



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

ESCUELA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**ESTUDIO DE HONGOS ENDOMICORRIZICOS EN
EL CULTIVO DE PAPAYA.**

T E S I N A

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO HORTICULTOR

PRESENTA:

RAMÓN MENDOZA CARRILLO

ENERO DE 2007

APATZINGÁN, MICHOACÁN, MÉXICO





UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
ESCUELA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

LA MESA DE SINODALES QUE REVISÓ LA

T E S I N A

TITULADA

**ESTUDIO DE HONGOS ENDOMICORRIZICOS EN
EL CULTIVO DE PAPAYA**

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO HORTICULTOR

PRESENTA

RAMÓN MENDOZA CARRILLO

A P R O B A R O N :

DR. JOSÉ LUIS ESCAMILLA GARCÍA
Presidente del H. Jurado

ING. GABRIEL E. VEGA M.
Sinodal

ING. SALVADOR VENEGAS F.
Sinodal

ENERO DE 2007

APATZINGÁN, MICHOACÁN, MÉXICO



A G R A D E C I M I E N T O S

A MIS ASESORES DE TESIS

DR. JOSÉ LUIS ESCAMILLA GARCÍA

M.C. MARIO FIGUEROA CÁRDENAS

ING. GABRIEL E. VEGA MÉNDEZ

DEDICATORIA

A MI ESPOSA:

GRACIELA ARÉVALO CERVANTES: por la paciencia que me ha tenido para lograr una superación continua y que me ha motivado a dar siempre lo mejor de mi persona. Porque caminamos juntos teniendo como meta dejar un buen ejemplo a nuestros hijos y formarlos como buenos ciudadanos.

MI HIJOS:

JULIO CÉSAR, ALEJANDRO Y DENISSE: porque en Ustedes encontré la fuerza que me condujo a la meta profesional y académica.

A MIS COMPAÑEROS:

Por esos años de convivencia y compañerismo en los cuales anidamos nuestras esperanzas, aspiraciones y anhelos profesionales.

AL RECTOR DE LA UNIVERSIDAD:

Por habernos brindado todo tipo de facilidades para nuestro diplomado de titulación.

A LA DIRECTORA DE LA FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA “PRESIDENTE JUÁREZ”:

Por transmitirme su entusiasmo personal para la realización de este trabajo de investigación.

AL DIRECTOR Y PROFESORES DE LA ESCUELA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS:

Por su incondicional apoyo, por sus asesorías en la búsqueda del conocimiento universitario que me ha orientado hacia una vocación profesional de servicio dirigida hacia los productores agropecuarios apoyándolos para elevar su productividad y sus niveles de bienestar.

PARA MIS COMPAÑEROS DOCENTES Y ADMINISTRATIVOS DEL CECYTE 09 APATZINGÁN.

Í N D I C E

	Página
ÍNDICE	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	v
INTRODUCCIÓN	vi
Justificación	vii
Objetivos	viii
CAPÍTULO I	
REVISIÓN DE LITERATURA	
1.1 Importancia Económica de las Micorrizas	1
1.1.1 Antecedentes de las micorrizas.	2
1.1.2 Beneficios por la aplicación de micorrizas	5
1.2 Comportamiento de la altura de las plantas de papayo en campo	6
1.3 Comportamiento del número de hojas en planta de papaya en campo	7
1.4 Comportamiento de fructificación de papaya en condiciones de campo	7
1.5 Comportamiento de floración de la papaya en condiciones de campo	8
1.6 Importancia y aplicación de las micorrizas arbusculares	8
1.7 Importancia del fósforo en las plantas	11
1.8 Taxonomía	12
CAPÍTULO II	
MATERIALES Y MÉTODOS	17
CAPÍTULO III	
ESTUDIO DE HONGOS ENDOMICORRIZICOS	
3.1 Métodos de separación de esporas	18
3.1.1 Método de tamizado y decantación en húmedo	18
3.1.2 Método de adhesión y flotación	19
3.1.3 Método de pipeteo	19
3.1.4 Método de centrifugación	20
3.2 Cuantificación de esporas	21
3.3 Métodos de separación de esporas	24
3.4 Cuantificación de esporas	25
3.5 Metodologías moleculares aplicadas a la investigación en hongos micorrizas arbusculares	26
3.6 La inoculación e infección de la micorriza	28
3.6.1 Infección	29
3.7 Estructura morfológica de las micorrizas	31
3.8.1 El proceso de aislamiento de esporas micorrízicas	34
3.8 Técnica de tinción de raíces micorrizadas	36
CONCLUSIONES	38
BIBLIOGRAFÍA	39

ÍNDICE DE FIGURAS

	página
Figura 1 Método de tamizado y decantación en húmedo (Gerdemann y Nicholson, 1963)	18
Figura 2 Método de adhesión y flotación (Sutton y Barron, 1972)	19
Figura 3 Método de pipeteo (Smith y Skipper, 1979)	20
Figura 4 Método de centrifugación (Jenkins, 1964)	21
Figura 5 Tipos de unión de la hifa	22
Figura 6 Esporocarpos con peridio y sin peridio.	23
Figura 7 Células auxiliares.	23
Figura 8 Azigospora formada por el género Acaulospora	24
Figura 9. Método de separación de esporas	25
Figura 10. Proceso de infección de las raíces con micorrizas vesículo-arbusculares	30
Figura 11 Espora de la micorriza arbuscular Entrophospora colombiana31
Figura 12 Estructuras morfológicas de las micorrizas vesículo-arbusculares.	32
Figura 13 Muestreo para evaluación de hongos micorrízicos arbusculares.	34
Figura 14 Proceso de aislamiento de esporas35
Figura 15 Técnica de clareo y tinción (<i>Kormanik, et al., 1980</i>)	37

RESUMEN

Los recursos metodológicos que se utilizaron en este trabajo parten de una recopilación bibliográfica para lo cual se revisaron documentos, folletos técnicos y libros relacionados al tema del cultivo de papaya y al estudio de hongos endomicorrízicos. Inicia con una introducción que hace referencia a la importancia del cultivo y su origen. Continúa con el planteamiento del problema, la justificación para elaborar el presente documento así como los objetivos general y específicos.

En la revisión de literatura se dio énfasis a la importancia económica de la aplicación de micorrizas, describiendo además de manera breve los antecedentes correspondientes. Se enumeran una serie de beneficios por la aplicación de éstas y se describe además el comportamiento de las plantas de papaya en campo respecto a la altura de la planta, el número de hojas, la floración y la fructificación de la misma.

Más adelante se refiere a la nutrición vegetal y a la importancia del fósforo para favorecer la relación simbiótica entre el hongo y el cuerpo radicular del papayo. Así mismo, no se omite describir la clasificación taxonómica y sistemática de la micorriza, caracterizando algunos géneros micóticos.

En el capítulo tercero se relatan los métodos para la separación de esporas, su cuantificación, así como las metodologías moleculares aplicadas a la investigación en hongos micorrizas arbusculares. Se describen los procesos de inoculación e infección de la micorriza así como su estructura morfológica, aislamiento y técnicas de tinción de raíces micorrizadas.

A manera de conclusión se propone el uso de hongos micorrízicos para sustituir la fertilización inorgánica en el cultivo de la papaya con la resultante de una cultura más orgánica y un sustancial ahorro en la economía del productor de hasta un 343 %.

INTRODUCCIÓN

La planta de papaya (*Carica papaya L.*), es una fruta nativa de América tropical que se cultiva extensamente en regiones tropicales y subtropicales del mundo, en grande o pequeña escala en Florida, Hawai, África oriental británica, Sudáfrica, Ceilán, India Archipiélago Malayo, Australia y otros países tales como México, Brasil Cuba, Venezuela y Puerto Rico (*Ochse et al., 1984; Salunkhe y Desai, 1984*). En México, los principales estados productivos son: Veracruz, Guerrero, San Luís Potosí, Colima, Michoacán y Oaxaca.

Importancia del cultivo

El cultivo de la papaya tiene gran importancia económica y social para nuestro país, debido a su alto rendimiento y valor nutritivo, el Estado de Veracruz ha figurado, desde hace muchos años como la entidad mas importante de esta fruta, al aportar un volumen de producción de 129 704 toneladas durante la serie histórica comprendida de 1985 a 1994 (INIFAP, 1997). En la propagación de frutales, es práctica normal de los viveristas la esterilización o fumigación del suelo para obtener plantas libres de enfermedades radicales.

Planteamiento del problema

Considerando que los frutales son de suma importancia en la alimentación humana, y que su producción trae consigo elevados costos, resulta necesario estudiar y generar una tecnología del empleo y manejo de hongos endomicorrizicos arbusculares, pues estos juegan un papel muy importante en la nutrición, crecimiento y, por ende, vigor de las plantas (*Jaén 1987; Alarcón, 1993*). *Bolan (1991)* menciona que sus beneficios frecuentemente han estado relacionados con el incremento de la entrada de nutrimentos poco móviles, especialmente fósforo.

Existen evidencias que indican que la adición de la materia orgánica a los suelos conduce a un buen desarrollo de la micorriza (*Jaén 1989*). La elaboración de un biocarbono aprovechando desechos agroindustriales, su biodegradación y estabilidad en materias no contaminantes, y su posterior utilización como fuentes de nutrientes para las plantas, es una de las opciones de utilización de la pulpa de café y la cachaza de caña (*Montero, 1991*).

Justificación

El uso y manejo de inoculantes micorrizicos puede representar una alternativa tecnológica durante el proceso de propagación de especies vegetales en viveros y, teniendo como base los resultados obtenidos en numerosos estudios realizados sobre el tema en el presente trabajo se planteó conocer las respuesta de las plantas de papaya para la inoculación con la endomicorriza arbuscular, así como los efectos de simbiosis papaya-hongo. En la rizosfera se encuentran organismos que facilitan la absorción de nutrimentos por la planta, dentro de estos, los hongos micorrizicos arbusculares (HMA) han mostrado en diversas investigaciones que se encuentran asociados consistentemente a diversos cultivos dentro de lo que destaca el cultivo del papayo.

En vivero, la inoculación con HMA promueve un acelerado y vigoroso crecimiento de papayo, permitiendo obtener plántulas aptas para el transplante 30 días antes de lo que normalmente ocurre con un manejo tradicional (*Sánchez-Espíndola et al., 1993; Quiñones, 1997*).

Si se considera que la mayoría de la plantas pueden tener una respuesta positiva a la inoculación de los HMA en condición de campo, por consiguiente es importante seguir generando investigaciones sobre esta biotecnología para conocer su comportamiento en cultivos que sean redituables comercialmente. Si esto se combina con una dosis de fertilización química adecuada, probando que en época de

aplicación es más eficiente el agroquímico, puede lograrse una reducción en tiempo de cosecha e incremento en el rendimiento del fruto.

Objetivos:

Objetivo general:

- Conocer la tecnología microbiana micorrizica en el cultivo de papaya.

Objetivos específicos:

1. Conocer el proceso de inoculación de los hongos endomicorrizos arbusculares en papaya.
2. Estudiar el proceso de infección de las raíces de la papaya con micorrizas.
3. Conocer la técnica de tinción de raíces y proceso de aislamiento de las esporas micorrizadas.

CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 la importancia económica de las micorrizas

Entre los millones de seres vivos que habitan el suelo se encuentran los hongos. Algunos son capaces de provocar enfermedades en las plantas pero la mayoría es beneficiosa y muy eficiente en la descomposición de la materia orgánica.

En esta última categoría se encuentran las micorrizas (Ferrero-Cerrato 1989). es un grupo especial de hongos que se encuentran libremente en la naturaleza, forman hilos y cordones que les permiten rastrear entre las partículas del suelo.

Actúan como raíces extras de las plantas, los hongos micorrícicos bombean nutrientes a las plantas (fósforo, nitrógeno, potasio etc.), en contrapartida el hongo recibe de la planta los hidratos de carbono que no pueden sintetizar por carecer de clorofila.

Las plantas micorrizadas crecen con ventajas pues éstas aumentan la absorción de nutrientes y de agua. Además producen sustancias antibióticas lo que hace que las plantas sean más resistentes a las enfermedades. Si tienes un jardín o si tu familia lo tiene, entonces debes saber que cuesta mucho trabajo mantener a los insectos hambrientos alejados de las plantas y ayudar a que tus flores y vegetales crezcan saludables.

Muchas personas usan químicos, pesticidas y fertilizantes; otros sostienen que el uso de químicos ha tenido un mal efecto sobre el medio ambiente. Pero si no quieres usar químicos, pesticidas y fertilizantes ¿qué otras alternativas tienes? (Ferrero Cerrato 1989). Inténtalo con hongos, dicen algunas compañías del ramo.

De hecho, varias plantas –incluidas muchas que ingerimos como alimento- no pueden sobrevivir sin los beneficios que los hongos les ofrecen. entre los hongos más provechosos están las micorrizas. Las micorrizas se adhieren a las raíces de las plantas y las ayudan a tomar nutrientes del suelo, nutrientes que las plantas necesitan pero que no pueden absorber bien por sí mismas.

No todos los hongos son benéficos para las plantas. Algunas clases de hongos causan serias enfermedades en las plantas. la gran hambruna de la patata en irlanda se originó en la acción del hongo *Phytophthora o Infestans*, que destruyó los cultivos de papa en todo el país entre los años de 1845 y 1848.

Pero los hongos benéficos ayudan a las plantas a resistir enfermedades y permiten que éstas sean más fuertes. Algunos científicos especulan que los hongos ayudaron a las plantas a transferirse del agua a la tierra cuando el actual tomate, el maíz y la soya aún no existían.

Las micorrizas son asociaciones entre hongos benéficos y las raíces de las plantas. La relación beneficiosa de ciertos hongos con las plantas es un ejemplo de simbiosis. En la naturaleza, la simbiosis es la relación de dos o más organismos, que puede ser o no benéfica para ambas partes (*Ferrero Cerrato, 1989*).

1.1.1 Antecedentes de las micorrizas

En Colombia, el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) inició trabajos de investigación con micorrizas (MA) desde la década de los 80, donde se evaluó su importancia agronómica en cultivos tropicales como yuca y algunas pasturas. Se iniciaron trabajos de recolección de hongos nativos, aislamiento e identificación de micorrizas originarias del Valle de Cauca, Llanos Orientales, entre otras.

Como resultado de estas investigaciones se formó un Banco de Germoplasma, y algunas recomendaciones relacionadas con su biodiversidad potencial de uso en la agricultura. Existen también experiencias positivas con la aplicación de inóculos de micorrizas (*Glomus*, *Scutellospora* y *Entrophospora*) en frutales tropicales como araza (*Eugenia sptipitata*), borojó (*Borojoa sorbillis*) y chontaduro (*Bactris gasipaies*) (Salamanca et al., 1997).

Sin embargo, se conoce muy poco en especies como mora, lulo, uchuva, papaya. Aunque existen evidencias de su alta capacidad de asociación con MA, por lo que presentan un alto potencial para mejorar la aclimatación de plantas propagadas en vivero y posteriormente transplantadas a campo, donde frecuentemente son sometidas a condiciones de estrés por nutrientes especialmente fósforo y nitrógeno, estrés por sequía y altas temperaturas, así como problemas por toxicidad de compuestos de aluminio y sales, entre otros.

Las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*, entre ellas la micropropagación o multiplicación clonal, han sido empleadas como metodologías que logran aumentar significativamente los niveles de productividad de muchos cultivos. Después del enraizamiento *in vitro*, las *vitro* plantas requieren un periodo de adaptación en condiciones de vivero antes de ser llevadas a la plantación definitiva.

Las micorrizas arbusculares son importantes en la supervivencia y crecimiento de muchas especies de frutales micropropagadas; durazno (Fortuna et al., 1992 y 1998), piña (Guillermín et al., 1992), aguacate (Vidal et al., 1992), uva (Schubert et al., 1987, 1988, 1990), manzana y pera (Branzanti et al., 1987; Granger et al., 1983), fresas (Chávez et al., 1990; Hrselova et al., 1989; Vestberg, 1992) y plátano y banano (Ramcharan et al., 1995), yuca (Azcon - Barea, 1997).

Las técnicas de producción *in vitro* no sólo permiten la formación de micorrizas MA, sino que cuando ocurre durante fases tempranas puede ser una estrategia para mejorar el crecimiento de plantas (Gianinazzi et al., 1989). No

hay reportes a nivel mundial de utilización de micorrizas en especies de name (*Dioscórea*).

Las MA pueden ser utilizadas en la agricultura en forma de biofertilizantes, tanto en vivero como durante el enraizamiento *in vitro* plantas, constituyéndose así en una alternativa valiosa para solucionar problemas de micropropagación, aclimatación y nutrición de diferentes especies de importancia en la agricultura y reduciendo al mismo tiempo los costos de producción, ya que requieren una menor aplicación de insumos fertilizantes, riego y pesticidas y a su vez permitiendo de esta forma establecer sistemas de producción más eficientes, precoces y productivos, que aumenten la sostenibilidad de los cultivos.

De esta forma, estas tecnologías pueden beneficiar y ser fácilmente transferidas a técnicos y agricultores dedicados a la producción de especies de importancia económica en la Costa Atlántica como plátano, yuca y ñame, mediante el desarrollo e implementación de metodologías de manejo y producción, tanto de micorrizas arbusculares, así como también la aplicación de humus de lombriz en módulos locales artesanales establecidos en fincas de productores (*Gianinazzi et., 1989*).

Los estudios más recientes, muestran los efectos benéficos de las Micorrizas Arbusculares (MA) en el mejoramiento de la aclimatación de plantas micro propagadas (manzana, durazno), en la reducción de la mortalidad de plantas ornamentales y frutales, al crecer en sustratos con bajos contenidos de fósforo y buena aireación, que se reflejan en un incremento del peso seco de hojas y raíces, así como una floración significativamente más precoz utilizando micorrizas del género *Glomus* (*mohosead*, *intraradices* y *viscosum*) que en plantas no micorrizadas, (*Olivares y Barea, 1991; Fortuna, et al., 1996*).

En el ámbito mundial, se reportan múltiples experiencias acerca de los beneficios de las micorrizas arbusculares (MA) sobre especies frutales, donde frecuentemente se compara el crecimiento de plantas con micorrizas y sin micorrizas, estas diferencias son atribuibles a una mayor absorción de

nutrientes, mayores niveles en la producción de hormonas y mayores contenidos de clorofila (Godar, Awasthi y Kaith, 1996; Lovelock, kylo, et al., 1997).

Estas diferencias se han observado en especies tropicales como Mora Excelsa, *Prioria copaifera* en Caribe (Trinidad y Tobago y Panamá), y en múltiples árboles tropicales de la familia Fabacea, dicotiledóneas y angiospermas (Torti, et al., 1997). Otros autores reportan beneficios en especies como Chirimoya (Azcón y Barea, 1997), en *Tamarindus indica*, *Parkia biglobosa*.

1.1.2 Beneficios por la aplicación de micorrizas.

Las micorrizas son asociaciones entre la mayoría de las plantas existentes, con hongos benéficos, que permiten incrementar el volumen de la raíz y por tanto permiten una mayor exploración de la rizósfera y son consideradas los componentes más activos de los órganos de absorción de nutrientes de la planta, la que a su vez provee al hongo simbiote, de nutrientes orgánicos y de un nicho protector (Azcon - Barea, 1997).

Las asociaciones simbióticas establecidas por las plantas y los hongos pertenecientes a los Zigomicetos, orden de los Gomales, más conocidas como micorrizas arbusculares, son consideradas en la actualidad a nivel mundial como biofertilizantes, bioprotectores y biorreguladores para la mayoría de cultivos y ya hacen parte del manejo integrado de suelos y de plagas, así como del manejo de los materiales micropropagados en el área de la biotecnología vegetal (Azcón y Barea, 1997).

Es ampliamente conocida la multitud de ventajas que tiene una planta micorrizada con respecto a una que no lo esté. Entre estas ventajas, se encuentran:

- Contribución a la nutrición mineral de la planta, en especial a su aporte de fósforo, por absorción, translocación y transferencia; en

la nutrición nitrogenada de la planta, y en la adquisición de otros nutrientes como zinc y cobre, y se considera que probablemente podrían translocar potasio, calcio, magnesio y azufre.

- Control biológico para algunos patógenos provenientes de suelo, e incremento de la tolerancia de la planta a patógenos.
- Efecto positivo sobre el desarrollo y distribución de biomasa.
- Mejoramiento de la tolerancia a condiciones de estrés hídrico y salinidad.
- Influencia sobre la fotosíntesis de la planta hospedera.
- Producción de hormonas estimulantes o reguladoras de crecimiento vegetal.
- Incremento en la relación parte aérea/raíz de la planta micorrizada.
- Aportes en recuperación de suelos por ser formadores de agregados del suelo.
- Uso potencial en suelos degradados o áridos en programas de revegetación.
- Interacción positiva con fijadores libres y simbióticos de nitrógeno y otros microorganismos de la rizósfera (*Olivares y Barea, 1991*).

La simbiosis de endomicorriza arbuscular debe ser considerada como un elemento esencial para promover sanidad y productividad en los cultivos de importancia económica. Beneficios máximos serán obtenidos si se inocula con hongos micorrizógenos eficientes y si se hace una selección de combinaciones compatibles de hongo - planta - suelo. En general, cuanto más temprano se establezca la simbiosis, mayor el beneficio (*Azcón y Barea, 1997*).

1.2 Comportamiento de la altura de las plantas de papayo en el campo

De manera general, las plantas hongos micorrizadas arbusculares mostraron alturas superiores a las no micorrizadas. Así mismo Quiñones (1995) indica que una planta inoculada con HMA puede responder mejor al trasplante en campo, debido al vigor adquirido del vivero.

Al respecto *Braunberger (1991)* comenta que la disminución en la altura de las plantas se debe a que la fertilización en fechas en donde la micorriza se esta estableciendo en las raíces, produce una disminución del porcentaje de arbusculos, que a su vez ocasionan un bajo porcentaje arbuscular en la planta hospedera.

Pero en su parte *Ferrera-Cerrato (1989)* indica que las asociaciones micorrizicas están reguladas por la interacción entre las plantas hospedera, los hongos endomicorrizicos, las condiciones ambientales y edáficas, las propiedades de la raíz, la perturbación del suelo, la compactibilidad de la planta hospedera y el hongo, las practicas culturales, las labores del cultivo, así como la presencia de otros microorganismos nativos en el suelo (bacterias, otros HMA, nematodos, etc.)

1.3 Comportamiento del número de hojas en planta de papaya en campo

Las hojas juegan un papel muy importante en el cultivo de papaya porque, en función del número de estas, se determina la futura producción, que hasta los primeros 60 días después del trasplante hubo una tendencia exponencial en cuanto al numero de hojas, momento critico si se considera que es en esta fecha que se inicia la floración y por consiguiente la futura producción. al igual que con la altura y el diámetro, el numero de hojas siempre fue superior en las plantas micorrizadas que en las no micorrizadas (*Díaz g. 1995*).

1.4 comportamiento de fructificación de papaya en condiciones de campo

La presencia de frutos se evaluó durante dos fechas, a los 120 días y 151 días después del transplante, para observar el efecto que había tenido la inoculación en la fructificación, se encontró que el los tratamientos micorrizados presentaron mayor fructificación que los no micorrizados.

Así mismo, *Zarate, (1991)* indica para el caso de la papaya obtuvo incremento hasta de 40% en los tratamientos con micorriza y fertilizados.

Finalmente se incluye que es importante tener plantas micorrizadas y postergar la primera fertilización hasta 30 ddt para obtener mejor respuesta. Nuevamente, se resalta la importancia que tienen estos endofitos en facilitar la disponibilidad de fósforo en la planta y su efecto en la precocidad de la misma *Zarate, (1991)*.

1.5 Comportamiento de la floración de la papaya en condiciones de campo

La fertilización a base de fósforo es esencial para el cultivo de las papayas por que esta puede influir en adelantar la floración y por consiguiente la producción. En este experimento (*Vargas et al., 1995 y Mandujano 1993*), para entender el papel de la inoculación micorrizica en condiciones de campo, evaluaron la aparición de las primeras flores, considerando un factor de días a la floración, de esta manera, se encontraron que todos los tratamientos micorrizados iniciaron su floración a 45 días después de plantación, valor importante si se compara con el dato reportado normalmente, que indica que la floración inicia después de 60 días. Con base en esto, puede decirse que la planta de papaya respondió correctamente a la inoculación y el fósforo que pudo adsorber permitió la precocidad observada.

1.6 Importancia y aplicación de las micorrizas arbusculares.

¿Que nos motiva a la aplicación de micorrizas?. En el año 2025, se prevé que la población para América Latina y el Caribe alcanzará la cifra de 799 millones de habitantes, con relación a 40 millones en 1985, es decir que en 40 años prácticamente se duplicará la población. Para satisfacer las crecientes demandas de la región es necesario incrementar la producción agropecuaria en una tasa cercana al 2% anual (*Nores, 1992*).

Estas demandas en producción podrán ser satisfechas mediante aumentos en la productividad y/o a través de la incorporación de nuevas tierras a la producción agropecuaria, las mayores áreas con posibilidades de expansión agrícola se encuentran localizadas en el trópico húmedo (1.500 millones/ha) (*Grant, 1957; ICA, 1974; IGAC, 1983*).

Colombia como país tropical y por su alta biodiversidad, presenta ventajas naturales, para la producción de especies como plátano, yuca y ñame, las cuales se encuentran adaptadas a diversas regiones naturales como la Región Caribe, el Piedemonte Llanero y los Valles Interandinos.

El uso de tecnologías apropiadas facilita que este enorme potencial pueda ser aprovechado para la producción competitiva y sostenible de las regiones. En la actualidad, la producción comercial para el consumo en fresco o para la agroindustria requiere superar múltiples limitantes, que se manifiestan a lo largo de toda la cadena productiva, desde la selección de materiales genéticos adaptados a condiciones agroecológicas específicas, en el manejo de plantas propagadas a partir de vivero o por técnicas de micropropagación al ser transplantadas a condiciones de campo, debido al desconocimiento de los mecanismos de adaptabilidad o aclimatación de estas especies, que se refleja en pérdidas en la producción, uso excesivo de insumos fertilizantes y pesticidas, que aumentan los costos de producción y afectan la competitividad de estas especies, hasta la cosecha y poscosecha que incluye procesos agroindustriales (*Grant, 1957*).

Adicionalmente, la mayoría de las tecnologías existentes corresponden a especies de plantas adaptadas a condiciones de zona templada y subtropical, como a zonas mediterráneas. Las especies tropicales en su mayoría cuentan con escaso conocimiento y poco desarrollo de tecnologías apropiadas, la mayoría de las cuales han sido desarrollada a partir del conocimiento empírico de los productores y que debe ser revisada y validada por la ciencia y la tecnología.

En condiciones naturales la mayoría de las plantas tropicales adaptadas a diversos nichos ecológicos se encuentran asociadas con microorganismos del suelo, como micorrizas, estableciendo relaciones benéficas (simbióticas). Esta estrategia de la evolución ha sido muy exitosa, y a pesar de que su conocimiento se reporta desde hace más de un siglo, solo durante las últimas décadas el hombre ha empezado a utilizarla en las producciones hortícolas y

frutícolas, donde existen evidencias de su potencial y éxito para el desarrollo competitivo y sostenible de estas especies.

Adicionalmente, las nuevas tendencias del mercado tanto mundial como regional, buscan ser más cautelosas en lo referente a la aplicación de agroquímicos y pesticidas en la agricultura, por los problemas que ocasionan sobre la salud humana (*Grant, 1957*).

Dentro de la diversidad de esos microorganismos del suelo, y sus diferentes interacciones, se destacan grupos de relaciones positivas como el de algunas asociaciones simbióticas micorrízicas, presentadas entre las raíces de las plantas y ciertos hongos del suelo, que juegan un papel clave en el ciclase de nutrientes en el ecosistema y en la protección de las plantas contra estrés cultural y ambiental, que han demostrado efectos positivos en la absorción de nutrientes, dentro los cuáles el más estudiado a nivel mundial ha sido el fósforo.

Las principales limitantes para la absorción de fósforo por las plantas son la baja disponibilidad de fósforo en los suelos (deficiencia del nutriente y procesos de fijación) y la baja movilidad del elemento que no permite que la planta lo pueda absorber. Las micorrizas, permiten aumentar el área de exploración de las raíces en el suelo, permitiendo una mayor zona de contacto y por tanto de absorción de nutrientes y agua, favoreciendo a las plantas que establecen relaciones simbióticas con ellas.

En Colombia, la aclimatación, la adaptación y la multiplicación de los cultivos en diversas condiciones agroecológicas, son las mayores limitantes para la producción sostenible y eficiente. Los microorganismos tienen un gran potencial para contribuir a la solución de múltiples problemas de la agricultura, dentro de los cuales, los biofertilizantes con base en micorrizas arbusculares (MA) son una alternativa para reducir pérdidas en los procesos de multiplicación de especies frutales, mejorar la aclimatación y nutrición de frutales de importancia actual y potencial.

Estas tecnologías tienen aplicación en un gran número de especies, incorporadas a la producción de semilla de buena calidad, tanto a nivel de vivero como en el manejo de los materiales micropropagados en el área de la biotecnología vegetal (*Ascós y Barea, 1997*).

1.7 Importancia del fósforo en las plantas

El fósforo es esencial para el crecimiento de las plantas y es absorbido casi enteramente en forma inorgánica, no existe otro nutriente que pueda sustituirlo, es uno de los tres nutrientes principales además de N y K, aunque de los elementos primarios es el requerido en menor cantidad, la disponibilidad de éste, en la mayor parte de los suelos agrícolas del trópico, es limitada (*Bhat, 1973*).

El fósforo es constituyente de ácidos nucleicos, fosfolípidos, vitaminas, es indispensable en procesos donde hay transporte, almacenamiento y transformación de energía; actúa también en la fotosíntesis, respiración, división y elongación celular. Otras de sus funciones son las de estimular la formación temprana y el crecimiento de las raíces, intervenir en la formación de los órganos de reproducción de las plantas; es vital para la formación de semillas; acelera la maduración de los frutos en los cuales generalmente se almacena en altas concentraciones (*Guerrero, 1991; Brokes, 1984*).

El primer síntoma por falta de fósforo es el de una planta atrofiada, las hojas pueden deformarse, con deficiencias severas, se pueden producir áreas necróticas en las hojas, frutos y tallos, los síntomas generales son: germinación y crecimiento lentos, el crecimiento de la parte aérea y de las raíces se reduce, tallos cortos y delgados, pérdida del color verde del follaje y desarrollo de una coloración verde azulosa, color púrpura en el follaje, al margen, posteriormente estos pueden secarse y morir, las hojas son pequeñas, la defoliación prematura comienza por las más viejas. Las deficiencias de fósforo traen como consecuencia una baja producción del cultivo (*Sánchez, 1981*).

El origen tanto orgánico como mineral del fósforo en el suelo, supone que los procesos responsables del suministro a la planta sea de naturaleza química y biológica. Esto supone que la cuantificación de la disponibilidad de fósforo para la planta sea particularmente difícil.

El predominio de una y otra forma en la solución del suelo depende del pH; bajo condiciones ácidas predomina H_2PO_4 y en condiciones alcalinas $HP_4=$ existiendo un equilibrio entre las dos formas, cuando el pH está cercano a la neutralidad. Ambas formas son igualmente disponibles a las plantas, pero su concentración en el suelo es muy pequeña (*Guerrero, 1996; Fassbender, 1989*).

1.7 Taxonomía

Durante mucho tiempo, la importancia ecológica y taxonómica de los hongos endomicorrízicos en la producción agrícola no fue comprendida, fue a partir de 1955, después de los trabajos de Bárbara Mosse cuando se descubrió la acción benéfica que ejercen sobre el crecimiento de las plantas hospederas.

Uno de los criterios mas empleados en la taxonomía de los hongos micorrízicos vesículo-arbuscular es la morfología y fisiología de las esporas. sin embargo estos hongos no son cultivables *in vitro* por lo que es necesario realizar trabajos de inducción de colonización en diferentes hospederos.

El primero en reconocer que los hongos que forman la micorríza v-a pertenecen al orden endogonales fue peyronel (1923, citado por trappe y schenk, 1982). posteriormente peyronel en el 1969 describen a los hongos endomicorrizicos en base a la morfología de asociación hongo-raíz.

La clasificación actual de los hongos endomirrízicos se basa en las relaciones filogenéticas cimentadas en pruebas quimiotaxonómicas, cromosómicas y fisiológicas entre los miembros de la familia endogonacea, quedando comprendida de la siguiente manera su clasificación:

Reino: Fungi

Subreino: Thallphyta
División: Amastigomicota
Subdivisión: Zigomicotina
Clase: Zigomicetes
Orden: Endogonales
Familia: Endogonacea

A continuación se da la descripción de las esporas pertenecientes a los diferentes géneros.

Género *Glomus*: (del griego, *glomus* = una bola de estambre), forma esporas libres en el suelo y en esporocarpos. la germinación de los tubos germinativos es por crecimiento renovado de la hifa sustentora. se ha aceptado que las clamidiosporas representan estados asexuales de especies zigospóricas.

Todas las especies que forman este género se encuentran en todos los hábitats de la naturaleza, siendo común su fructificación bajo el suelo, aunque también se han visto esporocarpos sobre la superficie del suelo y dentro de las raíces de las plantas hospederas. las clamidiosporas son globosas, subglobadas, ovaladas, cilíndricas e irregulares. su pared esta constituida hasta por nueve capas de 1-2 a 3-17 micras de espesor. el contenido de la espora se comunica con el de la hifa sustentora en el periodo juvenil, pero cuando las esporas maduran se cierra el poro de comunicación por un engrosamiento de la pared externa de la hifa sustentora, la cual puede ser recta en forma de embudo o encorvada (Gerdemann y Trappe, 1974).

Género *Sclerocystis*: (del griego, *sclero* = fuerte, *cystis* = vesícula). este género difiere de *Glomus* por el arreglo típico de sus esporas en una capa simple, alargada y radial fuera de plexo hifal de esporocarpo. esta diferencia ha sido de gran valor taxonómico, sin embargo, podría ser un estado evolutivo más avanzado en morfología estructural de los esporocarpos de *Glomus*. la distribución de este género es muy reducida, pues únicamente se le ha encontrado en suelos tropicales y subtropicales.

las especies que forman este género, producen esporocarpos globosos de 460-750 x 590-780 micras de diámetro, y con color café a negro. se han contabilizado hasta 27 clamidiosporas estrechamente empaquetadas alrededor del plexo central del esporocarpo. las clamidiosporas son de color café oscuro de 140-185 x 20-50 micras, en forma de clava a subcilíndrica, afilándose a una unión hifal de 7-10 micras de diámetro. las paredes de las esporas son de 1.5-5 micras de espesor en las orillas y en sus ápices engrosados es 17-25 micras, el engrosamiento de la base es de 5-8 micras y presenta oclusión de la unión en la madurez (Gerdemann y Trappe, 1974; Janos, 1984). (Fig. 5).

Género *Acaulospora*: (del griego *a* =sin, *caulos* = tallo, *spora* =espora), se caracteriza por que sus esporas son sensibles. las esporas producidas por este género son consideradas como azigospóricas, forman vesículas largas de un contenido denso y se producen terminalmente sobre una hifa lateral que esta comunicada a la espora madre. a menudo las esporas hijas tienen un tamaño similar al de la espora madre.

El contenido de las vesículas es transferido a la espora, la vesícula se vacía y se colapsa. la azigosporas son producidas en el suelo, son largas, globosas y subglobosas (Gerdemann y Trappe, 1974; Janos, 1984). (Fig. 7).

Género *entrophospora*: (del griego, *entro* =interno, *phos* = lateral, *spora* = espora). hasta el momento no existe una descripción concreta de las características morfológicas e implicaciones fisiológicas de las esporas que forman este genero, lo poco que se sabe, es que las esporas poseen una hifa sin forma bien definida como *Glomus* o en *Gigaspora*. cuando alcanzan su madurez las esporas de entrophospora dan origen a una espora hija en el extremo opuesto y lateralmente.

El citoplasma de la espora madre, es transferido por corrientes citoplasmáticas hacia la espora hija, la cual empieza a desarrollar y posteriormente a estabilizar su metabolismo con el subsecuente crecimiento; mientras tanto, la espora madre sufre una desintegración celular lenta y se

colapsa. las esporas de este género son esféricas y globosas con citoplasma denso. presentan de cuatro a siete paredes con ornamentaciones (Alwis y Abeynayake, 1980).

Género *scutellospora*: (del latín, *scuteum* = escudo, *spora* = espora) se caracteriza por la producción de esporas libres en el suelo (raramente se forman en las células corticales de las raíces). son de tamaño grande, variables en forma, usualmente son globosas o subglobosas, pero también hay ovoides, ovovoides, piriformes o irregulares especialmente cuando se contraen durante su formación; poseen un bulbo suspensor, usualmente con una hifa reducida que se extiende hacia la espora con una o mas proyecciones como clavija.

La estructura de la pared presenta dos grupos, una que es externa con una o mas paredes que son membranosas y flexibles, mientras que la del grupo interno son de paredes coriáceas rígidas. la germinación es por medio de uno o mas tubos germinativos producidos cerca de la base de la espora en el escudo de germinación, el cual esta formado sobre o dentro de una pared flexible interna.

Las azigosporas producen células auxiliares que pueden ser protuberantes o ampliamente papiladas. es importante mencionar que este género forma endomicorrizas con arbusculos e hifas enrolladas, pero sin vesículas (Schenck y Pérez, 1987).

De la revisión taxonómica pueden sustraerse las siguientes consideraciones:

- 1) Los géneros *Glomus* y *Sclerocustis*, forman esporocarpos en el suelo, siendo más frecuente en *Glomus* la presencia de esporas simples en el suelo del género *Glomus* hay especies que forman esporas en la epidermis de las raíces.
- 2) Los géneros *Gigaspora*, *Acaulospora*, *Entrophospora* y *Scutellospora* no producen esporocarpos. los géneros se

diferencian entre si por la hifa sustentora típica como el gigaspora o por la formación de esporas conectadas a hifas terminales dilatadas en acaulospora y entrophospora.

- 3) Sin hifa de soporte o sustentora no es posible realizar la identificación de una espora a nivel de género y mucho menos a nivel de especies.

CAPÍTULO II

Materiales y Métodos

Los recursos metodológicos que se utilizaron para la elaboración de este trabajo, fueron a partir de la investigación bibliográfica, recurriendo a documentos, libros y folletos relacionados al tema, realizando además una breve recopilación hemerográfica. Así mismo, se incluye información que se obtuvo a través de sitios WEB relacionados al estudio de hongos endomicorrizicos en el cultivo de papaya.

La información fue procesada, clasificada y analizada para su discusión y conclusión. Para ello se utilizó material de papelería, una computadora con conexión a Internet con puerto periférico para impresora, enseres de oficina, libretas para hacer anotaciones y formular resúmenes. la información recabada se sistematizó metodológicamente con el formato de tesina, teniendo como resultado final el presente documento.

CAPÍTULO III

ESTUDIO DE HONGOS ENDOMICORRIZICOS

3.1 Métodos de separación de esporas

La separación de esporas del suelo es de gran importancia en el estudio de ecología, fisiología y taxonomía de la endomicorriza vesículo-arbuscular (v-a). existen diversos métodos para extraer las esporas del suelo y se basan en el diámetro y densidad de las esporas una vez separadas es posible el análisis cualitativo o cuantitativo.

3.1.1 Método de tamizado y decantación en húmedo (Gerdemann y Nicholson, 1963)

Este método permite la extracción de esporas de un buen porcentaje pero no se logra una buena separación de las esporas del material orgánico:

- 1) En un vaso se agrega 100 g de suelo de rizósfera y 1000 ml de agua.
- 2) Se agita mecánicamente durante cinco minutos.
- 3) Se deja reposar 3 minutos con la finalidad de eliminar residuos.
- 4) Pasar la suspensión a través de una columna de tamices graduados colocados en orden decreciente (500, 250, 149, 105, 74, 44 micras).
- 5) Agregar nuevamente agua al decantado y repetir pasos (2) al (4).
- 6) La fracción del suelo obtenida en cada tamiz se pasa a papel filtro cuadrado para su posterior cuantificación (Figura 1).

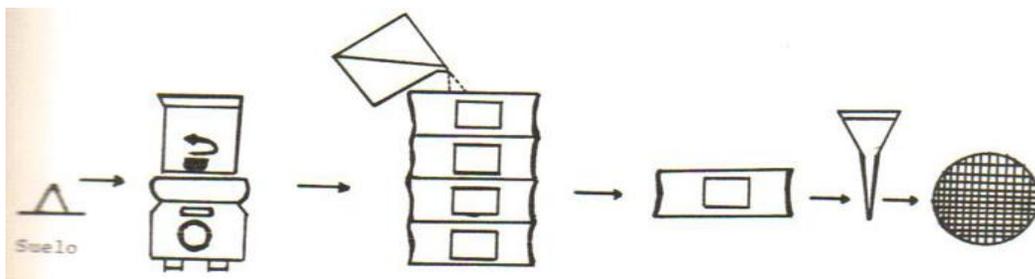


Figura 1 Método de tamizado y decantación en húmedo (Gerdemann y Nicholson, 1963)

3.1.2 Método de adhesión y flotación (Sutton y Barron, 1972)

En este método no es necesario el uso de tamices y existe una buena extracción de esporas pero con materia orgánica adherida.

- 1) Se hace una suspensión con 100 g de suelo 1000 ml de agua.
- 2) Se agita mecánicamente durante 5 minutos y se dejan reposar por tres minutos
- 3) El material que flota en la superficie de agua es transferido a un embudo de separación.
- 4) Se deja reposar en el embudo de 1 a 2 minutos.
- 5) Se abre la llave del embudo regulando la salida de agua (75–100 ml/min)
- 6) El material adherido en las paredes del embudo es arrastrado posteriormente con agua destilada a un papel filtro cuadrículado para su posterior cuantificación (Figura 2).

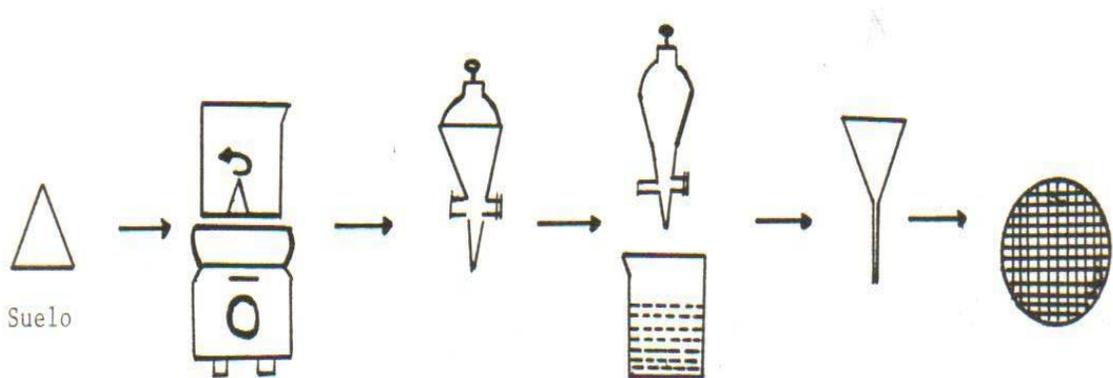


Figura 2 Método de adhesión y flotación (Sutton y Barron, 1972)

3.1.3 Método de pipeteo (Smith y Skipper, 1979)

Este método es muy fácil y rápido de realizar pero se necesita poco suelo por lo que no es una muestra representativa.

- 1) 10g de suelo se colocan en una probeta y añaden 90 ml de agua.

- 2) Se agita manualmente por un minuto.
- 3) Inmediatamente se pipetea de la suspensión 10 ml.
- 4) Son pasados a través de un papel filtro cuadrículado para su posterior cuantificación (figura 3).

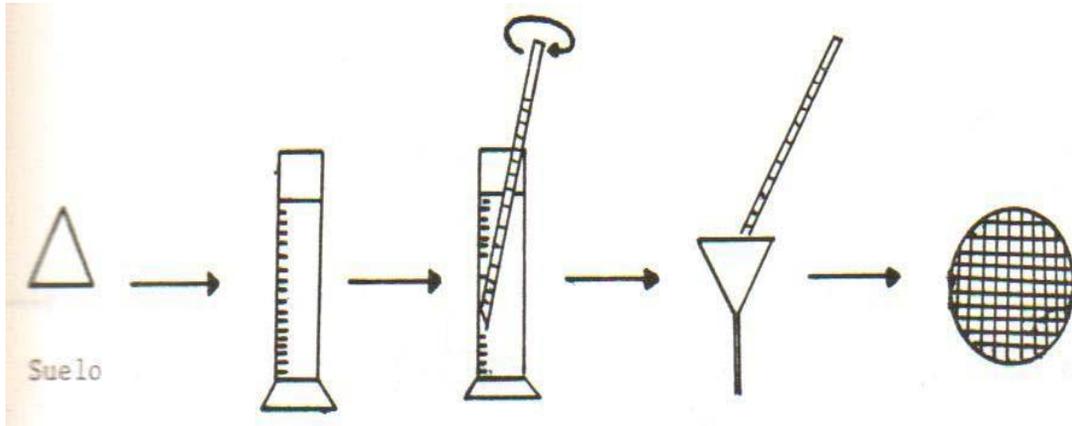


Figura 3 Método de pipeteo (Smith y Skipper, 1979)

3.1.4 Método de centrifugación (Jenkins, 1964)

- 1) Se realiza los pasos (1) al (5) del método de Gerdemann y Nicolson (1963).
- 2) El contenido de los tamices que se vaya a utilizar (se emplean frecuentemente las fracciones 500, 105, 74 y 44 micras) se pasan a tubos de centrifugación de 50 ml.
- 3) Se les aplica algo de agua a los tubos y se centrifugan por 4 minutos a 1800 rpm.
- 4) Se decanta el agua sobre un papel filtro y se saca el material orgánico de la pared interna con el dedo.
- 5) Al residuo de los tubos se aplica una solución de azúcar al 50 % se agita y se centrifugan por dos minutos a 1800 rpm.
- 6) Se decantan las soluciones en los tamices correspondientes y se lavan las esporas con agua y se pasan a papel filtro para la separación o conteo (Figura 4).

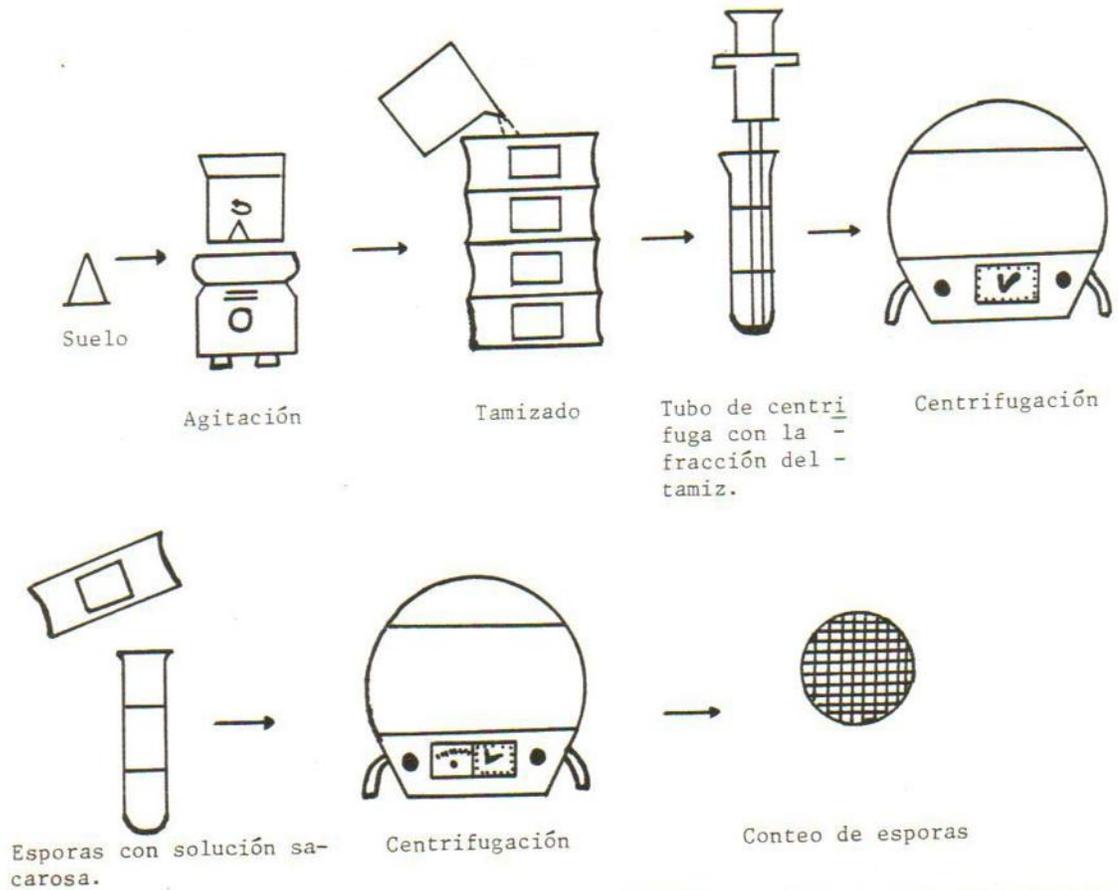


Figura 4 Método de centrifugación (Jenkins, 1964)

3.2 Cuantificación de esporas

La cuantificación de esporas se utiliza para determinar la población total y diversidad de las esporas de hongos endomicorrízicos presentes en una muestra de suelo para realizar esto es necesario extraer esporas por los métodos de separación ya mencionados.

El conteo de esporas realiza bajo el estereoscopio al colocar la fracción retenida de los tamices en cajas de petri con agua destilada o en papel filtro cuadrado. el número de esporas se calcula por gramo de suelo seco.

Para la separación y posterior identificación, las esporas son extraídas con un micro pipeta o una pipeta Pasteur modificada de la punta y colocadas en vidrios de reloj, tomando en consideración sus características morfológicas como forma, color e hifa sustentadora (Figuras 5, 7, y 8).

En todo trabajo con hongos endomicorrízicos es necesario tener placas de referencias de las esporas extraídas, con la finalidad de identificarlas taxonómicamente por medio de claves y tener una colección de referencia.

Estas placas se realizan, cuando cambian los extremos del porta objetos una gota de polivinil-alcohol o en su defecto agua destilada y agregando en uno de los extremos otra gota del reactivo del melzer's. en cada gota se depositan de 5 a 20 esporas y se colocan los cubreobjetos. en el lado en donde esta el reactivo del melzer's se presiona para romper las esporas y facilitar la observación y número de paredes.

TIPOS DE UNION DE LA HIFA



a) RECTA



b) CURVEADA

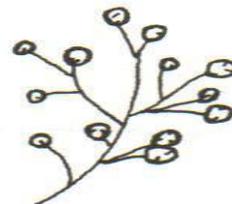


c) EMBUDO

ESPOROCARPO



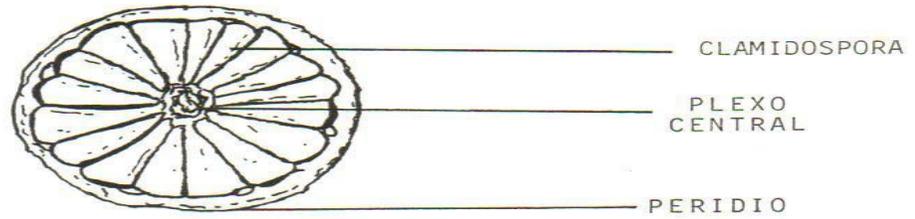
CELULAS AUXILIARES



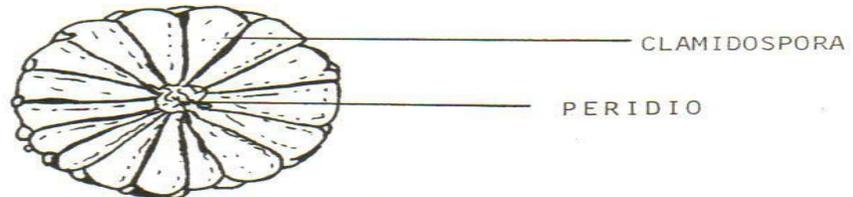
Las clamidosporas se forman en los extremos de las hifas, la pared de la espora puede ser laminar o doble, nacer individualmente en el suelo o en esporocarpos, la unión con la hifa sustentora es recta (a), curvada (b) o en embudo (c) y puede formar células auxiliares.

(Schenck y Pérez, 1987)

Figura 5 Tipos de unión de la hifa.



SIN PERIDIO



Los hongos que pertenecen a este género se caracterizan por formar clamidosporas, las cuales están arregladas ordenadamente en una singular capa alrededor del plexo central, formando así el esporocarpio

(Schenck y Pérez, 1987)

Figura 6 Esporocarpos con peridio y sin peridio.



CELULAS AUXILIARES



EQUINADA

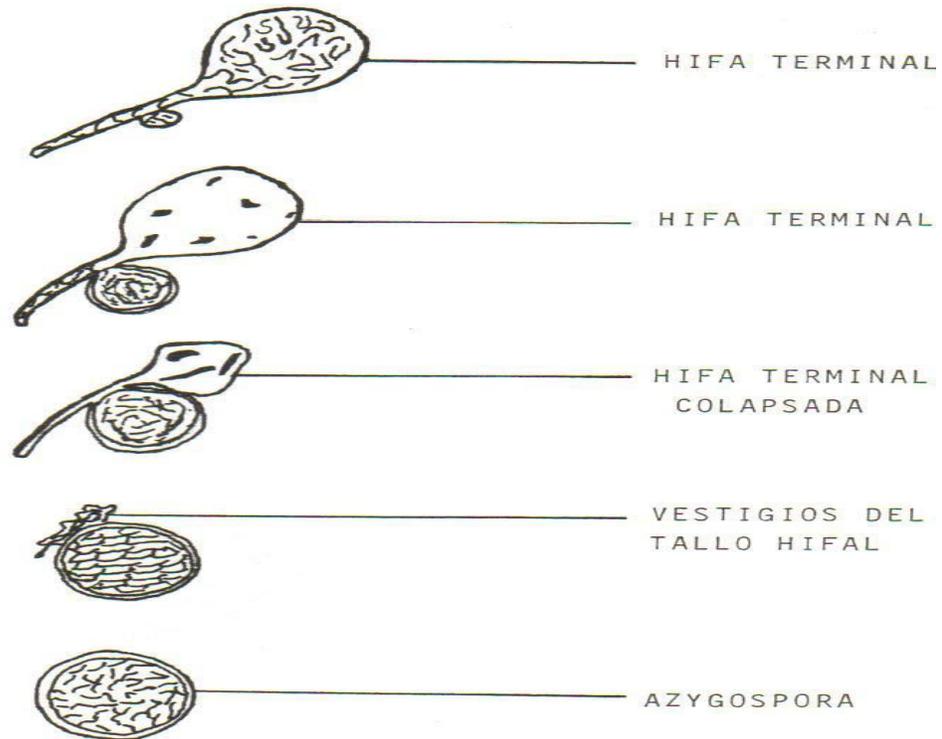


FINAMENTE
PAPILADA

Las zigosporas germinan del extremo de una hifa sustentora bulbosa. Producen vesículas extramatriciales y células auxiliares. La unión con la hifa sustentora es vertical.

(Schenck y Pérez, 1987)

Figura 7 Células auxiliares.



Los hongos que pertenecen a este género forman azygosporas. La espora nace de una vesícula grande de pared delgada de una hifa terminal en forma de embudo ancho, el contenido de la vesícula es transferido a la espora y cuando esta alcanza la madurez la vesícula se vacía y se colapsa (Schenck y Pérez, 1987)

Figura 8 Azygospora formada por el género Acaulospora

3.3 Métodos de separación de esporas

La separación de esporas del suelo es de gran importancia en el estudio de ecología, fisiología y taxonomía de la endomicorriza versículo-arbuscular (v-a). existen diversos métodos para extraer las esporas del suelo y se basan en el diámetro y densidad de las esporas una vez separadas es posible el análisis cualitativo o cuantitativo.

1.- Método de tamizado y decantación en húmedo (*Gerdemann y Nicholson, 1963*). este método permite la extracción de esporas de un buen porcentaje pero no se logra una buena separación de las esporas del material orgánico:

En un vaso se agrega 100 g de suelo de rizósfera y 1000 ml. de agua.

- a) Se agita mecánicamente durante cinco minutos.
- b) Se deja reposar 3 minutos con la finalidad de eliminar residuos.
- c) Pasar la suspensión a través de una columna de tamices graduados colocados en orden decreciente (500, 250, 149, 105, 74, 44 micras).
- d) Agregar nuevamente agua al decantado y repetir pasos (b) al (d).
- e) La fracción del suelo obtenida en cada tamiz se pasa a papel filtro cuadrado para su posterior cuantificación (figura 9).

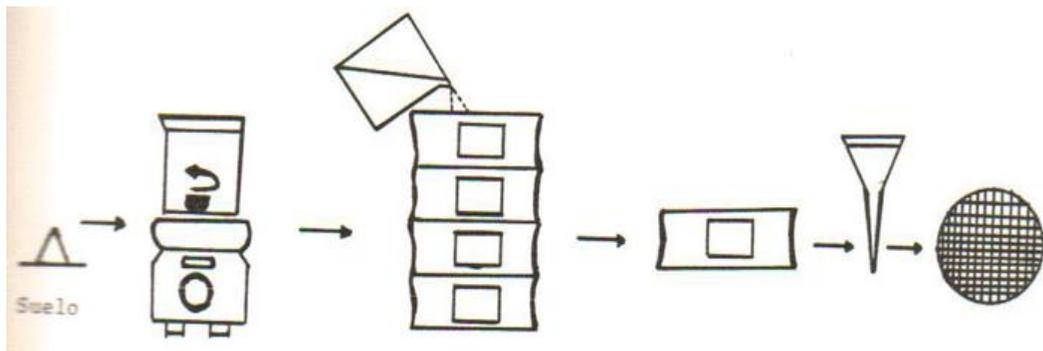


Figura 9. Método de separación de esporas

3.4 Cuantificación de esporas

La cuantificación de esporas se utiliza para determinar la población total y diversidad de las esporas de hongos endomirrizicos presentes en una muestra de suelo para realizar esto es necesario extraer esporas por los métodos de separación ya mencionados. el conteo de esporas realiza bajo el estereoscopio al colocar la fracción retenida de los tamices en cajas de petri con agua destilada o en papel filtro cuadrado.

el número de esporas se calcula por gramo de suelo seco. para la separación y posterior identificación, las esporas son extraídas con un micro pipeta o una pipeta Pasteur modificada de la punta y colocadas en vidrios de reloj, tomando en consideración sus características morfológicas como forma, color e hifa sustentadora.

En todo trabajo con hongos endomicorrízicos es necesario tener placas de referencias de las esporas extraídas, con la finalidad de identificarlas taxonómicamente por medio de claves y tener una colección de referencia. estas placas se realizan, cuando cambian los extremos del porta objetos una gota de polivinilo-alcohol o en su defecto agua destilada y agregando en uno de los extremos otra gota del reactivo del melzer's.

En cada gota se depositan de 5 a 20 esporas y se colocan los cubreobjetos. En el lado en donde esta el reactivo del melzer's se presiona para romper las esporas y facilitar la observación y número de paredes.

3.5 Metodologías moleculares aplicadas a la investigación en hongos micorrizas arbusculares (HMA)

La diversidad de HMA no ha sido investigada intensivamente a pesar de que se ha encontrado que la presencia de micorrizas presenta una relación directa con la diversidad florística y los ciclos de carbono y fósforo en comunidades naturales.

Esta situación se explica por la gran dificultad que implica la identificación de HMA, aunque la morfología de las esporas ha sido usada con propósitos de identificación, esta debe ser realizada a partir de cultivos puros (a partir de una sola espora) proceso que es lento e impredecible ya que es posible que las esporas extraídas no sean viables (*Vargas, 1995*).

Por estas razones, los métodos moleculares pueden ser útiles en la identificación de especies. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite amplificar DNA de una sola espora, y las técnicas basadas en PCR han sido utilizadas para amplificar DNA a partir de hongos MA e identificar materiales colectados incluso al nivel de especie.

Los requerimientos de cualquier método molecular aplicado a la investigación de la diversidad y ecología de HMA son que estos sean reproducibles usando DNA de una sola espora de HMA, rápidas, fáciles y

suficientemente económicas para permitir el trabajo de muchas muestras (Vargas G. 1995).

Aunque se ha asumido por mucho tiempo que no existe ningún tipo de especificidad en la interacción hongo-planta, el conocimiento de la dinámica poblacional de micorrizas en ambientes naturales puede llevar al entendimiento de estas interacciones, lo que permite un mejor uso de este tipo de asociaciones naturales en especial en sistemas agroalimentarios (Vargas G. 1995).

Estudios desarrollados en los cultivos de plátano, yuca y ñame de pequeños y medianos productores de la costa atlántica, han demostrado que existen varios limitantes relacionadas con el manejo fitosanitario, agronómico y de comercialización de estos cultivos.

Estos limitantes se han abordado implementando diferentes estrategias, lo que ha permitido el establecimiento de un programa multidisciplinario para abordarlas y solucionarlas, acercando nuevas tecnologías al agricultor que permitan un desarrollo competitivo y sostenible de su cultivo, el establecimiento de programas de desarrollo tecnológico, permitirá conseguir un impacto final de tipo socioeconómico en la región.

Dentro del desarrollo del proceso productivo de semillas limpias de cualquier especie, la etapa de adaptación de las plántulas bajo condiciones de invernadero núcleo y vivero, es particularmente crítica, y en general, un buen desarrollo del cultivo en el campo, reflejado en el aumento de los niveles de productividad, dependen en gran medida de los niveles de adaptativos iniciales y nutricionales a los que la planta sea sometida durante todo su ciclo, por lo que es necesario desarrollar una estrategia que facilite y que asegure las dos etapas y lleve a la obtención mayores rendimientos del cultivo (Vargas G. 1995).

3.6 La inoculación e infección de la micorriza

3.6.1. Inoculación

Un punto definitivo en la utilización de las micorrizas es la obtención de un inóculo que sea capaz de inducir en forma efectiva la infección en el cultivo que se trata de beneficiar (*Dehne, 1975*).

Un aspecto importante es el de establecer cuales son los propágulos de las micorrizas vesículo arbusculares. Se acepta que en el suelo existen tres tipos de inóculos, los cuales aunque con diferente grado de capacidad de supervivencia y potencial infectivo, puede originar la simbiosis y son los siguientes: a). las grandes esporas de resistencia de los hongos, b). las raíces micorrizadas, o sus fragmentos, procedentes de plantas preexistentes, c). los agregados de hifas que sobreviven en el suelo (*Burbano, 1989*).

Debe tenerse en cuenta que uno de los grandes inconvenientes para la obtención del biofertilizante a base de micorrizas es que este hongo se propaga únicamente si se tiene una planta que le sirva de hospedero, y lograr así su multiplicación.

Por lo tanto debe realizarse una cuidadosa selección de hospederos y condiciones de clima y suelo para lograr este propósito, pudiendo ofrecer al agricultor un producto confiable, que beneficie el sistema productivo donde se aplique y a su vez conserve recursos como suelo, agua y medio ambiente ya que no contiene productos químicos contaminantes.

El inoculante empleada fue *Glomus* spp. Zac-19 con 75%-80% de colonización en el sistema radical de su hospedante alfalfa, proporciona por el área de microbiología del programa de edafología del instituto de recursos naturales del colegio de posgraduados en las ciencias agrícolas.

Se trabajo con semillas de papaya (variedad maradol) lavadas con agua corriente para eliminar resto de pulga, murciélago y zarco testa. posteriormente estas se estuvieron por un lapso de 24 horas en agua corriente para eliminar resto de sustancias inhibidoras de la germinación (*Ellis et al., 1985*) para la germinación de las semillas de papayo se prepararon charolas de germinación desinfectadas con hipoclorito a 10% en la arena estéril desinfectada con bromuro de metilo con la dosis recomendada por *Calderón (1991)* sembrando una semilla por cavidad.

Cuando las semillas germinaron y las plántulas contaban con dos hojas verdaderas y similares de crecimiento, se procedió a transplantarlas a las bolsas de polietileno (capacidad de 250 g), las cuales ya contenían una mezcla con la base a suelo-arena-pulpa de café en proporción 2:1:2y estaba previamente humedecida, si se inocularon con 10 g del inóculo micorrízico. cuando las plantas de papayo tenían dos meses en la etapa de invernadero, se transplante al terreno definitivo, el cual la previamente preparado con cepas de 30 x 30 x 30cm.

3.6.2 Infección

La colonización del hongo a la raíz de la planta puede ser originada por el micelio precedido por la germinación de esporas de resistencia que permanecen en el suelo.

Las clamidiosporas que resisten condiciones adversas en el suelo, germinan frecuentemente a circunstancias favorables, emitiendo un tubo germinal, tubo que muere a no ser que encuentre y penetre con éxito en una raíz.

La presencia de un sistema micelial, integrado por dos fases, un micelio externo, el cual coloniza el suelo, cuya extensión puede ser considerable, sin embargo esta característica varía, y un micelio interno que se ubica dentro de la corteza de las raíces micorrizadas (*Harley, 1983; Smith, 1988*) (Figura 10).

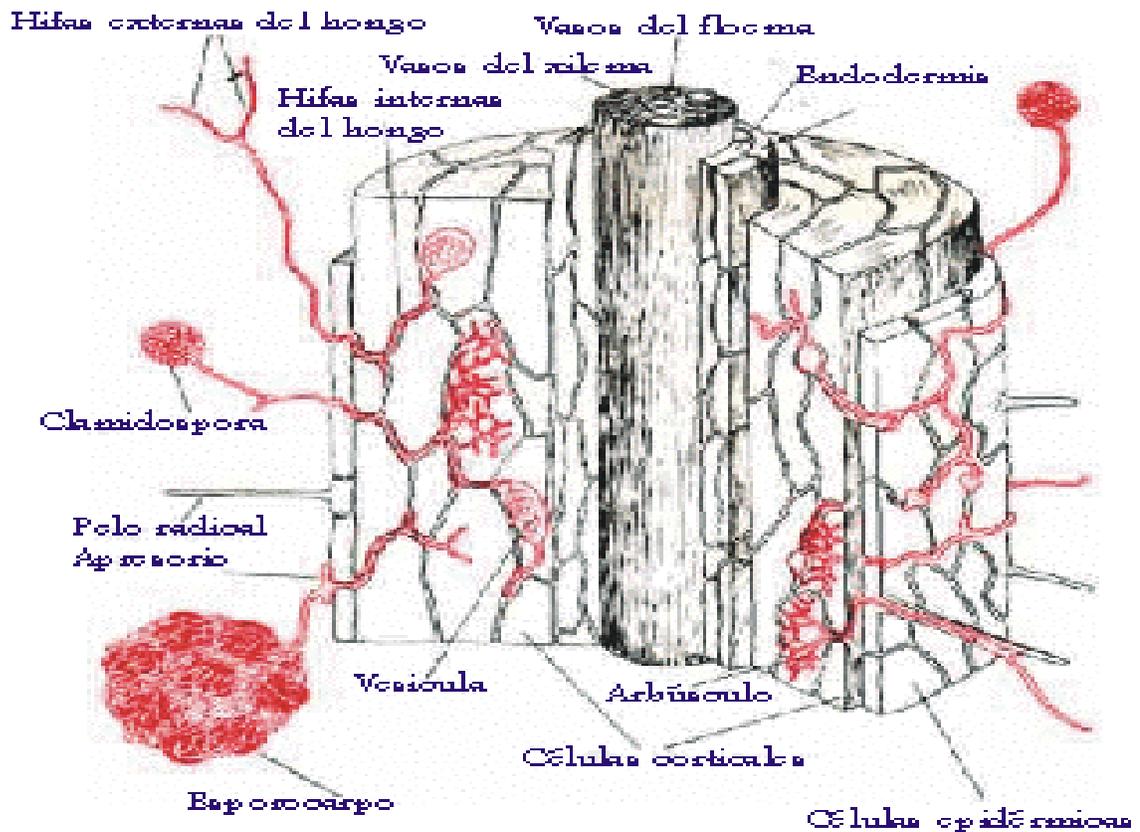


Figura 10. Proceso de infección de las raíces con micorrizas vesículo arbusculares.

La presencia de micelio externo constituye uno de los principales pilares de la asociación, ya que estas hifas se desarrollan más allá del suelo que circunda la raíz, trascienden la rizósfera y transportan nutrimentos directamente a la planta.

Se presentan dos tipos de hifas extramatriciales: las hifas de avance significativo en el suelo y las hifas absorbentes (Harley, 1983). Las primeras son de paredes gruesas, grandes, con proyecciones angulares muy definidas, las cuales siguen la trayectoria de las raíces en el suelo, o en algunos casos, simplemente crecen a través del suelo en busca de ellas; éstas aunque absorben nutrimentos, su función primordial aparentemente, es de soporte y base permanente de la red micelial.

3.7 Estructura morfológica de las micorrizas

Las hifas que penetran las raíces se inician a partir de estas hifas de avance; as hifas absorbentes de paredes más finas, se desarrollan a partir de las de avance y se dividen dicotómicamente extendiéndose en el suelo, son las componentes del hongo que absorben los nutrimentos para transportarlos al hospedero. Su escaso diámetro les permite explorar los poros más finos del suelo, especialmente cuando estos tienen altos contenidos de arcillas y materia orgánica.

No se conoce aún la distancia a la cual puede extenderse, dada la alta relación área/volumen que genera su presencia, el micelio externo de la endomicorriza arbuscular permite que la planta pueda explorar intensamente un gran volumen de suelo (*Baron, 1992*).

A partir del micelio externo del hongo se pueden formar células auxiliares aisladas o agrupadas, cuya función no se ha determinado totalmente y grandes esporas con paredes gruesas, las cuales pueden sobrevivir por años y cuando germina inicia un nuevo ciclo de la simbiosis (Figura 11).

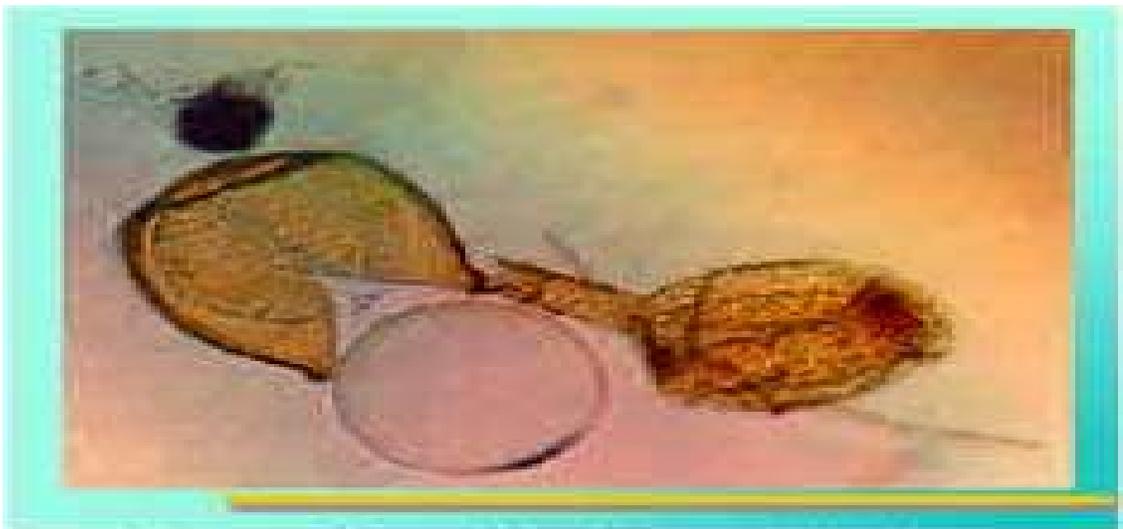


Figura 11. Espora de la micorriza arbuscular entrophospora colombiana

El desarrollo del micelio interno se inicia cuando una clamidospora entra en contacto con la raíz, formando un apresorio, penetrando la epidermis y desarrollando hifas que crecen intra e intercelularmente; estas forman enrollamientos al interior de algunas células del hospedero, extendiendo la infección longitudinalmente en la raíz, penetran a las células más internas de la corteza (*Baron, 1992*). (Figura 12).

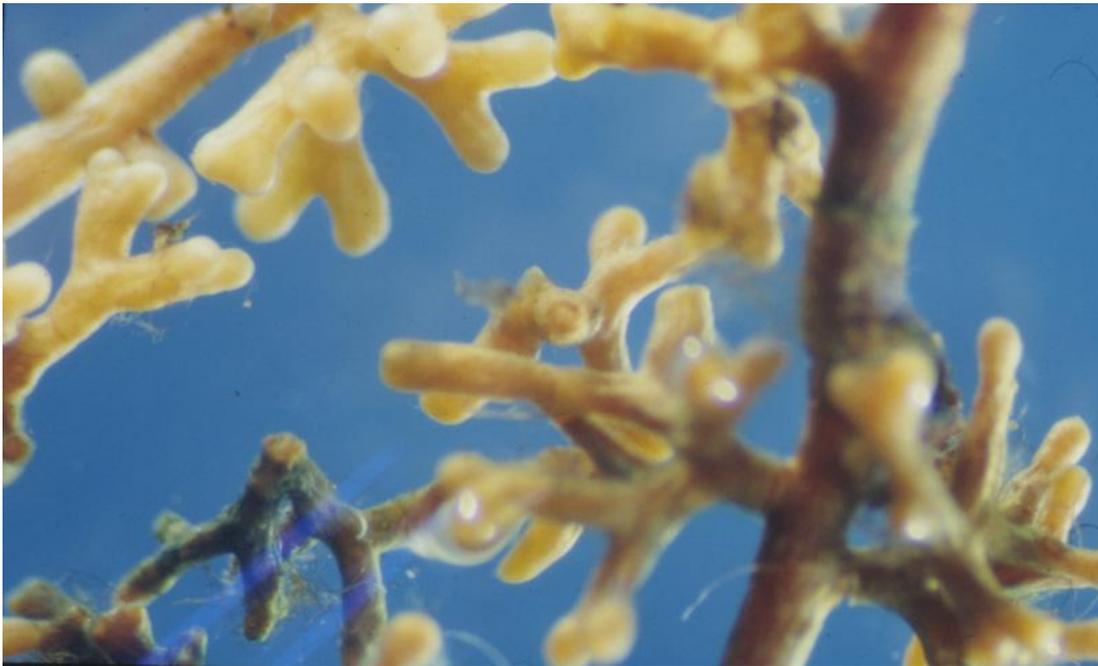


Figura 12 Estructuras morfológicas de las micorrizas vesículo-arbusculares.

En este lugar, a partir de hifas intercelulares, se forman ramificaciones laterales que trascienden las paredes de las células del hospedero, cuyo plasmalema se invagina y rodea totalmente la estructura fungosa, la cual una vez en el interior de la célula, se ramifica en forma dicotómica repetidamente, dando lugar a una estructura tridimensional arborescente que se ha denominado arbúsculo.

En la zona de contacto hospedero-arbúsculo se forma una matriz interfacial, en donde, se ha comprobado ocurre la mayor transferencia de nutrimentos entre los asociados.

Algunos géneros de micorrizas arbusculares producen vesículas, las cuales consisten en ensanchamientos de hifas, que se disponen inter o intracelularmente, ocupando posiciones terminales o intermedias en las hifas.

Las vesículas se desarrollan posterior a los arbusculos, en las regiones más antiguas de la infección y contienen material lipídico, por lo cual se las ha aceptado comúnmente como órganos de almacenamiento de algunos de los hongos micorrizógenos arbusculares.

Estas estructuras poseen una pared fina, que puede espesarse en algunas ocasiones, transformándose en clamidiospora. El hecho de encontrarlas asociadas con raíces viejas o muertas, sugiere que también desempeñan un papel como órganos de reposo o de propagación del hongo.

Esta estructura la forman todos los hongos micorrizógenos arbusculares, con excepción de los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora* (*Harley, 1983; Smith, 1988*).

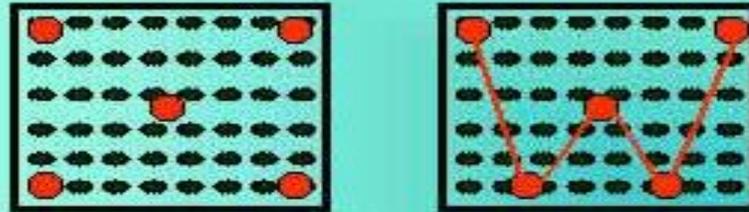
La asociación simbiótica beneficia a la planta con un incremento en la altura, vigor, área foliar y mejora el estado nutricional en la parte aérea. En la raíz ocurren cambios anatómicos y citológicos. La asociación ocasiona cambios en la organización celular del meristemo apical y cilindro vascular de las raíces, en ellas se detiene la actividad meristemática, haciendo decrecer el índice mitótico medio y la síntesis de ADN Y ARN formándose un tejido parenquimatoso en los ápices radicales.

En contraste, los núcleos de las células corticales activados por el hongo están totalmente diferenciados e involucrados directamente con la cromatina en comparación con las células no infectadas (*Baron, 1992*). En las células corticales colonizadas se realizan alteraciones en su organización que varían de acuerdo a su localización, lo que condiciona también al hongo.

Muestreo

Suelo
Raíces

Evaluación poblaciones de HMA
Estado de la colonización en campo



Profundidad 0 - 20 cm

En conjunto, se ha encontrado que la forma y el tamaño de los núcleos se ven influenciados por la simbiosis, registrándose que se torna de mayor tamaño que los de los testigos (sin micorrizados), sin que esto sea el resultado de una endoreduplicación del ADN, igualmente se rodean durante periodos de máxima actividad del hongo y se localiza centralmente.

3.7.1 Proceso de aislamiento de esporas micorrízicas

Para la evaluación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) se han desarrollado diversas metodologías tendientes al entendimiento de la ecología y funcionamiento de esta asociación simbiótica. Estas incluyen el aislamiento de esporas a partir de suelo, la tinción diferencial de raíces para evidenciar la colonización y metodología diferencial de raíces para evidenciar la colonización y metodologías moleculares para la identificación y taxonomía.

Para una buena evaluación, es básico realizar un muestreo que sea representativo; éste debe hacerse a una profundidad entre 0 y 20 cm en forma de "x" o "w" (figura 13).

Las muestras realizadas en los diferentes puntos de muestreo seleccionados se deben mezclar y homogenizar completamente. La muestra debe secarse a temperatura ambiente hasta obtener el mínimo de humedad. Se toman entre 10 y 100 gramos de suelo, según las necesidades del estudio y se realiza el aislamiento de las esporas presentes siguiendo la metodología de tamizaje y centrifugación en gradiente de sacarosa (Sánchez-Espinosa 1993). Interpretación de la interacción con relación al éxito del proceso de esporulación número relativo de esporas dinámica de Poblaciones limitantes, el número de esporas puede variar de acuerdo a la estación el tiempo de esporulación varia de una tipo de HMA a otro, ya que existen dificultades en la identificación taxonómica. (Figura 14).



FIGURA 14. PROCESO DE AISLAMIENTO DE ESPORAS

El método utilizado para el aislamiento y conteo de esporas del suelo es el descrito por Gerderman y Nicholson (1963) con algunas modificaciones. Este método se basa en suspender una muestra de suelo en agua corriente y pasarla por varios tamices de 500µ, 250µ, 100µ, y 38µ de diámetro y acomodados de forma descendente.

Por lo general, se utilizan de 100 o 38 μ con la finalidad de aislar las esporas lo más limpias posibles y hacer el conteo. Cuando se realiza este método, se debe tener mucho cuidado y evitar salpicaduras que puedan incidir en los resultados.

El proceso de aislamiento consiste en lo siguiente: tomar una muestra de 1 a 10 gramos de suelo seco y se coloca en un baso de 250 ml, adicionando aproximadamente 100 ml de agua agitarlo por 15 minutos, después de transcurrido este tiempo, se adiciona agua y se vierte sobre los tamices previamente ubicados debajo de un fregadero, posteriormente se lava con agua corriente el contenido del tamiz superior, con la ayuda de una manguerilla evitando salpicaduras del tamiz de 38 μ recoge con cuidado la interfase y se vierte en un tubo de centrifuga de 50 ml con 25 a 30 ml de agua, se adiciona 20 ml de solución de sacarosa 72 % con ayuda de una jeringa con manguera rígida de manera que la solución quede por debajo del material suspendido en agua, se equilibra los tubos y se centrifuga durante cinco minutos a 200 revoluciones por minuto; se sacan los tubos de la centrifuga cuidando de no romper la interfase agua-sacarosa.

Con la ayuda de una jeringa, se recorre toda la superficie de la interfase y un poco de ésta para recoger las esporas que no atravesaron la solución, pasa el contenido de la jeringa por el tamiz de 38 μ y se lava para eliminar la sacarosa, el contenido del tamiz se recoge sobre papel filtro con la ayuda de un embudo, finalmente se hace el conteo de esporas con la ayuda del microscopio (*Gerderman, Nicholson 1963*).

3.8 Técnica de tinción de raíces micorrizadas

Con la técnica de tinción de raíces permite evaluar el éxito de la colonización, conocer el porcentaje de raíces colonizadas así como identificar estructuras presentes para determinar el estado de la colonización.

No obstante, se tienen las limitantes siguientes: las estructuras son transitorias, algunos tejidos presentan dificultades para el clareo y tinción así mismo la posibilidad para identificar taxonómicamente es limitada.

El método utilizado para la tinción de raíces micorrizadas es el de tinción con azul de tripano, descrito por Phillips y Hayman (1970) es el siguiente: lavan las raíces con abundante agua corriente, cubrir en las raíces con solución de KOH al 10%, en esta solución, las raíces se colocan baño de maría (90 °C) durante 10 a 15 minutos, posteriormente las raíces se lavan con agua corriente, utilizando preferiblemente un tamiz adecuado para evitar perdidas durante el enjuague.

Después del lavado se colocan en solución fresca de KOH al 10% y H₂O₂ al 10% mezclados en proporción 1:1 (V/V), dependiendo el tipo de raíz, se deben dejar de 5 a 10 minutos, las raíces se lavan en agua corriente colocando las raíces en un medio, acidificar con una solución de HCl al 1N durante 10 minutos, se decanta el HCl, lavando las raíces, posteriormente se adiciona el azul de tripano al 0.05% y se colocan las raíces baño maría por 10 minutos, retira el colorante y se guardan las raíces en un recipiente, lavándolas con agua destilada y se dejan en reposo por 12 horas para eliminar el exceso de colorante. Una vez pasado este tiempo se montan en lamina y laminilla, diez raíces de más o menos un cm de largo cada una, para finalmente observar al microscopio (Figura 15).



Figura 15. Técnica de clareo y tinción (Kormanik, et al., 1980)

CONCLUSIONES

El uso de hongos micorrizicos puede sustituir la adición de fertilización inorgánico, lo cual resulta en un ahorro para la economía del productor hasta un 343% si se considera que el costo de fertilización inorgánico por la planta es de \$1.71 y el de la planta inoculada de 0.50.

Aunque no se estimo el rendimiento, que las plantas fueron atacadas severamente por el virus de la mancha anular del papayo, los datos del diámetro de tallo, el cual esta directamente relacionado con la producción, permitiendo señalar que las plantas micorrizadas también tendría una mejor producción, lo que se traduciría en una ganancia para el agricultor.

La disminución en el uso de fertilizantes inorgánicos trae como consecuencia una mejor conservación del suelo, lo que coincide con lo que la planta el desarrollo sustentable, en le sentido de la preserva los recursos naturales para las futuras generaciones.

BIBLIOGRAFÍA

Alarcón, A., (1993). La Endomicorrizada Vesículo- Arbuscular en el Manejo de Dos Métodos de Propagación en Frutales. Tesis Profesional. Ing. Agr. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Veracruzana. Xalapa, Ver.

Azcon, Borea., (1997); Ecología, Fisiología y Bacteriología de la Micorriza Arbuscular. Edit. Alejandro Alarcón, Ronalf Ferrera-Cerrato.

Calderón, A. E.; (1991), Fruticultura general. El esfuerzo del hombre. ED. Limusa. México.

Chávez, M.C.R. Ferreira-Cerrato y A. Alarcón, (1996); Purificación y Elección de Hongos Endomicorrizicos para Cultivos de Interés Agrícola, Frutícola, Hortícola y Ornamental.

Díaz, G, (1995); Análisis de Costo- Beneficio pp.126-135. in: Memoria de la Reunión Técnica sobre el Cultivo del Papayo Maradol Rojo en la Costa de Jalisco.

Ferrera- Cerrato, *et al.* (1993). Manual de Microbiología. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México.

Forturo, P., *et al.* (1992), Ineffectively and Efectiveness of Different Species of Arbuscular Mycorrhizal fungi in Micropropagated Plants of M y S 2/5 Plum Rootstock Agronomic 12: pp. 825-829.

Guillermín, *et al.*, (1992), Role and Use of Micorrhiza in Horticultural Crop Production. Adv. SCI 4:25, pp. 25-40.

Gardeman y Trappe, (1974). Tesis para el Instituto de Recursos Genéticos y Productividad, Programa de Fruticultura. Moncecillo, Estado de México.

Jaén, C.D. (1989); Manual de Métodos para la Investigación y Aplicación de los Hongos Endomicorrizicos en Colegio de Posgraduados, México p. 130-175.

Juárez, P. N. (1995); Manejo de Plantaciones. pp. 27-32. in: Memoria de la Reunión Técnica sobre el Cultivo del Papayo Maradol Rojo en la Costa de Jalisco.

Lara, M. C. (1990); Malezas del Campo Experimental La Bandera, Mpio. de Actopan, Ver. Tesis Profesional. Ing. Agr. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Veracruzana. Xalapa, ver.

Mandujano, B.R.A. (1993); El Papayo. Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Agrícolas, Zona Tuxpan. Especialidad de Postgrados en Fruticultura Tropical. Tuxpan Veracruz. Publicación Técnica num. 137p.

Quiñones, A., E.E., D. Trejo A., T Aguas R., R. Ferrero-Cerrato y M.C. González Ch. 1995; Efecto en la Endomicorriza Arbuscular y la Adición de Tres Fuentes de Fósforo en el Crecimiento y Desarrollo del Papayo (*Carica papaya* L.) p. 99. In: Memoria del XXVI Congreso Nacional de las Ciencias del Suelo. Sociedad Mexicana de las Ciencias del Suelo; Cd. Victoria, Tamaulipas, México.

Sánchez –Espíndola, M.E; M.C. González Ch; R. Ferrero-Cerrato y D. Teliz-Ortiz. (1993); Introducción del Vigoren Plántulas de *Carica papaya*. Bajo el Arroyo. pp. 124-133. Avances de la Investigación; Sección Microbiefecto de la Micorriza Vesículo – Arbuscular *Glomus* sp. Como Factor Desológico de suelos. CEDAF Colegio de Postgrados.

Vidal, *et al.*, (1992); M.T.C Mycorrhizal Involution Enchaces Growth and Development of Micropropagated Plants of Avocado. Horstscience 27; pp. 785-787.

Vargas, G., A.B., H. Vásquez, A. y López, V. (1993); Determinación del abasto nutrimental en papaya. pp. 32-34. in: VI Reunión Científica del Sector Agropecuario y Forestal en el Estado de Veracruz.

www.fertiberia.com/informaci-onfertilizacion/articulos/otros/micorrizas.html-12K-

Autores citados

- ✓ Bhat, (1973)
- ✓ Branzanti et al., (1987); Granger et al., (1983)
- ✓ Chávez et al., (1990); Heselova et al., (1989); Vestberg, (1992)
- ✓ Gerdemann y Trappe, (1974); Janos , (1984)
- ✓ Gianinazzi et al., (1989)
- ✓ Godar, Awasthi y kaith, (1996); Lovelock, kylo, et al., (1997)
- ✓ Grant, (1957); Ica, (1974); Igac, (1983)
- ✓ Guerrero, (1991); Brokes, (1984);citado por Trappe y Schenk, 1992
- ✓ Jaén (1987); Bolan (1991)
- ✓ Montero, (1999)
- ✓ Ochse et al., (1984); Salunkhe y Desai, (1988)
- ✓ Ramcharan et al, (1995)
- ✓ Schenck y Pérez, (1987)
- ✓ Schubert et al., (1987), (1988), (1990),
- ✓ Torti, et al., (1997)
- ✓ Zarate (1991) probó 18 plantas tropicales, entre las cuales destaca el papayo, a las que inoculo tres especies de hongos micorrizicos y aplico una formula compleja de n-p-k (60-600-600 Kg ha-1), encontró que la respuesta del crecimiento fue mejor en las plantas micorrizadas y fertilizadas, obteniendo incremento superior a 40% en comparación con las plantas solo fertilizadas y sin inocular.