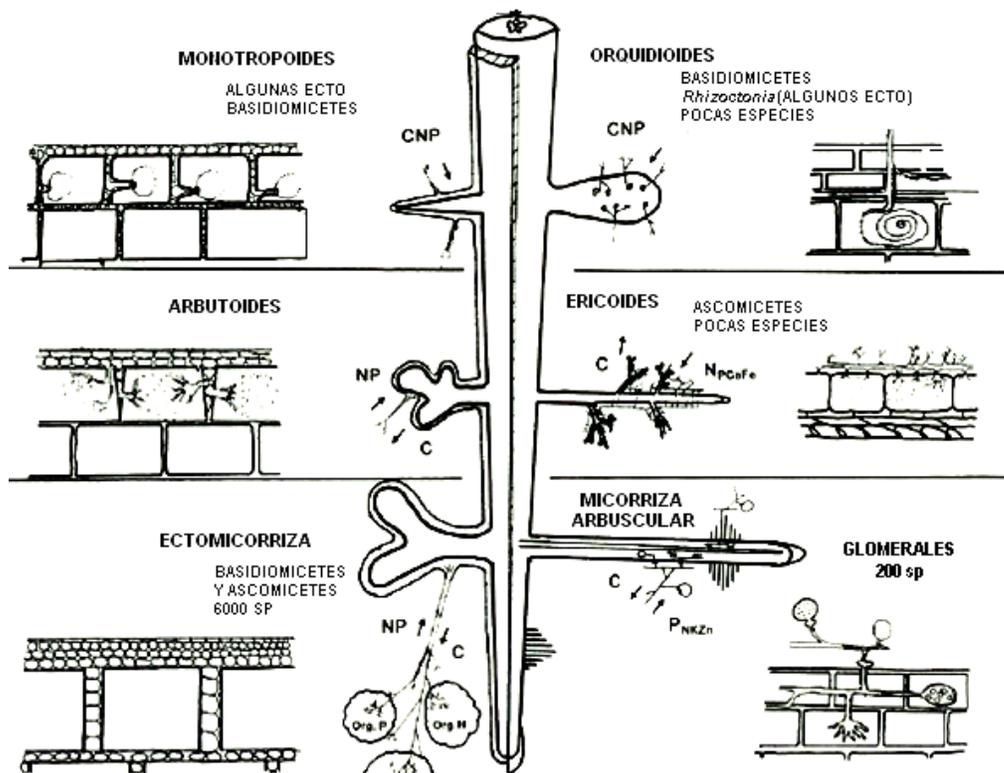


Figura 2. Tipos de micorriza (Modificado de Read, 1999).



Pocas son las familias botánicas en las que se excluye la posibilidad de asociarse a HMA, como en Pinaceae, Betulaceae, Fagaceae, Orchidaceae, Ericaceae, Chenopodiaceae, Fumaraceae, Cyperaceae, Commelinaceae, Urticaceae, Polygonaceae, Amaranthaceae, Capparidaceae, Caryophyllaceae, Cruciferaeae, Gentianaceae, Myrtaceae y Portulacaceae (Gerdemann, 1975; Sieverding, 1991; Bergeron, *et al.*, 1999, estos últimos citados en Alarcón, 2007). No obstante, en algunas de ellas la colonización por los hongos puede ser efímera, sin que su efecto sea esencial para la planta (Mikola, 1982), como ha sido mencionado para 16 especies del género *Carex* (Cyperaceae) (Miller, *et al.*, 1999).

Años (millones)	Eras	Periodos	Épocas	Características
4500	Azoica			Aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y minerales
3800	Precámbrica			
700	Paleozoica	Cámbrico		Trilobites (fósiles marinos)
500		Ordovícico		
435		Silúrico		Plantas terrestres. Evidencias fósiles de micorriza arbuscular
395		Devónico		Evidencias fósiles de micorriza arbuscular
345	Mesozoica	Carbonífero		Yacimientos de carbón
280		Pérmico		
230		Triásico		Dinosaurios
195		Jurásico		Pináceas; ectomicorriza
140		Cretácico		Desaparición de los dinosaurios
65	Cenozoica	Terciario	Paleoceno	
55			Eoceno	Primates, caesalpinoideas; especies ectotróficas
37	[Cenozoica]	[Terciario]		
23				
5				
1.8	Antropozoica	Cuaternario		
			Oligoceno	
			Mioceno	
			Plioceno	
			Pleistoceno	Glaciaciones
			Holoceno	<i>Homo sapiens</i>

Cuadro 1. Antecedentes de la evolución de los hongos micorrízicos arbusculares y ectomicorrízicos. (Tomado de Alarcón, 2007)



El estudio de la diversidad de los HMA se ha visto limitada principalmente por su biotrofia obligada y por la imposibilidad de reproducirlos y estudiarlos en ausencia de la planta (Souza, *et al.*, 2004). No se les conoce una fase sexual, así que la identificación de las especies de HMA se basa en las características morfológicas de esporas asexuales remanentes en el suelo, siendo el tamaño, color, hifa de sostén, ornamentación y estructuras de la pared los principales criterios usados para la delimitación de especies (Bago *et al.*, 2000). Sin embargo esta identificación no es muy confiable debido que se ha visto que numerosas especies llegan a estar presentes en el suelo sin esporular, o bien presentan periodos de esporulación poco definidos. La taxonomía de los HMA es bastante joven puesto que después de su descubrimiento la mayoría de los esfuerzos se concentraron en la descripción de nuevas especies dejando de lado las consideraciones taxonómicas (Morton, 1988).

2.3.1 Filogenia y taxonomía

Los intentos de clasificar los HMA se remontan a finales del siglo XIX y principios del XX, cuando se incluían en la familia Endogonaceae dentro del Phylum Zygomycota, basándose principalmente en el parecido de esporas y esporocarpos a los Zigomicetos (Gerdemann y Trappe, 1974). Por entonces no era evidente el posible origen monofilético de estos hongos, es decir, que compartieran o no un ancestro común. Hoy día, en base al análisis de la subunidad pequeña del ARNr se ha agrupado en un nuevo Phylum, denominado Glomeromycota (Fig. 3). Este Phylum aparentemente se encuentra más próximo de los Ascomicetos y Basidiomicetos, con quienes puede compartir un ancestro común, que de los Zigomicetos (Schüßler, *et al.*, 2001). Incluye una sola clase, los Glomeromycetes con cuatro órdenes, 10 familias y 13 géneros (Cuadro 2).

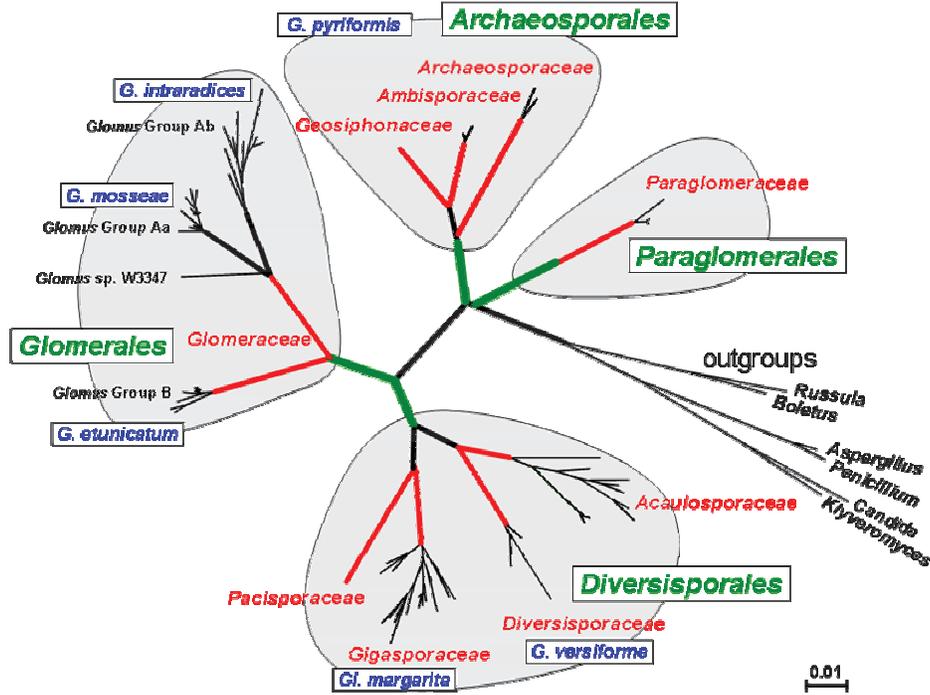


Figura 3. Filogenia propuesta para los HMA basada en un consenso de caracteres morfológicos y secuencias moleculares de la Subunidad Pequeña (SSU) del ARNr (Walker, 2008)

Phylum Glomeromycota

Clase Glomeromicetes

Órdenes	Familias	Géneros
Glomerales	Glomeraceae	<i>Glomus</i>
Diversisporales	Gigasporaceae Acaulosporaceae Entrophosporaceae Pacisporaceae Diversisporaceae	<i>Gigaspora</i> , <i>Scutellospora</i> <i>Acaulospora</i> , <i>Kuklospora</i> <i>Entrophospora</i> <i>Pacispora</i> <i>Diversispora</i>
Paraglomerales	Paraglomeraceae	<i>Paraglomus</i>
Archaeosporales	Geosiphonaceae Ambisporaceae Archaeosporaceae	<i>Geosiphon</i> <i>Ambispora</i> <i>Archaeospora</i> , <i>Intraspora</i>

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de los hongos micorrízicos arbusculares

Diversidad de los Hongos Micorrízicos Arbusculares asociados a plantas de aguacate (*Persea americana* Mill.), en un agroecosistema del Estado de Michoacán.



2.3.2 Estructuras formadas en la MA y proceso de colonización

La micorriza arbuscular se caracteriza por formar estructuras tanto extramatriciales como intrarradicales, que sólo son visibles a nivel microscópico. Así, pueden identificarse diversas estructuras que se forman la asociación simbiótica entre raíz-hongo (Sieverding, 1991). Primeramente, los hongos micorrízicos arbusculares generan una extensa red de hifas que favorece la absorción eficiente de agua y nutrientes contenidos en el suelo, al mismo tiempo que permite que la raíz posea un mecanismo alternativo que le ayuda a explorar una mayor superficie de suelo (Smith y Read, 1997). El micelio inicialmente permite la formación de esporas para la propagación de los hongos.

Las hifas extramatriciales o externas se desarrollan en el suelo y, en conjunto, forman un sistema complejo de redes de hifas responsables de la absorción de nutrientes, distribución de la asociación, formación de esporas, entre otras. Ya se ha discutido sobre que estas hifas tienen la capacidad de formar estructuras que pueden homologarse a los arbusculos, conocidas como estructuras ramificadas de absorción (BAS por sus siglas en inglés) cuya función puede estar relacionada con la absorción de fósforo y nitrógeno (Bago, *et al.*, 2000), pero no de carbono, lo que las diferencia de los arbusculos, así como también puede participar en la capacidad de intercambio de los mismos nutrientes (Bago, *et al.*, 1998). Por su parte, las hifas intrarradicales o internas permiten la dispersión de la asociación dentro del sistema radical mediante extensión longitudinal la cual está regulada de tal forma que su colonización sólo comprende las células del córtex de la raíz. Estas hifas penetran la epidermis de la raíz una vez que logran diferenciarse unidades de infección (colonización) del tipo de los apresorios (Alarcón, 2007).

Generalmente, las esporas (Fig. 4) son producidas en el suelo, aunque algunas especies del género *Glomus* tienen la capacidad de formarlas en el



interior de la raíz. Las esporas se consideran como los principales propágulos de reproducción y supervivencia de los hongos cuando están expuestos a condiciones adversas. Estas estructuras se caracterizan por ser multinucleadas y mediante estudios de amplificación de ADN se ha comprobado que las esporas son heterocarióticas. No obstante, se desconocen aspectos como la ploidía que puedan presentar y la fase sexual de los hongos (Bianciotto y Bonfante, 1992, citados en Alarcón, 2007).

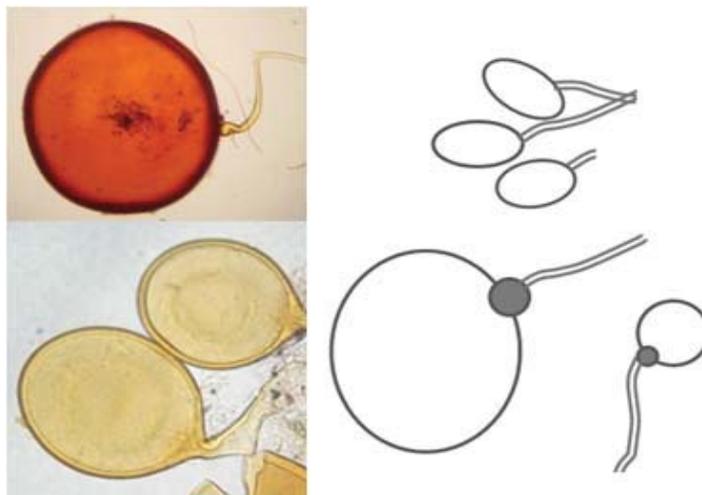


Figura 4. Esporas de hongo micorrízico arbuscular

La colonización de la raíz por parte de un hongo micorrízico es un proceso que involucra una secuencia de etapas aparentemente reguladas por una precisa interacción entre el endosimbionte y el hospedero (Román, 2003). Los estudios realizados con relación a las interacciones hospedero-microbio permiten describir los procesos que dan lugar al inicio de la colonización por HMA, partiendo de la emisión de señales por ambos participantes. Estas señales permiten el desarrollo de la simbiosis, caracterizada por la adhesión y el ingreso del hongo en los tejidos de su hospedero. El desarrollo de la expresión del reconocimiento y el establecimiento de los HMA en el sistema radical del hospedero están determinados por diversos factores, por lo que pueden definir ciertas etapas de las interacciones celulares en plantas hospederas y no hospederas (Alarcón, 2007).



El inicio de la colonización comienza con la germinación de las esporas y ésta es independiente de la presencia de la raíz del hospedero (Alarcón, 2007). Azcón *et al.* (1999) señalan las siguientes etapas básicas durante el proceso de la infección: 1) pre-infección, 2) penetración, 3) colonización intraradical, 4) desarrollo del micelio externo, 5) esporulación y 6) re-infección.

La pre-infección se encuentra asociada a la actividad de los propágulos infectivos que se encuentran presentes en el suelo que circunda a la raíz. Dichos propágulos pueden ser esporas o micelio fúngico (Román, 2003). La germinación de esporas, requiere en varios casos del estímulo de los exudados radicales (Daniels, 1984). Durante la germinación, el tubo de germinación se proyecta desde la espора hasta encontrar la superficie de la raíz. La hifa micelial tiene en cambio, un origen menos definido y puede ser el producto de múltiples ramificaciones dicotómicas (Elias y Safir, 1987).

Barea, *et al.* (1991) señalan que la penetración se inicia con la formación de un punto de entrada caracterizado por el desarrollo de un abultamiento o apresorio de contacto sobre la superficie de la raíz. No es del todo claro si el mecanismo de penetración está medido por un evento enzimático, por un evento mecánico o, por una combinación de ambos. En cualquier caso, dado el carácter no patogénico de estos hongos, la producción de enzimas hidrolíticas sería (en cantidad) apenas suficiente para abrir paso a la hifa de penetración sin alterar la estructura de la pared celular.

Una vez que penetra la hifa del hongo en la raíz, se genera un proceso proliferativo que conduce al establecimiento de una unidad de colonización que se puede extender a varios centímetros de distancia a partir del punto de penetración (Barea, *et al.*, 1991). El avance de la infección se restringe a la epidermis y parénquima cortical. La endodermis actúa como una barrera que impide el paso del hongo hacia el cilindro vascular, evitando el riesgo de una infección sistémica (Barea, *et al.*, 1991). La unidad de colonización avanza mediante el crecimiento



de hifas aseptadas que se extienden entre las células corticales y que generan estructuras características, como los arbusculos y las vesículas (Fig. 5).

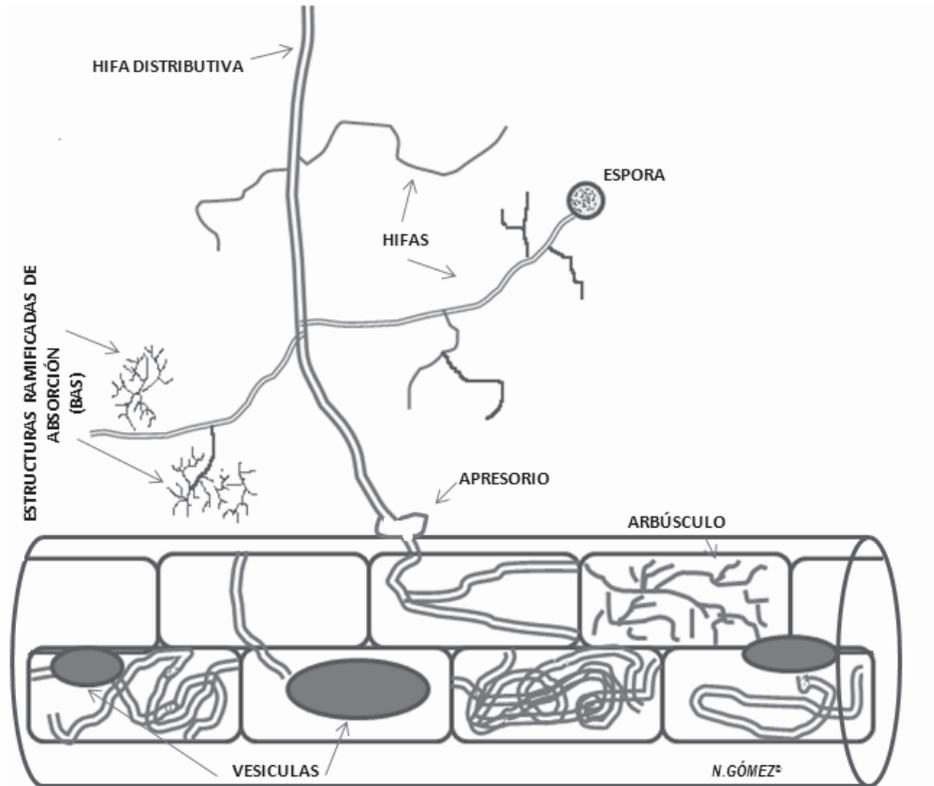


Figura 5. Características morfológicas relevantes del metabolismo de los hongos micorrízicos arbusculares

El desarrollo del micelio externo o extramatricial (ME), es un evento simultáneo al avance de la infección cortical del micelio interno (MI). Este micelio actúa como un puente que conecta el suelo con el interior de la raíz. Las hifas externas se proyectan a varios centímetros más allá de la superficie de la raíz, e incluso pueden establecer vínculos con raíces vecinas (Newman *et al.*, 1994).

Barea, *et al.* (1991) señalan que algunas semanas después de iniciada la infección, el hongo está en condiciones de esporular, sin embargo, tal acontecimiento está supeditado a las condiciones ambientales que imperan en el



suelo. Específicamente, la humedad parece ser el factor regulador de mayor importancia, ya que se ha visto que el estrés hídrico del suelo acelera la esporulación. En el micelio externo se desarrollan las estructuras reproductoras del hongo, en tanto que en el micelio interno se concentran las actividades metabólicas y de almacenamiento de carbono (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988).

2.3.3 Importancia de la MA

En términos generales, la importancia de los HMA puede traducirse en los beneficios que aportan a las plantas, en relación con el mejor aprovechamiento de agua y nutrimentos, especialmente el fósforo cuando éste es limitado. Además mantienen por mayor tiempo la funcionalidad de la raíces, mientras que el micelio externo genera una extensa red de hifas en el suelo que permite al raíz mayor capacidad de exploración del volumen del suelo. De esta manera el sistema radical micorrizado posee una mayor capacidad de absorción, tanto de nutrimentos como de agua, en comparación con aquellas raíces que no tienen la simbiosis establecida. Por otra parte el suelo también es favorecido por la actividad de los HMA; en cuanto a la estabilidad del suelo, las hifas permiten la agregación de las partículas del suelo, lo que evita que la pérdida de éste por agentes de erosión sea menor (Abbott y Gazey, 1994). A su vez, la actividad de los HMA permite que las poblaciones microbianas sean modificadas, participando así como agentes reguladores de la microbiota benéfica y patogénica y, de este modo, influir en la dinámica del carbono orgánico del suelo y de la fertilidad del mismo (Alarcón, 2007).

La protección brindada por el hongo hace que además, la planta sea más resistente a los cambios de temperatura y a la acidificación del suelo derivada de la presencia de azufre, magnesio y aluminio. Por si todo esto fuera poco, algunas reacciones fisiológicas del hongo inducen a la raíz a mantenerse activa durante



más tiempo que si no estuviese micorrizada. Esto deriva en una mayor longevidad para la planta (Alarcón *et al.*, 2004).

2.3.4 Herramientas moleculares en el estudio de la MA

El estudio de la diversidad de los HMA hasta hace poco tiempo era una tarea que presentaba una serie de complicaciones, principalmente por su biotrofia obligada y la imposibilidad de estudiarlos en ausencia de una planta. Por otro lado, la mayoría de los estudios de diversidad se ha basado en las diferencias morfológicas que presentan sus esporas remanentes en el suelo. No obstante el polimorfismo genético en el Phylum Glomeromycota es mucho mayor al que se espera en base a las características morfológicas de sus esporas (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 2001). Los datos filogenéticos obtenidos de las secuencias del ADNr 18S de diferentes hongos se han usado para fechar su origen entre 353 a 462 millones de años (Simón *et al.*, 1993), lo que corresponde al periodo en que las plantas primitivas colonizaron los continentes.

Ya han sido propuestas varias metodologías no morfológicas, para identificar las especies de micorrizas, entre las cuales destacan las técnicas bioquímicas o serológicas, sin embargo ninguna de ellas ha conseguido el nivel de resolución adecuado por lo que la utilidad no se ha generalizado. La biología molecular ofrece varias herramientas para solucionar los inconvenientes que genera el estudio morfológico-descriptivo de los HMA, tal como es el caso de los marcadores de ADN que han demostrado ser una excelente herramienta en los estudios taxonómicos, estimación de relaciones evolutivas y variabilidad genética e identificación de diferentes organismos, este potencial les permite ser empleados en la identificación y caracterización de hongos MA, apoyados en gran medida en la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Esta técnica presenta gran versatilidad en sus aplicaciones, además de su alta especificidad y sensibilidad. En este sentido, Bruns y Gardes (1993), señalan que la región ideal para realizar amplificaciones de PCR deben cumplir con los siguientes criterios: 1) estar presentes en todos los hongos de

diversidad de los hongos micorrizicos arbusculares asociados a plantas de aguacate (*Persea americana* Willd.), en un agroecosistema del Estado de Michoacán.

